

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



Faculté Des Sciences De la Nature et De la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'étude

En vue d'obtention de diplôme de master

En science de la nature et de la vie

Filière : science biologique

Spécialité : microbiologie et toxicologie alimentaire

Thème

**Recherche des champignons aflatoxinogènes du genre *Aspergillus*
dans l'aliment de volaille et détection des aflatoxines**

Soutenu le 2 juillet 2016

Réalisé par :

M^{elle} .BRAHMI Manel et M^{elle} .ZAHY Narimène

Devant le jury composé de :

M ^{me} EDDAIKRA A.	MAA	Présidente	Université de Blida
M ^{me} DEBIB A.	MCB	Examinatrice	Université de Blida
M. MOKRAN S.	MCA	Promoteur	ENS Kouba
M ^{elle} MEKLAT A.	MCA	Co-promotrice	Université de Blida

Année universitaire: 2015/2016

Remerciements

Nous voudrions signifier notre gratitude au Professeur **SABAOU N.** qui dirige le laboratoire de biologie des systèmes microbiens (LBSM) de l'École Normale Supérieure de Kouba d'Alger qui nous a accueillis dans son laboratoire et mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de nos expériences. Nos sincères remerciements pour la confiance qui nous a constamment témoigné.

Monsieur **MOKRANE S.** ; maître conférence A à l'ENS de Kouba pour son professionnalisme, son savoir incontestable et pour nous avoir suivi tout au long de la réalisation de notre mémoire. Nos sincères remerciements pour la confiance et le soutien qui nous a accordé.

Madame **MEKLAT A.** ; maître conférences A à l'USD de Blida, nos sincères remerciements pour notre professeur qui nous a accompagné durant notre cursus universitaire non seulement pour son soutien mais aussi pour le partage d'expérience et de savoir qu'elle a porté pour la rédaction de ce mémoire.

Madame **BOUTI K.** ; maître assistante A à l'ENS de Kouba, nos profondes remerciements et reconnaissance pour nous avoir inspiré ce sujet de mémoire et de nous avoir soutenu, accompagné et surtout partager votre expérience afin d'aboutir à ce modeste travail et l'intention particulière et sympathie qu'elle a portée tout au long de notre partie expérimentale.

Nous remercions également les membres du jury pour avoir présider notre travail de soutenance.

On souhaite également remercier toutes les personnes qui nous ont aidés à fournir les échantillons nécessaires au sein du laboratoire, en particulier les employés d'unité de fabrication d'aliment de volaille en général.

Dédicace Narimène

*A cœur vaillant rien d'impossible
A conscience tranquille tout est accessible
Quand il y a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre
Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins
Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent
Les études sont avant tout
Notre unique et seul atout*



Je dédie ce travail à.....



Mes parents : Ma très chère et douce maman, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mon frère et ma sœur : Reda et Mélissa qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Ma binôme : Nélma , nous avons partagé des jours surchargées de travail, où l'on n'a pas le moral, des jours où rien ne va. Il y a des jours où on se sentait, triste, découragée, où l'on a envie de pleurer, c'est ma meilleure amie la plus exceptionnelle de toutes. Celle qui ne m'a jamais déçue. Jamais je n'aurais pensé trouver une fille autant merveilleuse qu'elle, mais je l'ai trouvée. J'espère qu'on restera amie pour la vie !

Ma tante : picou pour son chaleureux accueil chez elle pour moi et ma binôme au cours de notre recherche.

Mes amis (e) : hidayette , asma , abdou ,said, pitchou, adlen ,tahar, djalil , wail,
Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour
tous vos efforts.

Dédicace Manel

Quand il y a la soif d'apprendre

Tout vient à point à qui sait attendre

Je dédie ce mémoire en premier à ma chère amie, confidente et binôme

Narimene pour toutes les années passées ensemble à donner de notre mieux

, et ainsi aux bons moments partagés, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi

afin d'accomplir ce mémoire.

À mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères

sentiments, pour leur soutien moral et physique, leur encouragement contenu et

patience illimitée, que dieu les garde pour moi.

À mes adorables sœurs : Naila et Yassamine pour leur soutien, gentillesse, et

encouragement, un immense amour à leur égard.

Dédicace particulière à Tonton Hadji pour son dévouement.

À mes Amis : Yasmine, Mimi, Aliba, Sarra, Sousous Pitehou, Abdou,

et en particulier à Ghiles car sans sa présence, ses conseils judicieux

, sympathie, ce mémoire n'aura jamais eu le jour.

À tous ceux qui aime le savoir

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les mycotoxines ont des structures chimiques et des effets toxiques très variés, chez les animaux d'élevage, l'exposition aux mycotoxines peut se traduire par une baisse des performances zootechniques et l'altération de la santé animale. La démarche générale qui a été adoptée dans cette étude consiste en l'isolement et le dénombrement de la flore fongique de 64 échantillons de matière première (maïs, orge, tourteaux de soja et son de blé) et d'aliment composé (farine et granulé) contaminant l'alimentation de volaille, en utilisant la technique de suspension-dilution et l'ensemencement direct des graines sur milieu gélosé Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar (DRBC), et identifier les espèces toxigènes du genre *Aspergillus* ainsi que leur pouvoir producteur des aflatoxines.

L'analyse mycologique des 64 échantillons (35 de matière première et 29 d'aliments composés) montre une contamination par les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. La méthode de dilution révèle une dominance nette du genre *Fusarium* (42,76%) suivi du genre *Penicillium* (26,33%) et *Aspergillus* (11,24%). La méthode directe affirme une dominance claire du genre *Aspergillus* (59,63%) suivi du genre *Penicillium* (13,6%) et *Fusarium* (10,3%). Parmi les différentes sections d'*Aspergillus* identifiées on trouve: A, section *Nigri*, *Terrei*, *Circumdatet Candidi* la plus dominante est l'*Aspergillus* section *Flavi* (79,58%).

Le pouvoir producteurs d'aflatoxines B de 223 souches appartenant à la section *Flavi* révèle un taux d'isolats aflatoxinogènes de 74 % déterminé par CCM.

Les résultats de l'analyse par HPLC des 8 échantillons (4 de maïs, 1 d'orge, 1 de tourteau de soja et 1 d'aliment composé) montrent des quantités faibles qui varient de 0.6 à 2.91 µg/kg.

Mots clés : *Aspergillus* section *Flavi*, aflatoxine B, aliment de volaille.

RESUME

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites secreted by molds that mainly belong to the *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* genus. They have different chemical structures and toxic effects, in farm animals the exposure to mycotoxins leads to the decrease of the animal performance and the alteration of its health. The general approach that has been adopted in this study consists in the isolation and enumeration of fungal flora of 64 samples of raw material, including (corn, barley, soybean meal and wheat bran) and blended feed (flour and granulate) contaminating poultry feed by the methods of suspension-dilution and the direct sowing of the seeds on the on agar medium Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC), and identifying the toxigenic species of *Aspergillus* genus as well as and their power of aflatoxin's production.

The mycological analysis of 64 samples (35 of first material 29 and compound feed) displays a contamination by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. The dilution method shows a clear dominance of the genus *Fusarium* (42.76%) followed by the genus *Penicillium* (26.33%) and *Aspergillus* (11.24%). The direct method displays a clear dominance of the genus *Aspergillus* (59.63%) followed by the genus *Penicillium* (13.6 %) and *Fusarium* (10.3 %). Among the different sections of *Aspergillus* identified we cite: A, section *Nigri*, *Terrei*, *Circumdat* and *Candidi*. However, the most dominant section was l'*Aspergillus* section *Flavi* (79.58 %).

The power of aflatoxin's B production of 223 strains belonging to the *Flavi* section reveals an aflatoxinogenic isolates rate of 74% determined by TLC.

Results from HPLC analysis of 8 samples (4 corns, 1 barely, 1 soybean meal, and 1 blended feed) show small amounts ranging from 0.6 to 2.91 µg/kg.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*, Aflatoxin B, Poultry feed.

ABSTRACT

ملخص

تعتبر السموم الفطرية مركبات ثانوية تفرزها فطريات تنتمي أساسا إلى أجناس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium*. تمتلك هذه السموم تراكيب كيميائية وآثار سمية متعددة. يؤدي تعرض حيوانات المزارع لهذه السموم إلى تدهور صحتها وانخفاض في الإنتاج. وفي هذا السياق، كان الهدف من هذا العمل عزل وتوصيف الفطريات السامة في 64 عينة من المكونات الأولية (الذرة، الشعير، وجبة فول الصويا و نخالة القمح) و الغذاء المركب (العليقة) (طحين و حبيبات) لغذاء الدواجن، باستعمال تقنية المعلقات المخففة والزرع المباشر على وسط (DRBC) مع تحديد نوع الفطريات السامة التابعة للجنس *Aspergillus* و اختبار قدرتها على إنتاج الأفلاتوكسينات.

التحليل الفطري لـ 64 عينة (35 من المكونات الأولية و 29 من أعلاف الدواجن) يوضح تلوث هذه المواد بالأجناس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium*. تثبت تقنية المعلقات المخففة سيطرة واضحة للجنس *Fusarium* (42,76%) متنوع بالجنس *Penicillium* (26,33%) و *Aspergillus* (11,24%) . أما بالطريقة المباشرة تؤكد سيطرة الجنس *Aspergillus* (59,63%) متنوع بالجنس *Penicillium* (13,6%) ثم الجنس *Fusarium* (10,3%). تم التعرف على عدة مجموعات من *Aspergillus* من بينها: مجموعات *Candidi Circumdati Terrei, Nigri* و مجموعة *Flavi* حيث تكون هذه الأخيرة أكثر سيادة (79,58%).

تظهر نتائج الكشف عن القدرة الإنتاجية للأفلاتوكسين B لـ 223 عينة (تنتمي إلى *Aspergillus* مجموعة *Flavi*) على وسط مستخلص جوز الهند (CAM) وبتقنية الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM). إن معظم الأنواع التي تم عزلها لها القابلية على إنتاج الأفلاتوكسينات بنسبة 74%.

نتائج تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC لـ 8 عينة (4 من ذرة، 1 من الشعير، 1 من وجبة فول الصويا و 1 من الغذاء المركب) توضح نسبات قليلة تتراوح ما بين 0,6 إلى 2,91 ميكروغرام/كغ.

الكلمات مفتاحية: غذاء الدواجن B الأفلاتوكسين : *Aspergillus* مجموعة *Flavi*

Liste des abréviations

A : *Aspergillus*

AFs : Aflatoxines.

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomal.

AF (B1, B2, G1, G2, M1 et M2) : l'Aflatoxine (B1, B2, G1, G2, M1 et M2).

A.F.S.S.A : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AW : Activité de l'eau.

CAM : Coconut Agar Medium.

CIA : Colonnes d'Immuno-Affinité.

COP.A.WI : Coopérative Agricole de Wilaya Chargée de l'Agriculture.

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CE : Commission Européenne.

CYA : Czapeck Yeast Extract Agar.

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Aga.

DJA : Dose journalière admissible.

DJT : Dose Journalière Tolérable.

ENS : Ecole National Supérieur.

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine.

EFSA : Agence Européenne de Sécurité Alimentaire.

F.A.O : Food and Agriculture Organization.

FFT : Flore Fongique Total.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography.

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point.

LBSM : Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens.

ONAB : Office National d'Alimentation de Bétail.

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

O.R.A VI : Office Régional d'Aviculture.

PDA : Potato Dextrose agar.

PH : Potentiel d'hydrogène.

LISTE DES ABREVIATIONS

UV : Ultra-Violet.

UFC/g : Unité Formant de Colonie/Gamme.

List des Tableaux

Tableau 1. Valeur nutritive du maïs (Conan et al, 1992 ; Drogoul et al. 2004).....	6
Tableau 2. Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (AFSSA, 2006).....	14
Tableau 3. Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (AFSSA, 2006).....	15
Tableau 4. Teneurs maximales tolérées en AFB1 recommandées en alimentation animale (en µg/kg) (d'après les directives européennes 2002/32/CE et 2006/575/CE)	22
Tableau 5. Dates des prélèvements, nombre et origine des échantillons de la matière première et d'aliment composé.	27
Tableau 6. Moyenne du taux de l'humidité relative des échantillons analysés.	39
Tableau 7. Moyenne du pH des différents échantillons analysés.	39
Tableau 8. Les isolats aflatoxinogènes appartenant au genre <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	52
Tableau 9. Caractéristiques des 8 isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> issus des échantillons maïs, orge, tourteau de soja et aliment composé.....	53

LISTE DES TABLEAUX

Liste Des Figures

Figure 1. Représentation de l'appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i> spp.....	11
Figure 2. Structures chimiques des 4 AFs (B1, B2, G1, G2, M1, et M2) (Zinedine, 2009) ..	12
Figure 3. Voies de biotransformation de l'aflatoxine B 1 (Bammler <i>et al.</i> , 2000)	20
Figure 4. Matières Première (a: orge, b: Maïs, c: Son de blé, d: taureaux de soja).....	24
Figure 5. Aliment composé (a: granulé et b: farine).	25
Figure 6. Localisation géographique des régions de prélèvements des échantillons d'aliment de volaille et les matières premières.....	26
Figure 7. Technique de dénombrement par étalement en surface.	30
Figure 8. Les étapes de la préparation des extraits pour le screening.	32
Figure 9. Dépôt des spots et leur migration dans la cuve.....	34
Figure 10. Schéma montrant les principales étapes utilisées pour l'analyse des aflatoxines.	35
Figure 11. Densité de la flore fongiques totale (UFC /g) des différents échantillons matières première et d'aliment composé.	40
Figure 12. Fréquence des différents genres d' <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> dans les échantillons de la matière première.....	41
Figure 13. Fréquence des différents genres d' <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> dans les échantillons de la matière première et de l'aliment composé.	42
Figure 14. Flore fongique totale dans les différentes régions d'Algérie.	42
Figure 15. Fréquence des différents genres d' <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> dans les échantillons de la matière première analysés (maïs et orge).....	43
Figure 16. Fréquence du genre <i>Aspergillus</i> dans les différentes régions d'Algérie.	44
Figure 17. Fréquence des différentes sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de la matière première et d'aliments composés analysés.....	45
Figure 18. Fréquence de différentes sections d' <i>Aspergillus</i> dans Les échantillons de maïs et d'orge.	46
Figure 19. Aspect macroscopique des différents genres poussant sur le milieu DRBC après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C (a= Le genre <i>Fusarium</i> , b = <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , c = Le genre <i>Penicillium</i>).	46
Figure 20. Aspect morphologique du genre <i>Aspergillus</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique: G× 400).....	47

Figure 21. Aspect macroscopique des sclérotés de type « L » d' <i>Aspergillus</i> sur milieu CYA après 7 jours d'incubation à 28°C.	47
Figure 22. Aspect morphologique du genre <i>Penicillium</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).....	48
Figure 23. Aspect morphologique du genre <i>Fusarium</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).....	48
Figure 24. Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).	49
Figure 25. Aspect morphologique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Terrei</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).	49
Figure 26 Aspect morphologique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).....	50
Figure 27. 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) (a: Revers jaune orange, b : Fluorescence bleue sous UV (365 nm)).....	50
Figure 28. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus flavus</i> sur CCM.....	51
Figure 29. Répartition des isolats aflatoxinogènes d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de l'intensité de fluorescence.	52

Tables Des Matières

INTRODUCTION:	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. L'alimentation de volaille en Algérie	5
1. Description de la filière avicole en Algérie.....	5
2. Evolution de l'élevage de volaille en Algérie	5
3. Alimentation des volailles	6
II. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines :	7
1. les moisissures.....	7
2. les mycotoxines	13
3. Les aflatoxines.....	17
MATERIELS ET METHODES	
I. MATERIELS	24
1. Aliment de volaille	24
1.1 La matière première	24
1.2 L'aliment composé (farine et granulé)	24
2. Souches de références	25
II. METHODES	25
1. Site d'étude et échantillonnage	25
2. Analyses physico-chimiques	28
3. Analyse mycologique	29
4. Identification morphologique des isolats fongiques.....	30
5. Repiquage des souches d'Aspergillus	31
6. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines	31
7. Extraction des aflatoxines du milieu de culture	32
8. Détection des aflatoxines par Chromatographie sur couche mince	32
9. Extraction d'aflatoxines à partir des échantillons	34
10. Confirmation et quantification des AFs par HPLC	36
RESULTATS ET DISCUSSIONS	
I. RESULTATS	39
1. Analyses physicochimiques	39

TABLE DES MATIERES

2. Analyse mycologique	39
2.2. Distribution des sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de matière première et d'aliment composé	44
2.2.1. Résultats de la méthode de dilution.....	44
3. Reconnaissance des genres et des espèces	46
4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	50
5. Quantification par HPLC des AFs présente dans quelques échantillons	53
II. DISCUSSION	54
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	61
ANNEXES	

Introduction

Les maladies d'origine alimentaires constituent l'un des problèmes les plus préoccupants à l'échelle mondiale. Elles engendrent à la fois des souffrances humaines et de graves retombées économiques et sociales.

Les filières d'élevage ont été perturbées à plusieurs reprises par des crises sanitaires de nature différentes. Ces événements ont eu pour conséquence de sensibiliser les consommateurs aux questions de sécurité alimentaire.

Ces maladies sont causées par divers agents en particulier les microorganismes pathogènes. En plus des virus et des bactéries pathogènes, les champignons toxinogènes constituent un danger réel pour la santé de l'homme et de l'animal par la sécrétion de substances hautement toxiques. Ces substances qu'on regroupe sous le nom des « mycotoxines » ont récemment été reconnues par l'organisation mondiale de la santé, comme source importante de maladies d'origine alimentaire (OMS, 2002).

La contamination par les mycotoxines peut se faire aux différentes étapes de l'élaboration des aliments pour animaux, elle débute au champ et se poursuit durant la conservation. Les productions céréalières qui constituent les principaux vecteurs de la contamination chez l'animal. L'organisation des nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (F.A.O) estime qu'environ un quart des récoltes de la planète est significativement contaminé par les mycotoxines, occasionnant des pertes mondiales estimées de 5 à 10 % (Yiannikouris et Jouany, 2002)

Les mycotoxines présentent une activité hépatotoxique, cancérigène, immunotoxique, néphrotoxique, hématotoxique, neurotoxique et altèrent le fonctionnement des organes de reproductions. Chez les animaux d'élevage, l'exposition aux mycotoxines peut se traduire par une baisse des performances zootechniques et l'altération de la santé animale. A cela, il faut ajouter un problème de sécurité alimentaire suite au passage de certaines mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans les productions, animales, ainsi elles peuvent être à l'origine de toxicités chroniques et aiguës allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, respiratoire et digestif chez l'homme ou l'animal (Riba, 2008)

Les principales mycotoxines faisant l'objet d'une surveillance étroite sur le plan sanitaire et économique, dans les productions agricoles céréalières sont les aflatoxines produites par le

genre *Aspergillus*, .Elles sont responsables d'intoxications aiguës parfois mortelles, par ingestion massive de la toxine, notamment chez les animaux d'élevage, d'intoxications chroniques à long terme, qui se traduisent pour certaines toxines par un pouvoir cancérigène intense chez l'homme ou bien chez l'animal (Krogh, 1987).

Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination.

Actuellement, les méthodes couramment utilisées permettent de quantifier directement les mycotoxines. Ces techniques restent relativement onéreuses et ne permettent donc pas la mise en œuvre de plan d'échantillonnage contenant plusieurs centaines voire milliers d'échantillons à analyser (Dragacci *et al.*, 2005). En plus, quand la mycotoxine est détectée, il est trop tard car il n'existe pas de procédés fiables permettant de retirer la mycotoxine sans dénaturer le produit.

En Algérie, l'état de la présence des mycotoxines dans l'alimentation animale est mal connue; peu d'études ont été réalisées et les conséquences restent actuellement sous estimée chez les animaux et chez l'homme. Cette étude a pour but de présenter l'état des connaissances sur le risque lié aux mycotoxines plus particulièrement pour la filière avicole.

Ainsi l'objectif de notre étude se focalise sur :

- Réalisation d'une analyse mycologique pour l'alimentation de la volaille (les ingrédients premiers et l'aliment composé) au niveau des wilayas de : Bejaia, Blida, Tipasa, Tizi ouzo , Boumerdes , Alger, Sétif, Mostaganem, El Eulma, Adrar, Batna, Biskra
- Identification des genres fongiques dominants isolés des différents échantillons
- Identification des espèces d'*Aspergillus* isolés des différents échantillons.
- Tester la capacité des souches isolées à la production des aflatoxines
- Détection des aflatoxine dans les échantillons de l'alimentation de volaille par les colonnes d'immuno-affinité (CIA) ainsi que leur dosage par HPLC.

I. L'alimentation de volaille en Algérie

1. Description de la filière avicole en Algérie

Durant les trois dernières décennies la filière avicole algérienne a connu l'essor le plus spectaculaire parmi les productions animales. La filière avicole algérienne a atteint un stade de développement qui lui confère désormais une place de choix dans l'économie nationale en général et dans l'économie agricole en particulier (Kaci et Cheriet, 2011).

La coexistence des secteurs privés et public intervenant à tous les niveaux de la filière (la commercialisation des produits vétérinaires, la fabrication du matériel avicole, la production et la commercialisation des intrants avicoles – aliments, œufs à couver, poussins «chair », poulettes démarrées –l'élevage avicole, l'abattage et la commercialisation des produits avicoles), alors que les entreprises publiques (EPE ONAB-SPA et Groupe Avicoles Régionaux) sont surtout représentées dans les activités d'amont. La filière avicole est aussi marquée par une forte présence d'institutionnels et d'organismes sanitaires et de contrôle de la qualité, afin de rendre compte de l'ensemble des relations (Kaci et Cheriet, 2011).

La volaille constitue une source de protéines animales appréciable et économique, notamment pour les pays en voie de développement, ce qui a justifié son développement très rapide sur l'ensemble du globe depuis une trentaine d'années (Sanofi, 1999).L'offre en viandes blanches en Algérie est passée de 95 000 à près de 300 000 tonnes entre 1980 et 2010, soit une progression de +212% en 30 ans. Ceci a permis d'améliorer la ration alimentaire moyenne en protéines animales de près de 35 millions d'algériens .Cependant avec 6 Kg de viande de poulet par personne et par an (MADR, 2011), l'algérien demeure parmi les plus faibles consommateurs loin derrière l'Européen avec ses 23.7 Kg, le brésilien 37 Kg, ou encore l'américain 52.6 Kg (ORIVAL, 2011).

2. Evolution de l'élevage de volaille en Algérie

L'aviculture en Algérie a connu une importante évolution au cours de ces dernières années, et à tendance à faire disparaître son secteur traditionnel. Le démarrage de cet élevage intensif, qualifié d'industriel n'a commencé qu'à partir des années soixante-dix au sein de l'O.N.A.B (Office National des Aliments du Bétail), qui s'est chargé à la réalisation de l'autosuffisance de la population galopante en protéines animales.

- ❖ En 1970 le ministre de l'agriculture et de la révolution agraire élargit la mission de l'O.N.A.B en le chargeant d'entreprendre toute action susceptible d'augmenter et de

régulariser les productions des viandes blanches, et ceci en créant au sein de chaque wilaya une coopérative agricole de wilaya chargée de l'agriculture (COP.A.WI.)

- ❖ En (1974–1977), que l'on a assistés à l'émergence d'une politique avicole axée essentiellement sur la filière chair intensive.
- ❖ En 1981 ce fut la création de l'O.R.AVI (Office Régional d'Aviculture) dans les trois régions du pays : Est – Centre – Ouest ; et ce pour impulser une nouvelle dynamique au secteur avicole.
- ❖ Durant la décennie (1980 – 1990), le nombre d'élevages avicoles en Algérie a enregistré un accroissement, à la faveur des politiques avicoles initiées par l'état et, particulièrement favorables au capital privé.

Aujourd'hui, l'élevage fermier et artisanal de caractère traditionnel a été progressivement remplacé par une véritable activité industrielle intégrée dans un circuit économique complexe (Djebou, 2006).

3. Alimentation des volailles

3.1 Matières premières

Les céréales et leurs coproduits représentent la principale matière des aliments composés et, par conséquent, l'aliment principal des monogastriques. Elles constituent un complément énergétique pour les ruminants (Merck, 2003).

3.1.1 Maïs

Le maïs est la céréale de choix pour l'alimentation des volailles. C'est l'ingrédient le plus utilisé dans l'alimentation des monogastriques, il est très apprécié grâce à sa valeur énergétique élevée parmi les céréales elle est de 3925 kcal/kg brut (tableau 1), En effet, le maïs contribue approximativement par 65% de l'énergie métabolisable et 20% des protéines brutes d'un régime de démarrage des volailles. En plus, c'est la céréale la plus communément utilisée dans les régimes de volailles élevés intensivement (Larbier et Leclercq, 1992 ; Dragoul et al, 2004).

Tableau 1. Valeur nutritive du maïs (Conan et al, 1992 ; Drogoul et al. 2004)

Matière sèche (%)	Protéine brute (%)	Cellulose brute (%)	Calcium (gr/Kg)	Phosphore (gr/Kg)	Energie métabolisable (Kcal/Kg)
86.42	9.57	2.46	0.05	0.3	3726

3.1.2 Sorgho

Le sorgho occupe le second rang parmi les céréales les plus utilisées dans l'élevage commercial de poulets de chair, dindons et poules pondeuses (Beyer, 2014). Il est souvent cultivé dans les zones où les ressources en eau sont limitées et peut être utilisé jusqu'à une proportion de 70 % dans les rations pour poulets de chair et poules pondeuses, et jusqu'à 55% dans les rations destinées aux dindons, en remplacement total du maïs.

3.1.3 Tourteaux de soja

Les tourteaux sont des sous-produits des huileries qui, à cause de leur richesse en protéines, présentent un grand intérêt dans l'alimentation animale. La valeur nutritionnelle protéique varie en fonction de l'espèce végétale d'origine et de la technique de fabrication (Guérin et al, 1989).

3.2 Aliments composés

Un aliment composé contient plusieurs matières premières simples (céréales, issues, farines animales ou végétales), des minéraux, des vitamines et des additifs divers, les ingrédients se trouvent au départ sous des formes différentes (graines, particules de plusieurs tailles, liquides, graisses) (Larbier et Leclercq, 1992). La préparation des aliments est réalisée en plusieurs étapes : mouture, pré-mélange, mélange et incorporation d'huile (Buldgen. A et al, 1996)

II. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines :

1. les moisissures

1.1 Définition et caractéristiques

Les champignons, ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces champignons sont appelés couramment « moisissures », véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs....).

Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes (Cristina TABUC, 2007). Constituées par des filaments ramifiés (les hyphes), dont l'ensemble est connu sous le nom de mycélium.

Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à trois classes : zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes (Berthier et Valla, 2001)

Elles sont caractérisées par :

- La nature chimique de leur paroi cellulaire riche en chitine ;
- Leur cycle de vie qui comprend deux types de reproduction :
- Une reproduction asexuée, au cours de laquelle un spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées;
- La reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.
- La présence de glycogène, comme source de réserve
- L'absence de la chlorophylle ;

1.2 Classification

Différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leur spore :

Les *Zygomycota* possèdent des spores non flagellées contenues à l'extérieur d'une cellule et à thalle siphonné, les *Ascomycota* ont des spores non flagellées regroupées dans des sortes de sacs et formant en général 8 ascospores à l'intérieur de chaque asque et à thalle septé les *Basidiomycota* qui ont des spores portées par des basides non flagellées, à thalle septé et donnant en général 4basidiospores à l'extérieur de chaque baside et les *Chytridiomycota* produisant des spores mobiles uni-flagellées (Guarro et Hoog ,1995).

1.3 Importance

Ces organismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires. Certains d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, etc.). Ainsi, dans les milieux naturels, les moisissures contribuent, avec d'autres microorganismes, à la biodégradation et au recyclage des matières organiques, comme la litière ou le bois.

Certains sont utilisés dans les processus biotechnologiques pour la synthèse des différents acides, comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes (protéases et pectinases) (Perry *et al.* , 2004), d'autres sont utilisés dans l'industrie

agroalimentaire, pour l'affinage des fromages et l'amélioration des qualités organoleptiques de certains produits alimentaires (saucisse)

Dans le domaine pharmaceutique, les moisissures sont utilisées surtout pour la production d'antibiotiques (pénicilline, céphalosporine, etc.) (Botton *et al*, 1990). Environ 22% des antibiotiques identifiés et 40% des enzymes produites industriellement sont élaborés par les champignons filamenteux (Demain et Fang, 2000).

Par ailleurs, le développement indésirable des moisissures sur une denrée peut entraîner : une modification de l'aspect, altération des qualités organoleptiques (odeur et flaveur) et des propriétés technologiques, réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés

Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (Cahagnier *et al*, 1998). Ces métabolites sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Des manifestations dans la qualité organoleptique (en modifiant le goût) mais aussi de graves problèmes sanitaires surgissent, comme les risques d'intoxication due à la présence de mycotoxines.

1.4 Champignons toxogènes

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

1.4.1 Genre *Aspergillus*

1.4.1.1 Généralités

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002), ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales.

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (Morin, 1994) et d'autres sont aussi connus pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines.

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990).

1.4.1.2 Identification du genre *Aspergillus*

a. Description macroscopique

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur des colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces, 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.

b. Description microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur la quelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides .

Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates

(Figure 1) (Badillet *et al.*, 1987). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir (Cristina,2007)

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

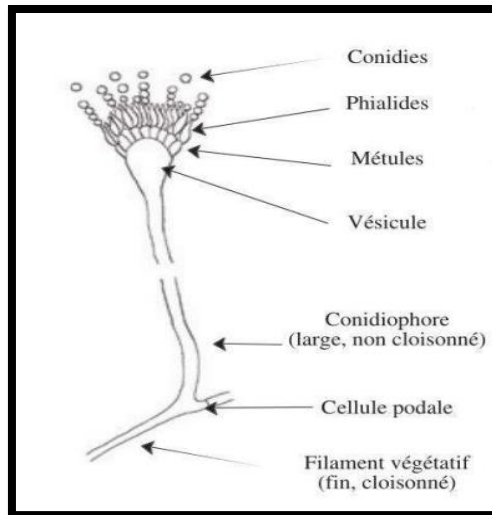


Figure 1. Représentation de l'appareil reproducteur des *Aspergillus* spp
(Chabasse D, et al ,2002)

1.4.2 Classification des espèces d'*Aspergillus*

La classification du genre *Aspergillus* est actuellement organisée en sous genres et en groupes. Ces groupes ont été appelés «Sections» par Gams et *al.* (1986).complétant les descriptions morphologiques (essentiels) par 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*, *Ornati* et « *Warcupiella* group ». Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998).

1.4.3. Les espèces de la section *flavi* et la production des aflatoxines

D'après Samson *et al.* (2006), il y'a 18 espèces appartenant à la section *Flavi* , neuf espèces sont aflatoxinogènes. Trois espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. L' *A.flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2, *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B1 ; B2, G1, G2) et *A. nomius*, une souche rare, proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

A l'état actuel, on connaît, du point de vue structure, Au moins 16 structures d'aflatoxines et leurs analogues sont caractérisés mais seulement 4 sont des aflatoxines majeures, AFB1, AFB2, AFG1, et AFG2, contaminant des produits agricoles et posant des problèmes pour la santé humaine et animale (Park et Liang., 1993). Les aflatoxines M1et M2, dérivés respectifs

des aflatoxines B1 et B2, apparaissent dans le lait et ses dérivés. Ces aflatoxines ont tenus leur appellations du fait de leur détections dans le lait « Milk » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Jaquet, et *al.*, 1982).

Les aflatoxines sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (aflatoxine B) ou des lactones hexatomiques (aflatoxine G) (figure 2).

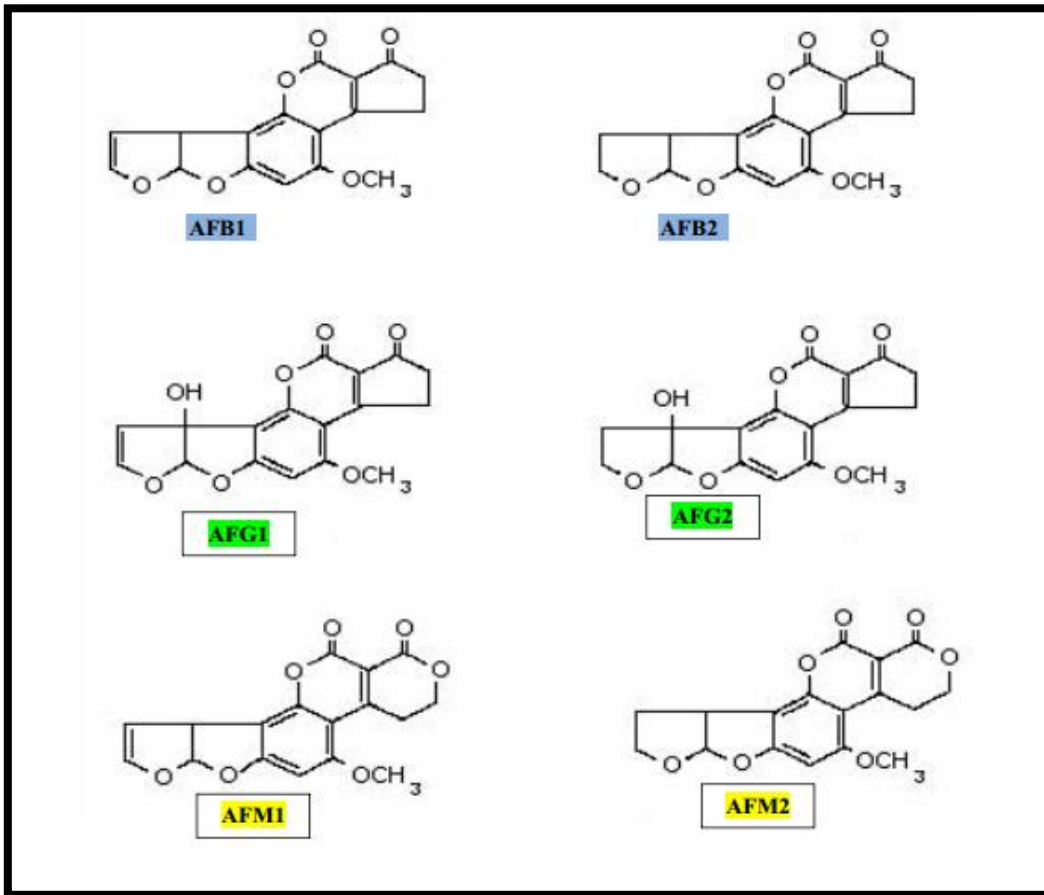


Figure 2. Structures chimiques des 4 AFs (B1, B2, G1, G2, M1, et M2) (Zinedine, 2009)

Les espèces de cette section sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 33°C (Domsch *et al.*, 1980). 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). Ils sont donc plus présents dans les régions tempérées chaudes comme les régions tropicales et subtropicales.

morphologiquement, il est très difficile de distinguer entre les différentes espèces appartenant à cette section, c'est pourquoi la différenciation est basée non seulement sur les caractères

morphologiques mais aussi sur une approche polyphasique (profil des métabolites) (Frisvad et *al.*, 2005) et sur les caractères moléculaires (séquençage de la région ITS1-ITS2, β -tubulines).

2. les mycotoxines

2.1 Définition

Le terme mycotoxine vient du mot grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. Ce sont des métabolites secondaires produits après la phase de croissance du champignon, naturellement présentes dans l'air ambiant, le sol et sur les cultures (Yiannikouris et Jouany, 2002). Elles affectent de nombreux produits agricoles dont les céréales, les fruits secs, les noix, les grains de café, les raisins et graines oléagineuses (D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C).

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). Comme elles sont peu métabolisées par les organismes vivants, les mycotoxines peuvent également se transmettre *via* les produits d'origine animale (lait et produits laitiers, abats, charcuterie, etc.) (Pitt, 2000).

Plusieurs genres de moisissures sont connus comme étant producteurs de mycotoxines. Parmi eux, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps*. Une même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes. Quelques exemples de mycotoxines et les moisissures retrouvées en alimentation humaine et/ou animale sont résumés dans le tableau 2.

2.2 Impacts des mycotoxines sur la santé

Les mycotoxines sont des molécules très toxiques pour l'homme et l'animal, Les organes et tissus cibles sont très divers : foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines. Leur effet toxique est très étendu: effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques (WANGICAR ,2005) .qui se manifestent à plus ou moins long terme (quelques mois à quelques années).

Certaines toxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent oestrogéniques (zéaralénone), immuno/hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (patuline) Le tableau 3 résume les effets et les mécanismes d'action des principales mycotoxines (AFSSA, 2006)

Tableau 2. Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (AFSSA, 2006).

Denrées	Espèces toxiques contaminantes	Mycotoxines probables
Blé, Farine, pain, maïs, et chips.	<i>Aspergillus section Flavi</i> <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. citréoviride</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. pubertum</i> , et <i>Fusariummoniliforme</i>	AFs Ochratoxine Stérigmatocystine, patuline acide pénicillique, désoxynivalénol, zéaralénone, et fumonisine
Arachide, et noix.	<i>Aspergillus section Flavi</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P cyclopium</i> , et <i>P. expansum</i> .	AFs, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, trichothécènes, et cytochalasines.
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao, et houblon.	<i>Aspergillus section Flavi</i> , <i>Penicillium Viridicatum</i> , <i>P. roqueforti</i> <i>P. patulum</i> , et <i>P. commune</i>	AFs, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, et acide pénicillique
Viandes, porc salé, et fromage.	<i>Aspergillus section Flavi</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , et <i>P. cyclopium</i> .	AFs, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, et pénitrem.
Poivre noir et rouge, et pâtes.	<i>Aspergillus section Flavi</i> , et <i>A. ochraceus</i> .	AFs, et Ochratoxine.
Fèves, orge, maïs, sorgho, et soja.	<i>Aspergillus section Flavi</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusariummoniliforme</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. islandicum</i> , et <i>P. urticae</i> .	AFs, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, griséofulvine, et alternariol.
Pâtisserie réfrigérée ou congelée	<i>Aspergillus section Flavi</i> , <i>A.versicolor</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. citreoviride</i> , <i>P.palitans</i> , <i>P.puberulum</i> , <i>P.roquefort</i> , et <i>P. urticae</i> .	AFs, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, et penitrem
Denrée alimentaire (stockage domestique).	<i>Aspergillus section Flavi</i> , <i>Penicillium</i> <i>Fusariumoxysporum</i>	AFs, acide kojique, ochratoxine, pénitrem, patuline, acide pénicillique, et trichothécènes.
Pomme et produits dérivés de pomme.	<i>Penicillium expansum</i> .	Patuline.

Tableau 3. Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (AFSSA, 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire
Aflatoxine B1+ M1	Hépatotoxicité. Génotoxicité. Cancérogénicité. Immunomodulation.	Formation d'adduit à l'ADN. Péroxydation lipidique. Bioactivation par le cytochrome P450. Conjugaison aux GS-transférases.
Ochratoxine A	Néphrotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP. Détoxification par les peptidases.
Patuline	Neurotoxicité. Mutagenèse in vitro.	Inhibition indirecte d'enzymes.
Trichothécènes (toxine T-2, déoxynivalénol, etc.)	Hématotoxicité. Immunomodulation. Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur. Tissu hématopoïétique et cellules immunitaires. Impact sur la synthèse des protéines. Altération des immunoglobulines.
Zéaralénone	Fertilité et reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques. Bioactivation par des réductases. Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central. Hépatotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Inhibition de la synthèse de céramide. Altération du rapport sphinganine/sphingosine. Altération du cycle cellulaire.

2.3 Impacts économique des mycotoxines

La contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines occasionnent des coûts économiques directs et indirects pour la filière d'élevage. Les pertes directes sont dues à l'altération de l'aliment par les moisissures et les pertes indirectes sont causées par la présence de mycotoxines sur les aliments qui peut entraîner une baisse du revenu de l'éleveur par la chute de la productivité des animaux de rente auxquelles s'ajoutent des frais de soins vétérinaires (vaccination, antibiothérapie) (Boudra, 2011).

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 (Zinedine, 2009).

2.4 Prévention du risque mycotoxique

Le caractère ubiquiste des moisissures associés à la multitudes d'espèces susceptibles de produire des mycotoxines fait que l'élimination totale des mycotoxines n'est pas envisageable à court et moyen terme car il faudrait pour cela détruire des stocks considérables de produits agricoles des circuits de transformation et de distribution pouvant mettre en danger la suffisance alimentaire. C'est pour ce la il faut diminuer progressivement les concentrations de mycotoxines à des niveaux acceptables pour la santé publique.

La meilleure stratégie pour garantir la sécurité sanitaire des aliments vis-à-vis de la présence de mycotoxines dans les aliments, consiste à appliquer les règles pratiques permettant de limiter la survenue de ces contaminants. La réduction des contaminations repose sur la stratégie préventive qui consiste à mettre en place un plan de contrôle et d'analyse des points critiques (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point), il s'agit de s'assurer de la bonne qualité sanitaire du grain, du site de stockage, du nettoyage des équipements et de la bonne hygiène du personnel (RIBA,2008). En cours de stockage, le taux de contamination doit être suivi, et les denrées contaminées doivent être isolées afin d'empêcher les contaminations croisées.

Un système de lutte intégré contre les mycotoxines doit se concevoir à trois niveaux de production (lopez-Garcia ,1999) :

✓ **Lutte avant récolte**

La prévention au champ consiste en l'utilisation d'insecticides et/ou de fongicides

✓ **Lutte au moment de la récolte**

Il est recommandé que le grain soit récolté à pleine maturité et que les dommages mécaniques, liés à la récolte, soient limités autant que possible.

✓ **Lutte et décontamination après récolte**

La décontamination consiste à supprimer, détruire ou réduire les effets toxiques des mycotoxines elle doit être efficace sans rendre les denrées traitées impropres à la consommation en utilisant de nombreux procédés biologiques (bactéries lactiques), chimiques (ammoniac) et physiques (ultra-violet) ont été proposés (O.M.S, 2002).

2.5 Réglementation

L'un des outils pour maîtriser les risques pour la santé humaine liés à la contamination de la chaîne alimentaire par les mycotoxines est la mise en place d'une réglementation adaptée, basée sur une évaluation scientifique du danger pour que le consommateur ne soit pas exposé à des doses pouvant entraîner des effets indésirables sur sa santé. Ces travaux sont menés en collaboration avec l'EFSA (Agence européenne de sécurité alimentaire) et l'OMS

(Organisation mondiale de la santé) (Portelli, 2005). À la fin de 2003, une centaine de pays avaient élaborés des limites spécifiques pour les mycotoxines dans les aliments (F.A.O, 2004).

Selon A.F.S.S.A (2006), le classement établi par le centre international de recherche sur le cancer (préambule des monographies C.I.R.C –19 janvier 1999) est textuellement le suivant:

- Groupe 1: L'agent (le mélange) est cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont cancérigènes pour l'homme
- Groupe 2A: L'agent (le mélange) est probablement cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont probablement cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 2B: L'agent (le mélange) est peut-être cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont peut être cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 3: L'agent (le mélange, les circonstances d'exposition) ne peut être classé quant à sa cancérigénicité pour l'homme (les études ne peuvent pas être interprétées en terme de présence ou d'absence d'effet cancérigène en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes, ou aucune donnée expérimentale de cancérigénicité n'est disponible).
- Groupe 4: L'agent (le mélange) n'est probablement pas cancérigène pour l'homme.

3. Les aflatoxines

3.1 Origine et structure des Aflatoxines

À la suite d'une maladie « Turkey X disease » qui a affecté la volaille en Angleterre, et plus particulièrement les dindons, Sargeant *et al*, (1961) ont isolés de la nourriture de ces volailles à base d'arachide, une substance capable d'induire expérimentalement la même maladie. Ce fut le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des aflatoxines (Asao *et al.*, 1963 et 1965).

3.2 Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires

La présence des AFs dans l'alimentation humaine et animale est le résultat d'une contamination par des espèces fongiques aflatoxinogènes, compte tenu de leurs conditions de synthèse, les aflatoxines sont généralement trouvées dans des aliments en provenance des régions chaudes et humides.

Elles ont été détectées dans les céréales (maïs, blé, orge, avoine, seigle, riz) et les produits à base de céréales, des oléagineux (soja), des noisettes et leurs dérivés, arachides, beurre d'arachide, pistache, des légumes (pommes de terre, lentilles, piments) et fruits secs et bière

(Cristina,2007). Ainsi l'aflatoxine M1, dérivé de L'AFB1, peut être retrouvée dans le lait maternel et ses dérivés issus d'animaux consommant des aliments contaminés par l'AFB1.

3.3 Les facteurs influençant la teneur en AFs dans les denrées alimentaires

Les conditions les plus favorables pour un développement d'*A. flavus* et une production d'aflatoxines 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).

Ces proliférations fongiques et les productions d'aflatoxine ont lieu au champ et au cours du stockage. Au champ, les insectes attaquent la surface des grains facilitant ainsi l'accès de la moisissure aux structures internes qui contiennent les nutriments. Bien que les aflatoxines ne soient pas considérées comme des mycotoxines majeures des fourrages conservés, elles ont pu être détectées dans certains foins ou ensilages (Whitlow et Hagler, 2002) bien que la production d'aflatoxines n'a pas été démontrée après la mise en silo, leur présence dans le maïs au moment de la récolte entraînera une contamination de l'ensilage de maïs puisque ces toxines sont stables dans les conditions physicochimiques de conservation de l'ensilage. Par ailleurs, l'exposition prolongée à l'air du front d'attaque du silo peut favoriser le développement d'*A. flavus* et augmenter le niveau de toxines dans cette partie du fourrage qui est distribuée aux animaux.

3.4 Effets des aflatoxines chez les volailles

Les aflatoxines ont été découvertes à l'occasion d'un épisode toxique dans les élevages de dindes en Angleterre en 1960. La cible principale des aflatoxines est le foie. Une hyperplasie avec fibrose et prolifération des canalicules biliaires sont observés chez le canard (0,1ppm) ; dinde (0,3-0,5ppm) et le poulet (0,5-2ppm), Ceci s'accompagne d'altérations biochimiques et hématologiques (baisse du taux de protéines, cholestérol, triglycérides et augmentation gamma GT, phosphatase alcaline et transaminases dans le sang) (Hamilton, 1984). L'ingestion d'AFB pendant 12 semaines (0,25 à 2 ppm) entraîne la diminution de la production des œufs. A plus forte dose il y a perturbation de la formation de la coquille de l'œuf, et les œufs sont tachetés de sang (Shirley & Tohala, 1983).

L'effet biologique des aflatoxines dépendent des doses ingérées, du nombre de toxines présentes, de la durée d'exposition à l'aflatoxines et de l'état sanitaire de l'animal. Une forme aiguë et une forme chronique pouvant être observées.

3.4.1. Les toxicoses aiguës

L'intoxication aiguë par les aflatoxines peut se manifester par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids, un ictère, une ascite et le décès (Wogan, 2000). Elle provoque aussi des signes importants de lésions du foie induisant des congestions et des hémorragies.

L'aflatoxicose entraîne une accumulation d'acides gras dans le foie, les reins et le cœur, et peut être à l'origine d'encéphalopathies et d'œdèmes. La toxicité aigue est généralement fatale pour le volaille avec l'observation lors de l'autopsie d'un foie décoloré et augmenté de volume. La mort de l'animal peut survenir en quelques heures ou quelques jours (Riley, 1998). Les signes comportementaux les plus caractéristiques précédant la mort sont une démarche chancelante, de la nervosité et des spasmes musculaires.

Lorsque l'animal ne meurt pas, il y a prolifération de cellules indifférenciées, au niveau des canalicules biliaires. Les reins présentent des glomérulonéphrites et les poumons sont congestionnés (AFSSA ,2006)

3.4.2 Les toxicoses chroniques

La forme chronique de l'intoxication est la plus fréquente. Elle fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés pendant plusieurs semaines (minimum 1 semaine), le foie reste la principale cible, la fibrose hépatique s'accompagne de tumeurs et d'embryolétalité avec tératogénèse. On observe aussi une diminution des performances zootechniques. Une hyperplasie nodulaire avec fibrose et prolifération des canalicules biliaires sont les lésions observées pour des doses de l'ordre de 0,1 mg/kg d'aliment chez le canard, 0,3 à 0,5 mg/kg d'aliment chez la dinde et 0,5 à 2 mg/kg d'aliment chez le poulet (AFSSA ,2006).

Les aflatoxines agissent comme des intercalants ADN en créant des liaisons avec les bases guanines ce qui entraîne la mort de la cellule ou sa transformation en tumeur maligne (Riley, 1998).

3.5 La toxicocinétique

L'absorption peut avoir lieu par voie orale et trachéale. Elle est rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle (duodénum). La distribution à partir du plasma dans les hépatocytes est réalisée par diffusion passive (Pfohl- Leszkowicz, 1999).

Dans les modèles animaux, l'effet cancérigène et mutagène de l'AFB 1 est dû à sa biotransformation (ou bioactivation) dans l'organisme par l'intervention des cytochromes P450 hépatiques. Suite à une oxydation microsomiale sous contrôle des cytochromes P450 hépatiques, l'AFB 1 est transformée dans l'organisme en AFB 1 -8,9-époxyde qui va réagir avec la guanine au niveau de l'azote en position 7 pour donner le trans-8,9- dihydro-8 (7-guanyl)-9- hydroxy-aflatoxine B 1 . Il existe deux isomères d'AFB 1 -8,9- époxyde (figure 6) L'exo-époxyde est le principal métabolite responsable des adduits à l'ADN, l'endo-époxyde est beaucoup moins toxique. L'AFB 1 -8,9-époxyde est un métabolite responsable de l'effet cancérigène et mutagène de l'AFB 1. L'AFB 1 n'est pas la seule mycotoxine à provoquer des dommages à l'ADN tous Les AF sont mutagènes dans tous les tests (Joubrane, 2011) .

Une partie de l'AFB1 est éliminée après biotransformation dans la bile (conjugaison au glutathion ou au sulfate). La sécrétion biliaire représente 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales. 15 à 25 % de la dose ingérée est éliminée par voie urinaire sous forme de dérivés conjugués ou sous forme inchangée (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

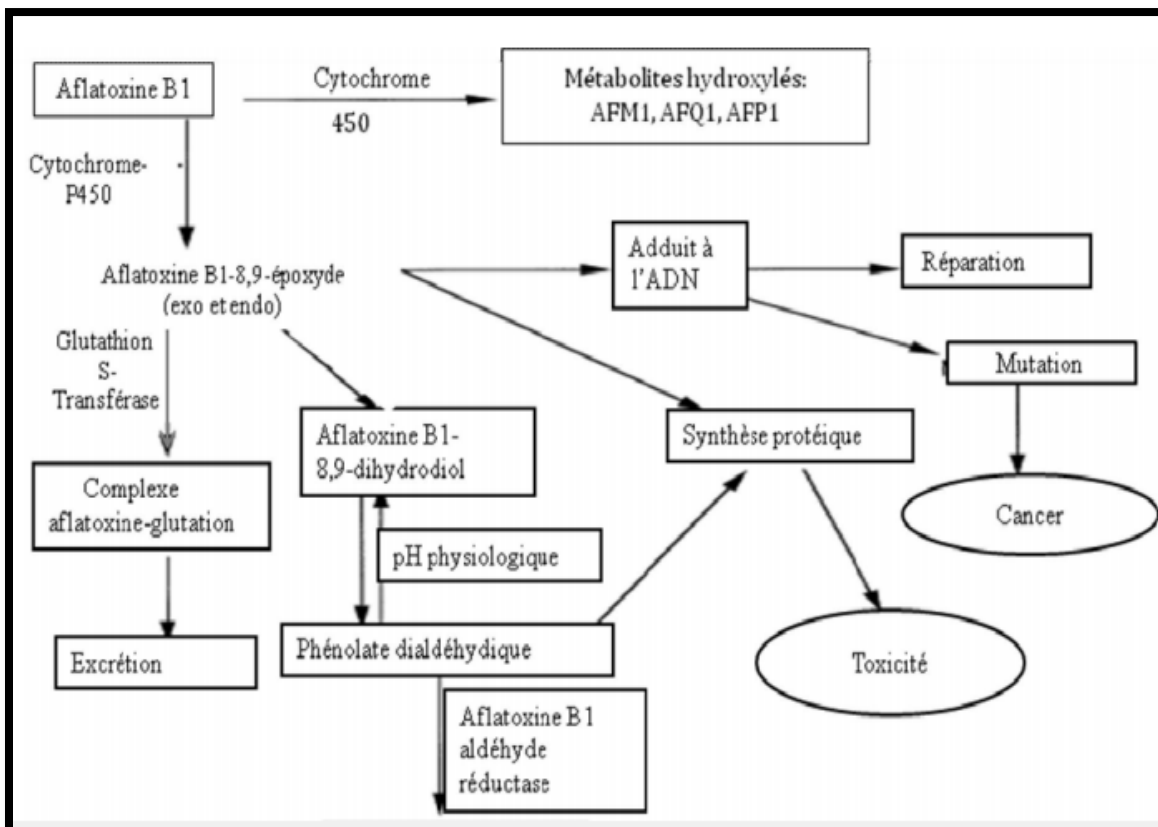


Figure 3. Voies de biotransformation de l'aflatoxine B 1 (Bammler *et al.*, 2000)

3.6 Méthodes d'analyse d'aflatoxine

Les aflatoxines contaminant les matières premières alimentaires et faisant l'objet d'une réglementation qui porte soit sur la présence d'aflatoxine B1 seule, soit sur la présence des quatre aflatoxines distinctement ou bien les quatre aflatoxines ensemble (l'aflatoxine totales). Divers méthodes permettent la recherche de chacune de ces combinaisons.

3.6.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Cette technique a été publiée dans la septième directive de la commission européenne (CE) du 1^{er} mars 1976(JOCE N° L102/9 du 15avril 1976) modifiée par les directives de la CE N° 81-680 (JOCE du 29aout 1981) et le N° L327/54 (JOC du 13 novembre 1992) portant fixation des méthodes d'analyses communautaire pour le contrôle officiel des matières premières et aliment simple pour animaux.

La recherche des aflatoxines dans les denrées contaminées nécessite une extraction par un solvant organique, une purification et une identification par observation de la fluorescence avec une lampe U.V à 366 nm en comparaison avec celle d'un témoin (BLANC .M ,1983). La séparation et le dosage des aflatoxines s'effectuent sur des plaques recouvertes de gel de silice avec développement mono ou bidimensionnel dans une cuve contenant un mélange de solvants binaire ou ternaire (LAFON, 1978).

3.6.2 Colonnes d'immuno-affinité (CIA)

Cette méthode consiste en la purification de l'aflatoxine B1ou des aflatoxines totales à partir d'un extrait d'échantillon alimentaire par passage sur une colonne d'immunoaffinité contenant un support garni d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces mycotoxine (candlish et al ,1988).

3.6.3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est une méthode de choix pour l'analyse de nombreuses mycotoxines pour ses performances en termes de vitesse, automation et précision (chan et al ,2004).

3.7. La Dose journalière admissible (DJT ou DJA) d'aflatoxines

La DJA est une estimation de la dose présente dans les aliments, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée tous les jours pendant toute la vie, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, est exprimée en milli (ou micro) gramme de produit par Kg de poids corporel.

Comme l'aflatoxine est une mycotoxine cancérogène génotoxique, il n'existe pas un seuil pour lequel il ne peut pas y avoir un risque. c'est pourquoi, il est difficile de fixer de dose journalière tolérable (DJT) pour les aflatoxines (A.F.S.S.A, 2006). Il y'a donc lieu de fixer

des limites au niveau le plus bas possible afin de réduire l'exposition à un niveau aussi faible qu'il soit raisonnablement possible de l'être.

3.8 Réglementation relative aux aflatoxines

Le règlement 1881/2006/CE a fixé les limites maximales pour les aflatoxines potentiellement présentes dans les aliments pour animaux, Bien que l'AFB1 soit de loin le composé le plus toxique, et le plus fréquent, la présence des autres aflatoxines dans les denrées alimentaires ne peut pas être négligée, et leurs teneurs respectives varient d'une denrée à l'autre, c'est pourquoi le règlement 1881/2006/CE prévoit, pour des raisons de sécurité, de limiter à la fois la teneur en AFB1 et la teneur en aflatoxines totales (B1+B2+G1+G2) dans les denrées alimentaires.

Les limites maximales tolérées d'aflatoxines dans les produits d'alimentation animale sont données dans le tableau 4.

Tableau 4. Teneurs maximales tolérées en AFB1 recommandées en alimentation animale (en µg/kg) (d'après les directives européennes 2002/32/CE et 2006/575/CE)

Types d'aliments	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Toutes les matières premières des aliments pour animaux	20
Aliments complets pour bovin, ovin et caprins à l'exception de :	20
-aliments complets pour bétail laitier	5
-aliments complets pour veaux et agneaux	10
Aliments complets pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complémentaires	10
Aliments complémentaires pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments complémentaires pour bétail laitiers, veaux et agneaux)	20
Aliments complémentaires pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complémentaires	5

I. Matériels

1. Aliment de volaille

Dans cette étude nous avons travaillé sur des échantillons d'aliment de volaille (farine et granulé) composé à partir des ingrédients premiers prélevés au niveau des unités de fabrication et d'entreposage des différentes régions d'Algérie.

Les produits qui rentrent dans la composition de l'aliment sont en majorité importés par L'Office National d'Aliment de Bétail (ONAB) étant l'unique importateur étatique à l'échelle Nationale et assure l'approvisionnement en matière première de toutes les Unités d'Aliment de Bétail, relevant des Groupe Avicoles Centre, Est et Ouest

1.1 La matière première

La matière première est constituée par : le maïs, tourteaux de soja, son de blé, orge, (figure 4). Elle est acheminée en vrac vers les divers unités d'aliment de volaille.

Cette matière première ensuite est stockée dans des silos, puis transformée en produits finis pour l'alimentation de volaille.



Figure 4. Matières Première (a: orge, b: Maïs, c: Son de blé, d: tourteaux de soja).

1.2 L'aliment composé (farine et granulé)

L'alimentation finale est un mélange préparé à partir des ingrédients premiers avec des pourcentages différents selon le type et l'âge des animaux (figure 5). La fabrication de ces

divers produits destinée a l'alimentation des volailles se font lors de la réception des commandes afin de satisfaire les besoins des divers clients. Ensuite ces produits finis sont commercialisés dans des sacs en carton de 50 kg.

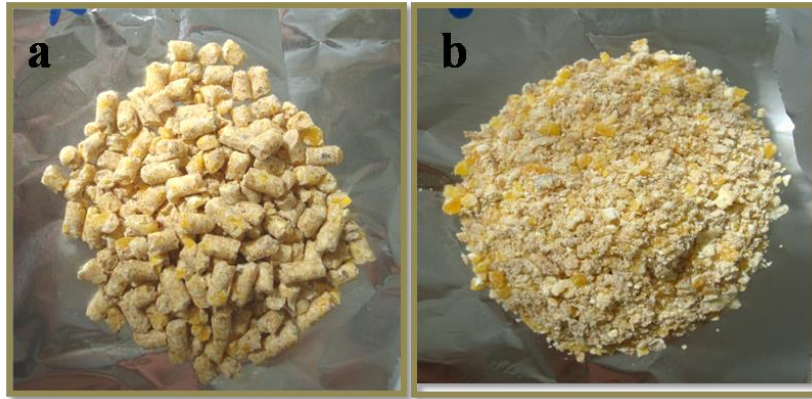


Figure 5. Aliment composé (a: granulé et b: farine).

2. Souches de références

Pour l'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines des isolats nous avons utilisé une souche de référence : *A.flavus* *NRL62477* qui produit l'aflatoxines B1 et B2 fournies par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

II. Méthodes

1. Site d'étude et échantillonnage

1.1 Sites d'étude

Les sites de prélèvements des échantillons de l'aliment de volaille et les matières premières (son de blé, maïs, tourteau de soja, orge) sont localisés dans les différentes régions d'Algérie (figure 6), regroupant :

- **La Mitidja** : Blida, Tipasa, Boumerdès et Tizi Ouzou, ces régions représentent les plaines fertiles de la région tellienne. Le climat est de type méditerranéen caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers humides et frais.
- **Les régions d'Adrar, Biskra, Mnia** : se caractérisent par un climat désertique chaud typique de la zone saharienne hyperaride, avec un été torride très long et un hiver court tempéré chaud (Hufty, 2001).
- **La région de Bejaia** : est caractérisée par un type de climat subtropical avec des hivers doux et pluvieux et des étés chauds et sec (selon la classification de Koppen).
- **La région de Sétif** : est caractérisée par un type de climat continental semi-aride avec des étés torrides et des hivers rigoureux (selon la classification de Koppen).

- **La région de Mostaganem** : est caractérisée par un type de climat semi-aride avec un hiver tempéré.

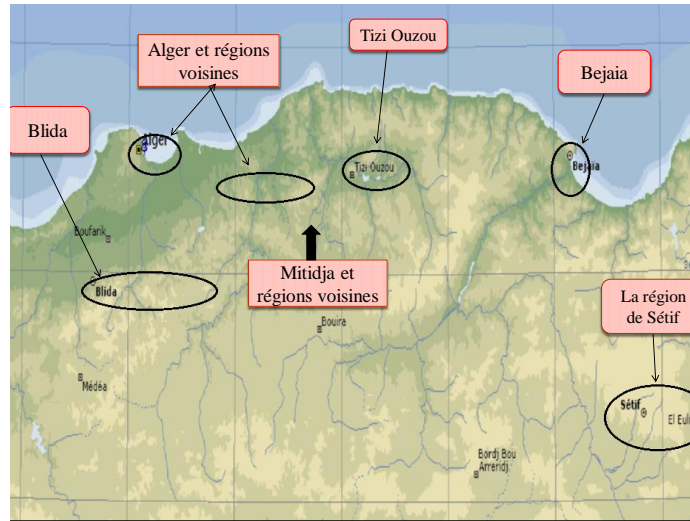


Figure 6. Localisation géographique des régions de prélèvements des échantillons d'aliment de volaille et les matières premières.

1.2 Collecte des échantillons

Au cours de cette étude, un total de 64 échantillons (35 échantillons de matière premières et 29 échantillons d'aliment composé) ont été collectés au niveau d'unité de fabrication et d'entreposage durant la période allant de la fin du mois de mars jusqu'au début du mois d'octobre de l'année 2015 (Tableau 5).

1.3 Techniques d'échantillonnage

Nous avons prélevé trois à cinq sous échantillons primaires au moment où les aliments sont passés par les processus de fabrication ou d'une livraison complète, et ça à partir de la surface et des couches profondes du compartiment de stockage mais aussi prélevé certains échantillons sur les côtés ou les rebords du compartiment, qui sont plus propices à l'apparition de moisissures (Tarr, 2003). Après, nous avons bien mélangé les sous échantillons de façon d'avoir un échantillon composite de 1Kg et le conserver dans un lieu sec et frais.

Tous les échantillons sont conservés dans des sacs en plastique à double épaisseur (Tarr, 2003) et mis dans des sacs étiquetés et acheminés au Laboratoire de Biologie de Système Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

Tableau 5. Dates des prélèvements, nombre et origine des échantillons de la matière première et d'aliment composé.

Origine	Echantillons	Nombre d'échantillons	Dates des prélèvements
Unité de fabrication Adrar	➤ Maïs	4	19/05/2015
Unité de fabrication Batna			
Unité de fabrication Biskra			
Unité de fabrication Menia			
Région ouest	➤ Aliment composé	4	14/05/2015
	➤ Son de blé	3	
	➤ Maïs		
	➤ Orge		
Pays d'importation	➤ Maïs de brésil ➤ Maïs d'argentine	2	24/09/2015
Unité de fabrication - Sétif-	➤ Tourteau de soja	2	28/09/2015
	➤	3	
	➤ Aliment composé		
	➤ Son de blé		
Unité de fabrication –Kouba-	➤ Maïs	5	25/05/2015
	➤ Son de blé		
	➤ Maïs		
	➤ Orge		
	➤ Aliment composé		
Unité de fabrication complexe agro-alimentaire d'EL-kseur- - Wilaya de BEJAIA-	➤ Aliment composé	3	13/09/2015
Unité de fabrication - Wilaya de BLIDA-	➤ Maïs	4	16/09/2015
	➤ Tourteaux de soja	3	
	➤ Aliment composé	9	
	➤ Son de blé	2	
Unité de fabrication -Wilaya de TIPASA-	➤ Maïs	3	20/09/2015
	➤ Tourteau de soja	2	
	➤ Son de blé	2	
	➤ Orge	1	
	➤ Aliment composé	5	
Unité de fabrication des frères	➤ Aliment composé	2	2/10/2015

GAWAWI merabou -Wilaya de TIZI OUZOU			
Unité de fabrication khemis khechna- wilaya de BOUMERDES-	➤ Aliment composé	1	6/10/2015
Nombre totale d'échantillons : 64			

2. Analyses physico-chimiques

2.1 Détermination du taux d'humidité

➤ Principe

La détermination de la teneur en eau est effectuée par une dessiccation de l'échantillon dans un four pasteur réglé à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à une masse constante (Nielsen, 2010).

➤ Mode opératoire

- Une tare en verre est séchée et pesée avec précision
- Mettre 05g d'échantillon dans la tare et peser avec précision
- Placer l'ensemble dans four pasteur à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3h
- On laisse l'échantillon se refroidir dans un dessiccateur pendant 15 min.
- On pèse une première fois puis l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

➤ Expression des résultats :

Le taux d'humidité relative d'un échantillon est donné par la formule suivante:

$$\% \text{ HR} = \frac{(\text{P0} - \text{Pt}) - (\text{P1} - \text{Pt})}{(\text{P0} - \text{Pt})} \times 100$$

- ❖ **HR**= humidité relative
- ❖ **Pt** = poids de la tare
- ❖ **P0** = poids de la tare avec échantillon
- ❖ **P1** = poids constant après séchage multiple

2.2 Détermination du pH

Le pH de nos échantillons a été déterminé par mélange de 10 g d'échantillon broyé avec 90 ml d'eau distillée a raison de deux répétitions par échantillon, le mélange est agitée et laissé en repos pendant une heure avant de mesurer le pH a l'aide d'un pH mètre .

3. Analyse mycologique

L'étude de la flore fongique associée à l'alimentation de la volaille a été réalisée en appliquant deux méthodes de détection :

3.1 La méthode directe

Cette méthode consiste à l'ensemencement en surface des grains de maïs et orge sur le milieu d'isolement (DRBC) dont la composition est donnée en annexe II

- Prendre 50 graines au hasard de 18 échantillons (14 échantillons de maïs et 4 échantillons d'orge) puis les introduire dans l'hypochlorite de sodium (NaClO_3) à 0,5% pendant 1 min afin d'éviter la contamination par le milieu extérieur (poussières d'autres sources).
- Rincer avec de l'eau distillée stérile trois fois de suite puis les égoutter et sécher.
- Ensemencer à raison de 10 graines par boîte pour chaque échantillon de maïs et 15 graines par boîte pour l'orge puis incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours dans l'étuve.

Le résultat de la méthode d'ensemencement direct des graines est exprimé en pourcentage (%).

3.2 La méthode de dilution

L'isolement et le dénombrement des moisissures dans les échantillons ont été réalisés par la technique des suspension-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé (Pitt et Hocking, 1997). Le milieu utilisé est le DRBC (Dicloran Rose Bengale Chloramphénicol) qui permet d'inhiber la croissance des champignons envahissant tel que le *Mucor* et le *Rizopus*, et de réduire la taille de mycélium de façon à mettre en évidence la plus part des champignons contaminant le produit analysé (Riba, 2008).

3.2.1 Préparation de dilution et ensemencement

Dix grammes de chaque échantillon broyés et tamisé, sont mis dans des flacons de 250 ml contenant 90 ml d'eau distillée stérile, additionnée de tween 80 à raison de 1ml (pour permettre une bonne dispersion des spores), la suspension est agitée pendant 20 minutes à l'aide d'un agitateur puis laissé au repos pour obtenir une dilution de 10⁻¹ l'essai qui a été utilisé pour la préparation de dilution de 10⁻² (Figure 7) puis un volume de 0.1 ml de chaque dilution a été étalé sur le milieu d'isolement, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours dans l'étuve.

3.2.2 Dénombrement

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 unité formant de colonie par gramme d'échantillon (ufc/g).

Parmi les champignons en croissance, les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* collectés d'une manière présomptive de chaque échantillon sont reconnus visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques. Les isolats ont été repiqués sur milieu CYA dont la composition est donnée en annexe II après incubation de 7 à 10 jours à 28 °C, ils sont conservés à + 4 °C pour les analyses ultérieures.

Le taux de contamination est calculé selon VDLUFA, (2007).

$$N = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

N = nombre d'unités formants colonies par gramme d'échantillon (UFC/g).

$\sum C$ = la somme de toutes les colonies des boîtes de comptage.

V = le volume de dilution étalé par boîte en ml.

n = nombre des boîtes qui peuvent être évaluées.

d = facteur de dilution.

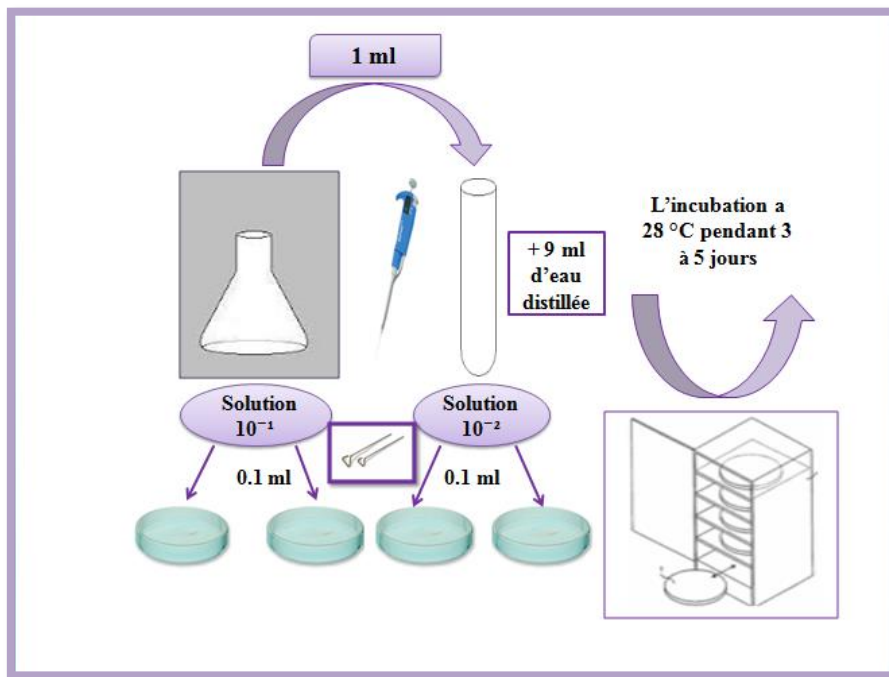


Figure 7. Technique de dénombrement par étalement en surface.

4. Identification morphologique des isolats fongiques

La reconnaissance des principaux genres et espèces fongiques repose sur l'étude des caractères macromorphologiques et micromorphologiques des moisissures isolées et effectuée

sur milieu Czapek Yeast Agar (CYA) à 25°C pendant 5 à 7 jours d'incubation (Pitt et Hocking, 1997).

4.1 Identification macroscopique

La reconnaissance des principaux genres et espèces fongiques repose sur l'observation de l'aspect des colonies des champignons (couleur, texture et de leur revers) qui se sont développés. Elle se fait tout d'abord à l'œil nu puis à la loupe binoculaire afin de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus* ou d'un autre genre en fonction des caractères morphologiques du mycélium.

4.2 Identification microscopique

L'observation microscopique repose sur les caractères suivantes : le mode de conidiogénèse, le mode de groupement des conidies (spores), l'agencement des cellules conidiogènes et la taille, l'ornementation et la couleur des conidies. La mise en évidence de ces caractères est réalisée selon la méthode suivante :

- Nous avons prélevés à l'aide d'une aiguille d'inoculation un échantillon sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif.
- On dépose l'échantillon prélevée sur une lame mouillée avec une goutte d'eau puis on pose une lamelle de couverture.
- L'observation se fait par un microscope photonique à grossissement (X100, X400).

5. purification des souches d'*Aspergillus*

La purification consiste à transférer aléatoirement et aseptiquement à partir de toutes les boîtes de pétri les souches d'*Aspergillus* sp (le genre d'intérêt) qui sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques sur le milieu PDA dont la composition est donnée en annexe II, puis les incuber 3 à 5 jours à une température de 28°C.

6. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines

Les souches fongiques sont réensemencées par point central (1 souche par boîte) sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM) favorable à la visualisation des AFs (Fente et *al.*, 2001) dont la composition est donnée en annexe II et laisser incuber 7 jours à une température de 28°C pour la détection des souches aflatoxinogènes.

Dans le milieu CAM, les AFs, 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. En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28 °C, les isolats producteurs d'AFb et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visibles sous la lumière U.V. (365 nm) (Davis et *al.*, 1987) et de couleur jaune orangé visible à la lumière du jour.

7. Extraction des aflatoxines du milieu de culture

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM et par HPLC, les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au chloroforme selon la méthode décrite par Calvo *et al.* (2004). la préparation des extraits est présenté en figure 8.

- ❑ Trois rondelles (de 5 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 écrasées à l'aide d'une spatule puis introduites dans des tubes eppendorf de 2 ml.
- ❑ Les eppendorfs utilisée sont pesées avant et après la mise des carottes.
- ❑ l'extraction des aflatoxine est réalisée par l'addition de 1 ml de méthanol (CH₃OH), toute en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction.
- ❑ Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 12000 tours/min.
- ❑ 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.

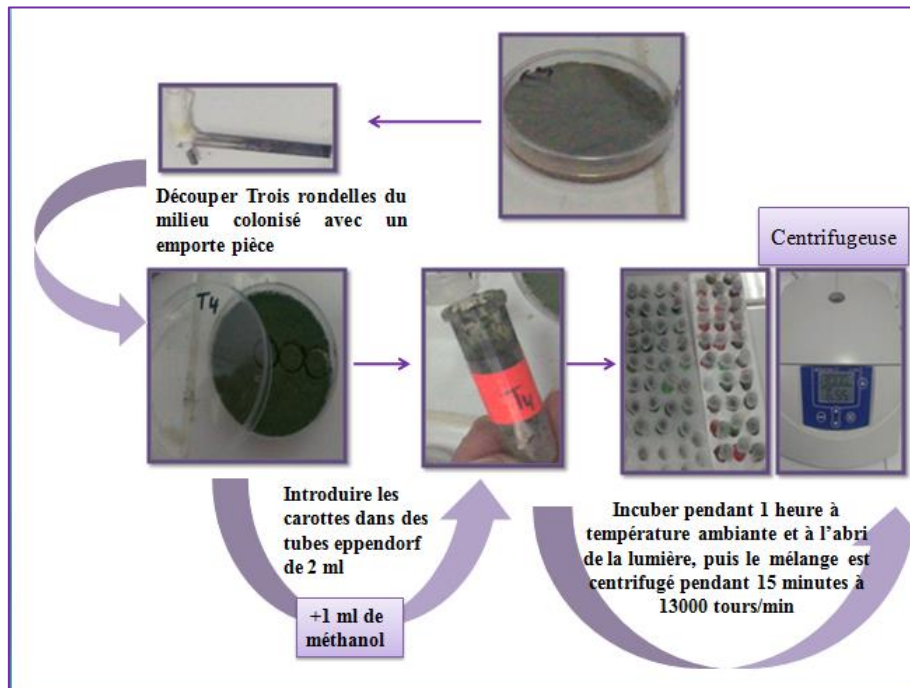


Figure 8. Les étapes de la préparation des extraits pour le screening.

8. Détection des aflatoxines par Chromatographie sur couche mince

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).

❖ **Préparation des plaques**

- Déposer 25 g de gel de silice (Kieselgel 60 GF254) dans une fiole conique.
- Ajouter 70 ml d'eau distillée, boucher et agiter énergiquement.
- Etaler immédiatement à l'aide d'un étaloir réglé d'une manière à obtenir une couche uniforme de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur.
- Laisser sécher à l'air.
- Au moment de l'utilisation activer les plaques en les plaçant pendant une heure dans un four à 110°C.

❖ **Dépôt des extraits à analyser**

- tracer des points éloignés de 1,5cm au bord de la plaque, et espacées entre eux de 1,5cm (11 points par plaque) A l'aide d'une règle.
- déposé soigneusement sur le point tracé 25 µl de l'extrait à analyser a l'aide d'une micro-seringue tout en évitant d'abîmer la surface de la plaque et en évitant d'avoir de grosses taches sur la plaque (figure 9).
- Un standard des AFs B utilisé comme témoin est spoté au même temps que les échantillons.
- le volume à déposer est spoté délicatement à petites gouttes puis séchées à l'aide d'un séchoir.
- 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 (90 :10 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.
- placer les plaques sous lumière UV (365 nm) pour la détection des aflatoxines dont Les AFs B sont caractérisés par une tache bleue et les AFs G par une tache verte.
- La quantité d'aflatoxine peut être estimée en comparant la taille et l'intensité de la tache par rapport à un standard dont la concentration en aflatoxine est connue.

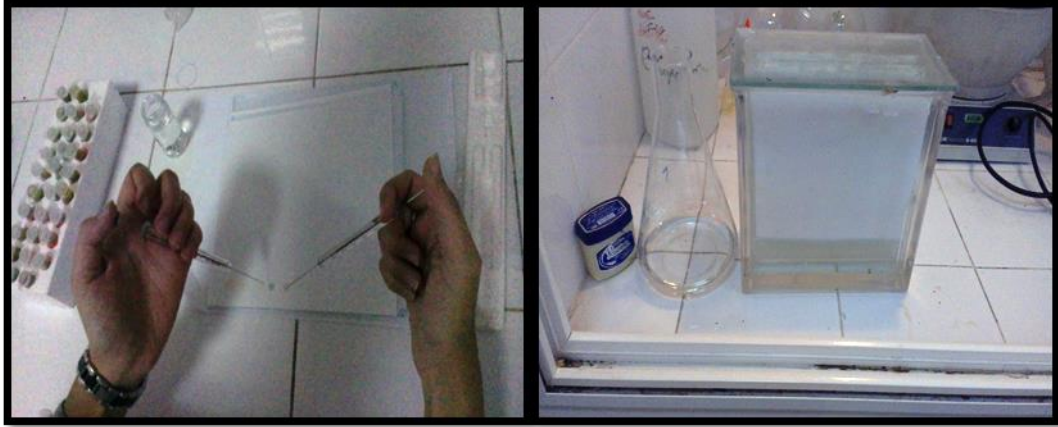


Figure 9. Dépôt des spots et leur migration dans la cuve

9. Extraction d'aflatoxines à partir des échantillons

9.1 Principe général

Le principe de la détermination des aflatoxines est basé sur leur extraction des aliments par des solvants organiques convenables et leur purification sur une colonne d'immuno-affinité (figure 10).

Les colonnes d'immuno-affinité contiennent chacune un anticorps très spécifique pour chaque mycotoxine recherchée et la purification de la mycotoxine dépend de son affinité à l'anticorps en question. Il est important de noter que l'anticorps peut être dénaturé par une température élevée et des changements de pH ainsi que Le tampon doit être toujours au dessus du gel et la colonne doit être conservée entre 2 et 8°C (zindine ,2011).

L'éluat de la toxine est effectué par un éluant (solvant organique) dénaturant la liaison anticorps-antigène. L'identification et la quantification de la toxine dans l'éluat se fait finalement par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) couplé à un fluorimètre.

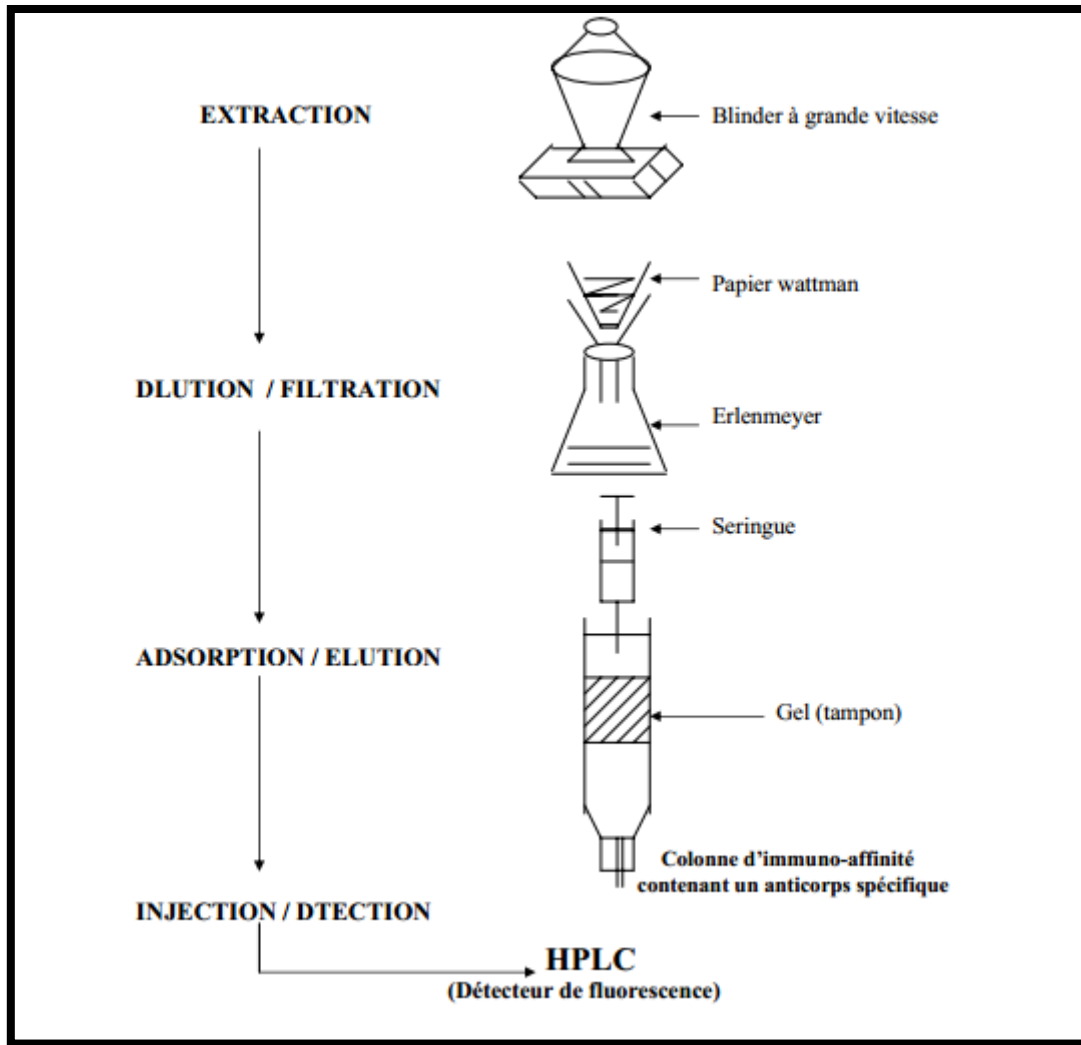


Figure 10. Schéma montrant les principales étapes utilisées pour l'analyse des aflatoxines

9.2 Extraction à partir de l'aliment composée (volaille) et la matière première

Les échantillons ont été analysés en utilisant un protocole fournis par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

❖ Pour une matrice non grasse comme : le maïs

- Extraire 20g d'échantillon dans 100 ml (80% de méthanol, 20% d'eau) en utilisant un blinder à grande vitesse pendant cinq minutes.
- Faire passer l'extrait à travers un filtre plissé.
- Ajouter 14 ml de l'extrait purifié à 86 ml de tampon phosphate salin (PBS) a un pH=7.2.


❖ Pour l'aliment composé :


- Ajouter 2g de NaCl a l'échantillon

- Extraire avec 100 ml (80% de méthanol, 20% d'eau) et 50 ml n-hexane dans blinder à grande vitesse pendant trois minutes.
- Faire passer l'extrait purifié à travers un filtre plissé.
- Ajouter 1 ml de l'extrait purifié a 6 ml de tampon phosphate salin (PBS) contenant 6% de tween20.

Après avoir accordé la méthode appropriée pour chaque échantillon de notre étude on procède à l'étape de chromatographie d'immufoaffinité :

- faire passer l'échantillon à travers un filtre de Whatman afin d'enlever la turbidité résiduelle.
- Prendre **0-10 ml** d'extrait dilué selon la procédure de l'extraction et sensibilité de détection :

 **Pour l'aliment composé :** maximum 2,8 ml représente 0,08gram de la matrice peut être appliqué sur l'Afla CLEAN SMART colonne,il est indispensable de maintenir un débit de 3ml/min maximum.

 **Pour le maïs :** 10ml d'extrait dilué représente 0,28g de la matrice.

- laver la colonne et faire passer 2ml de l'eau distillé à travers la colonne avec un débit maximum de 3ml/min.
- Enlever soigneusement l'eau résiduelle en passant de l'air dans la colonne.
- Eluer avec 0,4ml de méthanol. Laisser le méthanol agir sur le gel pendant 5 minutes afin de rompre l'interaction anticorps-analyte.
- Diluer ou concentrer l'éluât selon l'exigence et mesurer directement par HPLC, sinon concentrer prudemment à sec et stocker au frais dans l'obscurité.

10. Confirmation et quantification des AFs par HPLC

Une confirmation et une quantification des aflatoxines par HPLC munie d'une cellule électrochimique de dérivation au brome « KOBRA Cell » a été également réalisée

- Lors de la première utilisation, la colonne chromatographique est lavée toute une nuit par le passage d'un mélange d'acétonitrile-eau (85/15, v/v) à un débit de 0,20 ml/min.
- conditionnée pendant 45 min par passage de la phase mobile utilisée pour l'analyse à un débit de 0,5 ml.
- Les AFs sont analysées sur un chromatographe de marque Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japon) .

- ❑ La phase mobile est composée de méthanol-acétonitrile-eau (20:20:60 v/v). Pour la dérivation, à un litre de phase mobile, 119 mg de bromure de potassium et 350 µl d'acide nitrique 4M sont ajoutés (selon le manuel KORA Cell®).
 - ❑ Le débit est réglé à 0,5 ml/min, Un volume de 20 µl d'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microseringue. L'analyse est réalisée en condition isocratique.
 - ❑ La pression est alors de 28-30 mPa et les temps de rétention des AFs B1, B2, G1 et G2 sont respectivement 30, 24, 22,5 et 21 min.
 - ❑ Des solutions standards de l'aflatoxine B1 pure de concentrations connues sont injectées intercalées parmi la série d'échantillons.
 - ❑ Un extrait de l'aflatoxine G obtenu à partir d'*A. parasiticus* a été utilisé comme témoin pour la détection de cette mycotoxine dans les échantillons.
 - ❑ La détection est réalisée en réglant l'onde d'excitation à 362 nm et des filtres d'émission à 425 nm pour B1 et B2 et à 455 nm pour G1 et G2 (optima pour les AFs). Des lavages au méthanol de qualité HPLC sont effectués après chaque injection afin d'éliminer les traces d'AFs.
 - ❑ L'AFB1 et l'AFG1 sont confirmées par leur transformation dans la cellule *KOBRA Cell*, placée en post-colonne, en leur dérivé 9,10-dibromé, qui est détecté par spectrofluorimétrie. La cellule de *KOBRA Cell* est connectée au système HPLC entre la colonne HPLC et le détecteur de fluorescence.
- Les 4 aflatoxines séparées et l'agent précurseur de dérivation (bromure de potassium) entrent dans le *KOBRA Cell*, où va se dérouler la réaction électrochimique générant le brome. Les aflatoxines et le brome ressortent de la cellule avant que la réaction de dérivation n'ait lieu. Celle-ci aura lieu dans le tube de connexion avant l'entrée dans le détecteur de fluorescence . Cette longueur de tube entre la sortie de la cellule et le détecteur est donc très importante et doit être suffisante pour permettre la réaction de dérivation au brome qui dure 4 secondes (KOBRA Cell, 2005). L'enregistrement et l'analyse des chromatogrammes sont effectués par un logiciel adapté (Normasoft).

I. Résultats

1. Analyses physicochimiques

1.1. Humidité relative

L'analyse concernant l'humidité relative a été réalisée pour 33 échantillons, révèle que tous nos échantillons (maïs, tourteaux de soja, son et aliment composé) sont peu hydratés, les valeurs moyennes s'échelonnent généralement entre (7,60 et 10,27) (Tableau 6).

Tableau 6. Moyenne du taux de l'humidité relative des échantillons analysés.

Produit	Nombre d'échantillons	Moyenne d'humidité relative
Maïs (grain, poudre)	(7)	8.19
Tourteaux de soja	(5)	9.81
Son de blé	(4)	10.27
Orge	(1)	7.60
Aliment composé (granulé)	(5)	9.25
Aliment composé (farine)	(11)	9.31

1.2. PH

Les résultats du pH des différents échantillons analysés (maïs, tourteaux de soja, son de blé et aliment composé), indiquent que l'ensemble des échantillons sont légèrement acide avec des valeurs comprises dans l'intervalle (6,24 et 6,64) (Tableau 7).

Tableau 7. Moyenne du pH des différents échantillons analysés.

Produit	Nombre d'échantillons	Moyenne du pH
Maïs (grain, poudre)	(10)	6.37
Tourteaux de soja	(7)	6.64
Son de blé	(7)	6.54
Aliment composé (granulé)	(9)	6.40
Aliment composé (farine)	(18)	6.24

2. Analyse mycologique

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

2.1. Analyse de la flore fongique dans les échantillons de matière première et de l'aliment composé

Dans notre étude, un total de 64 échantillons ont été analysés. Nous avons prélevés 35 échantillons de matière première et 29 échantillons d'aliment composé depuis le mois de mai, septembre et octobre 2015 au niveau de différentes unités de fabrication et d'entreposage en Algérie, conservés au LBSM de l'ENS de Kouba. Les méthodes utilisées pour l'identification et le dénombrement des champignons sont : la méthode de dilution et la méthode directe.

Le dénombrement de la flore fongique est réalisé selon le type d'aliment analysé et selon les genres reconnus d'une manière présomptive d'après leur aspect macro et micromorphologique sur les boîtes d'isolement.

2.1.1. Résultats de la méthode de dilution

L'exploitation des résultats obtenus par cette méthode permette l'appréciation du taux de contamination des différents échantillons de matière premières (tourteau de soja, son de blé, maïs en poudre) et aliment composé (farine, granulé). La Densité de la flore fongique totale varie entre $7,475 \cdot 10^3$ et $62,5 \cdot 10^3$ ufc/g, dont le maïs en poudre présente une forte contamination de $62,5 \cdot 10^3$ ufc/g suivi d'aliment farine ($41,31 \cdot 10^3$), son de blé ($19,86 \cdot 10^3$), aliment granulé ($8,3 \cdot 10^3$) et tourteau de soja ($7,475 \cdot 10^3$) ufc/g (figure 11).

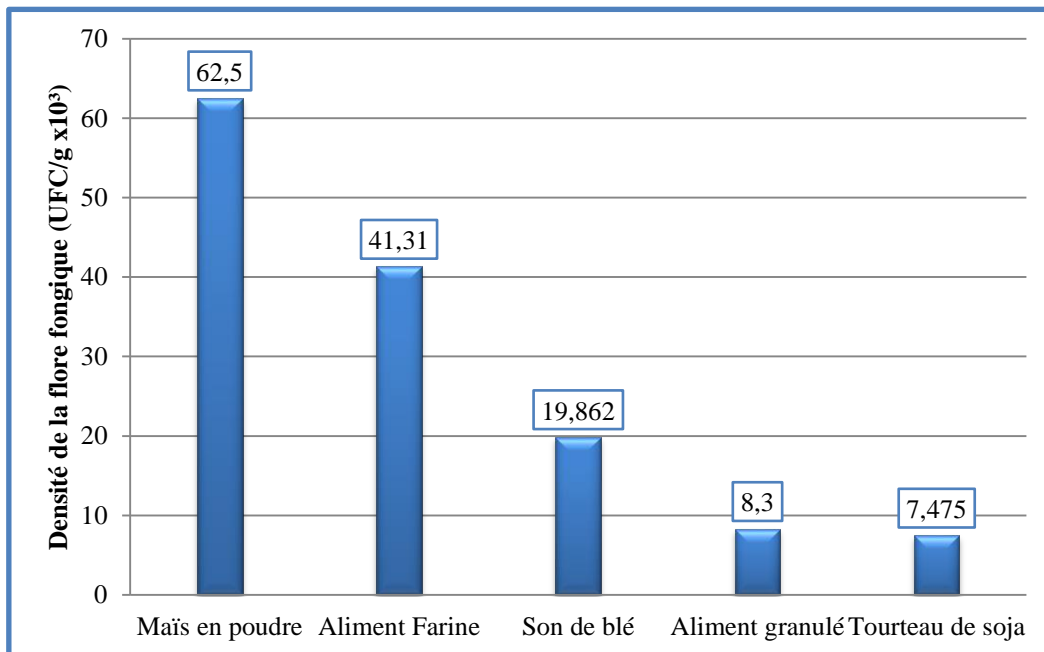


Figure 11. Densité de la flore fongiques totale (UFC /g) des différents échantillons matières première et d'aliment composé.

La dominance relative du genre *Fusarium* est remarquable dans les échantillons de maïs en poudre et tourteau de soja avec un taux de (80% et 39.3 %) suivi de son de blé (7.25%). Par ailleurs le genre *Penicillium* présente un taux de contamination faible avec un pourcentage de

18,4 %, 22,7% et 15,72% respectivement dans les échantillons de maïs en poudre, tourteau de soja et son de blé, par contre le genre *Aspergillus* contamine très faiblement les échantillons de maïs en poudre (0,8%), tourteau de soja (6,55 %) et son de blé (7,25%) (Figure 12).

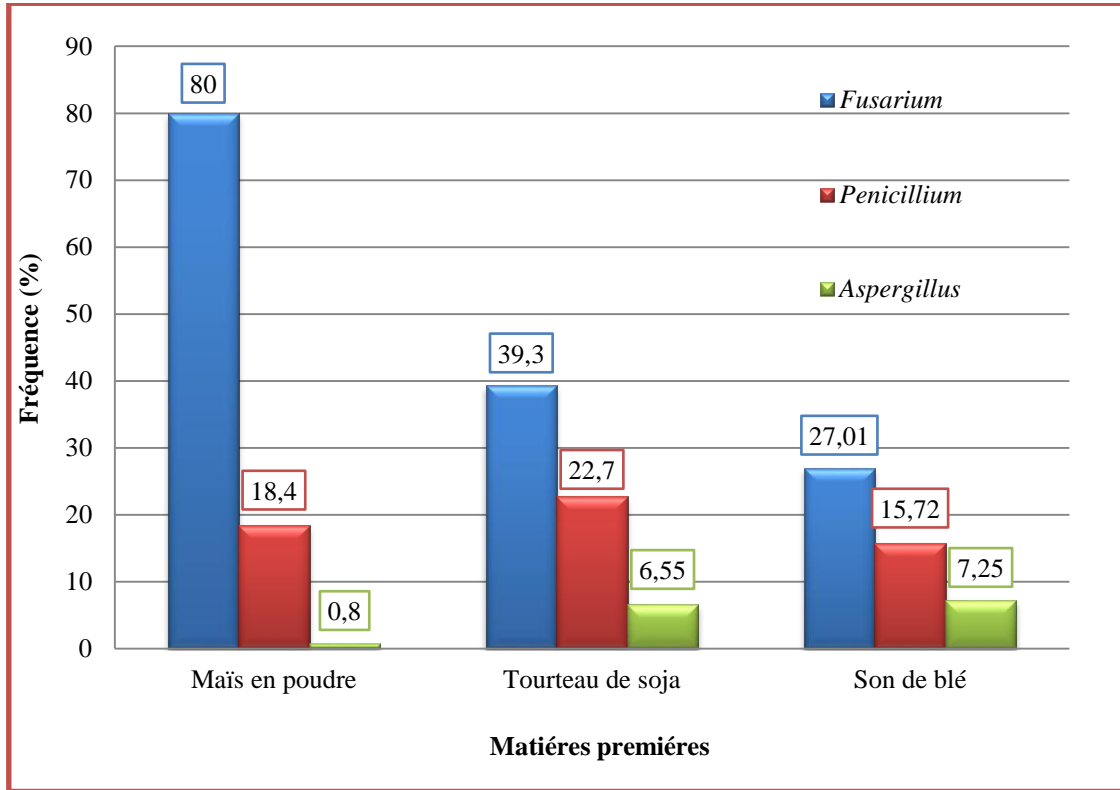


Figure 12. Fréquence des différents genres d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* dans les échantillons de la matière première.

En ce qui concerne l'aliment composé le genre *Fusarium* est dominant dans l'aliment farine avec une fréquence de (62,9 %) par rapport à l'aliment granulé dont le pourcentage est de (24,36%), ainsi la dominance du genre *Penicillium* est clair dans l'aliment granulé par rapport à l'aliment farine (47,89%, 26,97%) respectivement, par ailleurs le genre *Aspergillus* présente un taux de contamination très faible dans les échantillons de l'aliment farine (4,21%) et granulé (17,64%) (Figure 13).

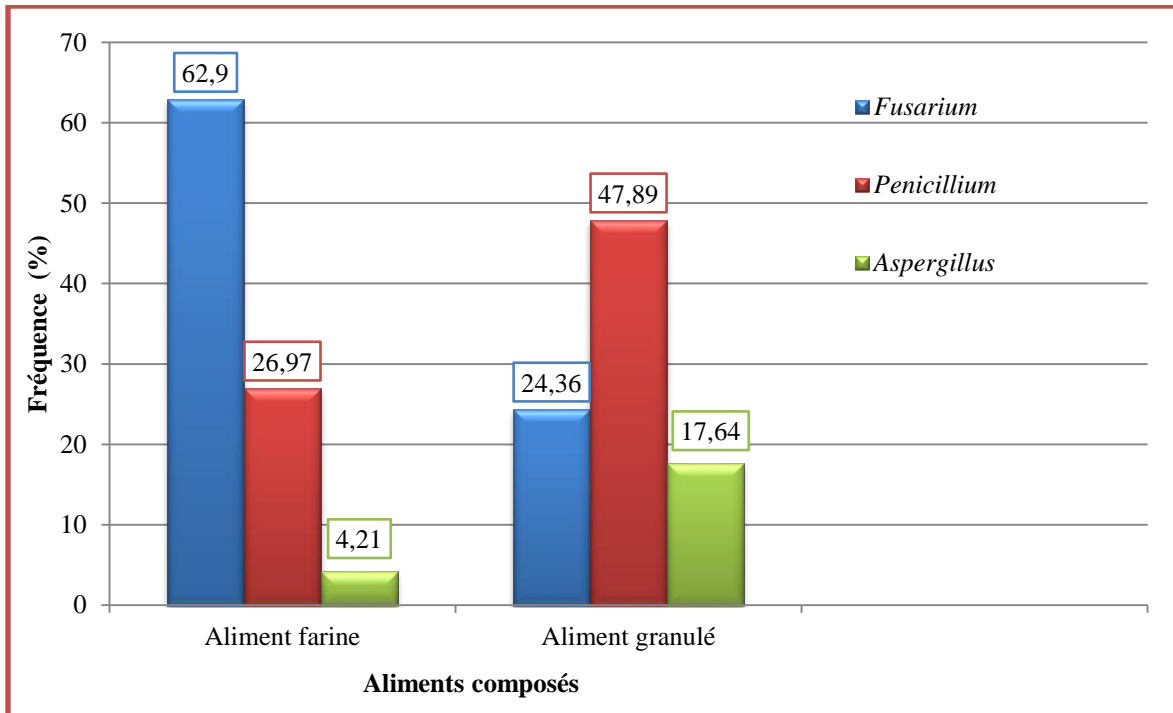


Figure 13. Fréquence des différents genres d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* dans les échantillons de la matière première et de l'aliment composé.

On note que les échantillons prélevés au niveau de Blida et Alger présentent une forte densité de la flore fongique $47,02 \cdot 10^3$ et $42,17 \cdot 10^3$ par rapport aux échantillons collectés dans les régions de Mostaganem ($23,8 \cdot 10^3$), Béjaia ($19,4 \cdot 10^3$), Setif ($3,2 \cdot 10^3$) et Tizi ouzou ($2,45 \cdot 10^3$) (figure 14).

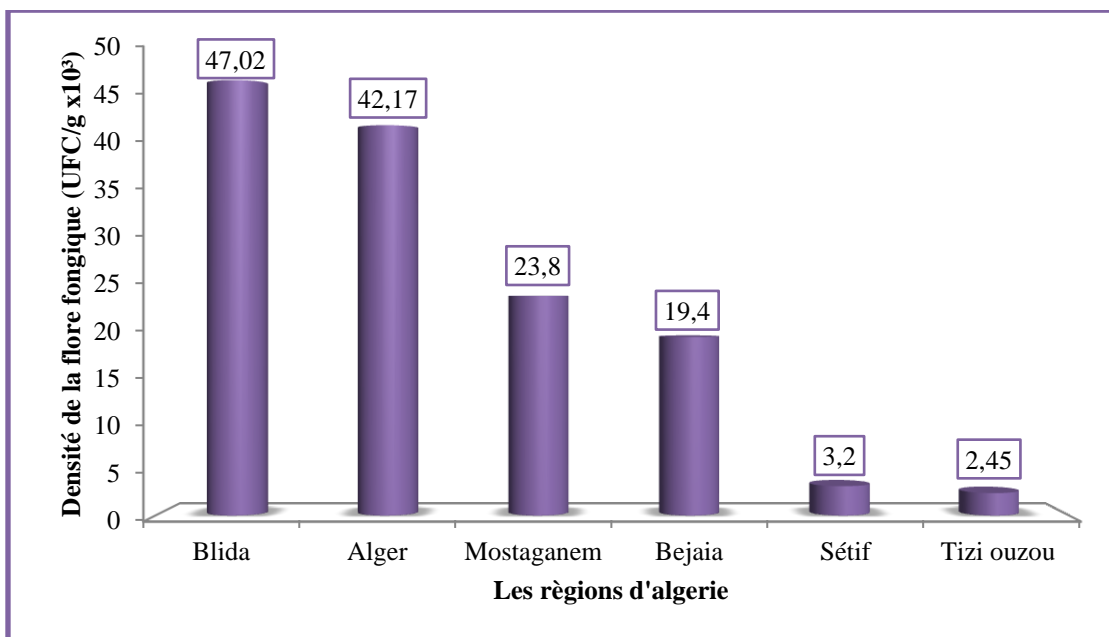


Figure 14. Flore fongique totale dans les différentes régions d'Algérie.

2.1.2. Résultats de la méthode directe

Les résultats de l'analyse des différents échantillons de matière première montrent que le taux de contamination est de 100% avec une dominance du genre *Aspergillus* pour les échantillons de maïs et orge dont la fréquence est de (55.68% et 63.58 %) respectivement. Le genre *Penicillium* et *Fusarium* sont présents en faible fréquence dans les échantillons de maïs (18.63% et 12.36%) respectivement suivi par les échantillons d'orge avec un taux de (8,56% et 8,23%) respectivement (figure 15).

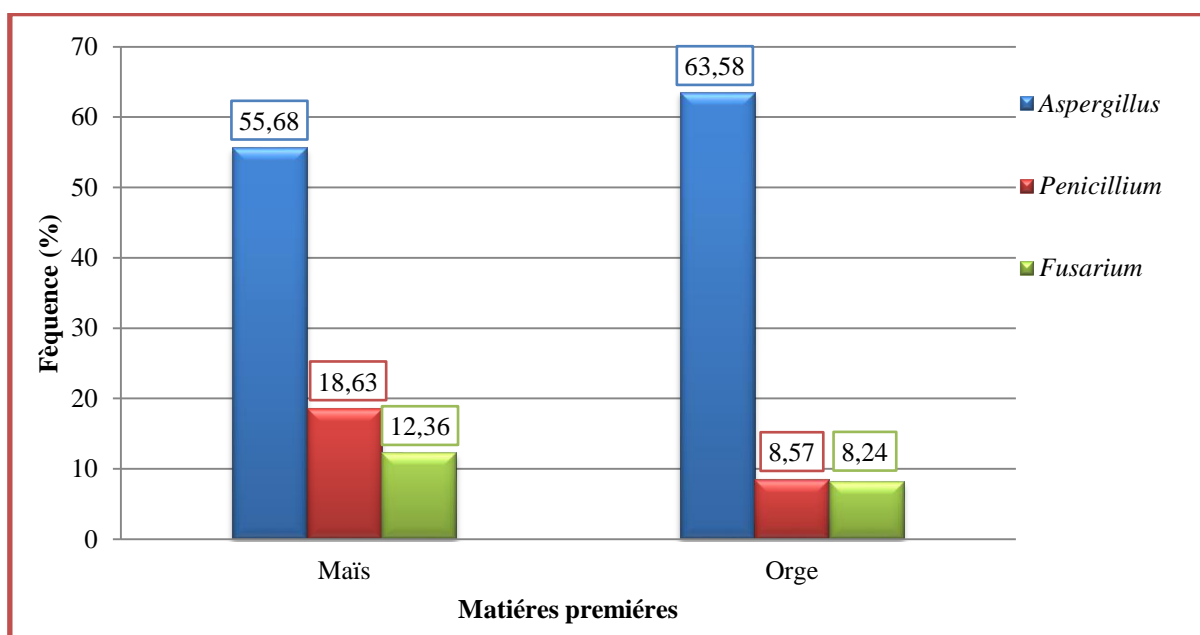


Figure 15. Fréquence des différents genres d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* dans les échantillons de la matière première analysés (maïs et orge).

La dominance du genre *Aspergillus* dans les échantillons collectés dans les régions de Blida, Alger et Tipasa est remarquable avec des fréquences de 93,09%, 90,57%, et 90,26% respectivement. Par contre les échantillons prélevés au niveau de Sétif (51,63 %), Mostaganem (47,83%) et les régions du sud (22,95%) présentent des fréquences relativement moyennes à assez élevés (Figure 16).

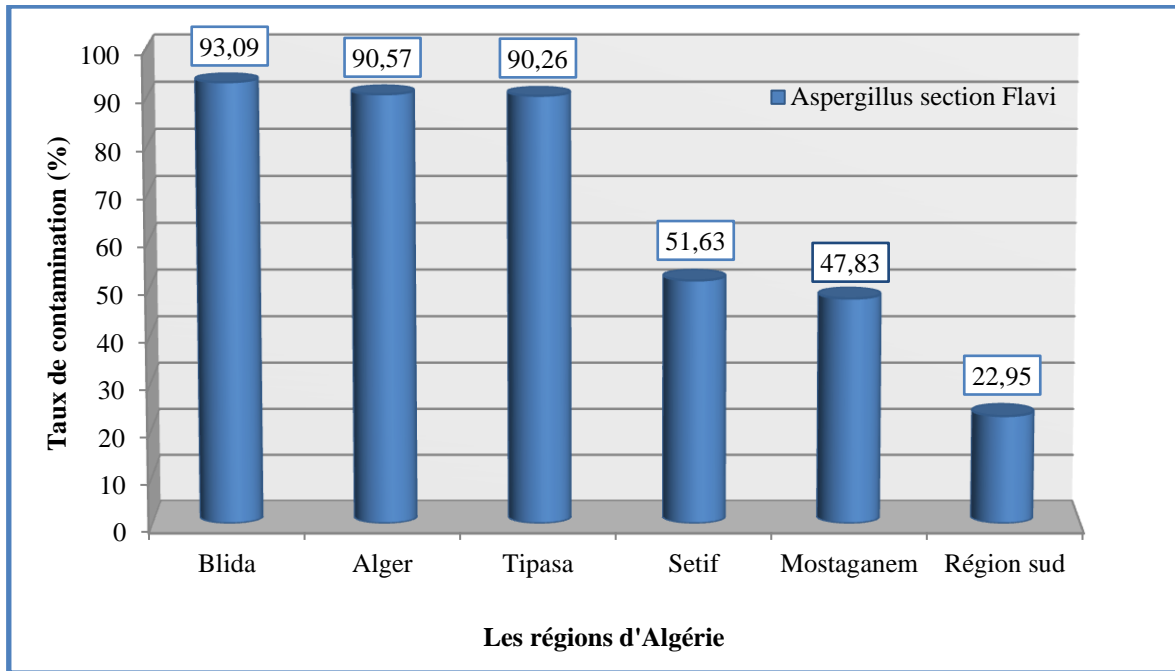


Figure 16. Fréquence du genre *Aspergillus* dans les différentes régions d'Algérie.

2.2. Distribution des sections d'*Aspergillus* dans les échantillons de matière première et d'aliment composé

2.2.1. Résultats de la méthode de dilution

Dans cette méthode nous nous sommes particulièrement intéressés au genre *Aspergillus* dont certaines espèces produisent les aflatoxines, la notion d'espèce employée ici désigne plutôt le groupe voire la section.

Parmi les sections d'*Aspergillus* identifiées, la section *Flavi* présente une forte incidence dans les échantillons de matière première et aliment composé, à un degré moindre la section *Nigri*, et faiblement pour la section *Terrei*, *Circumdati* et *Candidi* (Figure 17).

➤ *L'Aspergillus* section *Flavi* est enregistré dans tous les échantillons analysés. On note une contamination des échantillons de matière première (son de blé, tourteau de soja et maïs en poudre) avec un taux de 82,71%, 65,21% et 50% respectivement, ainsi pour les échantillons d'aliment composé farine (85,93%) et granulé (86,36%).

➤ *L'Aspergillus* section *Nigri* présente une contamination moindre dans les échantillons de maïs en poudre (50%) et tourteau de soja (30,43%). Cependant un taux relativement très faible est enregistré dans les échantillons de son de blé (4,93%), aliment farine (4,68%) et aliment granulé (13,63%).

➤ *L'Aspergillus* section *Terrei* présente un taux relativement faible dans l'échantillon de son de blé (4,93%) uniquement. On ne note aucune contamination dans les autres échantillons.

➤ *L'Aspergillus* section *Circumdati* présente un taux relativement faible dans l'échantillon de tourteau de soja (4,34%) uniquement. On ne note aucune contamination dans les autres échantillons.

➤ *L'Aspergillus* section *Candidi* présente un taux relativement faible qui a été observé dans les échantillons de son de blé (7,4 %) et aliment farine (9.37 %).

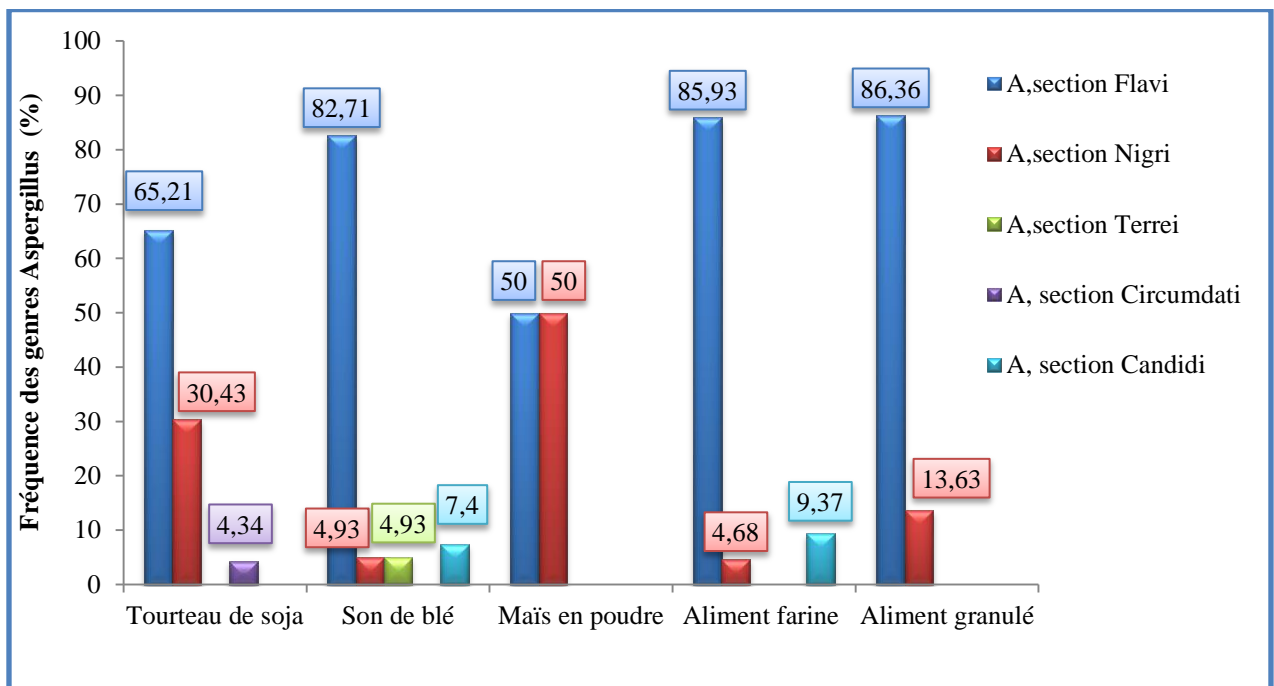


Figure 17. Fréquence des différentes sections d'*Aspergillus* dans les échantillons de la matière première et d'aliments composés analysés.

2.2.2. Résultats de la méthode directe

Parmi les sections d'*Aspergillus* identifiées dans les échantillons de maïs et d'orge, *Aspergillus* section *Flavi*, est la plus dominante, ainsi à un degré moindre d'*Aspergillus* section *Nigri* et *terrei* (Figure 18).

Nous rappelons que les échantillons de maïs et d'orge sont fortement contaminés par le genre *Aspergillus* selon la méthode directe décrite précédemment.

➤ *L'Aspergillus* section *Flavi* présente une forte fréquence dans les échantillons de maïs et d'orge avec un taux de 87,65% et 99,24% respectivement (Figure 18).

➤ *L'Aspergillus* section *Nigri* présente une fréquence relativement faible dans l'échantillon de maïs (11,58%) et très faible dans l'échantillon d'orge (0.75%) (Figure 18).

➤ L'Aspergillus section terreii présente une très faible contamination dans l'échantillon de maïs (0.75 %) uniquement (Figure 18).

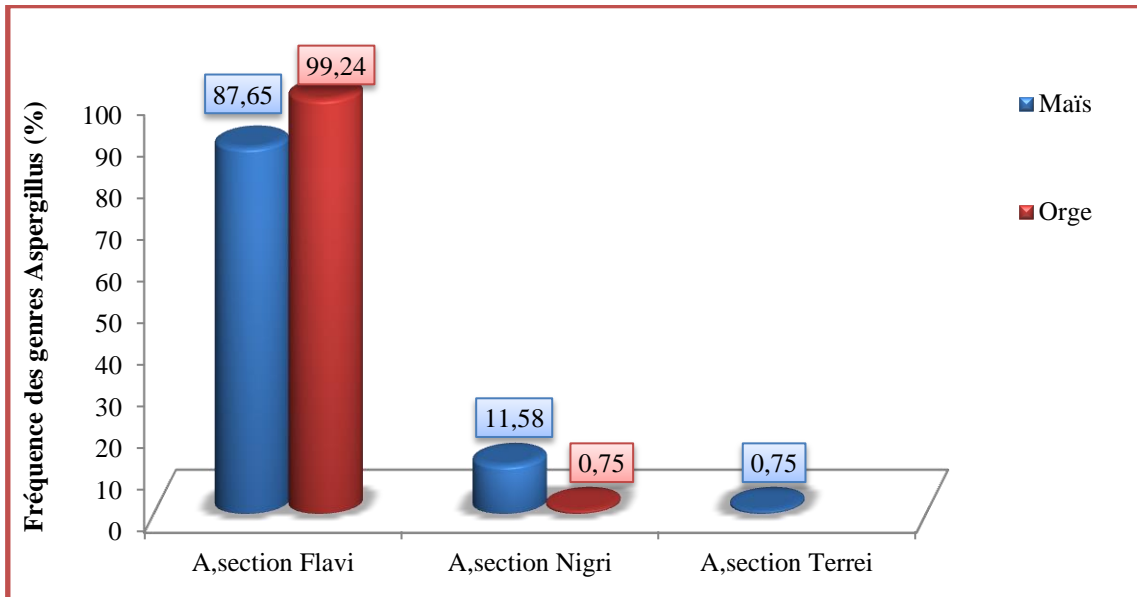


Figure 18. Fréquence de différentes sections d'*Aspergillus* dans Les échantillons de maïs et d'orge.

3. Reconnaissance des genres et des espèces

3.1. Reconnaissance des genres

Les principaux genres fongiques identifiés au cours de cette étude sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et de la texture de la colonie, sur le milieu d'isolement (DRBC), ainsi que les structures micromorphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres (Figure 19).

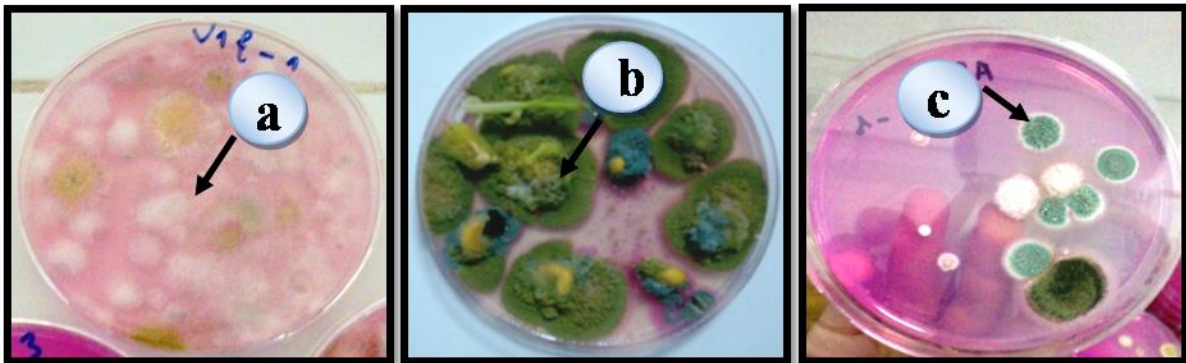


Figure 19. Aspect macroscopique des différents genres poussant sur le milieu DRBC après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C (a= Le genre *Fusarium*, b = *Aspergillus* section *Flavi*, c = Le genre *Penicillium*).

➤ **Le genre *Aspergillus***

Les espèces de ce genre se caractérisent par des colonies mycéliennes poudreuses qui atteignent 3 à 7 cm de diamètre après 5-7 jours d'incubation sur milieu CYA. Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique ou ovoïde, suivant les sections et les espèce, une ou deux rangées de stérigmates prend naissance sur les têtes (unisérié ou bisérié) (Figure 20) de couleur jaune-vert à brun dont certaines produisent des sclérotés brun foncé ou parfois jaunes (Figure 21).

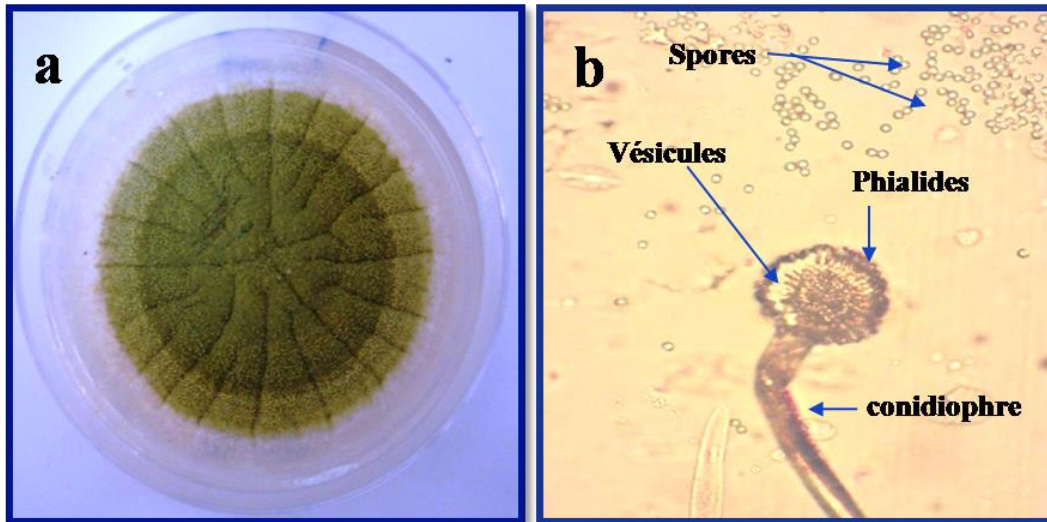


Figure 20. Aspect morphologique du genre *Aspergillus* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique: G× 400).

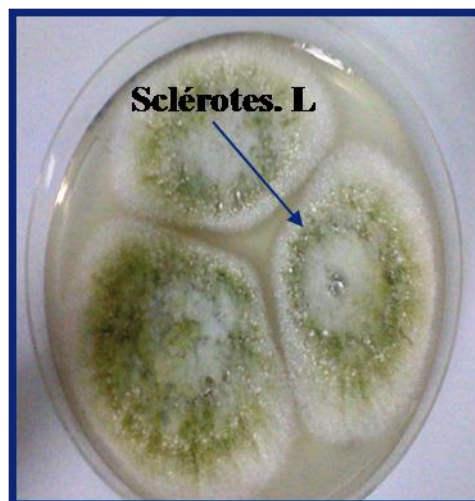


Figure 21. Aspect macroscopique des sclérotés de type « L » d'*Aspergillus* sur milieu CYA après 7 jours d'incubation à 28°C.

➤ **Le genre *Penicillium* :**

Les colonies sont généralement de couleur bleu-vert facilement reconnaissable à l'œil nu ou à la loupe, peu développées, elles atteignent 3cm de diamètres sur milieu CYA après 7 jours d'incubation à 28°C, les spores sont produites en chaînes par des phialides groupées en pinceau (d'où le nom de *Penicillium*) (Figure 22).

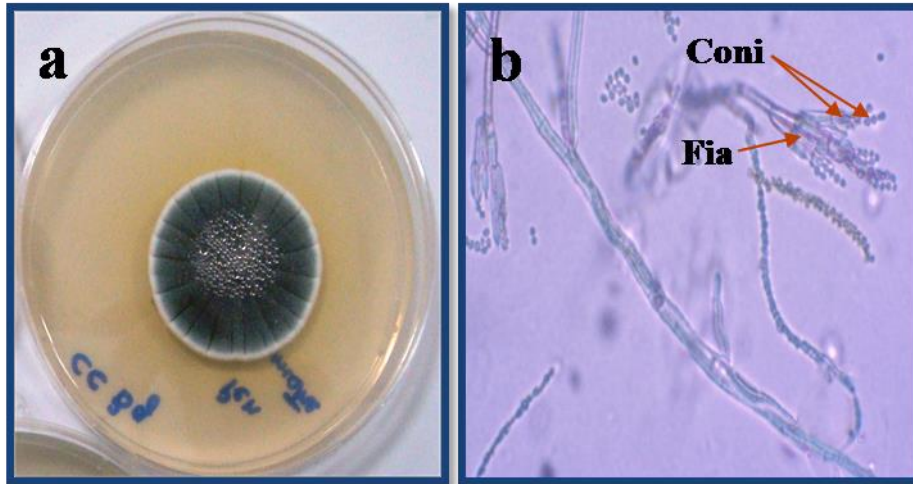


Figure 22. Aspect morphologique du genre *Penicillium* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).

➤ **Le genre *Fusarium***

Les cultures de ce genre sont d'aspects et de couleurs variés, sur le milieu CYA la forme des colonies blanches a un diamètre de 4 cm ou plus envahie souvent toute la surface de la boîte de Pétri. La reconnaissance est surtout basée sur l'observation des conidies de forme très caractéristique, les microconidies et les macroconidies portées par des phialides (Figure 23).

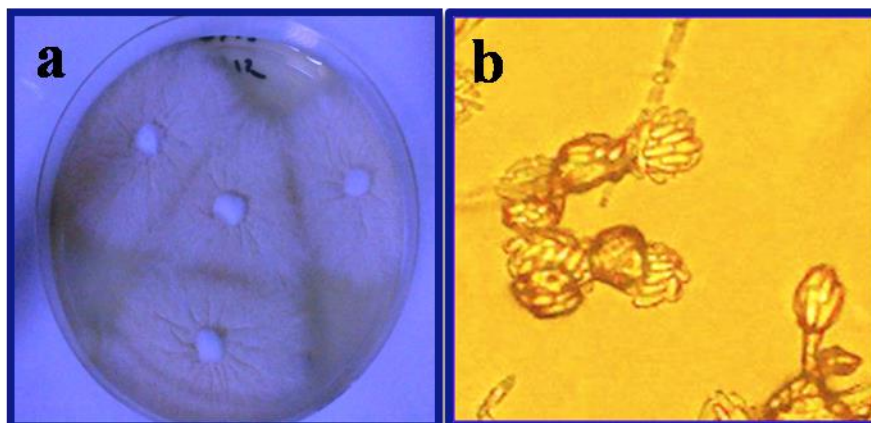


Figure 23. Aspect morphologique du genre *Fusarium* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).

3.2. Reconnaissance des sections du genre *Aspergillus*

Les souches que nous avons isolées et identifiées comme *Aspergillus* ont été rattachés à 4 sections qui sont *Aspergillus* section *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* et *Circumdati*.

➤ *Aspergillus* section *Nigri*

Cette section présente sur le milieu CYA des colonies foncées souvent noires et des conidiophore unisériés ou bisériés a un diamètre de 6cm ou plus, qui envahissent souvent toute la surface de la boîte de Pétri (figure 24).

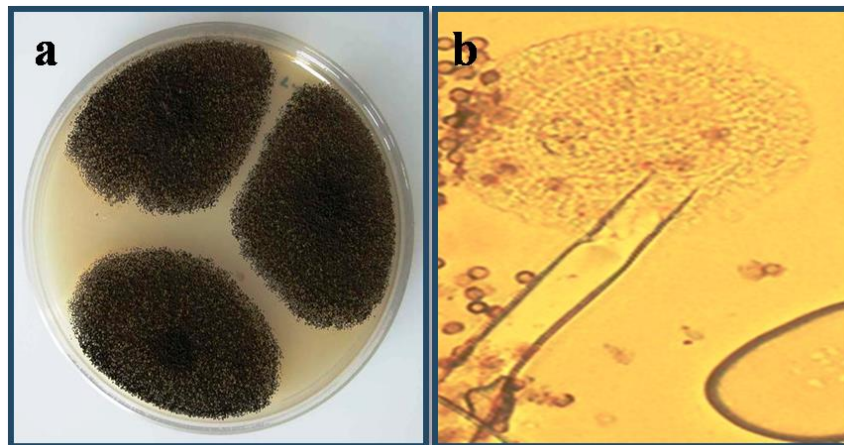


Figure 24. Aspect macroscopique d'*Aspergillus* section *Nigri* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).

➤ *Aspergillus* section *Terrei*

Cette section présente sur le milieu CYA une colonie brun-beige à brun-orangé, l'aspect microscopique montre une forme d'éventail avec têtes conidiennes bisériées en forme de longues colonnes et la vésicule est globuleuse (Figure 25).

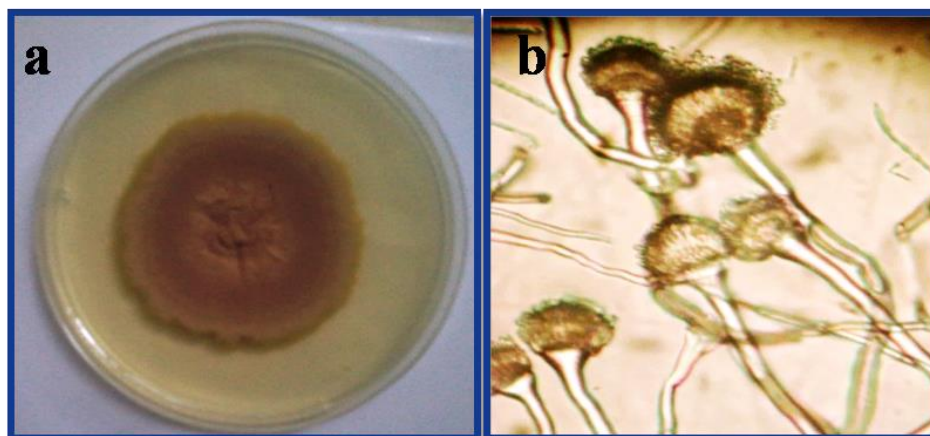


Figure 25. Aspect morphologique d'*Aspergillus* section *Terrei* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).

➤ *Aspergillus section Circumdati*

Cette section présente sur le milieu CYA des têtes conidiennes bisériées de couleur jaunes à ocres, des sclérotes de couleur brun clair à brun foncé (Figure 26).

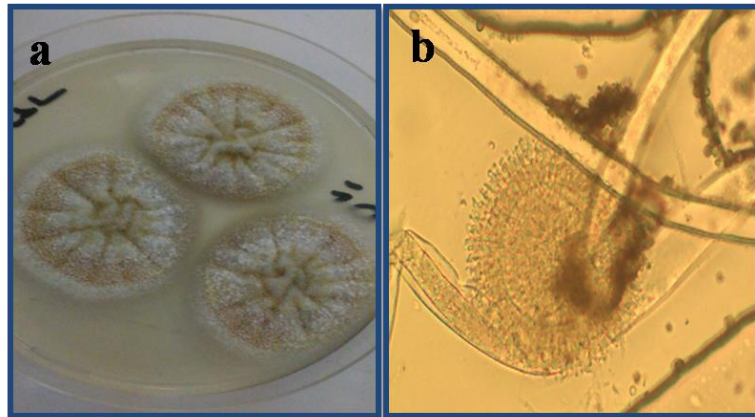


Figure 26 Aspect morphologique d'*Aspergillus section Circumdati* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C° (a: Aspect macroscopique, b: Aspect microscopique G×400).

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

Nous avons étudiés le pouvoir producteur d'aflatoxine de 223 souches appartenant à la section *Flavi* isolées des échantillons collectés en 2015: 17 isolats de tourteaux de soja , 35 isolats de son de blé, 3 isolats de maïs en poudre , 112 isolats de maïs en graines , 13 isolats d'orge en graines , 25 isolats d'aliment composé farine et 18 isolats d'aliment composé granulé.

Le criblage des isolats aflatoxinogènes est basé sur la mise en évidence d'un revers jaune orangé sur le milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et une fluorescence bleue sous U.V (Figure 27).

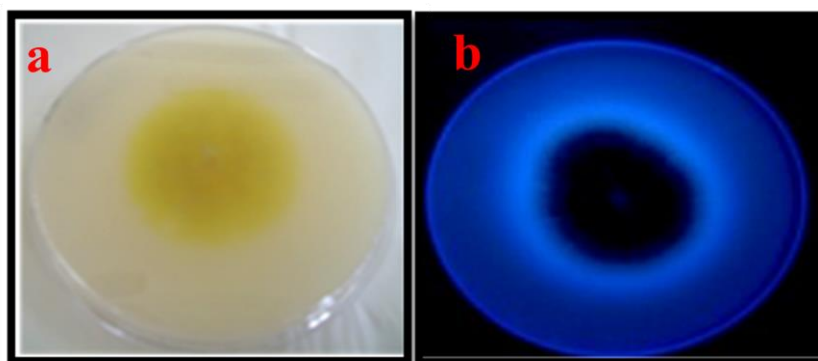


Figure 27. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) (a: Revers jaune orange, b : Fluorescence bleue sous UV (365 nm)).

Le pouvoir producteur de tout les isolats a été vérifié par CCM en utilisant un standard d'AFB1 et l'extrait de la souche de référence *A.flavus* NRLL62477 qui produit L'aflatoxines B1 et B2. les résultats ont révélés un taux de production de 74 %. La fluorescence des AFs sur CCM est illustrée sur la (figure 28).

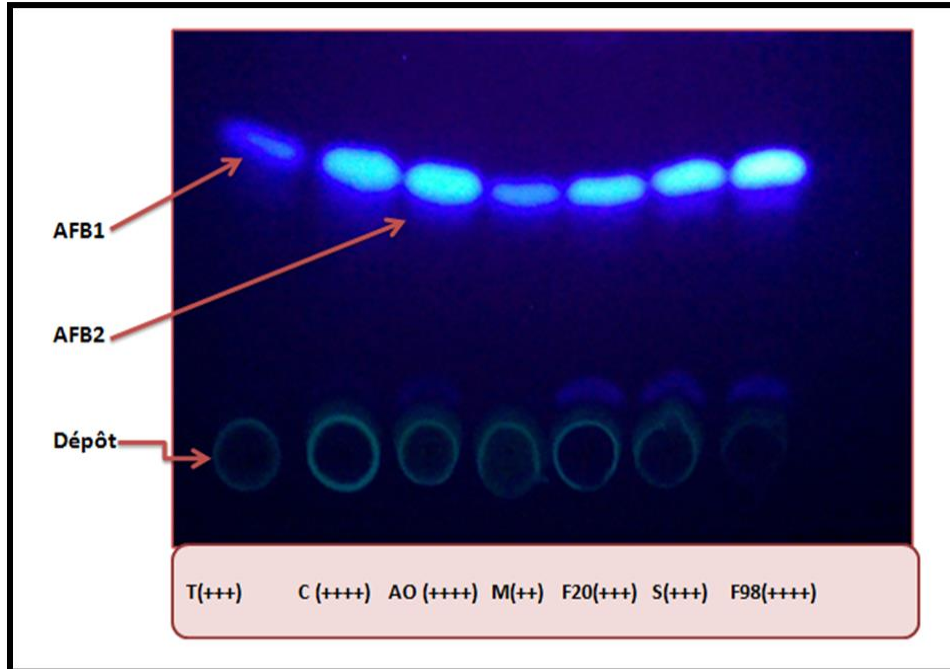


Figure 28. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus flavus* sur CCM.

T : témoin souche de référence *A.flavus* NRLL62477 productrice d'aflatoxines B1 et B2 / C : maïs BLIDA / AO : orge ATTATBA / M : tourteaux de soja TIPAZA / F20 : tourteaux de soja SOUMAA / S : maïs SOUMAA / F98 : aliment farine BEJAIA.

La détection par chromatographie sur couche mince (CCM) a démontré les isolats aflatoxinogènes selon les quantités d'aflatoxine B1 produites elles ont été subdivisées en 4 catégories :

- Des isolats fortement producteurs (++++/+++): cette catégorie représente 7,3% et 24,8 % respectivement des 223 isolats testés.
- Des isolats moyennement producteurs (++) cette catégorie représente 42,42 % des 223 isolats testés
- Des isolats faiblement producteurs (+) cette catégorie représente 25,45 % des 223 isolats testés
- Des isolats non producteurs (-) : cette catégorie représente 26 % des 223 isolats testés

Les résultats ont révélé un taux de production de 74 %. En effet des isolats provenant des échantillons de maïs,orge, aliment granulé,tourteau de soja, maïs en poudre,aliment farine et

son de blé sont producteurs d'aflatoxines et représentent un taux de 86,60%, 84,61%, 72,22, 70,58 %, 66,66 % , 60%, 42,85 % respectivement (tableau 8)

On note que tous les isolats produisent l'aflatoxine B mais aucun ne produit l'aflatoxine G (résultat montré par le test de CCM) (Figure 29).

Les résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats aflatoxinogènes (sur les plaques) sont donnés en annexe IV.

Tableau 8. Les isolats aflatoxinogènes appartenant au genre *Aspergillus* section *Flavi*

produits	Nombre d'isolats Testés	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Intensité de la Fluorescence				Moyenne des Isolats aflatoxinogènes (%) par CCM
			++++	+++	++	+	
Maïs	112	97	8	22	42	25	86,60
Orge	13	11	1	3	6	1	84,61
Aliment granulé	18	13	1	3	5	4	72,22
Tourteau de soja	17	12	0	6	5	1	70,58
Maïs en poudre	3	2	0	1	0	1	66,66
Aliment farine	25	15	1	3	6	5	60
Son de blé	35	15	1	3	6	5	42,85
Nombre total	223	165	12	41	70	42	
Pourcentage (%)	100	74	7,27	24,84	42,42	25,45	

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

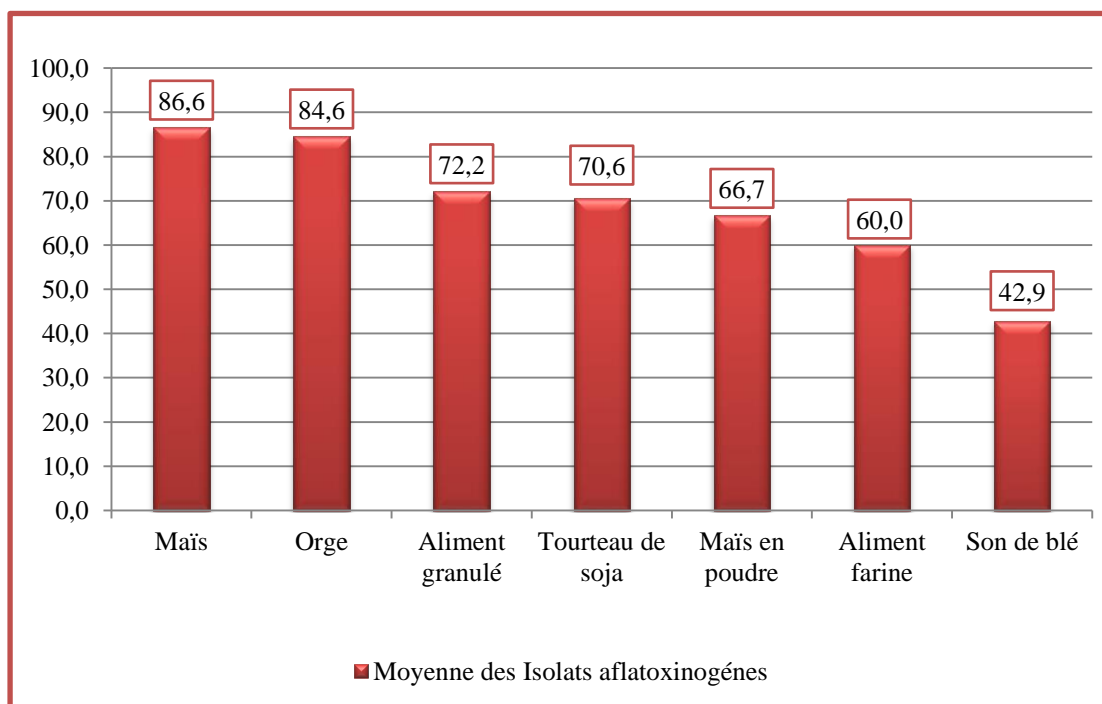


Figure 29. Répartition des isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction de l'intensité de fluorescence.

5. Quantification par HPLC des AFs présente dans quelques échantillons

Le but de cette analyse était surtout de savoir la quantité d'AFB1 présente dans quelques matrices. Il aurait été souhaitable d'analyser systématiquement toutes les matrices. Toutefois, en raison du coût élevé des analyses par HPLC, la quantification de la production d'AFB1, a été réalisée pour 07 échantillons seulement sur les 64 (tableau 9).

Tableau 9. Quantité des aflatoxines dans les échantillons de Maïs, orge, Tourteau de soja et aliment granulé.

Code	Source	Origine	Quantité d'AFB1 (µg/kg)
M65	Tourteau de soja	Guerouaw	0,80
M104	Maïs	Kouba	0,82
M60	Maïs	Soumaa	0,89
M63	Orge	Kouba	1,03
M59	Maïs	Guerouaw	1,02
M80	Aliment granulé	Attatba	3,02
M57	Maïs	Mostaganem	2,91

Les résultats de l'analyse des échantillons de tourteau de soja, orge et aliment granulé ont révélés des quantités de (0,80, 1,03 et 3,02 µg/kg) respectivement, ainsi les teneurs en AFB1 dans les échantillons de maïs varient de (0,82 à 2,91 µg/kg).

II. Discussion

Les moisissures qui engendrent des aflatoxines sont très répandues dans le monde entier, sous les climats tempéré, subtropical et tropical, elles peuvent être produites avant comme après les moissons, sur de nombreux aliments de l'homme et de l'animal et plus particulièrement sur les oléagineux, les fruits comestibles en coque et les céréales (Chandra et Sarbhoy, 1979).

Les facteurs physiques essentiels qui influencent la croissance et la production de mycotoxine sont la température, l'activité d'eau et le pH (Mitchell *et al.*, 2004). La disponibilité en eau a une influence déterminante sur le développement du champignon ainsi que sur sa production de mycotoxines, notamment dans les denrées peu hydratées comme les céréales (Cahagnier *et al.*, 1998). Cependant, le problème de la conservation se pose en termes très différents selon le niveau technologique du pays. Si dans la plupart des pays développés, les silos sont soumis à une forte surveillance, ce n'est pas le cas dans les pays en voie de développement où un manque de surveillance est remarqué. Les risques liés à la contamination par les champignons toxigènes sera donc plus élevé d'autant plus que dans ces pays le climat est plus propice à la prolifération des moisissures.

Nos résultats montre que tous les échantillons (Maïs, Tourteaux de soja, son de blé et Aliment composé (farine et granulé) sont peu hydratés, les valeurs moyennes de l'humidité relative varient généralement entre 7,60 % et 10,27%. Ces derniers coïncident avec les résultats obtenus par Gadi, 2011. Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales au stockage (Pardo *et al.*, 2004).

Nos échantillons étaient légèrement acides avec des valeurs comprises dans l'intervalle [6,24 - 6,67]. Des résultats similaires ont été obtenus par Balzer (2003) selon lequel la majorité des moisissures se développent dans un pH compris entre 4 et 8, avec une croissance optimale entre 5 et 6, certaines tolèrent cependant des pH beaucoup plus acides ou très alcalin. En raison de leur acidité de nombreux aliments sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne (Tabuc, 2007).

La contamination des denrées alimentaires par les aflatoxines peut avoir lieu tout au long de la chaîne alimentaire sur le sol, la récolte, la manutention, le transport et le stockage (Giray *et al.*, 2007). Nos résultats de l'analyse fongique ont montrés une forte contamination des 64 échantillons (35 échantillons de matière première et 29 échantillons d'aliment composé) analysés par les champignons potentiellement toxigènes (*Aspergillus*, *Penicillium*

et *Fusarium*), ce qui confirme les résultats obtenus par d'autres chercheurs (Bragulat *et al.*, 1995; Accensi *et al.*, 2004 ; Khosravi *et al.*, 2008) .

La méthode de dilution montre que la fréquence de contamination par le *Fusarium* dans les échantillons (tourteau de soja, son de blé, maïs en poudre, aliment composé farine et granulé) est moyenne (42,8%) par rapport au *Penicillium* (26,33 %) suivi des *Aspergillus* (11,24 %).

La dominance du genre *Fusarium* qui est un champignon de champ est révélé au niveau du maïs en poudre due préalablement au broyage des grains de maïs avec une fréquence faible d'*Aspergillus et Penicillium* qui sont des champignons de stockage comparant au son de blé dont la flore fongique est moindre, les spores des moisissures sont concentrées sur la partie externe (l'enveloppe) du grain où elles y sont étroitement liées et par conséquent, l'élimination des enveloppes des grains de blé par brossage abrasif réduit le taux de contamination d'environ 87% (Laca *et al.*, 2006), ainsi une diminution de la flore fongique est révélé au niveau de tourteau de soja. Les mycotoxines dans les oléagineux, graines ou tourteaux, sont largement détruites lors de l'extraction des huiles et des traitements industriels (Yiannikouris et Jouany, 2002)

D'une part, nous avons observé un taux élevé de *Fusarium* au niveau de l'aliment composé (farine) contenant déjà les grains de maïs broyées. Ce champignon est présent à l'intérieur des graines, et le broyage a permis sa mise en évidence par rapport à l'aliment composé granulé dont la contamination est faible à cause des traitements par la température élevée au cours du processus de granulation ce qui élimine la majorité de la flore fongique (Tabuc, 2007). Mais malgré ce processus technologique permettant souvent la réduction de la flore Fongique cela n'exclut pas la présence des mycotoxines qui sont thermostable. D'autre part un taux élevé des genres *Aspergillus et Penicillium* au dépend des *Fusarium* a été observé au niveau de l'aliment granulé. Ceci confirme le statut de flore de « stockage » de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage.

La répartition de la flore fongique selon les régions montre que les échantillons prélevés au niveau de Blida et Alger, dont le taux d'humidité est plus élevé, sont plus chargés en moisissures que ceux collectés dans les régions de Mostaganem, Bejaia ,Sétif et Tizi ouzou. Cette différence est vraisemblablement liée aux différences des taux d'humidités de ces régions. Par ailleurs, La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud est très connue (Pitt et Hocking, 1997).

Nos résultats d'identification préliminaires des champignons appartenant au genre

Aspergillus montre la dominance de la section Flavi. Cette section est souvent rapportée dans la littérature comme contaminant des denrées alimentaires en particulier les céréales (Baquiao *et al.*, 2013).

La méthode directe révèle que les échantillons de maïs et orge sont contaminés surtout par *Aspergillus flavus* (59,63%) suivi par *Penicillium* (13,6%) et *Fusarium* (10,3%) ce qui est à l'opposé de la méthode de dilution. Cela prouve une autre fois que *A. flavus* est un contaminant de stockage. *Aspergillus flavus* vit dans le sol à l'état saprophyte mais est capable de provoquer le pourrissement des grains (Horn et Dorner, 1998). Les grains de maïs analysés sont conservés en contact direct avec le sol (sans conditionnement). Cette constatation a été déjà faite par Castegnaro et Pfohl (2002) qui rapporte que les conditions de stockage des ingrédients premières sont mauvaises. En effet, les insectes représentent les principaux vecteurs de spores de moisissures au champ et dans les lieux de stockage elles dégradent la paroi des grains, favorisent la contamination par les moisissures et la production des mycotoxines.

L'analyse de nos résultats de la méthode direct selon la provenance des échantillons a révélé la dominance remarquable d'*Aspergillus* section *flavi* dans les régions de Blida, Alger et Tipaza avec un taux très élevé qui varie entre 90,57% et 90,26%. *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (Gourama et Bullerman, 1995), il est très répandu dans la nature (Pařenicová *et al.*, 2000) et tout particulièrement dans les régions à climat chaud comme l'Algérie (Mantle, 2002; Hocking et Pitt, 2003).

Le dosage qualitatif par CCM des aflatoxines B1 des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* s'est révélé positif pour la majorité d'entre elle (42,9 à 86,6 %). Cela peut être expliqué par la possibilité que les souches d'*Aspergillus* isolées de ces échantillons soient toxigènes (Bourgeois *et al.*, 1996). Selon Folcher, (2008), on entend par « espèce fongique toxigène », une espèce pour laquelle certaines souches sont susceptibles d'élaborer ou de provoquer l'apparition d'un ou plusieurs métabolites toxiques dans certaines conditions.

Le maïs est considéré parmi les cultures fragiles à haut risque de contamination par les moisissures toxigènes à la différence des autres céréales supposées plus résistantes à la contamination par les moisissures et la production des mycotoxines notamment l'orge et le blé (Jelinek, 1988).

Nos résultats ont montré que l'AFB1 est produite par 86,60 % de souches d'*Aspergillus* section *Flavi* isolé du maïs. Ce taux élevé de potentiel toxigènes des souches n'a pas été

trouvé en analysant directement la matrice. En effet, la quantité enregistrée dans les 4 échantillons de maïs analysés par HPLC est comprises entre 0,82 et 2,91 µg/kg. Les valeurs maximales de l'AFB1 que nous avons obtenu ne sont pas en accord avec les résultats obtenu en Brésil par Vargas, 2001 dont les niveaux de contamination du maïs par les aflatoxines atteint les 129 µg/kg.

En effet l'orge, le tourteau de soja et l'aliment composé granulé présentent une faible teneur en AFB1 1,03 µg/kg, 0,80 µg/kg et 3,02 µg/kg respectivement en raison de 1 échantillons analysé malgré qu'ils présentent une forte contamination par les isolats aflatoxinogènes (84,6% , 70,6% et 72,2% d'isolats aflatoxinogènes). Il faut souligner que la capacité de production *in vitro* par certaines souches ne traduit pas obligatoirement les mêmes capacités *in vivo*. En effet, il peut y avoir des souches capables de produire la mycotoxine dans les conditions naturelles mais pas dans les conditions de laboratoire et inversement (Mantle, 2002; Medina *et al.* , 2005). Cette hypothèse peut d'ailleurs expliquer, en partie, l'absence de corrélation entre le taux d'isolats mycotoxinogènes et la présence de la mycotoxine mycotoxinogènes et la présence de la mycotoxine dans une denrée alimentaire, ce que a été observé dans notre cas.

Conclusion générale et perspective

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier la flore fongique et les espèces aflatoxinogène appartenant au genre *Aspergillus* qui contamine la matière première et l'aliment composé au niveau des unités de fabrication de l'aliment de volaille en Algérie.

A la lumière de ce travail, nous constatons que l'alimentation de volaille présente un taux de contamination considérable, dont la méthode de dilution démontre une moyenne de contamination par le genre *Fusarium* (42,8 %) et *Penicillium* (26,33 %) suivi par le genre *Aspergillus* (11,24%), ainsi les résultats analytique de la flore fongique obtenu par la méthode directe montre une forte contamination par *Aspergillus* (59,63 %) suivi du *Penicillium* (13,6 %) et *Fusarium* (10,3 %) .

La mise en évidence du pouvoir producteur d'aflatoxine par la détection sur CCM a permis de montré que près de 75% des isolats appartenant au genre *Aspergillus* section flavi produisant l'aflatoxine B1, ainsi la quantification par HPLC des AFs de quelque matrice nous a permis de constater que les échantillons sont contaminés par les AFs avec de très faibles quantité qui ne présente aucun danger pour le volaille et par la pour le consommateur. Même si la plupart des quantités détectées soient inférieures aux normes, ceci ne doit pas être considéré comme sans risque parce que cette mycotoxine est résistante dans les conditions de stockage et des analyses périodiques sont préconisées pour estimer son accumulation. En effet, les teneurs en AFB1 peuvent être revues à la hausse si les conditions de la toxigenèse sont favorables. 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.

En Algérie, beaucoup d'éléments restent à découvrir dans cet axe. La présence des mycotoxines dans l'alimentation animale mérite la réalisation de sérieuses études. Ceci est d'autant plus important que les mycotoxines présentant une grande importance sanitaire et économique chez les volailles et le risque de passage à l'homme. Avant toute extrapolation de nos résultats, il convient de noter que ceux-ci ne représentent 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.

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

- réduire le niveau de contamination en appliquant des règles de bonnes pratiques de culture et en respectant des règles sanitaires simples au moment de la récolte, du stockage et de la transformation des aliments.
- Il est impératif de veiller sur les contrôles microbiologiques et toxicologiques de l'alimentation animale susceptible d'être contaminés par les mycotoxines. A cet effet, des laboratoires spécialisés en la matière doivent être mis en place sur tout le territoire du pays.

Références bibliographiques

- 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.
- Annuaire, O.** (2001). Le marché des produits des viandes carnés et avicoles 2001. ofival–paris–France.
- Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L., & Wogan, G. N.** (1963). Aflatoxins b and g. *Journal of the American Chemical Society*, 85(11), 1706-1707.
- Ayerst, G.** (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research*, 5(2), 127-141.
- Badillet G., de Briève C., Guého E.,** (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.
- Balzer, A.** (2003). Les trichothécènes: nature et origine. Thèse de doctorat.
- Bammler, T. K., Slone, D. H., & Eaton, D. L.** (2000). Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxin B1 biotransformation in non-human primates. *Toxicological Sciences*, 54(1), 30-41.
- Baquiao, A. C., de Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Atayde, D. D., & Correa, B.** (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food chemistry*, 139(1), 1127-1132.
- Berthier, J. & 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>
- Beyer, S.** (2014). Utilisation du sorgho grain dans l'alimentation des volailles : stratégies de formulation, condition de fabrication et valeur nutritionnelle pour poulets de chair poules pondeuses et dindons.
- Blanc, M.** (1983). Moyen de prévention et de destruction des aflatoxines (cas des graines d'arachides et de lettres dérivés). Thèse Université Pierre et Marie Curie.
- Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

- Boudra , H.** (2011). Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Thèse docteur d'université, Université Blaise.
- Bourgois, C. M., Mescle, J. F., &Zucca, J.** (1996). Microbiologie alimentaire Tome 1. Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité des aliments. Tec et Doc. Lavoisier.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., &Cabañes, F. J.** (1995). A mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(2), 215-220.
- Buldgen, A., Parent, R., Steyaert, P., &Legrand, D.** (1996).Aviculture semi-industrielle en climat subtropical. Guide pratique.
- Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., Frémy, J.M., Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D., &Roquebert, M.F.** (1998).Moisissures des aliments peu hydrates. Lavoisier Tec&Doc, France.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W., & Keller, N. P.** (2004). veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillusparasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4733-4739.
- Candlish, A. A. G., Haynes, C. A., & Stimson, W. H.** (1988).Detection and determination of aflatoxins using affinity chromatography. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(5), 479-485.
- Castegnaro, M., &Pfohl-Leszkowicz, A.** (2002).Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. 2e édition. Paris: Lavoisier, Tec. & Doc, 127-79.
- Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P.** (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation: biologie médicale.-159. Paris, Bioforma.
- Chan, D., MacDonald, S. J., Boughtflower, V., & Brereton, P.** (2004). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxinA in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1059(1), 13-16.
- Chandra, R., &Sarbhoy, A. K.** (1997). Production of Aflatoxins and Zearalenone by the toxigenic fungal isolates obtained from stored food grains of commercial crops. *Indian Phytopathology*, 50(4), 458-468.

- Conan, L., Métayer, J. P., Lessire, M., & Widiez, J. L.** (1992). Teneur en énergie métabolisable des céréales françaises pour les volailles. Synthèse d'enquêtes annuelles. *INRA prod. Anim*, 5(5), 329-338.
- Davis, N. D., Iyer, S. K., & Diener, U. L.** (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1593-1595.
- Demain, A. L., & Fang, A.** (2000). The natural functions of secondary metabolites. In *History of Modern Biotechnology I* (pp. 1-39). Springer Berlin Heidelberg.
- DJEBOU, Z.** (2006). Influence des conditions d'élevage sur les performances chez le poulet de chair .
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C.** (1997) Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H.** (1980). *Compendium of soil fungi*. Volume 2. Academic Press (London) Ltd.
- Dragacci, S., Grosso, F., & Fremy, J. M.** (2005). Analyse et détection des mycotoxines. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, (P3330).
- Drogoul, C., & Gadoud, R.** (2004). *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage* (Vol. 2). Educagri Editions.
- F.A.O** (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. FAO Food and Nutrition paper 81. FAO, Rome.
- Fente, C. A., Ordaz, J. J., Vazquez, B. I., Franco, C. M., & Cepeda, A.** (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4858-4862.
- Folcher, L.** (2008). Efficacité comparée de méthodes de contrôle des bio-agresseurs du maïs (*Zeamays L.*): Recherche de descripteurs en vue d'une modélisation prévisionnelle pour gérer le risque mycotoxine. Thèse de doctorat. Pau.
- Frisvad, J. C., Skouboe, P., & Samson, R. A.** (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B 1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(5), 442-453.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I., & Samson, R. A.** (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* (pp. 55-62). Springer US.

- Giray, B., Girgin, G., Engin, A. B., Aydin, S., & Sahin, G.** (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 18, 23-29.
- Gourama, H., & Bullerman, L. B.** (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection*, 58(12), 1395-1404.
- Guarro, J., & de Hoog, G. S. (Eds.)**. (1995). *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Guérin, H., Maignan, G., & Rasambainarivo, J. H.** (1989). L'alimentation du bétail à Madagascar, les ressources en matières premières, leur utilisation par l'élevage, action à mener pour le développement durable des productions animales.
- Hamilton, P. B.** (1984). Determining safe levels of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47(7), 570-575.
- Hocking, A. D.** (2003). Foodborne microorganisms of public health significance (No. Ed. 6). Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated (AIFST Inc.).
- Horn, B. W., & Dorner, J. W.** (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*, 767-776.
- Hufty, A.** (2001). Introduction à la climatologie: le rayonnement et la température, l'atmosphère, l'eau, le climat et l'activité humaine. Presses Université Laval.
- Jaquet, J., Lafont, J., & Lafont, P.** (1982). Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française*, 42, 63-67.
- Jelinek, C. F., Pohland, A. E., & Wood, G. E.** (1988). Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds--an update. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 72(2), 223-230.
- J.O.C.E** (Journal officiel des communautés européennes) n° L102/9 du 15 avril 1976 : directive 76/372/CEE de la commission du 1^{er} mars 1976, portant fixation de méthodes d'analyse communautaire pour le contrôle officiel des aliments des animaux.
- J.O.C.E** (Journal officiel des communautés européennes) n° L327/54 du 13.11.1992 : directive 92/95/CEE de la commission de 9 novembre 1992, portant fixation de méthodes d'analyse communautaire pour le contrôle officiel des aliments des animaux. Annexe, partie B.
- Joubrane, K.** (2011). Evaluation du risque lié aux champignons pathogènes producteurs d'ochratoxine a et d'aflatoxine b1 au niveau de la production du blé au Liban diplôme doctorat de l'université saint joseph de Beyrouth soutenue le 28 juillet 2011.

- Kaci, A., & Cheriet, F.** (2013). Analyse de la compétitivité de la filière de viande de volaille en Algérie: tentatives d'explication d'une déstructuration chronique. *New Mediterr. J Econ. Agric. Environ*, 12, 11-21.
- Khosravi, A. R., Dakhili, M., & Shokri, H.** (2008). A mycological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom Province, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1), 31-34.
- Krogh, P.** (1987). *Mycotoxins in food*. Academic Press Ltd.
- Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., & Pandiella, S. S.** (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 332-338.
- LAFON, P.** (1978). Aflatoxines et aflatoxicoses humaines. *Revue Médicale*, 9, 447-467.
- Larbier, M., & Leclercq, B.** (1992). *Nutrition et alimentation des volailles*. Editions Quae.
- Lopez-Garcia, R., Park, D. L., & Zubiare, G. D.** (1999). Procédés pour réduire la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires. *TECH. DOC (éd.): Les mycotoxines dans l'alimentation*, Lavoisier, Paris, 387-408.
- MADR** (2011). Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Statistiques agricoles, séries A et B. Alger, Algérie
- Mantle, P. G.** (2002). Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International biodeterioration & biodegradation*, 50(3), 143-146.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocana, L., Valle-Algarra, F. M., & Jiménez, M.** (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingenensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4696-4702.
- Merck** (2003). *Le manuel vétérinaire Merck 2eme édition française* Edition : Susan E Aiello B.S, D.V. MELS 1983-2013.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., & 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(2), 439-445.
- Morin, O.** (1994). *Aspergillus et aspergilloses: biologie*, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses*, 8-600.
- Moussaoui, A.** (1994). دراسات ميكروبيولوجية علي الدرة في مختلف مراحل تحويلاتها الصناعية لمعمل مغنية.
- Nielsen, S. S.** (Ed.). (2010). *Food analysis* (p. 550). New York, NY, USA: Springer.
- OFIVAL** (2011) -. *Le marché des produits carnés et avicoles. Note d'analyse*. OFIVAL.





- 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.
- Pardo, E., Marin, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J.** (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxinA production by *Aspergillusochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 79-88.
- Parenicova, L., Skouboe, P., Samson, R. A., Rossen, L., Visser, J.** (2000). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (pp 413-424). HarwoodAcademicPublishers, Amsterdam the Netherlands.
- Park, D. L., &Liang, B.** (1993). Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science &Technology*, 4(10), 334-342.
- Park, J. W., Kim, E. K., Shon, D. H., & Kim, Y. B.** (2002). Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives & Contaminants*, 19(11), 1073-1080.
- Paterson, R. R. M.** (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *ProcessBiochemistry*, 41(7), 1467-1474.
- Perry, J. J. staley JT, Lory S.** (2004). *Microliologie*. Edition Dunod, Paris.
- Peterson, S.W.** (2000). In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Harwood Academic, the Netherlands pp. 163-178.
- Pfohl-Leszkowicz, A.** (1999). Ecotoxicogénèse in : *Les mycotoxines dans l’alimentation, évaluation et gestion du risqué*, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17-35.
- Pfohl-Leszkowicz, A., &Castegnaro, M.** (2002). Rôle des mycotoxines dans le développement de certains cancers. *Toxines et recherche biomédicales*, collection SFET, Goudey-Pirričre, F., Bon Cassian, Puiseux-Dao, S. &Sauviat M6P (pp. 142-152).
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D.** (1997). *Fungi and Food Spoilage* Blackie Academic & Professional. New South Wales, Australia.
- Pitt, J. I.** (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical mycology*, 38(1), 17-22.
- Portelli, C.** (2005). Mycotoxines. *Bulletin veterinaire bimestriel-societeveterinaire pratique de france*, 89(1), 47.
- Raper K., Fennell D.J.**(1965). *The genus Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

- Riba, A.** (2008). Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière céréales en Algérie. Diplôme de Docteur en sciences biologiques. Option : Microbiologie. Soutenu le 13/12/2008 à l'UMMTO, Algérie.
- Riley, R. T.** (1998). Mechanistic interactions of mycotoxins: Theoretical considerations. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* Marcel Dekker, Inc., New York, 227-253.
- Shinha, K. K., & Bhatnagar, D. (1998). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. CRC Press.
- Roquebert, M. F.** (1998). Taxonomie des moisissures; Méthodes de culture et techniques d'observation; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, 39-95.
- Samson, R. A., Hong, S. B., & Frisvad, J. C.** (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44(1), 133-148.
- SANOFI** (1999). Les maladies contagieuses des volailles, France, 12 p.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., & Carnaghan, R. B. A.** (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts.
- Shirley, HV., & Tohala, SH.** (1983). Ochratoxicosis in Laying hens. 1982 Annual Science Progress report 83-08. University of Tennessee Agriculture experiment Station.
- Tabuc, C.** (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines diplôme de docteur en pathologie, mycologie, génétique et nutrition soutenu le 6 décembre 2007.
- Tarr, B.** (2003). Les moisissures et les mycotoxines - précautions à observer en cas de présence de blé contaminé par des moisissures et des mycotoxines dans l'alimentation des ruminants, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales, site page <http://omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/herd/food/mico1.htm>, consulté le 5-5-2012.
- VDLUFA.** (2007). Standard operating procedure for identifying bacteria, yeasts, moulds and dematiaceae as product-typical and spoilage indicating microorganisms in feeds. In *VDLUFA Method Book III, Suppl. 7* (ch. 28.1.3., 11 p).
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A. K., & Telang, A. G.** (2005). Effects of aflatoxin B 1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 607-615.
- Whitlow, L., & Hagler, W.** (2002). Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University. Department of Animal Science.
- Yiannikouris, A., & Jouany, J. P.** (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51(2), 81-99.







Zinedine, A. (2009). Détermination des mycotoxines dans les aliments commercialisés au Maroc et étude sur les bactéries lactiques et leur pouvoir de conservation et de biotransformation. Diplôme d'habilitation à Diriger des Recherches. INRA, Toulouse, France.

Annexe I**1. Appareillage**







- Les appareils utilisés dans Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

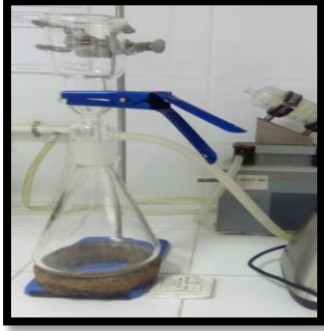

<p>pH-mètre (Corning- EEL modèle 109)</p>	
<p>Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)</p>	
<p>Microscope photonique : Motic BA210</p>	
<p>Autoclave</p>	

ANNEXES

<p>Etuve (Heraeus).</p>	
<p>Centrifugeuse</p>	
<p>Cuve d'électrophorèse</p>	
<p>plaques de gel de silice-60 254F (Merck)</p>	
<p>lampe UV (254 nm; 365 nm).</p>	
<p>Micro-seringue</p>	

ANNEXES

<p>Balance de précision (OSI, M-220 D, Dnver Instrument).</p>	
<p>Blinder</p>	
<p>Agitateur orbital Heidolph unimax 2010</p>	
<p>Micropipette</p>	
<p>Bain-marie (Bioblock Scientific, Polystat I ref. 33194 220 V)</p>	
<p>Shaker</p>	

Buchner	
Dispositif des colonnes d'immuno-affinité	

2. Les solvants


Méthanol(CH_3OH), éthanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), tampon phosphate salin (PBS), chloroforme (CHCl_3), acétone ($\text{CH}_3\text{CO CH}_3$)

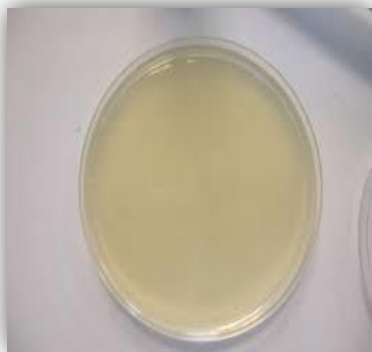
Le tampon phosphate salin

(souvent abrégé **PBS**, de l'anglais phosphate buffered saline) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. En général, la concentration de ces sels est celle du corps humain (isotonicité). Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter.

ANNEXE II

 Compositions des milieux utilisés

Milieu	Composition
<p data-bbox="264 573 624 692">Milieu d'isolement DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar) :</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="826 573 1366 611">- Glucose.....10 g <li data-bbox="826 629 1366 667">- Peptone5 g <li data-bbox="826 685 1366 723">- KH₂PO₄.....1 g <li data-bbox="826 741 1366 779">- MgSO₄,7H₂O.....0,5 g <li data-bbox="826 797 1366 835">- Rose Bengale.....25 mg <li data-bbox="826 853 1439 943">- Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline).....2 mg <li data-bbox="826 960 1439 1050">- Chloramphénicol.....100 mg <li data-bbox="826 1068 1366 1106">- Aga.....15 g <li data-bbox="826 1124 1366 1214">- Eau distillée.....1000 ml <li data-bbox="826 1232 1102 1270">- pH final 5,6 ± 0,2 <li data-bbox="826 1288 1439 1377">- Le rose Bengal est additionné sous forme solubilisée à raison de 0,5 ml/litre de milieu d'une solution de 5% dans l'eau. <li data-bbox="826 1395 1439 1485">- Le dichloran est additionné sous forme solubilisée à raison de 1ml/litre de milieu d'une solution de 0,2% dans l'éthanol.

**CYA (Czapek Yeast extract
Agar) :**

- Saccharose 30 g
- Extrait de levure ... 5 g
- Czapek concentré10 ml
- K₂HPO₄ 1 g
- Agar15 g
- Eau distillée1000 ml
- pH final= 6,2 ± 0,2

➤ Czapek concentré :

- NaNO₃30 g
- KCl5 g
- MgSO₄, 7H₂O5 g
- Fe SO₄, 7H₂O0,1 g
- Zn SO₄, 7H₂O0,1 g
- Cu SO₄, 5 H₂O0,05 g
- Eau distillée100 ml

**PDA (Pomme de terre,
Dextrose, Agar) :**

- Pomme de terre200 g
- Agar15 g
- Glucose20 g
- Eau distillée1000 ml
- pH final 5,6 ± 0,2

CAM (Coconut Agar Medium)



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

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

ANNEXE III

✚ Résultat du RH (%) des différents échantillons de matière première et l'aliment composé.

Maïs en grain et maïs en poudre	HR
C	7.78
MAT	8.06
M	8.69
MPT	9.83
MPS	9.09
S	6.83
T	7.05
L'orge	HR
AO	7.60
Tourteaux de soja	HR
TSB	10
TSAT	9.40
TSG	9.78
TST	9.76
TSS	10.11
Son de blé	HR
SAT	10.17
SBB	10.95
SG	9.78
ST	10.20

L'aliment composé granulé	% HR
ADB	9.18
AFGB	9.40
AFGBE	9.36
AFAT	9.78
ACB	8.54
L'aliment composé farine	% HR
ABT	9.34
ACQG	9.16
ACF	9.54
ADBE	8.91
AFK	9.30
APAT	9.18
ACAT	9.78
APRAT	8.80
APRB	9.76
APB	8.76
ACQB	9.98

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

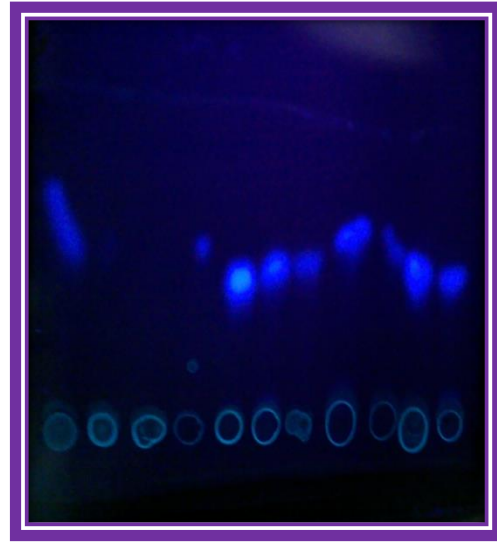
Maïs en grain et maïs en poudre	pH
M17	6,35
M18	6,34
M19	6,46
ME	6,42
MM	6,52
M	6,35
MPT	6,26
MPS	6,42
S	6,11
T	6,55
Tourteaux de soja	pH
TSB	6,73
TSAT	6,64
TSG	6,71
TST	6,68
TSS	6,74
TSK	6,59
TSE	6,41
Son de blè	pH
SAT	6,61
SBB	6,55
SG	6,47
ST	6,55
SBM	6,48
SBK	6,69
SBE	6,50

L'aliment composé granulé	pH
ADB	6,37
AFGB	6,38
AFGBE	6,30
AFAT	6,08
ACB	6,47
AFGM	6,14
FDN	6,44
CCB	6,55
DDN	6,52
L'aliment composé farine	pH
ABT	6,07
ACQG	6,13
ACF	5,93
ADBE	6,14
AFK	6,44
APAT	6,12
ACAT	6,17
APRAT	5,90
APRB	6,62
APB	6,47
ACQB	6,34
ADG	6,38
AFS	5,67
ACK	6,39
AFK2	6,56
CDE	6,17
CHM	6,40
PRS	6,32

ANNEXE IV



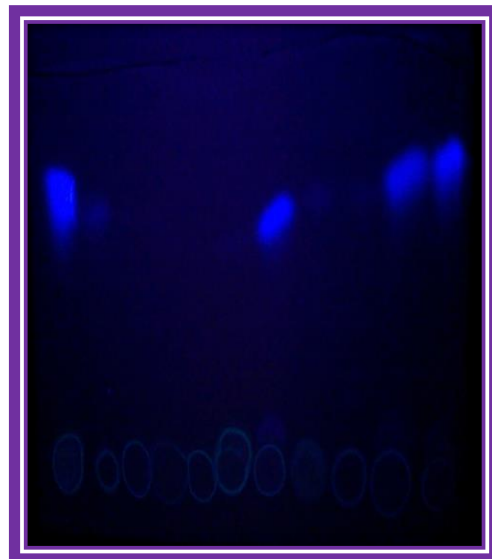
Plaque 1



Plaque 2



Plaque 3



Plaque 4

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