



جامعة عباس لغرور خنشلة  
ABBES LAGHROUR UNIVERSITY KHENCHELA



جامعة عباس لغرور خنشلة  
ABBES LAGHROUR UNIVERSITY KHENCHELA

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERHCE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA  
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

**Département De Biologie Moléculaire Et Cellulaire**  
Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de  
Master académique en biologie  
**Option : Microbiologie Appliquée**  
**Thème**

**Recherche et caractérisation des *Aspergillus* aflatoxinogènes  
dans les aliments de volailles**

**Présenté par :**

**Chehba Noura**

**Hout Bisma**

**Khaldi Chahira**

**Devant le jury :**

**Présidente Dr : Mezhoud. A MCB Université de Khenchela**

**Examinatrice Dr :Boutarfa.S MCB Université de Khenchela**

**Promotrice Dr : Azzoune.N MAA Université de Khenchela**

**Année Universitaire : 2023/2024**

## Remerciement

Tout d'abord, louange à « **ALLAH** » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail, m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes et m'a donné la volonté et le courage. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti. Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à madame **Azzoune Nadia** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.

Nos vifs remerciements à madame **Mazhoud Amel**, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire. Un Merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire **Boutarfa Soumia** pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Je tiens à remercier le professeur **Benghanem Mohammed Monsef** pour son aide, son soutien et ses encouragements constants, qui ont été d'une valeur inestimable.

Nos vifs remerciements à Mme **RAISLINDA** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire. Un Merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Un grand merci à **Mizan Sara** ingénieur de laboratoire de microbiologie pour son aide et ses conseils et ses interventions lors des observations au microscope.

Ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien actif des membres de ma famille. Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Résumé:

Les aliments de volaille constituent un substrat préférable pour les moisissures qui peuvent provoquer une altération technologique et sanitaire induisant un risque accru de contamination croisée par les mycotoxines, leur danger toxique et cancérigènes pour l'homme et l'animal. A cet effet, l'objectif de ce travail est d'étudier les populations d'*Aspergillus* section Flavi aflatoxinogènes et d'évaluer le pouvoir producteur d'aflatoxines (AFs) des isolats appartenant au genre *Aspergillus*.

Dans ce travail nous avons étudié la contamination des aliments complets de volaille par les populations d'*Aspergillus* section *Flavia* flatoxinogènes et d'évaluer le niveau de contamination de ce genre dans les échantillons commercialisés. Pour cela, un total de 40 échantillons d'aliments a été collecté au niveau des marchés les plus fréquentés des 4 régions Est d'Algérie ( Khenchela ,Batna, Oum el bouagi et Tébessa)

La démarche générale qui a été adoptée consiste l'isolement et le dénombrement des moisissures .Les principaux genres et espèces potentiellement toxigènes sont identifiés morphologiquement et la fréquence du genre *Aspergillus* a été déterminée. Les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* ont été identifiés selon leurs caractères morphologiques et chimiotypiques (production d'aflatoxines, de sclérotés et d'acide cyclopiazonique). Le screening des isolats aflatoxinogènes a été réalisé sur un milieu de culture à base d'extrait de noix coco (CAM) pour 20 isolats. La production est ensuite confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM).

Les résultats d'analyse fongique de 40 échantillons ont montré que la densité de la flore fongique est comprise entre (65,8% et 17,8% UFC/g). La plus forte densité (65,8% UFC/g) a été enregistrée dans les échantillons de Mais. Les principaux genres fongiques isolés sont *Aspergillus* et *Penicillium* et *Fusarium*. *Aspergillus* a été isolé dans tous les échantillons avec des taux allant de (43,4 à 25%) soit une moyenne de (34,2%). *Aspergillus* section *Flavi* et *Aspergillus* section *Nigri* représentent (38,8% et 30%) du genre *Aspergillus*, respectivement).

L'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines a révélé un taux d'isolats aflatoxinogènes de (75%). Un isolat produit les 2 AFs (AFB, AFG). Un taux de production de CPA de (66,66%) a été obtenu.

L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des caractères morphologiques et chimiotypiques des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* indique que cette section est dominée par l'espèce *A. flavus* (60%). Un isolat d'*A. parasiticus* a été isolé.

**Mots-clés :** aflatoxines, *Aspergillus* section *Flavi*, *fusarium*, aliment, volaille, Algérie

## **Abstract:**

Poultry feed is a preferable substrate for molds, which can cause technological and sanitary deterioration, leading to an increased risk of cross-contamination by mycotoxins and their toxic and carcinogenic hazards for humans and animals. To this end, the aim of this work is to study populations of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* and to assess the aflatoxin (Afs) producing capacity of isolates belonging to the *Aspergillus* genus.

In this work, we studied the contamination of whole poultry feeds by populations of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* and assessed the level of contamination of this genus in marketed samples. To this end, a total of 40 food samples were collected from the busiest markets in the 4 eastern regions of Algeria (Khenchela, Batna, Oum el Bouagi and Tebessa). The general approach adopted was to isolate and count molds. The main potentially toxigenic genera and species were identified morphologically, and the frequency of the *Aspergillus* genus was determined. Isolates of *Aspergillus* section *Flavi* were identified on the basis of morphological and chemotypic characteristics (production of aflatoxins, sclerotia and cyclopiazonic acid). Screening of aflatoxigenic isolates was carried out on a coconut extract-based culture medium (CAM) for 20 isolates. Production was then confirmed by thin-layer chromatography (TLC).

The results of fungal analysis of 40 samples showed that the density of fungal flora ranged from ( 65.8% to 17.8 % CFU/g). The highest density (65.8% CFU/g) was recorded in Mais samples. The main fungal genera isolated were *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Aspergillus* was isolated in all samples at rates ranging from (43.4 to 25%), with an average of ( 34.2%). *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus* section *Nigri* represent (38.8% and 30%) of the *Aspergillus* genus, respectively.)

A study of aflatoxin-producing capacity revealed a rate of aflatoxinogenic isolates of (75%). One isolate produced both AFs (AFB, AFG). A CPA production rate of (66.66%) was obtained.

The overall results for morphological and chemotypic characteristics of *Aspergillus* section *Flavi* isolates indicate that this section is dominated by the species *A. flavus* (60%). One *A. parasiticus* isolate was isolated.

**Keywords** :aflatoxines, *Aspergillus* section *Flavi*, *fusarium*, food , poultry, Algérie

## ملخص

تُعد أعلاف الدواجن ركيزة مفضلة للعفن، والتي يمكن أن تسبب تدهورًا تقنيًا وصحيًا، مما يؤدي إلى زيادة خطر التلوث بالسموم الفطرية، التي تعتبر سامة ومسرطنة للإنسان والحيوان. ولهذا الغرض، فإن الهدف من هذا العمل هو دراسة تجمعات الأفلاتوكسينات الأفلاتوكسية (الأفلاتوكسينات) من جنس *Asspergillus Flavi* وتقييم قدرة إنتاج الأفلاتوكسينات (Afs) للعزلات التي تنتمي إلى جنس *Asspergillus*

في هذا العمل، قمنا بدراسة تلوث أعلاف الدواجن الكاملة بمجموعات من فصيلة الأفلاتوكسينيك الأفلاتوكسينية من فصيلة الأفلاتوكسيلوس فلافي و قمنا بتقييم مستوى تلوث هذا الجنس في العينات المسوقة. تم جمع ما مجموعه 40 عينة غذائية من أكثر الأسواق ازدحاماً في 4 مناطق شرق الجزائر (خنشلة وباتنة وأم البواقي وتبسة).

وكان النهج العام المتبع هو عزل العفن وعدّ الفطريات. تم تحديد الأجناس والأنواع الرئيسية المحتملة التسمم من الناحية المورفولوجية وتم تحديد تواتر جنس *Asspergillus*. تم التعرف على عزلات الفصيلة *Asspergillus Flavi* على أساس خصائصها المورفولوجية والكيميائية (إنتاج الأفلاتوكسينات والأفلاتوكسينات المتصلبة وحمض السيكلوبيازونيك). تم إجراء فحص للعزلات الأفلاتوكسينية على وسط استزراع قائم على مستخلص جوز الهند (CAM) ل 20 عذلة. ثم تم التأكد من الإنتاج بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).

أظهرت نتائج التحليل الفطري لـ 40 عينة أن كثافة النباتات الفطرية تراوحت بين 65.8% إلى 17.8% من وحدة فطرية/غرام. وسُجلت أعلى كثافة (CFU/65.8 % غرام) في عينات الميس. كانت الأجناس الفطرية الرئيسية المعزولة هي *Asspergillus* والبنسليوم والفوزاريوم. تم عزل *Asspergillus* في جميع العينات بنسب تتراوح بين (43.4 إلى 25%) بمتوسط (34.2%). مثل قسم *Asspergillus Flavi* وقسم *Asspergillus* النيجري (38,8% و 30% من جنس *Asspergillus* على التوالي)

كشفت دراسة للقدرة على إنتاج الأفلاتوكسين عن معدل للعزلات المسببة للأفلاتوكسين بنسبة (75%). أنتجت إحدى العزلات اثنين من الأفلاتوكسينات الأفلاتوكسينية (AFB)، (AFG) كما تم الحصول على معدل إنتاج (66.66%) من الأفلاتوكسينات الأفيونية.

تشير جميع النتائج المتعلقة بدراسة الخصائص المورفولوجية والكيميائية لعزلات *Asspergillus* في القسم *Flavi* إلى أن هذا القسم يهيمن عليه نوع *A. flavus* (60%). وعُزل نوع واحد من *A. parasiticus*.

الكلمات المفتاحية : أفلاتوكسين، *Aspergillus section Flavi*, الأكل , الدواجن , الجزائر

# Table de matières

---

## Table de matières

Table de matières .....	6
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures: .....	10
Liste des tableaux.....	11
Introduction générale .....	13

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1:les moisissures: .....	16
I. Généralités sur les champignons .....	16
I-1/Ecologie de champignons: .....	16
I.2 La pathogénicité des champignons : .....	17
I.3 Taxonomié et classification: .....	17
I.3.1.la chimiotaxonomie:.....	20
I.3.2. Méthodes moléculaires: .....	20
Chapitre 2:Le genre Aspergillus: .....	21
1/Définition: .....	21
2/Caractères morphologiques d'identification:.....	22
3/Description macroscopiques:.....	23
4//Description microscopiques:.....	24
5 .Aspergillus section flavus: .....	24
6. Aspergillus section flavi: .....	25
Chapitre 3 : Les aflatoxines .....	27
II.1. Définition.....	27
II.2. L'origine .....	27
II.2.1.Aspergillus flavus .....	28
II.2.2.Aspergillus parasiticus .....	29
II.2.3. Section Flavi .....	30
II.4.Les propriétés physico-chimiques.....	31
II.5. Le métabolisme des aflatoxines.....	32
II.6.Toxicité .....	33
II.6.2. Toxicité chronique.....	33
II.7.Les effets des aflatoxines .....	34
II.8.Effets de l'AFB1 sur la santé des volailles .....	34
II.8. Transfert dans les produits animaux.....	35

# Table de matières

II.8.1. La contamination des productions carnées .....	35
II.8.2.L'exposition de l'homme .....	35
II.8.2.La contamination du lait et des produits laitiers .....	36
Chapitre 4 : les mycotoxines .....	37
1. Définition : .....	37
2. Mycotoxinogénèse .....	38
3. Facteurs affectant la mycotoxinogénèse .....	39
3.1. Facteurs intrinsèques : .....	39
3.2. Facteurs extrinsèques (facteurs environnementaux) : .....	39
4. Contamination des aliments par les mycotoxines .....	41
5. Impacts des mycotoxines sur les animaux .....	42
6. Effets des mycotoxines sur la santé et les performances des volailles .....	43
6.1. Exposition unique .....	44
7. Réglementation relative aux mycotoxines .....	45
8-Identification biochimique .....	45
8-1. Production de l'acide cyclopiazonique .....	45
8-2.Production des sclérotés .....	46

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

I.1.Objectif de ce travail .....	48
I.2.Date et lieu de travail .....	48
I.3. Les milieux de culture .....	48
I.4. Souches de référence .....	48
I.5. Appareillage et produits chimiques .....	48
I.5.1. Appareillage .....	48
I.5.2. Les produits chimiques et les solvants utilisés dans cette étude sont les suivants : .....	49
II.Méthode : .....	49
II.1.Collections des échantillons .....	49
II.2 .Méthode de prélèvement .....	49
II.3. Nature des prélèvements .....	50
II.4.Matière première : .....	50
III. Isolement de la flore fongique .....	50
III.1. Isolements et dénombrement de la flore fongique .....	50
III.2.Repiquage et purification .....	50
III.3. Identification des isolats fongiques .....	51

# Table de matières

III.3.1. Identification macroscopique .....	51
III.3.2. Identification microscopique .....	52
IV. Etude de la production des aflatoxines.....	52
IV.1.Détection de la fluorescence sur milieu de culture.....	52
IV.2.Extraction des AFs à partir de milieu de culture.....	53
IV.3. Détection et confirmation des AFspar chromatographie sur couche mince.....	54
V. Production et détection de l'acide cyclopiazonique et des sclérotés.....	55
V.1.Détection de la production de l'acide cyclopiazonique (CPA) .....	55
V.2.Production des sclérotés .....	55

## RÉSULTAT

I. Analyse fongiques des échantillons .....	57
1. Isolement et dénombrement de la flore fongique .....	57
1.1. Dénombrement par la méthode suspension-dilution.....	57
2. Identification morphologique des moisissures.....	58
2.1.Reconnaissance des principaux genres fongiques .....	58
2.2.Distribution des principaux genres fongiques .....	59
2.3.Distribution des isolats d'Aspergillus section Flavi et d'Aspergillus section Nigri .....	60
2.4.Incidence des isolats d'Aspergillussection Flavi aflatoxinogènes dans les échantillons Analysés : .....	61
II. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines, d'acide cyclopiazonique et de sclérotés.....	63
1. Les souches aflatoxinogènes isolées des échantillons de volaille .....	63
2. Production de l'acide cyclopiazonique (CPA) .....	64
3.Etude de la production des sclérotés .....	64
4.Caractérisation des Aspergillus section flavi en fonction de la production d'AFS, de CPA et des Sclérotés .....	65

## DISCUSSION

Discussion.....	67
Conclusion.....	72
Annexes .....	75
Les références.....	79

## Liste des abréviations

---

### Liste des abréviations:

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**AFS**:Aflatoxines

**AFB**:Aflatoxine Blue

**AFG**:Aflatoxine Green

**AFM** : Aflatoxine Milk

**AW** : Activité de l'eau.

**FAO** : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

**OTA** : Ochratoxine A

**OTB**:Ochratoxine B

**OTC** : Ochratoxine C

**PH**: Potentiel Hydrogène.

**UV** : Ultra Violet.

**NACL** : Hypochlorite de sodium

**NH<sub>4</sub>OH** : Amoniac.

**µg**: Microgramme.

**CAM**: Coconut Agar Medium

**CCM**: Chromatographie sur Couche Mince

**CPA**: Acide Cyclopiazonique

**µm**: Micromètre.

**CYA**: CzapeckYeastExtract Agar

**kg**: kilogrammes

**STC**: Stérigmatocystine.

**PCR**: Polymerase Chain Reaction.

**PDA**: Potato, Dextrose, Agar

**cm**: Centimètre.

°C = Degré Celsiues

% = Pourcentage

**IgA ,IgG, IgM**: Immunoglobulin G, M, A

**NACL** : Hypochlorite de sodium

## Liste des figures

### Liste des figures:

Titre	Page
Figure 1:Cladogramme montrant les lignées majeures des champignons	<b>19</b>
Figure 2:Exemples de noms de champignons nommés d'après leurs formes asexuée et sexuée: <i>Microsporumcanis</i> = <i>Arthrodermaotae</i> <i>Histoplasma</i> <i>capsulatum</i> = <i>Ajellomycescapsulata</i> <i>Cryptococcusneoformans</i> = <i>Filobasidiellaneoformans</i>	<b>20</b>
Figure 3 : Représentation schématique d'une têteaspergillaires	<b>22</b>
Figure 4 : Cycle fongique des champignons du genre <i>Aspergillus</i>	<b>23</b>
Figure 5:Aspect macroscopique des souches fongiques sur le milieu PDA agar de 7jours	<b>24</b>
Figure 6:Aspect microscopique des trois souches fongiques à grossissement X40'aspergillus sp1,d'aspergillus sp2,d'aspergillus sp3	<b>25</b>
Figure 7: Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i>	<b>26</b>
Figure 8:Taxonomy of <i>Aspergillus</i> section Flavi and their production of aflatoxins	<b>27</b>
Figure 9 :Structure morphologique du genre <i>Aspergillus</i>	<b>29</b>
Figure 10 : <i>Aspergillus flavus</i>	<b>30</b>
Figure 11 : <i>Aspergillus parasiticus</i>	<b>30</b>
Figure 12 :Facteurs affectant la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaineet animale	<b>32</b>
Figure 13: Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour l'analysefongique	<b>33</b>
Figure 14: Schéma du protocole d'extraction des aflatoxines à partir des isolats cultivés surmilieuCAM	<b>38</b>

## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux

<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Tableau 1. Les formules brutes des principales aflatoxines	<b>31</b>
Tableau 2. Mycotoxines sécrétées par les principaux genres de moisissures	<b>37</b>
Tableau 3. Températures et activités de l'eau optimales pour la production des mycotoxines	<b>39</b>
Tableau 4. Teneurs maximales réglementées ou recommandées en mycotoxines, dans les Aliments pour volailles	<b>43</b>
Tableau 5. codes des échantillons prélevés	<b>49</b>
Tableau 6. Densité de la flore fongique totale dans les échantillons de matière primaires	<b>58</b>
Tableau 7. Répartition des isolats aflatoxinogènes dans les 40 échantillons	<b>63</b>

# **Introduction générale**

# Introduction générale

---

## Introduction générale

Les champignons microscopiques ou moisissures provoquent d'énormes dégâts d'ordre sanitaire et économique chez le végétal, l'animal et l'Homme. Ces microorganismes peuvent être des agents phytopathogènes et des agents d'altération des produits alimentaires.

Les mycotoxines sont des métabolites toxiques produits par différentes espèces fongiques au cours de leur développement. Des moisissures peuvent être présentes sur les céréales, qui, de par leur composition et leurs conditions de culture, représentent un substrat particulièrement sensible à la contamination par les mycotoxines. Les volailles, du fait de la part importante de céréales dans leur alimentation, sont des espèces qui peuvent être fréquemment exposées aux mycotoxines.

Les effets potentiels indésirables des mycotoxines chez les volailles sont nombreux tels que des effets hépatotoxiques, néphrologiques, dermatotoxiques ou reprotoxiques. À ces effets manifestes sur la santé s'ajoutent des effets indésirables plus discrets tels une toxicité digestive, un effet immunomodulateur et des altérations de performances dont l'importance est plus difficile à évaluer. Les manifestations toxiques observées lors de la présence de mycotoxines dans les aliments dépendent en effet des mycotoxines en cause mais aussi du niveau d'exposition (dose, durée).

Les aflatoxines font partie des mycotoxines les plus toxiques et sont produites par certaines moisissures *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* qui se développent sur le sol, la végétation en décomposition, le foin et les graines. Les récoltes souvent touchées sont les céréales, les graines oléagineuses, les épices et les fruits secs oléagineux. Les principales aflatoxines produites dans les aliments sont, les aflatoxines B1, B2, G1 et G2. L'aflatoxine B1 (AFB1) est considérée comme la plus toxique et la plus abondante.

La gestion du risque passe donc par la prévention de la contamination des matières premières, le respect des bonnes pratiques de culture et de stockage, ainsi que la mise en place d'une réglementation fixant des concentrations maximales admissibles dans les denrées alimentaires.

Afin d'analyser les risques de contamination par les mycotoxines et de définir les mesures permettant de les maîtriser, il est nécessaire d'étudier d'une manière approfondie les espèces fongiques toxinogènes, d'évaluer leurs capacités de production des mycotoxines dans les

## Introduction générale

---

produits. Le genre *Aspergillus* est à l'origine de la contamination des aliments de volailles par les aflatoxines.

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs principaux se résument dans les volets suivants :

- Collecte des informations sur la contamination des aliments des volailles par les moisissures.
- Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* ayant la capacité à produire des aflatoxines.
- Confirmation de la production d'aflatoxine par les isolats sur milieu CAM et par CCM et caractérisation chimio-morphologique des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

Ce travail, structuré en trois chapitres, est présenté ainsi :

- Dans le premier chapitre intitulé « revue bibliographique », nous donnerons l'état actuel des connaissances sur les mycotoxines et en particulier les AFs et les espèces productrices qui font l'objet de notre étude. Une partie de ce chapitre, est consacrée aux généralités sur les moisissures et les mycotoxines. Dans la deuxième partie nous mettrons l'accent sur les champignons producteurs d'AFs du point de vue systématique. Des détails sur les AFs seront traités dans la troisième partie.
- Les méthodes d'isolement, de l'étude du pouvoir producteur d'AFs, de caractérisation chimio-morphologique des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* seront présentés dans le chapitre matériel et méthodes.
- Un chapitre est consacré aux résultats obtenus et à leur discussion et nous terminons par une conclusion et des perspectives.

# **Revue bibliographique**

## Chapitre 1:les moisissures:

### I. Généralités sur les champignons

Les moisissures ou champignons filamenteux sont des microorganismes environnementaux responsables d'infections chez l'homme. Les atteintes sont variées, depuis l'infection cutanée ou unguéale chez le patient immunocompétent jusqu'aux formes invasives ou disséminées diagnostiquées chez des patients immunodéprimés. Toutefois leur caractère environnemental qui se traduit par la présence de spores dans l'air ambiant leur confère également un rôle de contaminant des milieux de cultures. **(Gangeaux et al, 2023)**

Les moisissures sont des organismes microscopiques omniprésents qui se développent sous forme de filaments et comprennent de nombreuses espèces. Elles sont souvent associées à une texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, observable sur des aliments stockés depuis un certain temps ou dans des environnements humides. Les moisissures pruisent des spores, des structures de reproduction invisibles à l'œil nu qui peuvent se propager dans l'air. Elles peuvent également générer des substances chimiques telles que les mycotoxines, restant à l'intérieur des spores ou se libérant dans les matériaux colonisés, ainsi que des composés organiques volatils pouvant être libérés dans l'air. **(Naili et al, 2009)**

#### I-1/Ecologie de champignons:

Les champignons sont des organismes eucaryotes (ils possèdent un vrai noyau), sans chlorophylle et à une talle, ils sont hétérotrophes et utilisent la source de carbone de l'extérieur pour faire la synthèse de leur composé. **(Benhanem, 1977)**.

Les champignons sont aérobies, en générale, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) et mésophiles (température optimale 20-30°C) **(Benhanem, 1977)**. Ils jouent en effet un rôle crucial dans de nombreux écosystèmes, en établissant divers types d'interactions avec les espèces animales et végétales. Leurs métabolites secondaires ont également un potentiel énorme dans divers domaines, tels que l'agriculture, la biotechnologie, l'environnement et la santé. Leur utilisation dans les processus biotechnologiques pour la synthèse d'acides comme l'acide citrique et gluconique, ainsi que pour la production d'enzymes telles que les protéases et les pectinases, démontre leur importance dans ces domaines **(Nicklinet et al, 2000)**.

Dans la nature, les champignons se développent le plus souvent comme des microorganismes saprophytes. Ils participent à la dégradation et au recyclage de la matière et minérale,

présentent une grande diversité d'adaptations qui leur permettent de coloniser divers habitats, qu'ils soient terrestres ou aquatiques, dans des environnements allant des régions tropicales aux régions polaires. Leur capacité à supporter des conditions extrêmes telles que la sécheresse, l'humidité, les pressions osmotiques élevées et même des températures très chaudes ou très froides leur permet de prospérer dans une variété de milieux, y compris les composts chauds, les toundras arctiques, les hautes montagnes et même les chambres réfrigérées (Batton et al, 1990).

Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée.

### **I.2 La pathogénicité des champignons :**

Plus de 100 000 espèces connues, Elles sont pour la plupart saprophytiques, moins de 0,5 % sont reconnus pathogènes, Principaux obstacles à l'invasion des tissus : • Température élevée (37 °C) • Défenses cellulaires, Distribution géographique: parfois restreinte, parfois mondiale, Prévalence: très élevée pour certaines mycoses (dermatophytoses, candidose); faible pour d'autres, Contagiosité: exception faite des dermatophytoses et de cas rares de candidose et de pneumocystose, les mycoses sont très peu contagieuses, Mortalité élevée lorsque l'infection est invasive (Batton et al, 1990).

### **I.3 Taxonomié et classification:**

Les champignons sont en effet un groupe diversifié et écologiquement important, allant des organismes unicellulaires aux filaments mycéliens complexes. Leur paroi cellulaire chitineuse les distingue, et ils peuvent former des structures microscopiques comme des moisissures ou des macroscopiques comme des champignons. Les champignons inférieurs ont des hyphes siphonnées, tandis que les plus évolués ont des hyphes cloisonnées ou septées. Actuellement, les champignons sont divisés en 6 lignées majeures: *Dikarya*, *Mucoromycota*, *Zoopagomycota*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota* et *Opisthosporidia* (Philippe, 2021).

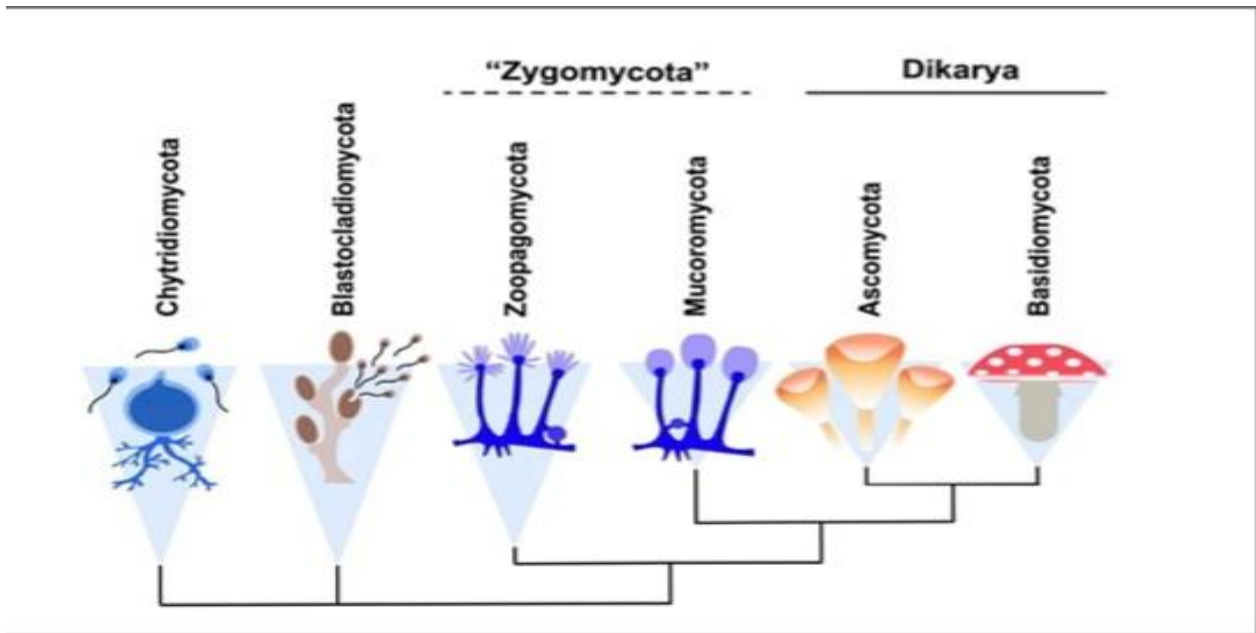


Figure 1. Cladogramme montrant les lignées majeures des champignons (Philippe, 2021).

## RÈGNE : FUNGI

	DIVISION	CLASSE	GENRE
SEXUÉE	ZYGOMYCOTA (mucoromycotina)  zygospore	Ordre : MUCORALES	<i>Rhizopus, Mucor, Lichtheimia</i>
	ASCOMYCOTA  asque	SACCHAROMYCETES  ASCOMYCETES	<i>Saccharomyces, Candida</i>  <i>Arthroderma (= dermatophytes)</i> <i>Ajellomyces (= Histoplasma, Blastomyces)</i>
	BASIDIOMYCOTA  baside	TREMELLOMYCETES	<i>Filobasidiella neoformans (=Cryptococcus neoformans)</i>
ASEXUÉE	FUNGI IMPERFECTI (DEUTEROMYCOTA)	BLASTOMYCETES	<i>Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Trichosporon</i>
	Attention! Classification taxonomique obsolète.	HYPHOMYCETES:	
		MONILIACEAE	<i>Aspergillus, Blastomyces, Coccidioides, Fusarium, Histoplasma, Microsporium, Trichophyton</i>
		DEMATIACEAE	<i>Alternaria, Cladosporium...</i>
	COELOMYCETES	<i>Phoma</i>	

**Figure 2:**Exemples de noms de champignons nommés d'après leurs formes asexuée et sexuée : *Microsporumcanis* = *ArthrodermaotaeHistoplasma* *capsulatum* = *Ajellomycescapsulata* *Cryptococcusneoformans* = *Filobasidiellaneoformans*. (Philippe, 2021)

La systématique des champignons est basée principalement sur des critères morphologiques. En pratique, la procédure la plus utilisée est la croissance d'isolats sur un milieu de culture approprié, ce qui permet de reconnaître les traits caractéristiques de ces isolats qui sont génétiquement stables et en général peu influencés par les changements environnementaux.

Cependant, dans certains cas, ces critères sont délicats à utiliser et requièrent une expérience particulièrement approfondie

### **I.3.1. la chimiotaxonomie:**

Il est fascinant de constater comment le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de classer les microorganismes en fonction de leurs caractéristiques biochimiques, en se basant sur l'étude de ces trois grandes classes principales de molécules : les métabolites primaires, les métabolites secondaires et les sémantides porteurs d'informations génétiques, tels que l'ADN, l'ARN et les protéines. Cela offre une compréhension plus approfondie de la diversité et de l'évolution des microorganismes (**Marjolaine et al, 2002**).

### **I.3.2. Méthodes moléculaires:**

Cette partie donne un aperçu des méthodes moléculaires utilisées en taxonomie fongique. Puisque le but de cette revue concerne avant tout les méthodes chimiques, cette partie n'est donc ni exhaustive ni très précise. Cependant, il est impossible de discuter de la taxonomie fongique sans citer les techniques moléculaires car celles-ci ont connu un progrès important et ont suscité un intérêt énorme grâce à l'émergence de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Les méthodes moléculaires sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total, dépendant du but poursuivi. Les méthodes utilisées dans l'étude de l'ADN total sont la détermination du contenu en bases guanine et cytosine de l'ADN nucléaire ou l'étude du taux d'hybridation de l'hétéroduplex ADN-ADN dont un brin appartient à l'organisme indéterminé et l'autre à un organisme de référence. Ce hétéroduplex est comparé à l'homoduplex des souches hybridées avec elles-mêmes. Les méthodes basées sur l'étude d'un gène ou de plusieurs gènes utilisent la technique PCR. Cette technique permet l'amplification de séquences spécifiques d'ADN via sa synthèse in vitro et l'obtention rapide et simple de microgrammes de l'ADN ciblé (**Marjolaine, 2002**).

## Chapitre 2:Le genre *Aspergillus*:

### 1/Définition:

Les champignons du genre *Aspergillus* sont saprophytes et cosmopolites. Les spores aspergillaires, ou conidies, sont ubiquitaires et retrouvées constamment en suspension dans l'atmosphère. (Philippe, 2021).

Les champignons du genre *Aspergillus*, dont la première description date de 1729, sont des moisissures saprophytes à filaments hyalins, cloisonnés, et sont haploïdes. Le genre *Aspergillus* appartient au groupe phylogénétique des Ascomycètes et à la famille des Trichocomaceae. Il comprend aujourd'hui quelques 185 espèces, dont une vingtaine retrouvées en pathologie humaine.

Les *Aspergillus* sont des moisissures présentes partout dans le monde, plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver. Ils ont un métabolisme aérobie et participent au recyclage du carbone et de l'azote de l'environnement. Ils sont thermophiles, pouvant survivre à des températures atteignant 70°C pour certaines espèces, et ne requièrent pas de nutriments spécifiques. (Desoubaux et al, 2020). Plusieurs espèces de ce genre sont capables de produire des mycotoxines.(Scheidegger et al,2003).

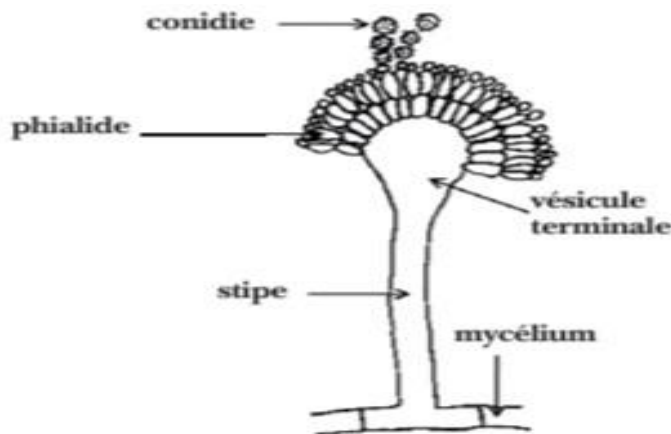
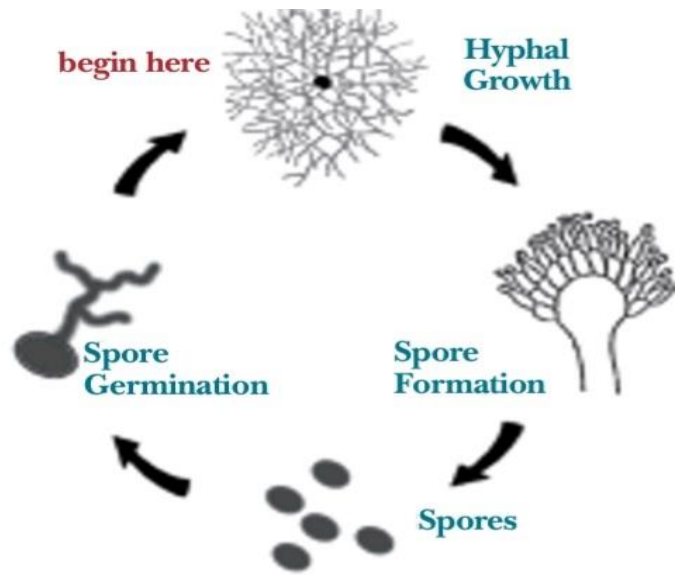


Figure03 : Représentation schématique d'une tête Aspergillaires. (Desoubaux et al, 2010).



**Figure 4 :** Cycle fongique des champignons du genre *Aspergillus* (Desoubeaux et al, 2010).

## 2/Caractères morphologiques d'identification:

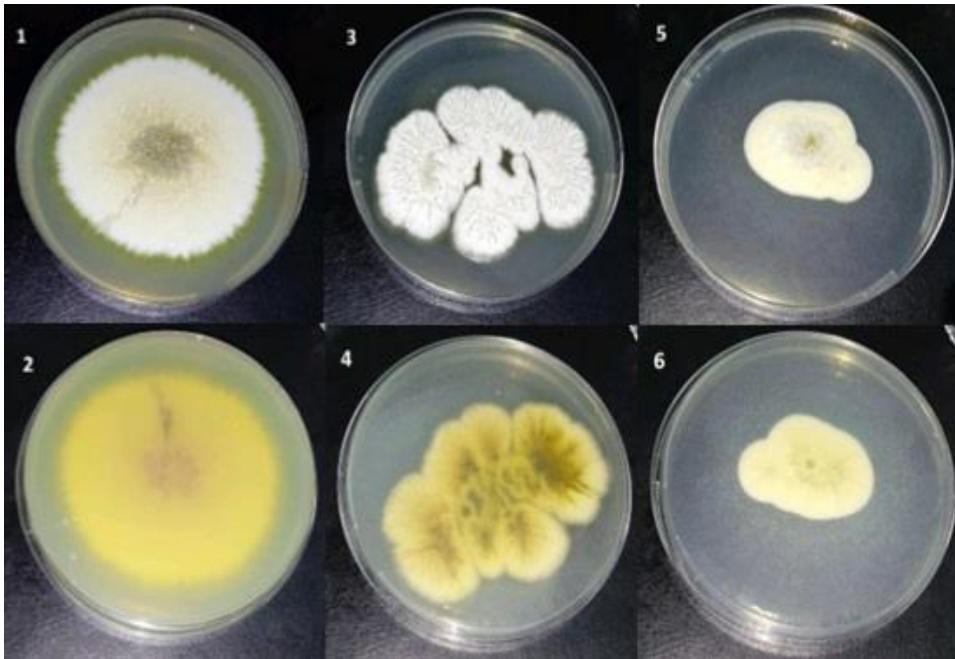
Effectivement, la classification et l'identification des champignons, y compris *Aspergillus*, ont traditionnellement reposé sur des caractères phénotypiques. Cependant, au fil des décennies, la caractérisation chimio-taxonomique et moléculaire a joué un rôle croissant dans cette démarche, offrant une précision accrue et des outils plus sophistiqués pour distinguer les espèces et comprendre leur phylogénie. (Bouti., 2021).

Les caractéristiques utilisées pour identifier les espèces de champignons, en particulier ceux du genre *Aspergillus*. Les caractéristiques macroscopiques telles que la couleur, la texture des colonies et les caractéristiques microscopiques comme la morphologie des conidies et des conidiophores sont essentielles dans ce processus d'identification. De plus, les caractéristiques des structures de reproduction sexuée, comme la taille et la morphologie des ascospores, sont également importantes pour différencier les espèces. (Bouti, 2021).

Les *Aspergillus* sont en effet caractérisés par leur thalle composé de filaments mycéliens hyalins, septés et ramifiés. À partir de ces filaments végétatifs, des conidiophores non cloisonnés se dressent et portent des vésicules variées, où se trouvent les cellules conidiogènes ou phialides (Bout, 2021).

### 3/Description macroscopiques:

L'aspect macroscopique des souches fongiques a été étudié après sept jours d'incubation sur milieu PDA (agar de pomme de terre). Ce type d'étude est couramment utilisé pour observer les caractéristiques visuelles des champignons cultivés en laboratoire. Il semble que la température idéale pour le développement des souches du genre *Aspergillus* se situe entre 22°C et 25°C, selon Chermete et Bussieras en 1993.



**Figure 5:**Aspect macroscopique des souches fongiques sur le milieu PDA agar de 7 jours. (Mansour, 2017)

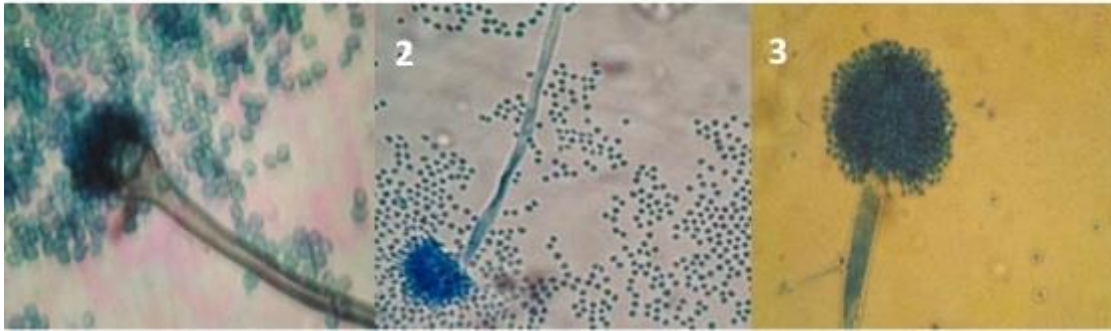
Les caractères utilisés comprennent la vitesse de croissance, la texture des colonies, le degré de sporulation, la production de sclérotés, les couleurs du mycélium, la production des pigments solubles et des exsudats. (Mimoune, 2017).

La couleur des colonies développant une teinte caractéristique, elle peut être brune, verte, jaune ou noir, selon les espèces ; le revers est en général incolore à jaune, il peut brunir ou rougir avec l'âge. (Zamoum, 2021).

Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique ou ovoïde. Suivant l'espèce, une ou deux rangées de stérigmates prend naissance sur les têtes. Sur ces stérigmates se forment et s'accumulent les spores en de très longues chaînes. (André, 2007).

### 4//Description microscopiques:

Les *Aspergillus* sont caractérisés par leur thalle végétatif composé de filaments mycéliens septés et ramifiés. L'identification spécifique du genre *Aspergillus* se fait souvent par l'observation des têtes aspergillaires lors de l'examen microscopique des colonies.



**Figure 6:** Aspect microscopique des trois souches fongiques à grossissement X40 *aspergillus* sp1, *d'aspergillus* sp2, *d'aspergillus* sp3. (Mansour, 2017).

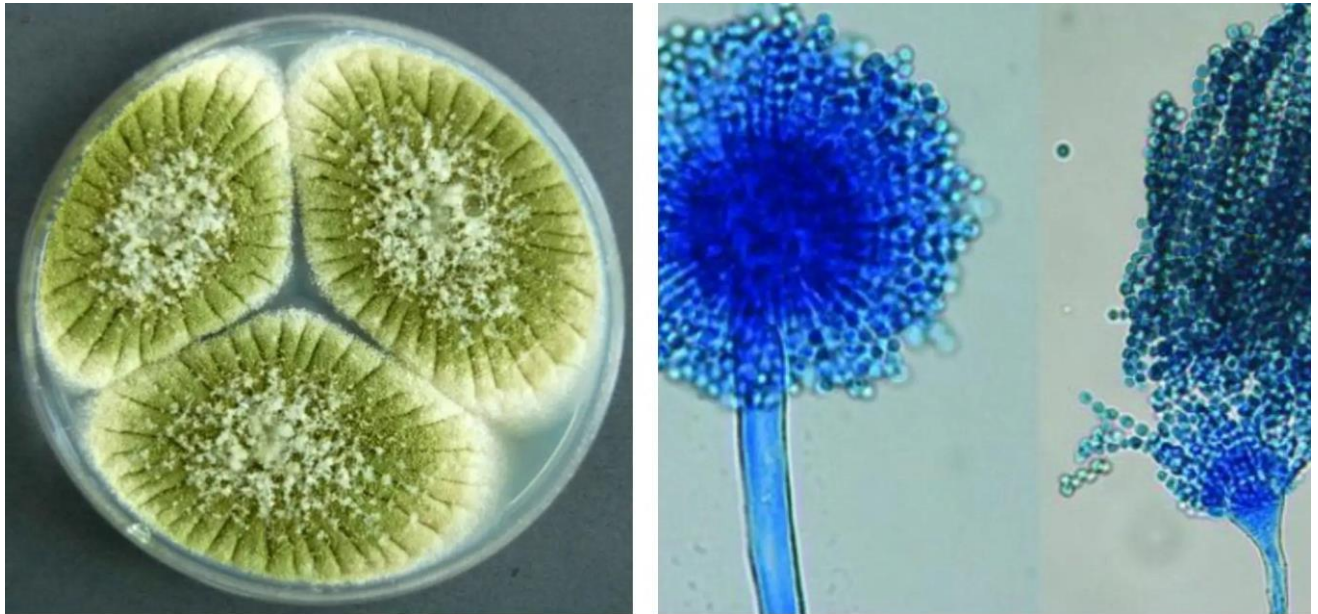
Filaments aspergillaires sont de diamètre fin (2 à 5  $\mu\text{m}$ ) et régulier, à bords parallèles. Ils sont cloisonnés par des septa. La paroi des hyphes est dite hyaline, c'est à-dire qu'elle reste claire, même en vieillissant. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) (Mimoun, 2017).

### 5 .*Aspergillus* section *flavus*:

*Aspergillus flavus* est un pathogène opportuniste des cultures. C'est important car il produit de l'aflatoxine comme métabolite secondaire dans les graines d'un certain nombre de cultures avant et après la récolte .C'est un pathogène des plantes, des animaux et des insectes, des maïs, de l'arachide et du coton. Dans le maïs, *A.Flavus* provoque la pourriture de l'épi, il provoque la pourriture de stockage dans de nombreuses cultures et il produit une mycotoxine hautement réglementée, l'aflatoxine B1. (Klich et al, 2007).

*Aspergillus flavus* est une espèce morphologiquement complexe classée en deux groupes en fonction de la taille de ses sclérotés. (Saori et al., 2021).

*Aspergillus Flavus* produit un nombre prodigieux de conidies aéroportées. Les échantillons d'air collectés dans les champs de coton à forte et faible teneur en aflatoxine ont montré un nombre plus élevé de propagules dans l'air provenant de champs à forte teneur en aflatoxine (52). (Urban et al., 1987).

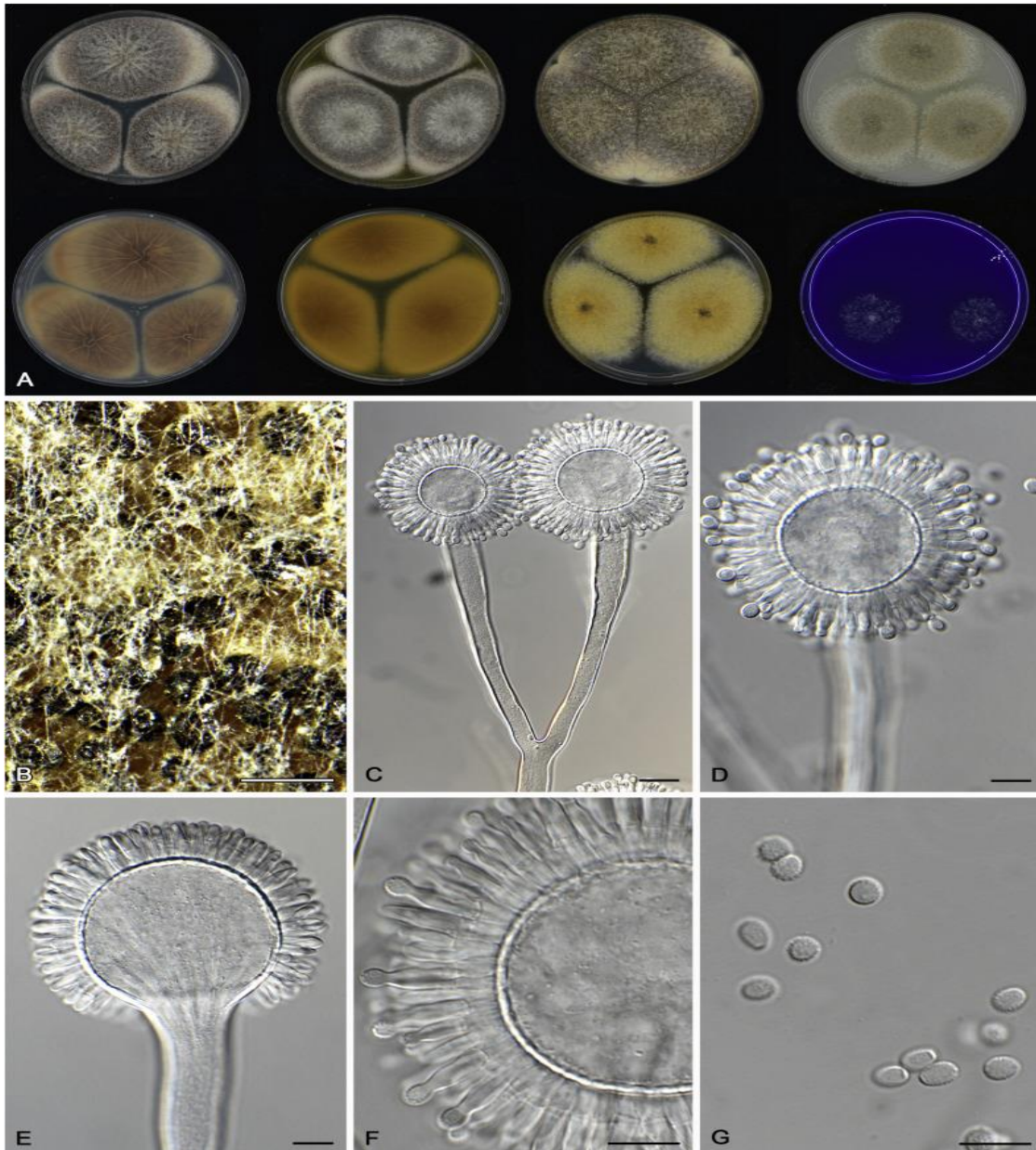


### *Aspergillus flavus*

**Figure 7:** Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus flavus*.

#### **6. *Aspergillus section flavi*:**

*Aspergillus section Flavi* comprend six espèces économiquement importantes qui sont très étroitement liées morphologiquement et phylogénétiquement, et qui sont souvent séparées en deux groupes en fonction de leur impact sur l'alimentation ou la santé humaine. Le premier groupe comprend *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*, qui peuvent causer de graves dommages aux produits alimentaires stockés tels que les grains de blé et de seigle, les noix, les épices et les arachides (Marie, 2010) Les espèces aspergillaires de la section *Flavi* sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 33°C (mimoune, 2018).



**Figure 8:** Taxonomie des *Aspergillus* section Flavi et leur production en aflatoxines (Frisvadet *al*, 2019).

## Chapitre 3 : Les aflatoxines

### II.1. Définition

Les aflatoxines sont des contaminants chimiques produites par les mycotoxines. Elles sont présentes naturellement et ont une large distribution et un haut pouvoir contaminant (Yaro et al. 2020).

Ils sont des dérivés de la coumarine produits par diverses moisissures, surtout *Aspergillus flavus Link*, un champignon fréquent dans le sol, sur des matières organiques variées, sur les grains et particulièrement sur les graines oléagineuses (Moreau, 1976).

La production d'aflatoxines se manifeste à des activités de l'eau (aw) élevées de 0.93 à 0.98, ce qui signifie que l'humidité excessive des grains favorise leur production surtout si la température est supérieure à 13°C (Meghazi, 2015).

L'aflatoxine B1 (AFB1) est l'un des composés les plus importants en raison de ses propriétés démontrées propriétés cancérigènes chez l'homme et sa présence fréquente dans de nombreux aliments à travers le monde (Caceres et al. 2020).

Les aflatoxines M1 et M2 sont les métabolites des aflatoxines B1 et B2, issus de leur hydroxylation dans le foie des animaux exposés (Dieme et al. 2016).

### II.2. L'origine

Les aflatoxines sont principalement produites par des espèces d'*Aspergillus* telles que *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Dieme et al. 2016). Les champignons *Aspergillus flavus* produisent les aflatoxines B1 et B2, alors que *A. parasiticus* produisent les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (Fangeat, 2008).

Cependant, ces dernières années, grâce au développement de la biologie moléculaire, la liste des espèces productrices d'aflatoxines s'est allongée et continue d'augmenter, toutes appartenant au genre *Aspergillus* et réparties dans les sections : *Flavi*, *Nidulans* et *Ochraceorosei*. La majorité des espèces aflatoxinogènes font partie de la section *Flavi* (Frisvad et al. 2019).

Cette section est, à l'heure actuelle, constituée de 34 espèces dont 19 sont capables de produire des aflatoxines. Cependant, ces différentes espèces sont beaucoup moins fréquentes que les deux principales espèces qui restent *A. flavus* et *A. parasiticus* (Hernandez, 2021).

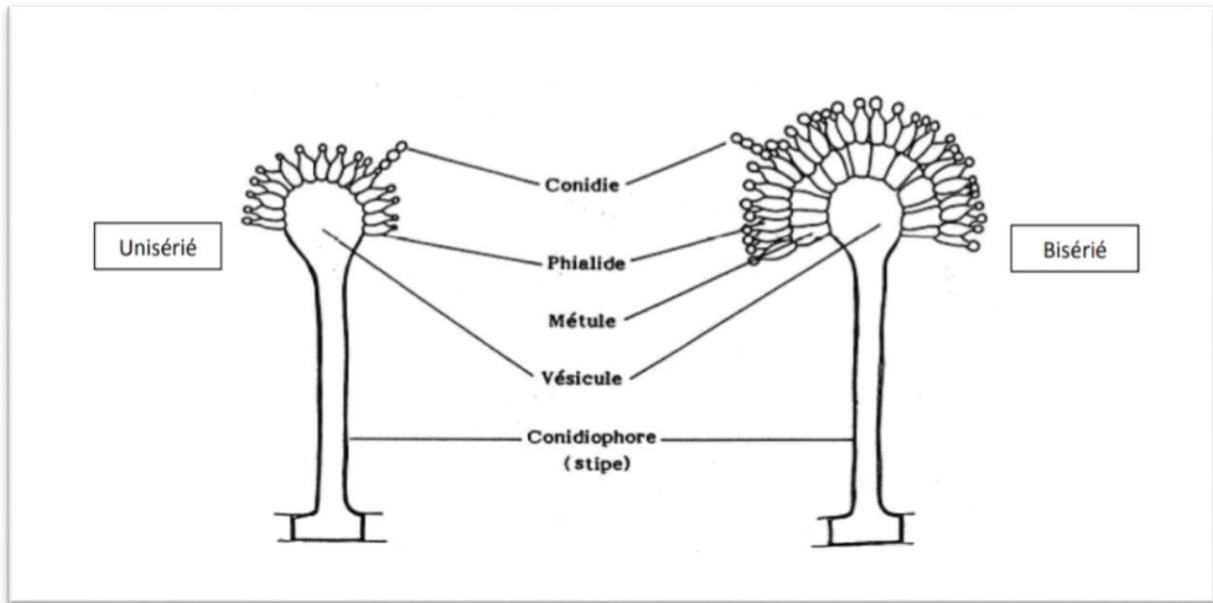


Figure 9. Structure morphologique du genre *Aspergillus* (Botton et al. 1990).

## II.2.1. *Aspergillus flavus*

*L'Aspergillus flavus* est un champignon cosmopolite, très répandu dans la nature et susceptible de contaminer plusieurs aliments. C'est un champignon qui fait beaucoup parler de lui depuis qu'on a découvert qu'il sécrète de métabolites hautement toxiques, les aflatoxines, cancérigènes et exerçant d'autres effets nuisibles sur la santé des hommes et des animaux (Joachim et al., 2020).

Les colonies d'*Aspergillus flavus* sont vert-jaunâtre à vert olive ( ), relativement planes et peuvent avoir des sclérotés bruns ou noirs de forme et de taille variables. Les conidiophores sont longs mais généralement inférieurs à 1 mm. Leur paroi est épaisse et très rugueuse (Elmahgubi, 2013).

La croissance d'*A. Flavus* est possible entre 25 et 37°C et sa température optimale de croissance est proche de 33°C. Il est présent entre la latitude 16° et 35° et peu fréquent au-dessus de 45°, même si les changements climatiques en cours vont modifier cette répartition (Hernandez, 2021).

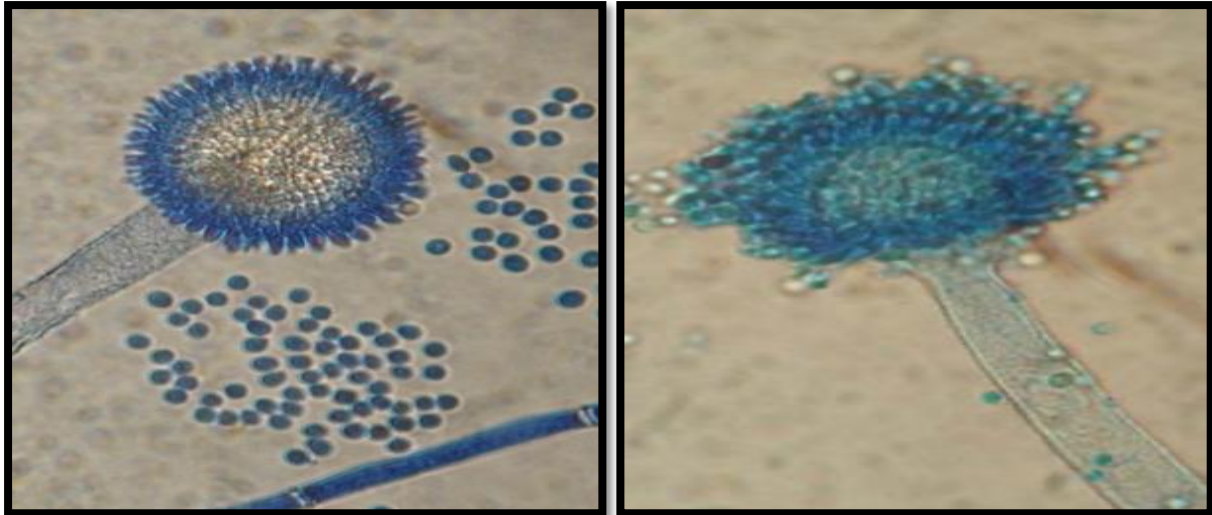


Figure 10 : *Aspergillus flavus* (Elmahgubi, 2013).

### II.2.2. *Aspergillus parasiticus*

Les colonies d'*A. Parasiticus* sont vert foncé, couleur lierre et plus floconneuses et profondes que celles d'*A. Flavus* sur milieu MEA (Figure 3). Le revers est clair sur Czapek et MEA. Les sclérotés sont possibles (100-500  $\mu\text{m}$ ). Les conidiophores sont incolores, de taille variable (300-700  $\mu\text{m}$ ) et leur paroi est lisse ou rugueuse dans la partie distale (El Khoury, 2016).

Les vésicules sont globuleuses (20-35  $\mu\text{m}$ ), les phialides sont pour la plupart unisériées (>90%). Les conidies sont globuleuses, très échinulées voir épineuses (3,5 à 5,5  $\mu\text{m}$ ) (Samson et al. 2010). Cette espèce produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide aspergillique, l'acide kojique mais pas l'acide cyclopiazonique (Elmahgubi, 2013).

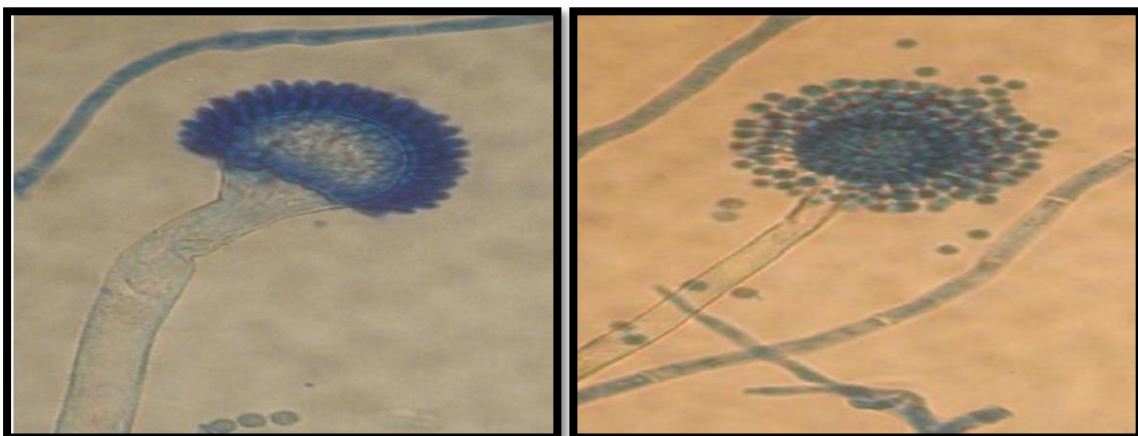


Figure 11. *Aspergillus parasiticus* (Elmahgubi, 2013).

### II.2.3. Section Flavi

Phylogénétiquement, la section *Flavi* est divisée en huit clades (*A. alliaceus*-, *A. avenaceus*-, *A. bertholletius*-, *A. coremiiformis*-, *A. flavus*-, *A. leporis*-, *A. nomius*- et *A. tamaris-clade*) et la section contient actuellement 33 espèces (Frisvad et al., 2019). Deux espèces ne produisent que des aflatoxines B1 et B2 (*A. pseudotamaris* et *A. togoensis*), et 14 espèces sont capables de produire des aflatoxines B1, B2, G1 et G2. Toutes les espèces des clades plus éloignés phylogénétiquement (*A. alliaceus*-, *A. coremiiformis*-, *A. leporis*-et *A. avenaceus-clade*) sont incapables de produire des aflatoxines(Zebiri, 2020).

### II.3. Structure chimique

Les AFs sont des composés organiques de nature non protéique. Elles sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (Aflatoxine B) ou des lactoeshexatomiques (Aflatoxine G) (Abdellaoui et Guellal ,2016).

Ils forment un groupe de 18 composés structurellement proches, dont six constituent les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments (B1, B2, G1, G2, M1 et M2) (Figure 4). Ce groupe de toxines est issu de la voie des polycétoacides.Les structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur le squelette de base (Gauthier, 2016).

**Tableau 1** : Les formules brutes des principales aflatoxines (Wogan ,1966).

Aflatoxines	Formule brute	Masse moléculaire g /mol
<b>AFB1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312
<b>AFB2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314
<b>AFG1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328
<b>AFG2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330
<b>AFM1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328
<b>AFM2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330

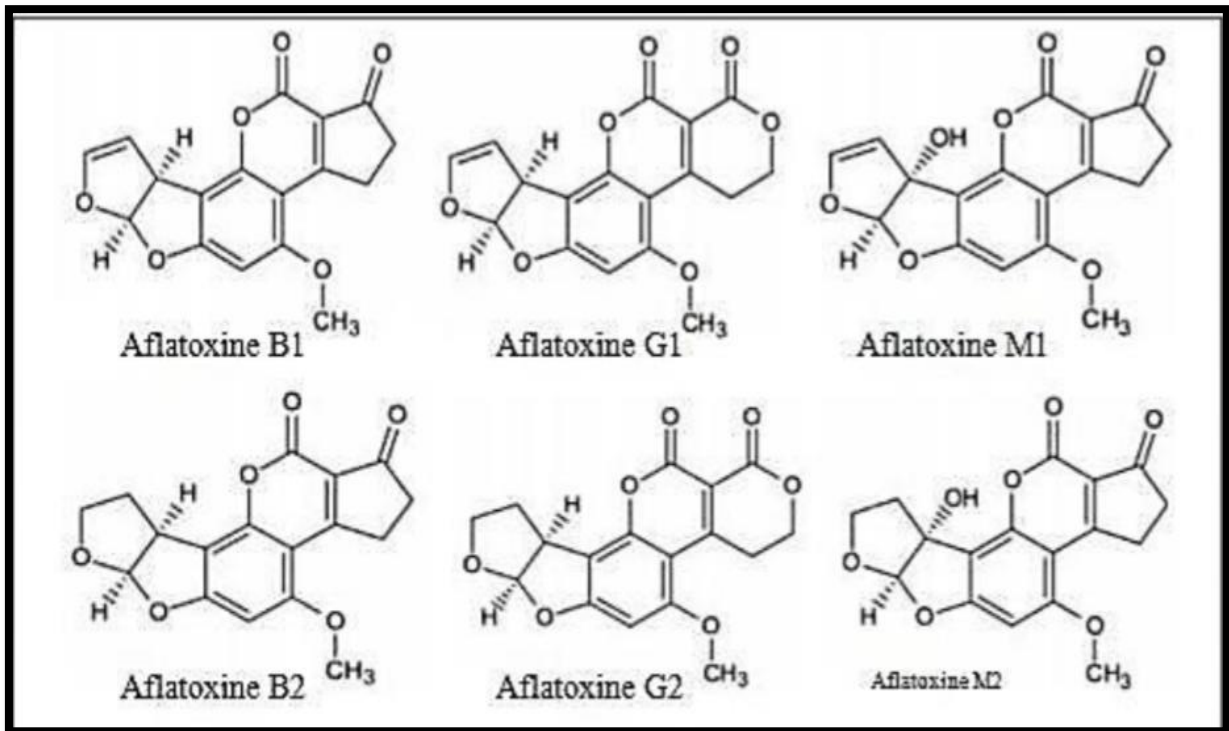


Figure 12 .Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2 (Boudjema, 2023).

#### II.4. Les propriétés physico-chimiques

- ❖ Les AFs sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), leur stabilité est très variée : dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10–20 mg/L) présentant une instabilité totale dans les solvants non polaires (Cole et Cox, 1981).
- ❖ Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune (El Khoury, 2016).
- ❖ Les pH extrêmes, supérieurs à 10 et inférieurs à 3, entraînent une instabilité de ces structures, également sensibles aux agents oxydants. La température minimale de décomposition s'élève à 237°C (Gauthier, 2016).
- ❖ Les Aflatoxines sont dites thermostables. En effet leur point de fusion minimum est de 237°C et jusqu'à 299°C pour les Aflatoxines M, expliquant ainsi leur résistance aux procédés de cuisson, de pasteurisation ou encore de stérilisation (Guénin et al, 2022).
- ❖ Par oxydation le cycle lactone des aflatoxines devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. Les aflatoxines sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de

cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique(Cole et Cox, 1981).

### II.5. Le métabolisme des aflatoxines

Après ingestion, l'AFB1 est absorbé dans l'intestin grêle où elle atteint la circulation sanguine et est transportée par les globules rouges et les protéines plasmatiques jusqu'au foie où elle est métabolisée. Cette métabolisation entraînant l'apparition de l'AFB1-8,9-exo-époxyde, une molécule encore plus dangereuse, le foie est considéré comme l'organe cible principale de cette mycotoxine (Soriano, 2007).

La biotransformation des groupements fonctionnels de l'AFB1 entraîne une réduction de la toxicité lors d'hydroxylation (Aflatoxine Q1) ou d'O-déméthylation (Aflatoxine P1) (Makhlouf, 2019).

Dans le foie, l'AFB1 subit plusieurs voies de métabolisation. Cette métabolisation est sous la dépendance du cytochrome P450 dans les cellules microsomales hépatiques. Elle peut suivre différentes voies (figure 13) (Hernandez, 2021) :

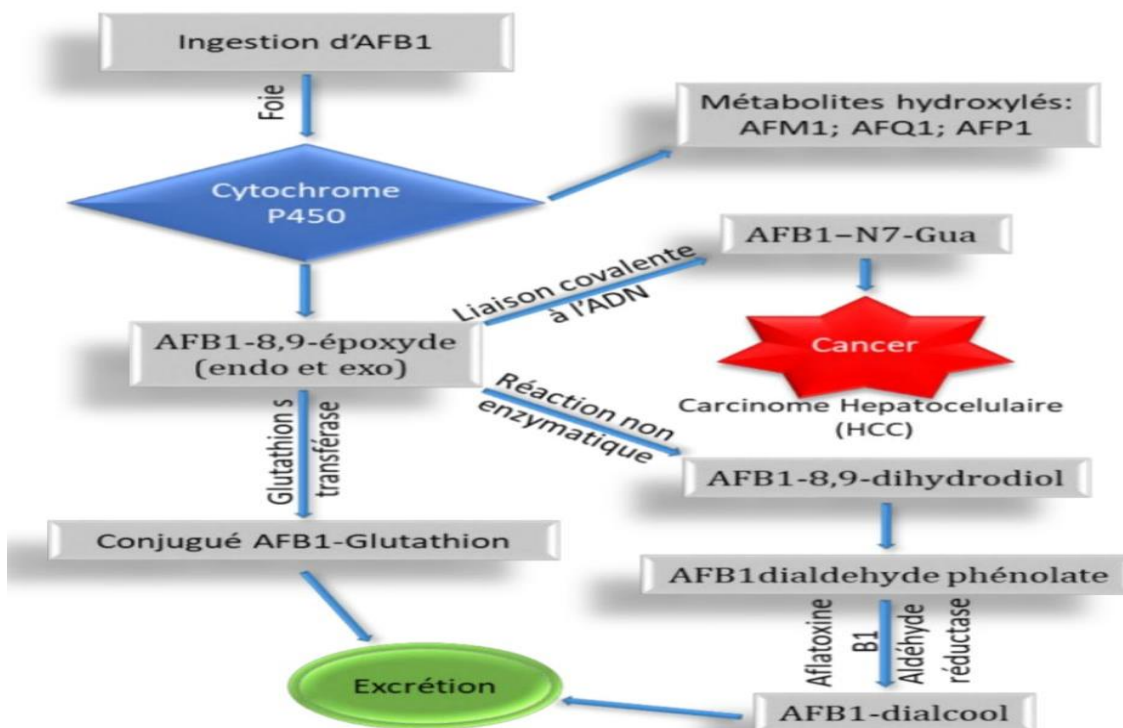


Figure 13 :Différentes voies de métabolisation de l'AFB1 (Hernandez, 2021)

### II.6.Toxicité

Le pouvoir toxique des aflatoxines est principalement associé à l'aflatoxine B1 qui est considérée comme le principal métabolite génotoxique et qui possède le plus fort potentiel cancérigène de toutes les aflatoxines (**Dieme et al. 2016**).

L'Aflatoxine B1 est la seule mycotoxine ayant un rôle avéré dans l'apparition de certains cancers du foie. C'est la raison pour laquelle elle a été déclarée agent cancérigène pour l'Homme par le CIRC (groupe 1) (**Gauthier, 2016**).

La présence d'une double liaison sur le cycle dihydrofurane de l'AFB1 et de l'AFG1 expliquerait la différence de toxicité avec leurs homologues AFB2 et AFG2. La différence de toxicité entre les aflatoxines du groupe B et G proviendrait de la substitution du cycle cyclopentone par un cycle lactone (**Firmin, 2011**).

#### II.6.1.Toxicité aiguë

Les effets d'une toxicité aiguë varient d'une espèce à l'autre suivant l'âge, le sexe, l'état général et le mode de contamination (**Erastus, 2011**).

Des cas d'intoxication aiguë remontent aux débuts des années 2000 au Kenya, et ont été attribués à l'ingestion de maïs contaminés. L'exposition à des doses massives d'Aflatoxines entraîne un ensemble de symptômes ressemblant à une hépatite aiguë : vomissements, ictère, douleurs abdominales, hépatomégalie et œdèmes (**Seifia et Derfalou, 2020**).

#### II.6.2. Toxicité chronique

La toxicité chronique des aflatoxines se manifestera après l'ingestion répétée de doses plus faibles que celles conduisant à l'intoxication aiguë. Ce type de toxicité peut être observé aussi bien chez l'homme que chez l'animal (**Elmahgubi, 2013**).

Les symptômes les plus courants sont l'immunosuppression, la tératogénèse, la mutagenèse, et l'apparition de différents carcinomes, le carcinome du foie étant le plus fréquent. L'exposition à la toxine peut être mise en évidence en dosant certains métabolites de l'AFB1 dans différents fluides biologiques tels que le sang, le lait et l'urine (**Hernandez, 2021**).

L'exposition chronique aux aflatoxines (AF) est responsable de cancers chez diverses espèces animales. Non seulement, l'AFB1 mais également le mélange des quatre aflatoxines (B1, B2, G1, G2) induit des tumeurs hépatiques aussi bien chez la souris que le rat, mais également chez le canard, la truite, le saumon et le singe (**Mariana, 2008**).

### II.7. Les effets des aflatoxines

L'AF B1 est la mycotoxine la mieux étudiée et la plus répandue et l'agent cancérigène naturel le plus puissant (Ait Mimoune et al., 2018), elle présente à la fois des propriétés cancérogènes, mutagènes, tératogènes, hépatotoxiques, et immunotoxiques. Cette AF a été étudiée de manière approfondie en ce qui concerne son pouvoir létal et sa létalité in vivo chez divers animaux de laboratoire (Boulekrout, 2021).

Les maladies causées par la consommation d'AFs sont désignées par aflatoxicose. Elle a été reconnue et décrite pour la première fois sur les animaux de ferme; aussi est-il important de considérer le problème au niveau des différents groupes d'animaux avant d'en arriver à l'Homme (Nikiéma, 1993).

La principale conséquence d'une intoxication grave par l'AFB1 est la nécrose hépatique qui se traduit par une forte augmentation des transaminases plasmatiques. Cette nécrose est associée à une infiltration de cellules inflammatoires. La réduction du nombre d'hépatocytes et leur dysfonctionnement provoquent une stéatose et une cholestase avec l'augmentation des taux plasmatiques en bilirubine, phosphatases alcalines (PAL) et  $\gamma$ -glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT) (Reguig et Boufala, 2021).

L'AFB1 exerce des effets hématotoxiques secondaires se caractérisant par des altérations dans les fonctions de la moelle osseuse et l'anémie consécutive à une aflatoxicose serait due à une aplasie médullaire et une hémolyse mais aussi à une diminution de l'absorption de fer. (Parent-Massin et Pachment, 1998).

Ils provoquent une dépression de la réponse immunitaire. L'AFB1 supprime l'activité du complément C4 et diminue la production des interleukines. Elle provoque aussi une hypoplasie du thymus (Abdellaoui et Guellal, 2016).

### II.8. Effets de l'AFB1 sur la santé des volailles

L'AFB1 a de nombreux effets sur la santé de la volaille ainsi que sur les performances zootechniques des animaux. En fonction de la dose absorbée et de la durée d'exposition, l'impact diffère (Viviane, 2017).

- 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 (**Brahmi et Zahi, 2016**).
- Les aflatoxines ont des effets immunotoxiques chez les volailles. En effet, pour des doses relativement importantes en aflatoxine (0,3-6 mg/kg de poids corporel), il apparaît une dépression de la réponse immunitaire. Il y a une baisse des Ig G et A, alors que les Ig M ne sont pas affectés (**Nadège, 2017**).
- La susceptibilité des volailles est très variable suivant l'espèce. Le dindon est moins sensible aux lésions hépatiques que le canard (**Diomède, 1974**). Chez le poussin, l'ingestion d'aliments contaminés par 2,5 ppm d'AFB1 pendant 3 semaines, provoque un ictère, un retard de croissance et des troubles de la coagulation sanguine (**Chattopadhyay et al., 1985**).

### II.8. Transfert dans les produits animaux

#### II.8.1. La contamination des productions carnées

Les aflatoxines peuvent être détectées dans le foie, les reins et les muscles de volailles, de porc ou de ruminants en conditions expérimentales. Leur présence sur le terrain n'est généralement constatée que dans les viandes de porc, de bovin et les charcuteries provenant de certains pays où la contamination des aliments pour animaux est fréquente à des niveaux élevés tel que l'Égypte, le Brésil, la Jordanie (**Firmin, 2011**).

La poule serait un vecteur plus important de résidus que le poulet, une excrétion dans les œufs étant également possible, au moins lors d'exposition à des doses élevées (**Assa, 2009**).

#### II.8.2. L'exposition de l'homme

La contamination des productions animales par les aflatoxines et les ochratoxines est une préoccupation de sécurité alimentaire. Chez l'homme, les cas de mycotoxicoses aiguës sont rares et se déclarent plutôt dans les pays où la consommation de nourriture locale et l'agriculture de subsistance sont pratiquées (**Shephard, 2008**).

### **II.8.2.La contamination du lait et des produits laitiers**

Les produits issus du métabolisme de l'AFB1 et de l'AFB2 qui se retrouvent dans le lait sont l'AFM1 et, à un degré moindre, l'AFM2. Ces métabolites correspondent à des formes hydroxylées de chacune des molécules parentes.

les aflatoxines apparaissent dans le lait environ 12 heures après une administration orale d'AFB1. La concentration dans le lait atteint un maximum en 24 à 48 heures et la clairance est très rapide puisque les aflatoxines disparaissent du lait 4 jours après leur retrait des aliments (Afssa ,2009).

## Chapitre 4 : les mycotoxines

### 1. Définition :

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. Les mycotoxines sont considérées comme les contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique et l'économie de nombreux pays (Lewis et Goodrich-Schneider, 2012). Il désigne des métabolites secondaires de faible poids moléculaires toxiques,

Sécrétés par des moisissures. Elles sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Mycotoxines sécrétées par les principaux genres de moisissures (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

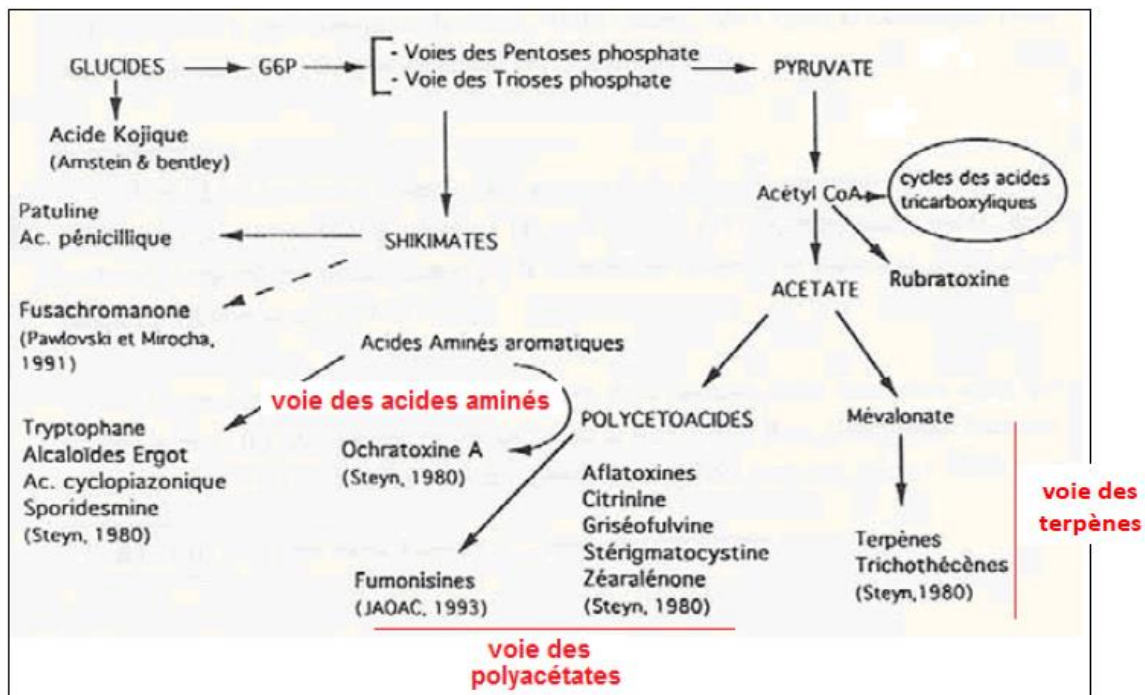
Moisissures	Mycotoxines
<i>Aspergillus</i>	AFs, OTA et STC, CPA
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes, Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine et Moniliformine
<i>Penicillium</i>	Citrinine, Patuline, Pénitrem A, CPA et OTA
<i>Alternaria</i>	Acide ténuazonique et Alternariol
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot

Les champignons ont développé la capacité de produire ces substances chimiques, qui ne sont pas essentiels pour leur fonctionnement (croissance, reproduction, respiration) mais qui pourraient leur conférer certains avantages compétitifs. Une même mycotoxine peut être élaborée par plusieurs espèces appartenant au même genre et parfois à des genres différents. En revanche, une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines (Bennet & Klich 2003 ; Fox & Howlett, 2008). À l'heure actuelle, plus de 300 mycotoxines ont été identifiées mais l'attention des scientifiques se concentre principalement sur les aflatoxines, l'ochratoxine A, les trichothécènes, la zéaralénone et la fumonisine en raison de leur forte prévalence et de leurs effets néfastes. Ces métabolites toxiques peuvent contaminer un grand nombre de produits alimentaires d'origine végétale et animale (Ji et al. 2016; Campagnollo et al. 2016).

## 2. Mycotoxinogénèse

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu sur le champ tout au long du cycle de croissance des cultures et pendant les étapes de récolte, de séchage, de transport et de stockage ou de transformation en fonction des différentes conditions (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les mycotoxines sont classées en fonction du champignon qui les produit, de leur structure chimique et / ou du mode d'action. Leur dégradation est un défi car la plupart sont thermostables. Ces composés sont des molécules de faible poids moléculaire (<1000 Daltons) d'origines et de nature chimiques diverses (dérivés d'acides aminés, des polyacétoacides, des acides gras ou des terpènes) (Hussein et Brasel 2001 ; Stein et Bulboacă, 2017).



**Figure 14 :** Voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc et al. 2007).

Lorsque des mycotoxines sont produites par des champignons se développant sur la plante au champ, elles sont communément appelées mycotoxines de champ (zéaralénone et fumonisine). Par contre, celles produites au cours du stockage, elles sont appelées mycotoxines de stockage (AFs, OTA, etc.). (Bhat et al., 2010).

### 3. Facteurs affectant la mycotoxinogénèse

La production des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. La sécrétion des métabolites secondaires par les moisissures toxinogènes dans les aliments dépend des facteurs environnementaux ou extrinsèques mais également d'autres facteurs, dits Intrinsic (Olsen et al. 2003; Blumenthal, 2004).

#### 3.1. Facteurs intrinsèques :

Le potentiel génétique est un facteur important. Au sein du même genre, on peut distinguer des espèces connues pour être toxinogènes et d'autres non. Au sein d'une même espèce toxinogène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. Par exemple, Toutes les souches d'*Aspergillus parasiticus* produisent les AFs par contre chez *Aspergillus flavus* la production est variable selon les souches. Par ailleurs un champignon peut produire plusieurs mycotoxines à la fois. Par exemple la production d'AFs et de CPA par *A. flavus*. En plus, une même mycotoxine peut être produite par des espèces différentes voire même par deux genres différents (ex. l'ochratoxine A produite par *Aspergillus* et *Penicillium*) (Riba, 2008).

#### 3.2. Facteurs extrinsèques (facteurs environnementaux) :

##### ✓ Facteurs physiques :

##### 1- Activité de l'eau (*aw*)

L'activité de l'eau est un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures et la production des mycotoxines (Tableau 3). La disponibilité en eau nécessaire à la toxinogénèse est généralement supérieure à celle permettant la croissance fongique. Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une *aw* de 0,80, par contre la production d'OTA par cette espèce n'est possible que lorsque l'*aw* est supérieure (Cairns-Fuller et al., 2005).

##### 2- Température

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

Pour les aflatoxines, une production optimale est observée à des températures proches de 30°C (28°C à 35°C). Lorsque la température augmente au-dessus de 36°C, la production des aflatoxines est presque complètement inhibée (Yu, 2012).

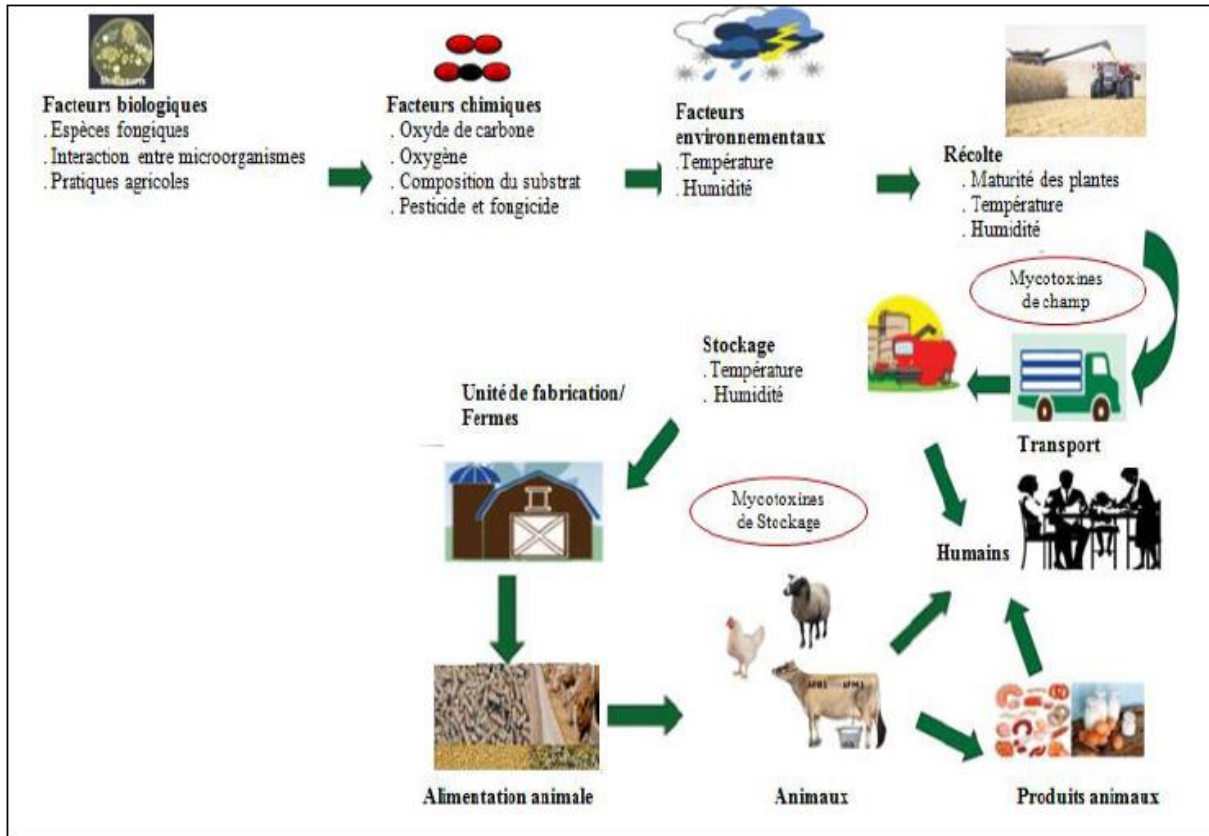
**Tableau 3 :** Températures et activités de l'eau optimales pour la production des mycotoxines (Neme et Mohammed, 2017).

Mycotoxine	Température (°C)	Activité de l'eau ( <i>aw</i> )
Aflatoxine	33	0,99
Ochratoxine	25-30	0,98
Fumonisine	15-30	0,9- 0,995
Zéaralénone	25	0,96
Deoxynivalenol	26-30	0,995
Citrinine	20-30	0,75- 0,85

✓ **Facteurs chimiques :**

**1- Acidité du milieu – PH**

Comme pour l'*aw*, la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique (Pfohl-leszkowicz, 1999). Les moisissures peuvent croître dans une gamme de pH optimal de croissance étant plutôt situé entre 5 et 6. Les aliments ayant un pH inférieur à 6, se trouvent être des cibles privilégiées de l'infestation fongique (Gautier, 2016). A l'instar du couple température /*aw*, l'intervalle de pH permettant une croissance fongique optimale est plus étendu que celui permettant la synthèse de toxines. Ainsi, la Fumonisine B1 est la plus produite à pH= 3,7 tandis que la croissance de sa moisissure productrice, *Fusariumproliferatum*, s'effectue préférentiellement à pH = 5,6 (Blackwell et al., 1994). Une faible valeur de pH joue un rôle dans la régulation de la production des stérigmatocystine et des aflatoxines par les *Aspergillus* (Gardiner et al. 2009).



**Figure 15 :** Facteurs affectant la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale (Haque et al. 2020 avec modification).

#### 4. Contamination des aliments par les mycotoxines

Les moisissures toxigènes peuvent se développer et produire des mycotoxines, sur tous les supports solides ou liquides dès que les conditions favorables sont réunies (Bullerman et Bianchini, 2007). La contamination par les mycotoxines se produit dans les denrées alimentaires d'origine végétale, en particulier les céréales, et autres produits agricoles destinés à la consommation humaine et animale. En plus, une fois contaminés, les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation...), ne permettent pas l'élimination des mycotoxines des aliments (Bullerman et Bianchini, 2007).

On estime que près de 25% des récoltes mondiales sont affectées chaque année par des champignons toxigènes (Vila-Donat et al. 2018). En plus, la contamination fongique influence la valeur nutritionnelle et l'appétence des aliments et représente un risque de toxicose (Magnoli et al., 2019).

Des études et enquêtes réalisées ces dernières années ont montré que la contamination par les Mycotoxines affecte généralement un grand nombre de matières premières et d'aliments finis

Destinés à la production animale. Cependant les céréales, notamment le maïs, font partie des Produits les plus contaminés (**Magnoli et al. 2019 ; Munkvold et al. 2019 ; Santos Pereira et al. 2019 ; Yang et al. 2020**).

### **5. Impacts des mycotoxines sur les animaux**

Les mycotoxines sont des molécules très toxiques pour l'homme et l'animal. Les effets toxiques de ces métabolites sont variables et interagissent de manière synergique, notamment leur structure chimique différente, leur concentration, la durée de l'exposition et le régime alimentaire ainsi que l'espèce, le sexe, l'âge et la fragilité de l'animal affecté (**Afssa, 2009 ; Brochard & Le Bacle, 2009**).

Les effets exercés peuvent être chroniques (les plus fréquentes) suite à l'ingestion prolongée de faibles doses de mycotoxines ou une intoxication aiguë (parfois mortelle) liée à l'ingestion de doses élevées pendant une courte durée. L'ingestion élevée de mycotoxines peut entraîner une détérioration de la santé et de la productivité des animaux ce qui cause une mortalité plus élevée. Les concentrations faibles de mycotoxines peuvent entraîner des pertes sub-cliniques de production et augmenter le risque et l'incidence d'autres maladies (**Magnoliet al. 2019**). Les principaux organes cibles dépendent de la mycotoxine et de l'organisme qui l'ingère, et comprend le foie, les reins, les poumons ainsi que le système nerveux, digestif, endocrinien et le système immunitaire (**Bhatnagar et al. 2002 ; Afssa, 2009 ; Boudra, 2010 ; Borreani et al. 2018**).

En général, les animaux monogastriques et les jeunes animaux sont plus sensibles aux mycotoxines que les ruminants et les animaux plus âgés. Les volailles par exemple, sont plus exposées aux mycotoxicoses du fait de l'importance de la part des céréales dans leur alimentation et de l'absence du réservoir ruminal. Ce dernier, contient une communauté importante et complexe de microorganismes capables de dégrader les toxines (**Afssa, 2009 ; Magnoli et al., 2019**). De ce fait, Les ruminants sont généralement plus résistants aux effets indésirables de mycotoxines. En revanche, il est important de souligner que la dégradation du rumen ne concerne qu'un nombre limité de mycotoxines. En effet, la DON et l'OTA, la ZEA et l'AFB1 sont peu détoxifiées, alors que d'autres mycotoxines comme les FBs ne sont pas dégradées. De plus, pour que cette détoxification soit réellement efficace, il faut que le rumen soit maintenu dans de bonnes conditions et un régime alimentaire doit favoriser un fonctionnement optimal de la flore ruminale. Or, chez les ruminants à potentiel de production élevé, les régimes riches en concentré permettent souvent de maximiser les performances,

mais peuvent être également à l'origine de modifications importantes de la flore ruminale, notamment une diminution du nombre de protozoaires, responsables de la dégradation de certaines mycotoxines (**Brossard et al. 2004 ; Boudra, 2010**).

### 6. Effets des mycotoxines sur la santé et les performances des volailles

Les mycotoxines sont des métabolites toxiques produits par différentes espèces fongiques au cours de leur développement. Des moisissures peuvent être présentes sur les céréales, qui, de par leur composition et leurs conditions de culture, représentent un substrat particulièrement sensible à la contamination par les mycotoxines. Les volailles, du fait de la part importante de céréales dans leur alimentation, sont des espèces qui peuvent être fréquemment exposées aux mycotoxines. Bien que plusieurs centaines de composés différents aient été identifiés, il est classiquement admis que, compte tenu de leur prévalence et leur toxicité, le nombre de mycotoxines ayant une véritable importance en santé est plus limité (**Afssa 2009, Marin et al 2013**). En Europe, c'est ainsi cinq toxines (ou familles) qui font l'objet de teneurs maximales en alimentation animale (tableau 3), avec pour certaines d'entre elles des teneurs spécifiquement applicables aux aliments pour volailles (**E.U. 2006**).

**Tableau 4 :** Teneurs maximales réglementées ou recommandées en mycotoxines, dans les aliments pour volailles.

Espèces	Mycotoxines	Teneur maximale réglementée/recommandée dans un aliment complet* (mg/kg)	Références
Volailles	Fumonisines (FB1 + FB2)	20	Recommandation 2006/576/CE
Volailles	Déoxynivalénol	5	Recommandation 2006/576/CE
Volailles	Zéaralénone	2**	Recommandation 2006/576/CE
Volailles	Ochratoxine A	0,1	Recommandation 2006/576/CE
Volailles (hors jeunes)	Aflatoxine B1	0,01	Règlement 2011/574/CE
Jeunes volailles	Aflatoxine B1	0,005	Règlement 2011/574/CE
Volailles	Ergot	1 000***	Règlement 2011/574/CE
Volailles	T2 + HT2	0,25	Recommandations 2013/165/UE et 2013/637/UE

\* Pour un aliment ayant un taux d'humidité de 12% ; \*\* Teneur maximale recommandée pour les céréales et produits à base de céréales, excepté les produits issus du maïs ; \*\*\* Matières premières des aliments pour animaux et aliments composés pour animaux contenant des céréales non moulues.

Les effets potentiels indésirables des mycotoxines chez les volailles sont nombreux tels que des effets hépatotoxiques, néphrotoxiques, dermatotoxiques ou reprotoxiques. À ces effets manifestes sur la santé s'ajoutent des effets indésirables plus discrets tels une toxicité digestive, un effet immunomodulateur et des altérations de performances dont l'importance est plus difficile à évaluer (Afssa, 2009).

### 6.1. Exposition unique

La toxicité par administration unique, ou toxicité aiguë, permet d'établir la dose létale médiane (DL50), qui représente la dose de substance causant la mort de 50% de la population exposée (tableau 2). La DL50 s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme de poids corporel (p.c.) de l'animal. Plus ce chiffre est faible, plus la substance est toxique. La DL50 peut varier en fonction de l'espèce, du stade physiologique, du sexe mais également du mode d'administration (ingestion, inhalation, injection) et du support de la mycotoxine (aliment, huile...).

#### \* Aflatoxines

Différentes aflatoxines peuvent être présentes dans les aliments, l'aflatoxine B1 (AFB1) est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité, par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. Chez les oiseaux, l'ingestion d'aflatoxines entraîne principalement une toxicité hépatique dont la sévérité varie en fonction de la bioactivation de l'AFB1 en métabolites plus toxiques (Guerre et al 1996).

2007) et 500 µg d'AFB1/kg chez le poulet. Lors d'une exposition prolongée pendant plusieurs semaines (souvent plus de 10), une fibrose hépatique accompagnée de tumeurs est observée. Une embryon- létalité avec tératogénèse sont également décrites (Afssa, 2006).

Le canard est particulièrement sensible à la toxicité de l'AFB1, ainsi, parmi les études publiées depuis 2006 celle de Wan et al (2013) révèle des modifications biochimiques de paramètres sanguins et une atteinte des organes immunitaires dès 25 µg AFB1/kg d'aliment, chez le canard Pékin de 21 jours.

Des effets immunosuppresseurs de l'AFB1 ont été observés chez des dindes suite à la distribution d'un aliment contenant 500 µg AFB1/kg entre 1 et 40 jours d'âge (Umar et al 2015).

Le poulet est plus résistant aux effets de l'AFB1. Chez la poule pondeuse, une baisse de la production et du poids de l'œuf ainsi qu'une stéatose hépatique sont constatées lors

d'exposition à des doses relativement élevées, par exemple, pour une distribution de 1000 µg AFB1/kg d'aliment pendant 4 semaines (**Leeson et al 1995**).

### 7. Réglementation relative aux mycotoxines

L'alimentation animale étant une voie importante par laquelle le danger des mycotoxines peut pénétrer dans la chaîne alimentaire humaine. Les estimations de sécurité sont souvent liées à la fois, à la sécurité des animaux comme les principaux consommateurs des aliments contaminés par ces mycotoxines, et à la sécurité des humains en tant que consommateurs indirects des résidus restés dans les aliments d'origine animale (**Santos Pereira et al. 2019**).

Pour tenter d'éviter les effets indésirables et les implications évoquées par ces substances, plusieurs institutions et organisations ont limité les niveaux acceptés de certaines mycotoxines chez les animaux, car les aliments véritablement exempts de mycotoxines sont impossibles à garantir. L'adoption de ces mesures réduirait le risque de contamination tout au long du processus de production et permettrait l'identification des lots et produits contaminés (**Magnoli et al., 2019**).

Généralement, les limites et les mycotoxines visées par la législation varient d'un pays à l'autre car, plusieurs facteurs de nature scientifique et socio-économique peuvent influencer ce processus décisionnel. Ceux-ci inclut la disponibilité de données toxicologiques, disponibilité de données sur la présence de mycotoxines dans divers produits, disponibilité de méthodes analytiques et législation des pays avec lesquels des contacts commerciaux existent (**Binder et Krska, 2012 ; Smith et al. 2016 ; Kovalsky et al. 2016**).

En Algérie la plupart des réglementations existantes en matière des mycotoxines se limitent aux aflatoxines. Dans l'aliment de bétail, la réglementation concerne l'AFB1 seulement et la valeur limite pour les matières premières des aliments pour animaux est de 20 µg/kg (**FAO, 2004**).

### 8-Identification biochimique

#### 8-1. Production de l'acide cyclopiazonique

##### • Culture et extraction

La production du CPA a été évaluée sur milieu CYA (Pildain et al. 2004). Les isolats d'*Aspergillus section Flavion* ont été mis en culture et incubés à 28 °C pendant 10 jours. L'extraction du CPA est réalisée selon la méthode de (**Bragulat et al. (2001)**). Trois carottes du milieu de culture colonisé par le champignon ont été découpées à l'aide d'un emporte

pièce et introduites dans un microtube Eppendorf puis pesées. L'extraction a été réalisée en ajoutant 1 mL de méthanol avec écrasement de gélose pour faciliter l'extraction. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 60 min. Après incubation, les microtubes Eppendorf ont été centrifugés pendant 10 min à 13000 rpm et les surnageants ont été récupérés et conservés à (-20 °C) jusqu'à leur analyse.

### • Détection de la production de l'acide cyclopiazonique

L'analyse du CPA produit par les souches isolées a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). Cette technique chromatographique, constitue une méthode de base qui permet de séparer et d'identifier plusieurs mycotoxines. Pour cela, 20 µL d'un standard de CPA et 20 µL de chaque extrait ont été déposés sur des plaques en verre préalablement imprégnées de gel de silice. Le développement des plaques a été réalisé avec un système solvant composé d'acétate d'éthyle/2-propanol/hydroxyde d'ammonium (40:30:20) (Pinto et al. 2001). Après développement, la révélation a été effectuée par pulvérisation des plaques par le réactif d'Ehrlich (1g de 4-diméthyle aminobenzaldéhyde dans 75 mL d'éthanol et 25 mL d'HCl concentré). La production du CPA a été déterminée par observation des taches violettes à la lumière du jour ( $R_f = 0,6$ ). La limite de détection du CPA est de 1 µg/mL.

### 8-2. Production des sclérotés

Dans le but d'étudier la production des sclérotés, les isolats appartenant à *Aspergillus* section Flavi, ont été mis en culture sur des boîtes Pétri contenant le milieu Czapek Yeast Agar (CYA), pendant 21 jours à 30 °C et à l'abri de la lumière (Novas et Cabral, 2002).

Une fois produits, les sclérotés ont été récupérés par grattage de la surface de la colonie. Les sclérotés récupérés ont été rincés avec un mélange eau éthanol pour éliminer les traces du mycélium, puis séchés à l'air libre et examinés au microscope photonique ( $G \times 10$ ) dans le but de déterminer leurs tailles. Pour chaque isolat, trois sclérotés ont été examinés. Les isolats ont été répartis en deux morphotypes S et L, en fonction de la taille des sclérotés. Le morphotype « L » est caractérisé par des sclérotés de taille supérieure à 400 µm, le morphotype « S » par contre produit des sclérotés de taille inférieure à 400 µm (Cotty, 1989).

## **Matériels et Méthodes**

## I.1. Objectif de ce travail

L'objectif de cette étude est d'analyser la présence de moisissures du genre *Aspergillus* produisant des aflatoxines dans les aliments de volaille vendues sur les marchés des différentes communes de la wilaya de khenchela et les autre wilaya tel queTebessa ,Batna et Oum bouagai.

## I.2. Date et lieu de travail

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du département des sciences de la nature de vie à l'Université de Abbes laghrour-khenchela et ceci durant la période allant du Avril et mai 2024.

## I.3. Les milieux de culture

Pour l'isolement et l'identification des *Aspergillus* sp. et des *penicillium* sp. les milieux de cultures utilisés sont les suivants:

- ❖ Milieu DRBC (Dichloran, Rose Bengal, Chloramphénicol) (**King et al., 1979**) utilisée pour les isolements des *Aspergillus* sp. et des *penicillium* sp.
- ❖ Milieu CYA (Czapek, Yeast, Agar) (**Pitt et Hocking, 1997**), utilisée pour l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques ainsi pour la production d'AFs et de CPA.
- ❖ Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (**Davis et al., 1987**), utilisé pour la mise en évidence du pouvoir producteur d'AFs par les isolats *Aspergillus* section Flavi..
- ❖ Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (**Raper et Fennell, 1965**), utilisée pour la conservation des souches.
- ❖ La composition de ces milieux de cultures est donnée en annexe I.

## I.4. Souches de référence

- ❖ Pour l'étude du pouvoir producteur d'AFs des isolats nous avons utilisé deux souches de références : *Aspergillus flavus* NRRL 3251T et *Aspergillus. parasiticus* CBS 100926T, fournies respectivement par l'INRA de Toulouse

## I.5. Appareillage et produits chimiques

### I.5.1. Appareillage

Les appareils utilisés dans cette étude sont les suivants :

- ❖ Autoclavage, étuves (Héraeus), agitateur orbital Heidolphunimax 2010, lampe UV (254 nm; 365 nm), mixeur, microscope optique, pH-mètre (Corning- EEL modèle

109), filtre wattman 04, micropipettes, balance de précision, et plaques de gel de silice-60 254F (Merck).

**I.5.2. Les produits chimiques et les solvants utilisés dans cette étude sont les suivants :**

chloroforme (CHCl<sub>3</sub>), méthanol (CH<sub>3</sub>OH), acétone, acétate d'éthyle, le réactif d'Ehrlich, hydroxyde d'ammonium, propanol.

### II.Méthode :

#### II.1.Collections des échantillons

Quarante (40) échantillons d'aliments de volaille ont été collectés. Les échantillons ont été prélevés de différents points de vente dans différentes communes de la wilaya de kenchela ( nssigha, babar, tazougart ), Batna , Tebessaet Oum baougi. Les prélèvements ont été pris au hasard, mis dans des sacs en plastique propres et acheminés directement au laboratoire pour les analyses ultérieures.

**Tableau 5** : codes des échantillons prélevés.

Code	Aliments volaille	Nombre	Date de prélèvement	Quantité
M.	Maïs	10	Avril- Mai	25 g
S.B	Son de blé	10		25 g
O	L'orge	10		25 g
T. S	Tourteau de soja	10		25 g

#### II.2 .Méthode de prélèvement

La collecte des échantillons a été effectuée au sein des différentes unités de vente de façon aléatoire. Les prélèvements des échantillons ont été effectués par des cuillères utilisées à cet effet pour minimiser les risques de contamination. Ces échantillons sont conservés dans des sacs en papier ou en plastique à double épaisseur, étiquetés et acheminés, au laboratoire. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

### II.3. Nature des prélèvements

Les prélèvements des échantillons ont été effectués dans le but d'isoler les champignons aflatoxinogènes et de déterminer le taux de production d'AFs par les isolats.

### II.4. Matière première :

En général, les ingrédients premiers composants l'aliment de bétail et analysés dans cette étude sont le maïs et l'orge (céréales), le tourteau de soja (produits oléagineux) et le son de blé (source de fibre). Ces produits sont en majorité importés et stockés ou en vrac.

### III. Isolement de la flore fongique

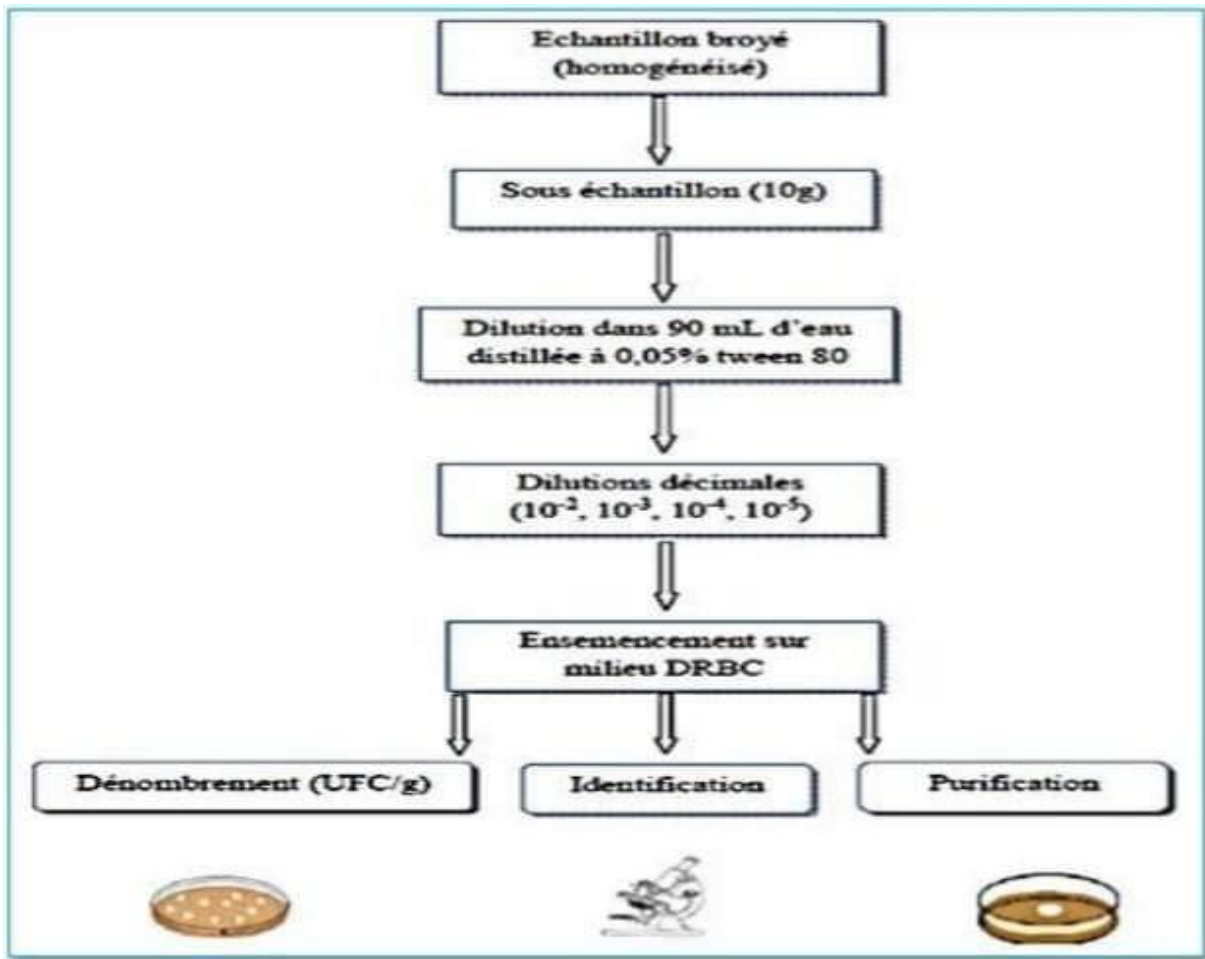
#### III.1. Isolements et dénombrement de la flore fongique

La méthode des suspension-dilution a été utilisée pour l'isolement de la flore fongique dans les différents échantillons. Dix grammes de chaque échantillon finement broyé et homogénéisé ont été dilués dans 90 mL d'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à 0,05%. Après agitation pendant 15 minutes avec un agitateur mécanique, des dilutions décimales (jusqu'à  $10^{-5}$ ) ont été réalisées à partir de la solution mère.

Un aliquote de 100  $\mu$ L de chaque dilution est ensemencé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu DRBC. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon. Les boîtes de Pétri ensemencées ont été incubées à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière pendant 7 jours. La lecture des boîtes est effectuée après 7 jours d'incubation. La charge fongique est déterminée par comptage des colonies et exprimée en UFC (Unité Formant Colonie) par gramme d'échantillon (UFC/g). Le dénombrement a été réalisé sur les boîtes Pétri contenant entre 10 et 100 colonies.

#### III.2. Repiquage et purification

Après le développement des colonies, on réalise des repiquages pour purifier les champignons d'intérêt et réduire les risques de contamination. Chaque colonie est isolée individuellement sur une nouvelle boîte de Pétri en utilisant une anse stérilisée, évitant ainsi tout contact avec les colonies voisines. Ce processus se déroule sur un milieu PDA, avec l'inoculum déposé au centre de la nouvelle boîte, marquée avec la date et les coordonnées de la boîte d'origine. Les repiquages sont effectués de manière aseptique près du bec Bunsen, et les boîtes sont incubées à  $28^\circ\text{C}$  pendant six jours jusqu'à l'obtention des souches pures. Les souches pures obtenues sont ensuite conservées à  $4^\circ\text{C}$ .



**Figure 16** : Représentation schématisée de la procédure expérimentale utilisée pour l'analyse fongique .

### III.3. Identification des isolats fongiques

L'identification des isolats fongiques repose sur une analyse minutieuse des caractères morphologiques des moisissures à l'état pur. Cette tâche complexe en mycologie vise à classer les souches selon leurs genres et espèces, en combinant les critères d'identification macroscopiques et microscopiques. Cette démarche implique une corrélation entre les aspects visibles à l'œil nu et les caractéristiques observées au microscope, permettant ainsi une identification précise des champignons isolés .

#### III.3.1. Identification macroscopique

L'identification des champignons a débuté par une observation macroscopique à l'œil nu, des colonies des champignons qui se sont développées suivies d'une analyse à la loupe binoculaire.

Les caractéristiques examinées incluent la couleur et la texture du thalle, la couleur du verso de la colonie, le contour, l'aspect (granuleux poudreux) et la présence des spores.

### III.3.2. Identification microscopique

L'identification microscopique se base sur plusieurs caractéristiques, comme l'organisation du mycélium, la taille des conidies et du conidiophore, l'ornementation des conidies et présence ou l'absence de métules. Elle se fait par deux méthodes :

#### III.3.2.1. Prélèvement ordinaire

Une aiguille d'inoculation a prélevé une petite partie de la colonie contenant des structures conidiogènes. Le prélèvement est pris à la périphérie de la colonie car les structures reproductrices sont jeunes et les spores ne sont pas abondantes. Ces prélèvements sont déposés sur une lame humidifiée avec de l'eau, puis recouverts d'une lamelle. Ensuite, l'échantillon est observé au microscope photonique à des grossissements de X 10 , X 40 et X 100.

#### III.3.2.2. Prélèvement direct avec un ruban adhésif transparent

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame (**Chabasse et al., 2002**). A partir des mêmes cultures on prend un autre fragment de scotch et on le récolte sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux gouttes de l'eau physiologique. Les observations microscopiques ont été effectuées à différents grossissements (**Guezlane et al., 2012**).

Cette technique permet aux spores et au mycélium d'adhérer à la surface du scotch ce qui permet de les observer directement au microscope photonique.

### IV. Etude de la production des aflatoxines

Les Aflatoxines possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement dans l'UV proche de 365nm. À cette longueur d'onde, les isolats producteurs d'aflatoxines *Bet G* développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, et sont caractérisés par un revers de colonie jaune orangé visible à la lumière du jour (**Davis et al., 1987**). Le criblage des isolats *d'Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'aflatoxine est réalisé par détection de la fluorescence à 365 nm sur milieu de culture à base de noix de coco (CAM), selon la technique décrite par (**Davis et al., 1987**). La production est confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM) (**calvo et al., 2004**)

#### IV.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture

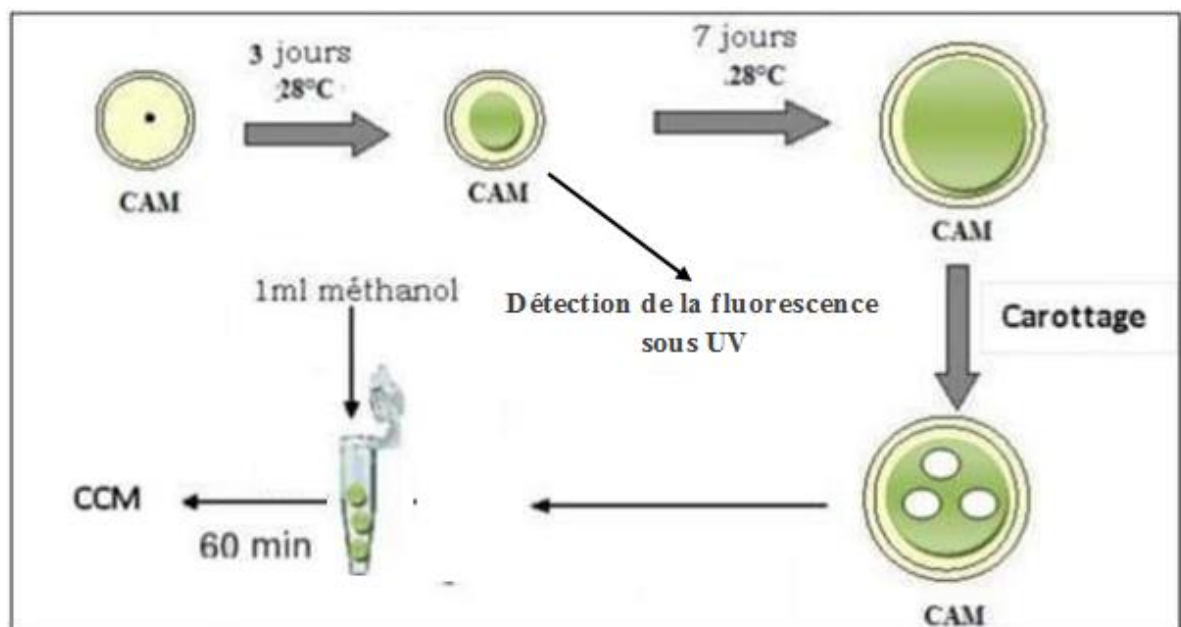
Les souches *d'Aspergillus* section *Flavi* sontensemencées par point central (1 souche par boîte) sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (**Fente et al., 2001**).

Dans le milieu CAM les aflatoxines combinées aux matières grasses du noix de coco, donnent une fluorescence visible sous UV surtout sur le revers de la colonie (Davis et al., 1987).

Après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les isolats producteurs d'aflatoxines développent autour de la colonie une fluorescence bleue visible sous la lumière UV.

### IV.2. Extraction des AFs à partir de milieu de culture

La production des aflatoxines par *Aspergillus section Flavi* a été confirmée par chromatographie sur couche mince, les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au méthanol. Selon la méthode décrite par Calvo et al., 2004, trois rondelles de 10mm de diamètre de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'une emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de pétri (60 mm de diamètre), les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2ml, l'extraction des aflatoxines est réalisée par l'addition de 1ml de méthanol, tout en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une micropipette puis injecté dans un autre tube Eppendorf, le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et à une température de 4°C pour une analyse ultérieure.



**Figure 17:** Schéma du protocole d'extraction des aflatoxines à partir des Isolats d'*Aspergillus section flavic* cultivés sur milieu CAM.

### IV.3. Détection et confirmation des AFs par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) c'est la méthode de séparation la plus simple, utilisée pour la détection des AFs décrite par l'AOAC, 2000 (Official Methods of Analysis). Elle consiste à déposer un aliquote de 10 à 15 µl (aspiré par une micropipette) de l'extrait à analyser sur plaques (20 x 20 cm, 0,25 mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F (Merck). A cet effet, les spots (aliquotes) sont déposés à 2cm du bord. Dans chaque plaque 6 échantillons sont spotés, espacés de 2cm. La séparation ou développement est effectuée, dans une cuve en verre fermée (20 x 20 cm), par le contact de la plaque avec la phase mobile.

Les solvants de développement sont le chloroforme et l'acétone (95:5v/v).

- ❖ Dépôt des extraits à analyser
- ❖ Tracer une ligne droite sur une plaque aux deux cotés sur la même plaque de CCM.
- ❖ A l'aide d'une micro-seringue, déposer un aliquote de 10 à 15 µl sur la plaque de CCM à 2 cm du bord inférieur soigneusement en évitant d'abimer la surface de la plaque.

Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de séparation des AFs. Sur une même plaque plusieurs échantillons peuvent être spotés avec des intervalles de 1,5 à 2cm. Un volume de 15 µl d'une solution standard d'un mélange d'AFB1 et d'AFG1 ont été spotés au même temps que les extraits des isolats analysés, Pour éviter d'avoir de grosses taches sur la plaque, le volume à déposer est spoté délicatement à petites gouttes puis séchées à l'aide d'un sèche-choir.

- ❖ Saturer la phase mobile pour éviter l'évaporation du solvant en utilisant une feuille de papier imbibée de la phase mobile sur la paroi de la cuve.
- ❖ Déposer la plaque verticalement dans la cuve à chromatographie qui contient la phase mobile composée de chloroforme/acétone (95 :5 v/v), le solvant migre jusqu'à ce qu'il atteigne la ligne limite du bord supérieur. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à température ambiante pendant 15 minutes.
- ❖ Les AFs sont détectés en plaçant les plaques sous lumière U.V. (365 nm). Les AFB et AFG apparaissent sous forme de tache bleue et verte respectivement. Une comparaison des rapports frontaux (Rf) des extraits avec ceux des standards et de l'intensité de la fluorescence des taches permet de confirmer la présence d'AFs et d'apprécier les quantités produites.

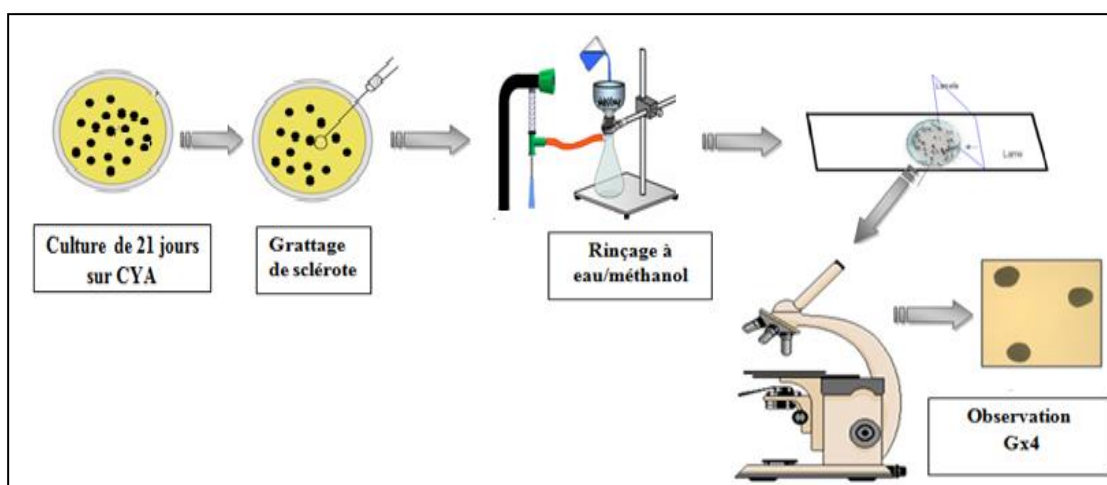
## V. Production et détection de l'acide cyclopiazonique et des sclérotés

### V.1. Détection de la production de l'acide cyclopiazonique (CPA)

L'analyse du CPA produit par les souches isolées a été réalisée par chromatographie surcouche mince (CCM). Cette technique chromatographique, constitue une méthode de base qui permet de séparer et d'identifier plusieurs mycotoxines. Pour cela, 15 µL d'un standard de CPA et 15 µL de chaque extrait ont été déposés sur des plaques en verre préalablement imprégnées de gel de silice. Le développement des plaques a été réalisé avec un système solvant composé d'acétate d'éthyle/2-propanol/hydroxyde d'ammonium (40:30:20) (Fernandez Pinto et al., 2001). Après développement, la révélation a été effectuée par pulvérisation des plaques par le réactif d'Ehrlich (1g de 4-diméthyle aminobenzaldéhyde dans 75 mL d'éthanol et 25 mL d'HCl concentré). La production du CPA a été déterminée par observation des taches violettes à la lumière du jour ( $R_f = 0,6$ ).

### V.2. Production des sclérotés

Dans le but d'étudier la production des sclérotés, les isolats appartenant à *Aspergillus* section *Flavi*, ont été mis en culture sur des boîtes Pétri contenant le milieu Czapek Yeast Agar (CYA), pendant 21 jours à 30 °C et à l'abri de la lumière (Novas et Cabral, 2002). Une fois produits, les sclérotés ont été récupérés par grattage de la surface de la colonie. Les sclérotés récupérés ont été rincés avec un mélange eau éthanol pour éliminer les traces du mycélium, puis séchés à l'air libre et examinés au microscope photonique ( $G \times 10$ ) dans le but de déterminer leurs tailles. Pour chaque isolat, trois sclérotés ont été examinés. Les isolats ont été répartis en deux morphotypes S et L, en fonction de la taille des sclérotés. Le morphotype « L » est caractérisé par des sclérotés de taille supérieure à 400 µm, le morphotype « S » par contre produit des sclérotés de taille inférieure à 400 µm (Cotty, 1989).



**Figure 17.** Protocole d'identification des sclérotés *d'Aspergillus* section *Flavi*

**Résultat**

### I. Analyse fongiques des échantillons

Ce travail de mémoire, a consisté en l'étude de la contamination fongique dans plusieurs types d'aliments de volailles commercialisés en Algérie et plus précisément dans la région de Khenchela, Batna et Oum El Bouaghi, Tebessa

Les objectifs principaux de notre travail étaient:

- La détermination de la charge fongique dans les aliments analysés afin d'estimer leur qualité microbiologique.
- L'identification des différentes espèces fongiques présentes dans l'aliment de volaille pouvant être à l'origine d'une éventuelle contamination par les mycotoxines. Toutefois, un intérêt particulier a été porté aux espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* en raison de leur aptitude à produire les aflatoxines. Pour les moisissures appartenant à ce groupe une identification des différentes espèces a été réalisée en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques (production des aflatoxines, les sclérotés et l'acide cyclopiazonique).

Les métabolites fongiques étudiés nous ont permis de classer l'ensemble des souches en différents chimiotypes.

#### 1. Isolement et dénombrement de la flore fongique

Dans notre travail, 40 échantillons (maïs, orge, tourteaux de soja et son de blé) ont été collectés dans différentes régions des quatre wilayas.

##### 1.1. Dénombrement par la méthode suspension-dilution

Bien que d'apparence saine, les résultats du dénombrement de la flore fongique sur milieu DRBC ont montré que tous les échantillons de matières premières (100%) sont contaminés par différents genres de moisissures. La densité moyenne dans les matières premières est comprise entre  $2,3 \times 10^3$  et  $3,1 \times 10^4$  UFC/g. (Tableau 6).

Des différences significatives dans les niveaux de contamination fongique sont observées ( $p < 0,05$ ). En effet, nous avons constaté que la densité fongique la plus élevée a été notée dans le maïs avec une moyenne de  $3,1 \times 10^4$  UFC/g, suivie des échantillons de son de blé ( $1,7 \times 10^4$ ), d'orge ( $6,1 \times 10^3$ ) et de tourteau de soja ( $2,3 \times 10^3$  UFC/g).

**Tableau 6 :** Densité de la flore fongique totale dans les échantillons de matières premières.

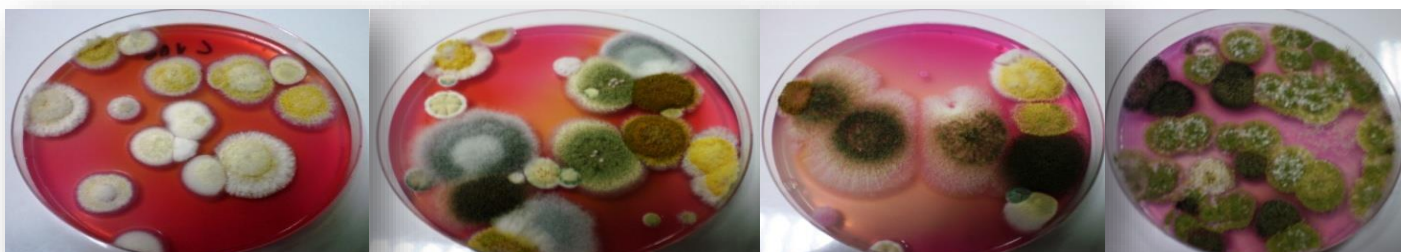
Matière première	Densité de la flore fongique (UFC/g)	Taux de contamination
<b>Maïs (n=10)</b>	$3,1 \times 10^4$	65,8%
<b>Son de blé (n=10)</b>	$1,7 \times 10^4$	58,6%
<b>orge (n=10)</b>	$6,1 \times 10^3$	32,5%
<b>Tortéau de soja (n=10)</b>	$2,3 \times 10^3$	17,8 %

## 2. Identification morphologique des moisissures

L'identification morphologique repose principalement sur la couleur et la texture des colonies, le mode de formation des spores (conidies), de leur type de groupement, leur couleur et leur forme, en se référant aux clefs d'identification de **Raper et Fennell (1965)** et **Pitt et Hocking (2009)**.

### 2.1.Reconnaissance des principaux genres fongiques

Les principaux genres fongiques isolés des échantillons analysés (Figure 18).

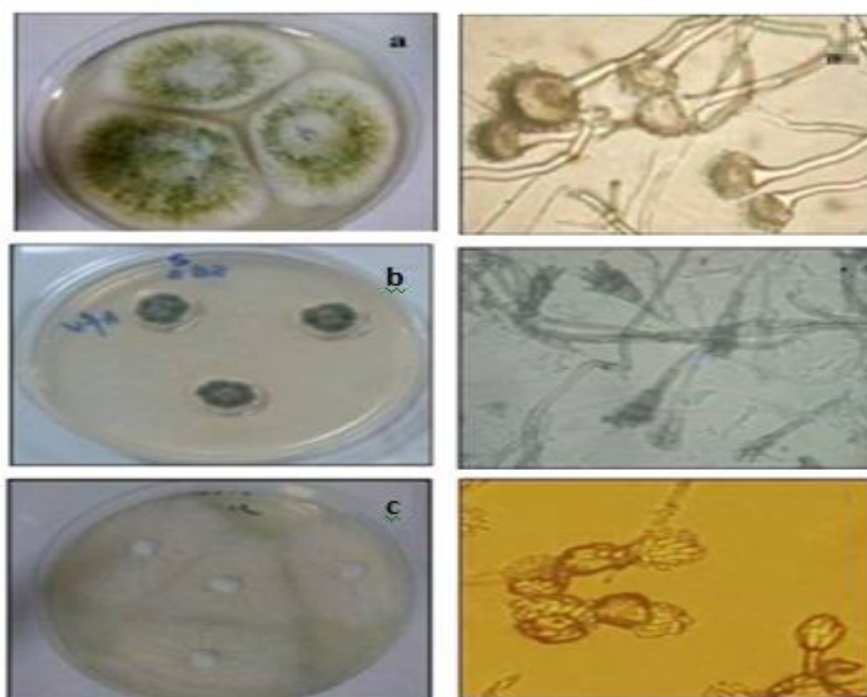


**Figure 18** .Colonies des moisissures poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

Les colonies d'*Aspergillus* se présentent sous forme poudreuse et atteignent généralement 3 à 7 cm de diamètre sur milieu CYA après 7 jours d'incubation à 28°C. Le mycélium, qui peut être hyalin ou coloré, est cloisonné et porte de nombreux conidiophores dressés. Ces conidiophores se terminent par des vésicules de forme variable, sur lesquelles sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les colonies du genre *Penicillium* sont effectivement granuleuses et de couleur bleu-vert, facilement reconnaissables à l'œil nu. Elles atteignent généralement 3 cm de diamètre 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*.. Les isolats de *Fusarium* présentent une grande variabilité de couleurs au niveau des colonies,

qui peuvent être laineuses ou cotonneuses. Sur le milieu CYA, les colonies atteignent généralement un diamètre de 4 à 7 cm. La caractéristique microscopique principale des *Fusarium* est la présence de macroconidies fuselées et cloisonnées. Cependant, la couleur seule ne suffit pas pour identifier les espèces, une observation de la morphologie et des caractéristiques microscopiques est nécessaire (figure 19).

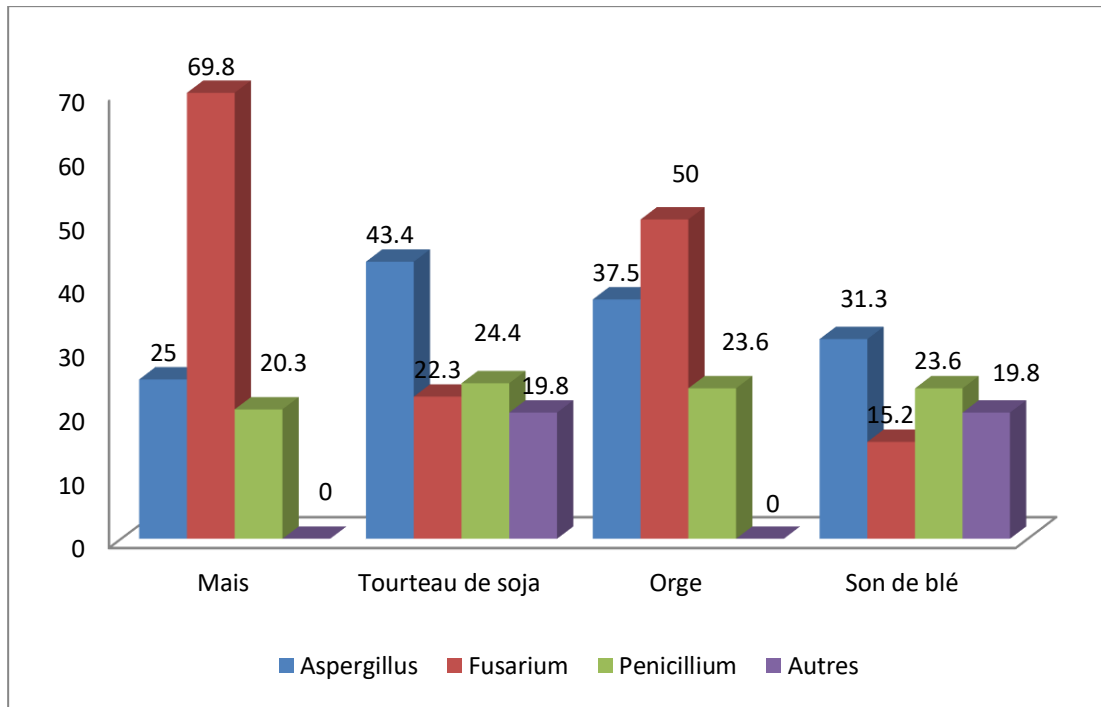
D'autres genres fongiques ont été identifiés, mais avec des fréquences très faibles, tels que *Alternaria*, *Mucor*, *Cladosporium* et *Rhizopus*.



**Figure 19** . Aspect macroscopique et microscopique des genres *Aspergillus* (a), *Penicillium* (b) et *Fusarium*(c).

### 2.2. Distribution des principaux genres fongiques

Les résultats ont montré la dominance du genre *Fusarium* dans les échantillons de maïs (69,8%) et d'orge (50%). Par contre dans le tourteau de soja et le son de blé les pourcentages de contamination par ce genre fongique sont plus faibles (22,3% et 15,2%, respectivement). Le genre *Aspergillus* est plus dominant dans les échantillons de tourteaux de soja et le son de blé (43,4% et 31,3%, respectivement). Cependant le pourcentage du genre *penicillium* est presque égale dans tous les échantillons analysés (Figure 20).

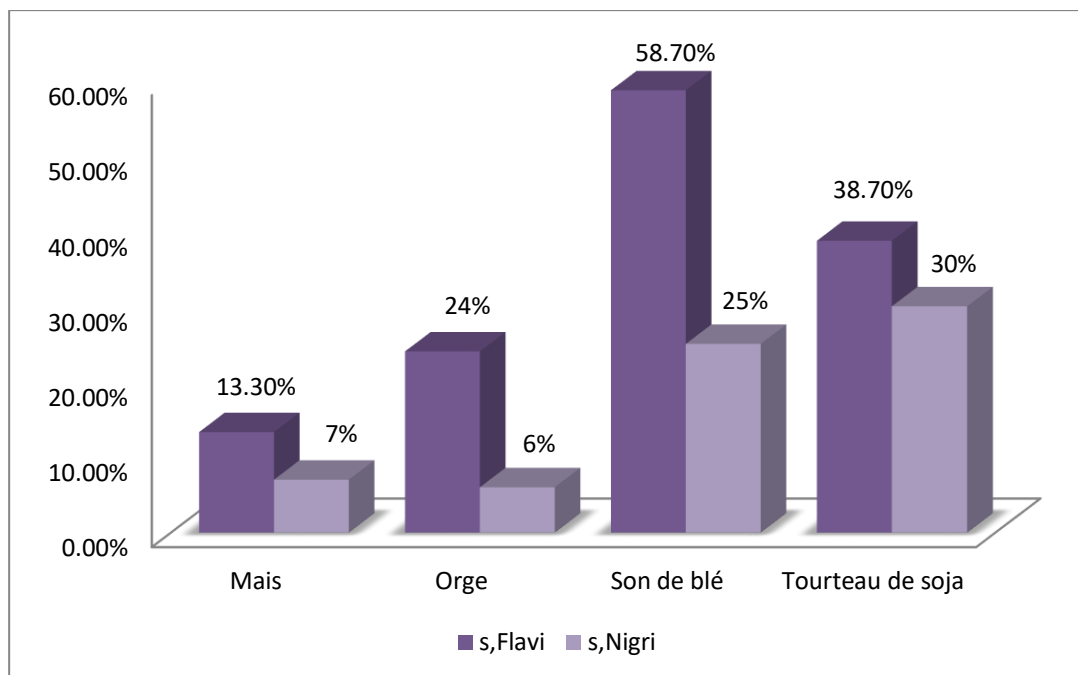


**Figure 20** : Pourcentages des principaux genres fongiques isolés des échantillons analysés

### 2.3. Distribution des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri*

Les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* représentent une moyenne de 38,8% et 30% du genre *Aspergillus* respectivement). Le son de blé (58,7%) sont les plus contaminés par les isolats de cette section. Les tourteau de soja sont à moindre degré (38,7%). Les échantillons de l'orge et de maïs sont moins contaminés par *Aspergillus* section *Flavi*. Les pourcentages respectifs de cette section dans ces échantillons sont 24%, 13,3% respectivement. En outre, les échantillons de tourteau de soja sont les plus contaminés par *Aspergillus* section *Nigri* (30%) suivies des échantillons du son de blé (25%). Le maïs et l'orge sont les moins contaminés par les isolats de cette section. Les autres isolats du genre *Aspergillus* appartiennent essentiellement à la section *Terrei* et à la section *Circumdati*.

On note une dominance de la section *flavi* dans toutes les régions par rapport à la section *Nigri*. Ainsi les taux de contamination des échantillons par les isolats de la section *Flavi* les plus élevés sont surtout enregistrés à Oum El bouagui, et khenchela. Les taux de contamination les plus faibles sont enregistrés dans les échantillons de Tebessa, et Batna.

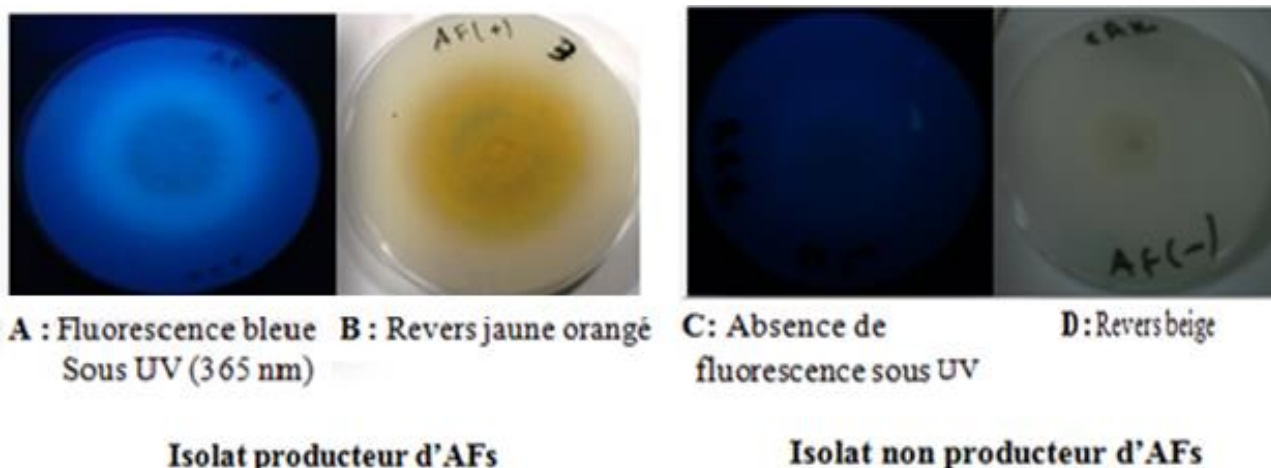


**Figure 21.** Fréquence d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* dans les échantillons analysés de maïs, orge, son de blé et tourteau de soja

### 2.4. Incidence des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes dans les échantillons analysés :

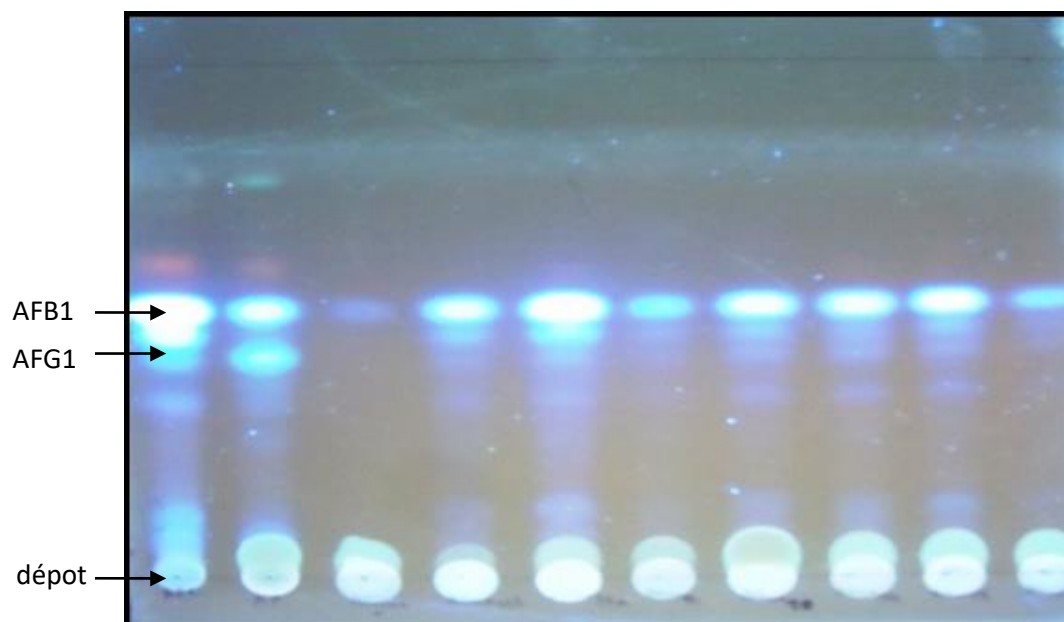
Selon les analyses mycologiques, le genre *Aspergillus* section *Flavi* était dominant dans la majorité des échantillons analysés. Au total, 20 isolats fongiques ont été isolés et testés pour leur capacité à produire des aflatoxines (AFs).

L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence des isolats aflatoxinogènes dans les échantillons analysés, ce qui permet d'estimer la qualité de ces produits en termes de risque d'aflatoxines. Le potentiel de production d'aflatoxines des isolats a été évalué en mettant en évidence une fluorescence bleu-violet ou bleu-vert sous UV à 365 nm sur un milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM). Les isolats produisant uniquement les aflatoxines B développent une fluorescence bleue, tandis que ceux produisant les aflatoxines G développent une fluorescence verte. La capacité des isolats à produire des aflatoxines sur milieu CAM a été confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM). La fluorescence des aflatoxines est illustrée sur une figure 21.



**Figure 22** . Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus* section flavisur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).

Les résultats ont révélé un taux de production de 50% et 60%, respectivement sur milieu CAM et sur CCM. L'analyse par CCM des différents extraits obtenus indique un taux de production plus élevé, 5 isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur CAM. Ce qui démontre que la CCM est plus performante que le milieu CAM. On note que toutes les souches ayant montré une fluorescence sur milieu CAM se sont avérées aflatoxinogènes sur CCM et l'intensité de cette fluorescence est liée à la concentration des aflatoxines produites par la souche. La majorité des isolats aflatoxinogènes produisent l'AFB1.



**Figure 22** : Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V. de la production des AFS par les isolats *d'Aspergillus* section flavi sur CCM

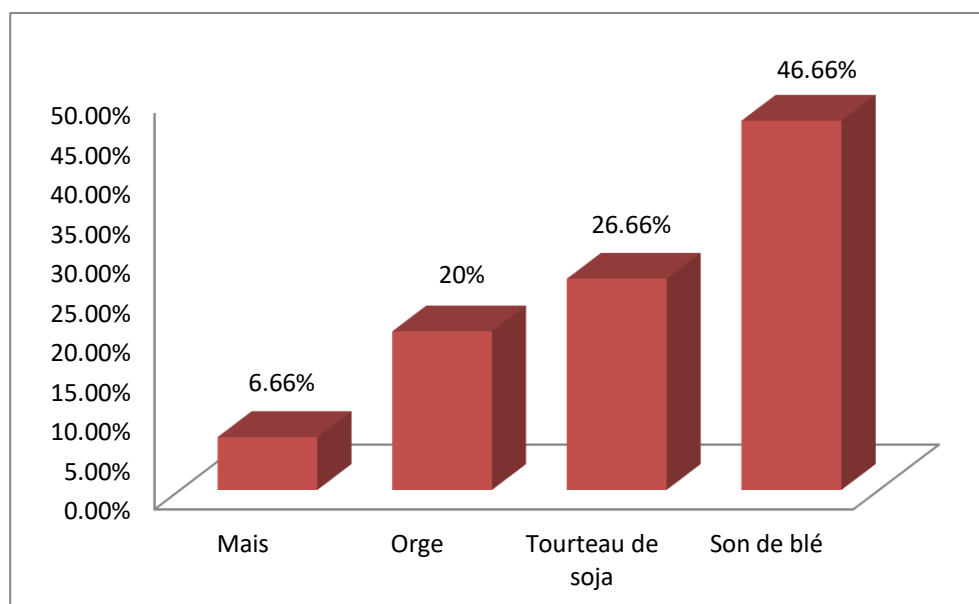
## II. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines, d'acide cyclopiazonique et de sclérotés

### 1. Les souches aflatoxinogènes isolées des échantillons de volaille

Sur les 20 isolats *d'Aspergillus* section Flavi isolés des échantillons, 14 isolats (70%) ont révélés des producteurs d'Aflatoxine de type B et 1 isolat (5%) produit les 2 types d'AFS (B et G)(tableau 7).

**Tableau 7.** Répartition des isolats aflatoxinogènes dans les 40 échantillons de matières premières analysés.

Type de produit	Nombre d'isolats testés	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Nombres d'isolats aflatoxinogènes(%)
Mais	2	1	6.66
Orge	3	3	20
Tourteau de soja	6	4	26,66
Son de blé	9	7	46,66

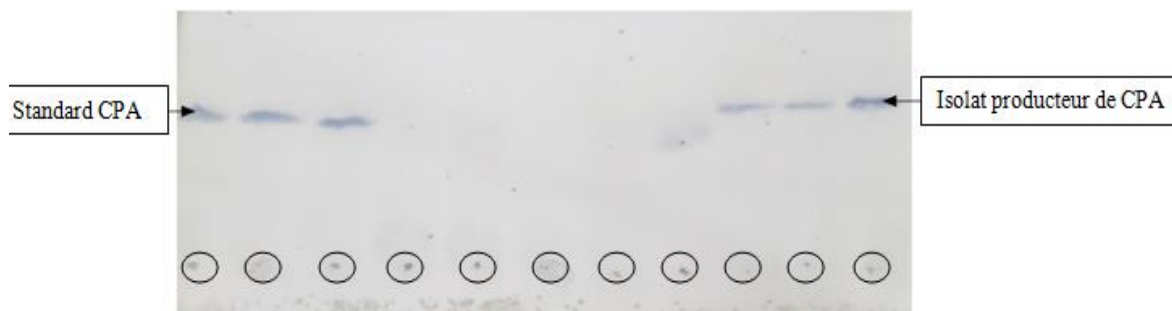


**Figure 23** .Fréquence (%) des isolats *d'Aspergillus* section Flavi producteurs d'AFs en fonction de type de produit.

## 2. Production de l'acide cyclopiazonique (CPA)

La production de CPA par les 15 souches d'*Aspergillus* section *Flavi* a également été examinée. L'analyse du CPA a été effectuée par CCM (**Figure 24**).

Un nombre de 10 souches (66.66.4%) productrice de CPA a été observé.



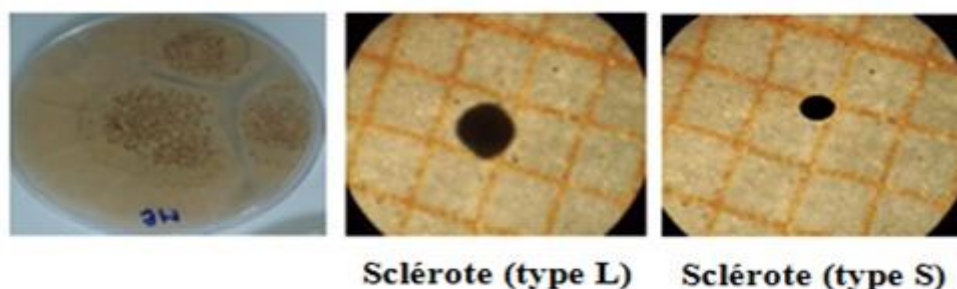
**Figure 24** . Chromatogramme des extraits méthanoliques des *Aspergillus* section *flavi* testés pour la production du CPA.

## 3. Etude de la production des sclérotés

Les sclérotés, sont des masses mycéliennes compactes, dures, pigmentées de forme globuleuses, ellipsoïdales ou allongées. Ils sont considérés comme des organes de conservation capables de résister aux conditions environnementales défavorables en raison de leur résistance à la dégradation chimique et biologique. La production et la taille des sclérotés est un caractère phénotypique des souches d'*A. flavus* (Abbas et al., 2005) qui est souvent utilisé dans l'identification morphologique.

L'étude de la production des sclérotés permet de classer les isolats en deux groupes distincts: les souches (L) produisant des sclérotés dont le diamètre est supérieur à 400 µm et les souches (S) avec des sclérotés inférieurs à 400 µm (Cotty, 1989).

Sur les 15 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*, 5 (33.33%) étaient des producteurs de sclérotés, dont 3 isolats de type L et 2 isolats de type S, cependant 10 isolats non producteurs.



**Figure 25** . Production et détermination de la nature des sclérotés au MO G×4 chez les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*.

### 4. Caractérisation des *Aspergillus* section *flavi* en fonction de la production d'AFS, de CPA et des Sclérotés

La caractérisation des espèces de cette section repose sur une taxonomie polyphasique à savoir l'étude des caractères morphologiques, des caractères moléculaires et la production de certains métabolites signalés dans la partie bibliographique. Dans le cadre de ce travail nous n'avons pas pu faire l'analyse de tous ces métabolites et nous nous sommes limités aux dosages des AFs, de CPA et des sclérotés. Ceci ne nous permet évidemment pas de faire une délimitation très précise de nos isolats.

Sur la base du profil de mycotoxines produites, en plus des caractères morphologiques, les 15 isolats aflatoxinogènes appartenant à la section *Flavi* ont été subdivisés en 4 groupes (Tableau 8).

- Le groupe I est constitué d'isolats produisant l'aflatoxine B, le CPA mais ne produit pas l'AFG et de sclérotés. Ces isolats seraient rattachés à *A. flavus* typique.
- Le groupe II inclue les isolats produisant l'AFB, le CPA et de sclérotés de type « S ». Ces isolats pourraient appartenir au groupe atypique d'*A. flavus* qui produit uniquement l'AFB.
- Le groupe III produit les deux types d'AFs B et G, mais pas de CPA et de sclérotés. Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*. Cette dernière, morphologiquement très proche d'*A. flavus*, produit les AFs B et G est fréquente dans le sol et parasite les insectes (Kurtzman et al., 1987; Peterson et al., 2000).
- Le groupe IV représente les isolats ayant la capacité de produire l'AFB et les sclérotés de type « L » mais pas de CPA. Ces isolats appartiendraient vraisemblablement à *A. flavus* typique.

**Tableau 8.** Répartition des 15 isolats aflatoxinogènes selon la production de CPA et de sclérotés.

Groupe	AFB	AFG	CPA	Sclérotés	Nombre d'isolats	Pourcentage (%)
I	+	-	+	-	9	60
II	+	-	+	S	2	13.3
III	+	+	-	-	1	6.66
IV	+	-	-	L	3	20

## **Discussion**

### Discussion

Les aliments de volaille sont probablement les graines les plus étudiées pour la présence de champignons et la production des mycotoxines en particulier les aflatoxines. Dans ce travail nous avons étudié la contamination des aliments concentrés complets de volaille en Algérie par les mycotoxines et plus précisément par l'aflatoxine B1. Pour cela, un total de 40 échantillons d'aliments a été prélevé dans les 4 wilayas d'Est d'Algérie (khenchela, batna, tebessa et Oum bouagui).

Les volailles ont besoin de plusieurs nutriments pour une alimentation équilibrée et saine. Protéines : Les protéines sont essentielles pour le soutien de la ponte et la croissance des volailles. Elles sont fournies par des aliments tels que le maïs, les pois, la fêverole, le tourteau de soja, et les tourteaux de colza., Glucides : Les glucides sont une source d'énergie pour les volailles. Ils sont assurés par des céréales comme le maïs, le blé, l'orge, le sorgho et le riz, ainsi que par des produits tels que le son de blé. Ainsi que les lipides, les vitamines et les sels minéraux qui jouent un rôle déterminant dans le bon développement naturel des volailles..(Mahajan, 2015).

La contamination des denrées alimentaires par les moisissures peut se produire à n'importe quel stade de la chaîne alimentaire : Production, stockage, transport, transformation et conditionnement (Doré et al., 2002). Les champignons du sol ou les débris végétaux peuvent répandre leurs spores sur la plante ou sur la graine et se multiplier ensuite pendant le stockage si les conditions sont favorables.

Dans les denrées alimentaires stockées dans des climats chauds (Pitt et Hocking, 1997). L'analyse de la flore fongique de l'aliments de volaille a révélé la présence de trois genres avec des pourcentages différents : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Une nette prédominance du genre *Aspergillus* suivi de *Penicillium* et *Fusarium* dans les échantillons de son de blé et le tourteau du soja. Ces résultats indiquent clairement la présence des moisissures dites de stockage à des taux élevés. La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud (le cas de notre région) est très connue (Pitt et Hocking, 1997). *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (Gourama et Bullerman, 1995) et il est par conséquent très répandu dans la nature et tout particulièrement dans les régions à climat chaud (Mantle, 2002).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie et qui signalent la dominance du genre *Aspergillus* dans les aliments de volaille. (Pitt et al., 1993). *Aspergillus* section *flavi* est très répandue dans les climats chauds et occupe des niches écologiques très divers (Wilson et al., 2002). Cette espèce vit dans le sol à l'état saprophyte mais est capable de provoquer le pourrissement des grains (Horn et Dorner, 1998).

Des résultats similaires ont été rapportés par Melle **Khadidja Benabderrahmane (2022)** au cours d'une Modélisation de la croissance des moisissures mycotoxinogènes dans l'alimentation de volaille à Ain Temouchent. La dominance du genre *Aspergillus* dans les échantillons de son de blé et du tourteau de soja sont en accord avec les études de **Bouti Karima (2021)**, dont ces résultats ont montré la dominance du genre *Fusarium* dans les échantillons de maïs (69,8%) et d'orge (50%). Par contre dans le tourteau de soja et le son de blé les pourcentages de contamination par le genre *Aspergillus* ont été les plus dominants. L'analyse de la flore fongique des aliments de volaille a révélé la présence de trois genres avec des pourcentages différents : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. On a aussi remarqué que même si les taux de contamination étaient différents entre les différents types d'aliments de volaille, la nature des espèces fongiques qui prédominent restait la même.

En comparant avec les études de **HAMEL Asma et al (2021)**, le taux de contamination du genre *Fusarium* dans les échantillons du son de blé et le tourteau de soja a été très élevé, par rapport au genre *Aspergillus* et *Penicillium*.

Nos résultats confirment le statut de la flore de stockage de deux genres (*Aspergillus* et *Penicillium*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant le stockage et le statut de la flore du champ représenté par le genre *Fusarium*, qui exige une forte humidité.

Dans cette étude nous avons révélé une forte contamination des échantillons du son de blé (25%) et du tourteau de soja (30%) par *Aspergillus* section *Nigri*. Les isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* peuvent constituer une source d'ochratoxine A dans ces denrées. Selon les études menées dans les régions à climat chaud, les espèces de cette section et de la section *Flavi* sont les plus fréquemment isolées dans les graines de céréales et d'autres céréales (**Riba et al., 2008, 2010; Abarca et al., 2001; Magnoli et al., 2003**). Toutefois leurs fréquences sont moins importantes que dans le maïs et l'orge.

Les analyses mycologiques ont montré la dominance du genre *Aspergillus* section *flavi* dans la majorité des échantillons d'aliments de volaille. Au total, 40 isolats du genre *Aspergillus*

section flavi ont été isolés et tester pour le pouvoir producteur d'Afs. Le but de cette étude est d'évaluer l'incidence des isolats aflatoxinogènes dans les échantillons analysés ce qui permet d'estimer la qualité de ces produits en termes de risque d'Afs.

La majorité (73.3%) des isolats aflatoxinogènes produisent l'AFB et le CPA avec présence ou non de sclérotas de type « L ». Cette catégorie d'isolats appartiendrait vraisemblablement à *A. flavus* typique (groupe I) (**Samson et al., 2004**). Nos résultats ont révélé que le pouvoir producteur d'AFs varié considérablement d'un isolat à l'autre. Il est connu qu'*A. flavus* produit généralement les AFs de type B1 et le CPA, mais cette production est extrêmement variable (**Richard et al., 1992; Horn et Dörner, 1999**). En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (**Pitt, et al., 1993; Horn et al., 1996**). De nombreux auteurs soulignent une corrélation positive entre la production d'AFs de type B et la production de CPA. Ainsi, **Pildain et al. (2008)** soulignent que le CPA est produit non seulement chez les souches productrices d'aflatoxine B comme *A. flavus* et occasionnellement chez *A. pseudotamarii* mais aussi chez *A. minisclerotigenes* et *A. parvisclerotigenus* productrices des deux types d'AFs (AFB et AFG). Dans une étude sur les *Aspergillus* section *Flavi* des sols de culture de maïs en Iran, **Mehdizadeh et al. (2006)** soulignent, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les AFs, le CPA et les sclérotas (groupe I). Ces auteurs rapportent un pourcentage d'isolats producteurs d'AFs et de CPA comparable à celui que nous avons obtenu.

**Giorni et al. (2007)** trouvent que 70% des souches d'*A. flavus* isolées du maïs d'Italie sont aflatoxinogènes et la moitié produit également le CPA. En outre, des différences dans la capacité de production des AFs peuvent être associées à la taille des sclérotas (**Cotty, 1989; Criseo et al., 2001**). D'après **Hua Sui-Sheng (2002)**, tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le morphotype « L », le plus fréquent, comprend des producteurs et des non producteurs. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie.

Parmi les 15 isolats aflatoxinogènes, 13.3% d'entre eux produisent des sclérotas de type « S ». Ces isolats sont fortement producteurs d'AFB1 révélée sur CCM. Nos isolats produisant l'AFB et le CPA sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus* sont rares. Le type « S », signalé pour la première fois par **Hesseltine et al. (1970)** est rarement rencontré (**Vaamonde et al., 2003; Barros et al., 2005; Giorni, 2007**). Selon **Carwell et Cotty (2002)**, les isolats de type « S » sont rencontrés fréquemment dans des régions à températures élevées

et à faible pluviométrie. Ces auteurs pensent que la production de sclérotés de type « S » est une forme de survie aux fluctuations climatiques. **Saito et Tsuruta (1993)** ont classé auparavant le type « S » comme une variété d'*A. flavus*: *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, qui produit uniquement l'aflatoxine. **B. Frisvad et al. (2005)** ont considéré comme une nouvelle espèce dont certains isolats produisent les AFs B et G. Les derniers travaux sur la taxonomie des *Aspergillus* section *Flavi* rattachent ce type d'isolat soit à l'espèce *A. mini sclerotium* soit à *A. parvisclerotigenus* qui diffèrent en elles du point de vue des métabolites produits (**Pildain et al., 2008**). Il faut signaler aussi que l'incidence des isolats aflatoxinogènes est aussi liée à la nature du substrat (**Horn, 2003**). Par exemple, le nombre d'isolats aflatoxinogènes est plus élevé dans les arachides (69%) que dans le blé (13%) (**Vaamonde et al., 2003**).

## **Conclusion générale et perspectives**

### Conclusion

L'évaluation du niveau de contamination par les champignons toxigènes est important, car elle permet de fournir des informations aussi bien sur la qualité des produits destinés à l'alimentation animale que d'éventuelle présence de mycotoxines. Beaucoup d'intérêt est accordé à la détection et à la quantification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* responsables de la contamination par les AFs des grains de maïs, d'orge, du son de blé et d'autres graines et fruits secs (Passone et al., 2010). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier les espèces aflatoxinogènes et les AFs dans les échantillons de maïs, d'orge, du son de blé et tourteau de soja commercialisés dans les quatre wilayas. Les résultats obtenus montrent que le son de blé et le tourteau de soja sont fortement contaminés par les moisissures dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus dominants. Ceci confirme le statut de flore de stockage de ces deux genres fongiques. Cependant les échantillons de maïs et l'orge ont montré une forte contamination par le *Fusarium* et une faible contamination par le genre *Aspergillus*. Nous avons également noté la dominance du genre *Aspergillus* dont les espèces appartenant aux sections *Flavi* et *Nigri*, dans la majorité des aliments analysés.

Les isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* nous ont montré une grande diversité du point de vue morphologique et chimiotypique. Ces isolats ont été classés en quatre groupes différents dont la majorité (60%) présentait les caractères d'*A. flavus* typique produisant le CPA. Certains (13, 3%) sont rattachés aux espèces d'*A. flavus* atypique ayant la capacité de produire de petits sclérotés (<400 µm). Un isolat rattaché à *A. parasiticus* et deux isolats seraient rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus*. La plus grande diversité d'*A. flavus* sera liée à une instabilité de certains de ces caractères ou à une évolution dans le temps de cette espèce. La dominance d'*A. flavus* dans les aliments a été signalée par de nombreux auteurs (Bayman et Cotty, 1991; Horn et al., 1996; Cotty, 1989; Pildain et al., 2004; Chang et al., 2006).

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

## Conclusion générale et perspectives

---

Enfin, il convient d'admettre, au vu de ces résultats, que les études réalisées dans cet axe restent insuffisantes et beaucoup de travail reste à accomplir.

Il serait intéressant, en perspective :

- Elargir l'étude sur un grand nombre d'échantillons et sur d'autres matrices de l'alimentation animale et les produits d'origine animale afin de disposer d'avantage de renseignements sur le suivi de cette contamination.
- Développer et valider d'autres méthodes analytiques, simples et à faible coût, afin de faciliter le contrôle et d'assurer un suivi régulier des aflatoxines dans les aliments.
- D'introduire les analyses mycotoxicologiques, comme paramètre d'analyse permanent et de routine à l'échelle national.
- Développer des stratégies de lutte biologique visant à limiter le développement des moisissures toxigènes et par conséquent la production des aflatoxines.

Il est aussi nécessaire à titre préventif, de prendre en compte quelques mesures pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation animale :

- Application des règles de bonnes pratiques de culture ainsi que l'amélioration des conditions de récolte, de stockage et de fabrication avec des températures et des taux d'humidité contrôlés afin d'éviter de réunir des conditions adéquates pour la production des AFs dans l'aliment des volailles. Ainsi, il faut conseiller aux producteurs des méthodes rationnelles de séchage et surtout d'éviter le contact prolongé des grains avec le sol.
- Les stratégies impliquant le tri et/ou la destruction des denrées contaminées sont peu réalistes du fait de leur coût économique important. Pour cela, il est intéressant de développer des méthodes de décontamination en utilisant des agents adsorbants (minéraux, organiques ou de micro-organismes) afin de limiter l'absorption des mycotoxines dans l'organisme de l'animal. Ceci permettrait de freiner les effets néfastes des mycotoxines.
- La maîtrise future du problème des mycotoxines dans l'économie de l'élevage et dans les produits animaux dépend de la mise en œuvre d'une politique adéquate dans le domaine de la gestion agricole, surtout que l'Algérie augmente constamment son autosuffisance dans la production des produits d'origine animale.

**Annexe**

## Annexes

### Milieux de culture

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

#### **Milieu DRBC (Dichloran, Rose Bengal, Chloramphénicol) (King et al., 1979)**

Glucose 10 g

Peptone de viande 5 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g

Rose Bengale (soit 0.5 ml d'une solution à 5% dans l'eau) 25 mg

Dichloran (soit 1ml d'une solution à 0.2% dans l'éthanol) 2 mg

Chloramphénicol 100 mg

Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6,2

Le milieu DRBC est utilisé pour l'isolement des champignons

Les milieux de cultures utilisés pour l'identification morphologique des principales espèces

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

Czapek Concentré 10 ml

Saccharose 30 g

Extrait de levure (Difco) 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

CuSO<sub>4</sub>/5H<sub>2</sub>O 0,005 g

ZnSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O 0,01 g

Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6,2± 0.2

Le milieu CYA est utilisé pour l'identification morphologique et la production de CPA et de

l'OTA

### **Concentré de Czapek (Pitt, 1979)**

NaNO<sub>3</sub> 30 g

KCl 5 g

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 5 g

Fe SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0, 1 g

Zn SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0, 1 g

Cu SO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O 0,05 g

Eau distillée 100 ml

pH 6.7 ajusté avec une solution HCl 2N

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

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat) 200 à 300 g

Saccharose 10 g

Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 5,6 ± 0,2

Le milieu PDA est utilisé aussi pour la conservation des isolats.

La solution utilisée pour les observations microscopiques est :

### **Coconut Agar Medium (CAM) (Davis et al., 1987)**

Cent grammes (100 g) de la noix de coco déchiquetées sont homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée portée à ébullition. Le mélange est filtré 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 15 g d'agar puis complété à 1000 ml par l'eau distillée. 3g de 13-cyclodextrine (03-cyd) sont ajoutés à un litre de milieu.

Le milieu CAM est utilisé pour la production et la révélation des aflatoxines.

**Nb.** Tous les milieux sont stérilisés pendant 15 min à 120°C

## **Les références**

### Les références

- . **ABDELLAOUI .M.,GUELLAL Ch.(2016)**.Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus* section Flaviaflatoxinogènes contaminant les amandes commercialisées en Algérie. Mémoire de master. Université Blida 1.131p
- . Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(8), 662-669.
- Aflatoxin. Eagan press, st Paul, Minnesota, USA.AFSSA.(2006)**. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapportsynthétique*, 80p.
- Afssa. (2009)**. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final*, 1-308.
- AFSSA. (2009)**. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final*.
- AFSSA. (2009)**. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final*.
- AFSSA.(2009)**. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final*, 308p.
- Ait Mimoune N., Riba A., Verheecke C., Mathieu F. et Sabaou N. (2016)**.- Fungal Contamination And Mycotoxin Production By *Aspergillus* Spp. in Nuts And Sesame Seeds, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5 (4), 301-305.
- ASLAFI, A., DELLIL, A., & MEKKI, S. (2018)**. Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans la région Tiaret (Doctoral dissertation, université ibn khaldoun-tiaret).
- ASLAFI, A., DELLIL, A., & MEKKI, S. (2018)**. Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans la région Tiaret (Doctoral dissertation, université ibn khaldoun-tiaret).
- Bellaâ Ibtissem., Naili Karima,( 2009)**.,Etudes analytique d'un champignon toxigène *aspergillus flavus*. Mémoire de master université de Khenchela.
- Benghanem-** Etudes microbiologique des dérivés du blé recherche particulière des moisissures et des aflatoxines .Université de Khenchela.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003)**. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010)**.Mycotoxins in Food and Feed : Present Status and Future

- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Moore, G. G., & Payne, G. A. (2014).** *Aspergillus/Aspergillus flavus*. In Encyclopedia of Food Microbiology (p. 83-91). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00012-4>
- Binder, E. M., & Krska, R. (2012).** *Romer Labs guide to mycotoxins*.
- Blackwell, B. A., Miller, J. D., & Savard, M. E. (1994).** Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. *Journal of AOAC International*, 77(2), 506-511.
- Blumenthal CZ. 2004. Production of toxic metabolites *Aspergillus niger*, *Aspergillusoryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food gradeenzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39: 214–228.
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018).** Silage review : Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Botton, A. Breton, M. Fevre, S. Gauthier, Ph. GUY, J.P. Larrent, P. Reymond,J.J.Sanglier,Y. Vayssier, P. Veau.(1990).** Moisissures utiles et nuisibles :importance industrielle. *Masson deuxième édition .*, Paris
- Bou djemâ G.(2023).**La recherche des *Aspergillus* section Flavi et leur mycotoxine dans les arachides. mémoire de master. université Abbas leghrou-Khenchela. 16p
- Bou djemâ. G.( 2023).**La recherche des *Aspergillus* section flavi et leursmycotoxines dans les arachides. Mémoires de master. Université. Khenchela.
- Boudra,h. (2010)** Les mycotoxines dans l'alimentation : mode de contamination, conséquences sur la santé des consommateurs et moyens de les combattre. *Sciences du Vivant* [q-bio]. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2). fftel-02814215
- BOULEKROUN .Ch.(2021).** Isolement et identification des champignonstoxinogènes isolés du blé récolté en 2020. Mémoire de master. Université M'Hamed Bougera de Boumerdès. 29
- Bouti karima.(2021).**Etudes de contamination par les champignons du genresaspergillus section flavi producteur d'aflatoxines et des aflatoxines de la filièrealimentaire animal en Algérie. Thèse de doctorat université. Ecole normal supérieur deKouba.
- Bragulat, MR, Abarca, ML et Cabañes, FJ (2001).** Une méthode de dépistage simple des champignons produisant de l'ochratoxine A en culture pure. *Revue internationale de microbiologie alimentaire* , 71 (2-3), 139-144.
- Cotty, PJ (1989).** Virulence et caractéristiques culturelles de deux souches d'*Aspergillus flavus* pathogènes sur coton. *Phytopathologie* , 79 (7), 808-814.
- Bleichrodt, H., Pinto, JL et Wakker, PP (2001).** Faire un usage descriptif de la théorie des

perspectives pour améliorer l'utilisation prescriptive de l'utilité attendue. *Sciences de gestion*, 47 (11), 1498-1514.

**BRAHMI M., ZAHY N. (2016).** Recherche des champignons aflatoxinogènes du genre *Aspergillus* dans l'aliment de volaille et détection des aflatoxines. Mémoire de master. Université Saad Dahlab-Blida .18

**Brochard, G., & Le Bacle, C. (2009).** Mycotoxines en milieu de travail : 1. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. *Mycotoxines en milieu de travail : 1. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines*, 119, 286, 288, 299-323 [27 p.].

**Brossard, L., Martin, C., Chaucheyras-Durand, F., & Michalet-Doreau, B. (2004).** Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reproductio NutritionDevelopment*, 44(3), 195-206.  
<https://doi.org/10.1051/rnd:2004023>

**Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007).** Stability of mycotoxins during food processing. *International journal of food microbiology*, 119(1-2), 140-146.

**Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., ... Bailly, JD (2020).** Biosynthèse des aflatoxines et régulation génétique : une revue. *Toxines*, 12 (3), 150.

**Cairns-Fuller V, Aldred D, Magan N. (2005).** Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of applied microbiology*, 99: 1215-1221.

**CHATTOPADHYAY S.K, TASKAR P. K., SCHWABE O., DAS Y. T., BROWN H. D. (1985).** Clinical and biochemical effects of aflatoxin in feed ration of chicks. *Cancer Biochembiophys*, 8, 67-75.

**Cole, R.J., et Cox, R.H. (1981).** Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of General Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.  
Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81.

**Dieme, E., Fall, R., Sarr, I., Sarr, F., Traore, D., Seydi, M. (2016).** Contamination des céréales par l'aflatoxine en Afrique: revue des méthodes de lutte existantes. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(5), 2285-2299.

**Dieme, E., Fall, R., Sarr, I., Sarr, F., Traore, D., & Seydi, M. (2016).** Contamination des céréales par l'aflatoxine en Afrique: revue des méthodes de lutte existantes. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(5), 2285-2299.

Diomède N.(1974).EFFETS DE LA SUPPLEMENTATION DE L'ANTIMYCOA SUR LA TOXICITE DE L'AFLATOXINE B1 CHEZ LE POULET DE CHAIR. Mémoire de master. Université Cheikh Anta Diop de Dakar .7-8

**El Khoury, A. (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) etAflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et Origine (Doctoraldissertation).

**El khoury, A. (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1(AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Diplôme deDocteur en sciences de la vie. 200p. Option : Génie des procédés et de l'environnement. Soutenu le 3/07/2007 à *l'institut national polytechnique de Toulouse, France.*

**El Khoury, R. (2016).** Maitrise du risque aflatoxique: Utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action (Thèse de doctorat ). Université De Toulouse.199.

**Elmahgubi, A. (2013).** Modulation de la toxigenèse fongique par des extraits naturels (Thèse de doctorat , Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT).13-42

**Erastus, K. (2011).** REPORT FAO/WHO RegionalConference on Food Safety for Africa((CAF 05/2)). <http://www.fao.org/3/a0215e/A0215E24.htm>

**Fangeat, L. (2008).** Les mycotoxines chez les bovins (Thèse de doctorat). UniversitéCLAUDE-BERNARD - LYON I.32-35.

FAO. (2004). Worldwideregulations for mycotoxins in food and feedin 2003. FAO food and nutrition papers, Rome, Italy, 81. 684 <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>

**Firmin, S. (2011).** Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbantorganique: évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiqueschez le rat et la brebis laitière (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).17

**Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M.,Larsen, T. O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., &Houbraken, J.(2019).**Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins,ochratoxins and othermycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1-63.

**Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., Houbraken, J. (2019).** Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and othermycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1-63.

**Gangneux, J. P., Harel, F., & Guegan, H. (2023).** Moisissures dans l'environnementet impacts sur la santé humaine. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2023(550),44-52.

**Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K., & Manners, J. M. (2009).** Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 155(9), 3149- 3156.

- Gauthier, A. (2016).** Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. *Sciences pharmaceutiques*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux. 36-39
- Guénin, C. Hubert. Clément .,(2022).** Principales mycotoxicoses du lapin de compagnie. Thèse de doctorat. 7-15
- Guerre P., Galtier P., Burgat V.,(1996).** Les aflatoxicoses chez l'animal: des manifestations cliniques aux mécanismes d'action. *Revue Méd Vét.* 147, 497-518.
- Hamilton, P. B. (1984).** Determiningsafelevels of mycotoxins. *Journal of Food Protection®*, 47(7), 570-575.
- Han X.Y., Huang Q.C., Li W.F., Jiang J.F., Xu Z.R.,( 2008).** Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxinB1 levels.*Livest.Sci.*, 119, 216-220.
- Haque, M. A., Wang, Y., Shen, Z., Li, X., Saleemi, M. K., & He, C. (2020).** Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry : A review. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104-095. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>
- Hernandez Hernandez, C. (2021).** *Extraction-Purification-Formulation de composés naturels capables de bloquer la synthèse de l'Aflatoxine B1* (Thèse de doctorat). université De Toulouse.3-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.009>  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.009>  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.009>  
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Hussein, H., & Brasel, J. M. (2001).**Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- International.Journal of Food Microbiology*, 119: 140-146.
- Ji C, Fan Y, Zhao L.( 2016).** Review on biological degradation of aflatoxin,zearalenone and deoxynivalenol, *Animal Nutrition Journal*. *Animal Nutrition*, 2: 127-133.
- Joachim, U. D. M. B., Thaddée, M. N., Lelo, M. (2020).** Inhibition du développement de l'*Aspergillus flavus* par l'acide acétique: Analyse de trois expériences réalisées à Kinshasa-RD Congo.*Le Journal des sciences animales et végétales* 45(1):7809-7821.
- kahlouch L. Mezain L, 2017.**Etudes de quelques métabolites socondaire du genreaspergillus ayant une activité biologique. Mémoire de maste.Université de Qostontine.
- Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., & Krska, R. (2016).** Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize—An Extensive Survey. *Toxins*, 8(12), 363. <https://doi.org/10.3390/toxins8120363>

**Leeson S., Diaz G.J., Summers J.D. (1995).** Poultry Metabolic disorders and mycotoxins, Eds University Books, Guelph, Ontario, Canada, 352p.

**Lewis DC, Goodrich-Schneider R.(2012).** **Mycotoxins in Fruit and Fruit Products.**

**Magnoli, Alejandra Paola, Poloni, V. L., & Cavaglieri, L. (2019).** Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 99-108.

**Magnoli, Alejandra Paola, Poloni, V. L., & Cavaglieri, L. (2019).** Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 99-108.

**Makhlouf, J. (2019).** Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique (Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT; Université Libanaise).39-52

**Mariana, T. (2008).** Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A): Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. *Institut National Polytechnique de Toulouse*.43-44

**Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V., 2013.** Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment, *FoodChem. Toxicol.*, 60, 218-237.

**MEGHAZI, N. (2015).** Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké (Thèse de doctorat).23

**Meren. A. Klich.( 2007).***Aspergillus flavus*: le principal producteur d'aflatoxines.Pathologie végétale moléculaire. P: 713-722.

**Miller, J.D. et Trenholm, H.L. (1994).** - Mycotoxins in grain :compounds other than Moreau, C. (1976). Les mycotoxines dans les produits laitiers. *Le lait*, 56(555-556), 286-303.

**Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I., & Gruber-Dorninger, C. (2019).** Mycotoxins in Corn : Occurrence, Impacts, and Management. In *Corn* (p. 235-287). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00009-7>

**Nadège M.(2017).**RECHERCHE ET DOSAGE DE L'AFLATOXINE BI DISTRIBUE A DAKAR ET DANS DES FERMES AVICOLES DE LA ZONE PERI- URBAINE DE DAKAR. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop De Dakar .33

**Neme K, Mohammed A.( 2017).**Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. *Areview. Food Control*, 78: 412-425.

**Nikiéma, P. A. (1993).** Etude des aflatoxines au Burkina Faso: détermination quantitative et qualitative des aflatoxines de l'arachide par des tests biochimiques et immunologiques.11-12

**Parent-Massin, D. Parchment, R.E. (1998).** Haematotoxicity of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149, 591-598.

- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999).** Les mycotoxines dans l'alimentation. Evaluation et gestion du risque. Tec & Doc Lavoisier.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999).** Métabolisation des mycotoxines-Effets biologiques et pathologies-Ecotoxicogénèse. Dans «Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque» de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Technique et Documentation, Paris, 18-35. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 125: 252-257.
- Rauber R.H., Dilkin P., Giacomini L.Z., Araujo de Almeida C.A., Mallmann C.A. (2007).** Performance of turkey poults fed different doses of aflatoxins in the diet. Poultry 86, 1620-1624.
- Reguig Y., Boufala A. (2021).** Etude prophylactique de quelques plantes médicinales contre l'intoxication induit par les mycotoxines (l'aflatoxine et l'ochratoxine A). Mémoire de master. Université Docteur Moulay Tahar Saida. 15-16  
Rev. Phytopathol. 25:249-70.
- 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. 190p. *Option : Microbiologie. Soutenu le 13/12/2008 à l'UMMTO, Algérie.*
- Rizzo A, Haikar A, Dobson A, Frisvad J, Holmes S, Olkku J, Persson SJ, Börjesson T. (2003).** Olsen M, Jonsson N, Magan N, Banks J, Fanelli C.). Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999- 00433.
- Samson, R.A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2010).** Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series, CBS Knaw, Fungal biodiversity center, Utrecht, Netherland, 390 p.
- Santos Pereira, C., C. Cunha, S., & Fernandes, J. O. (2019).** Prevalent Mycotoxins in Animal Feed : Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 11(5), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>
- Santos Pereira, C., C. Cunha, S., & Fernandes, J. O. (2019).** Prevalent Mycotoxins in Animal Feed : Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 11(5), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>
- Saori, A, Nancy. P, Keller, 2021.** The Annual review of phytopathology is online at phytoannuleerreviews.org aspergillus flavus. Vol: 49:107-33.

- SEIFIA.A , DERFALOU.A.(2020).** Recherche d'AFB1 et de la Caféine dans le café dans la région de Constantine par chromatographie sur couche mince.mémoire de master. Université Mohamed Khider de Biskra.9-17
- Shephard, G. S. 2008.** Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* 25(2):146-151.
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., & Hymery, N. (2016).** Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- Soriano, J. M. (2007).** Micotoxinas en alimentos. Ed. Díaz de Santos, Madrid.<https://www.editdiazdesantos.com/libros/soriano-del-castillo-jose-miguel-micotoxinas-en-alimentos-L03008080101.html> .
- Tabuc, C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de l'Institut Natinal de Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
- Umar S., Younus M., Rehman M.U., Aslam A., Ali Abdullah Shah M., Tanveer Munir M., Hussain S., Iqbal F., Fiaz M., Ullah S.(2015).** Rôle of aflatoxin toxicity on transmissibility and pathogenicity of H9N2 avian influenza virus in turkets. *Avian Path.*, 44, 305-310.
- Urban L et al, 1987.Epdemology of Aflatoxins Foration by Aspergillus flavus. Ann.**
- Verscheure, M., Lognay, G., & Marlier, M. (2002).** Revue bibliographique: lesmethodes chimiques d'identification et de classification des champignons.Biotechnologie, agronomie, société et environnement, 6(3).
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018).** A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*,114, 246-259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>
- Magnoli, Alejandra Paola, Poloni, V. L., &Cavaglieri, L. (2019).** Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *CurrentOpinion in Food Science*,29, 99-108.
- Viviane CH.S.(2017).**Contribution à l'étude du niveau de contamination par l'aflatoxine B1 des aliments pour volaille collectés à Dakar et environs: quantification par deux méthodes chromatographiques. mémoire de master. Université ChikhAnta Diop de Dakar .12
- Wan X.L., Yang Z.B., Yang W.R., Jiang S.Z., Zhang G.G., Johnston S.L., Chi F.(2013).**Toxicity of increasing aflatoxin B1 concentrations from contaminated corn with or without clay adsorbent supplementation in ducklings. *Poult. Sci.*, 92, 1244-1253.
- Wogan, G.N. (1966).** Chemical nature and biologicaleffects of the aflatoxins.*BacteriologicalReviews* 30, 461.

**Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2020).** Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122087.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122087>

**YARO, F. K., SAKO, M., KOITA, O., KANOUTÉ, G. (2020).** Evaluation Des Risques Sanitaires Lies Aux Aflatoxines Par La Consommation Du Riz A Bamako. *Revue Malienne de Science et de Technologie*, 1(24).

**Yu J. (2012).** Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 4: 1024-1057.

**Zamoun. S. (2022).** Diversité des mycoendophytes racinaires de l'ortie (*Urtica Dioïca*) de la région de Mâatkas (Tizi-Ouzou). Mémoire de master. Université Mouloud Mammeride Tizi-Ouzou.

**ZEBIRI, S. (2020).** Evaluation de la contamination du blé et de ses dérivés consommés en Algérie par les champignons ochratoxinogènes et par l'ochratoxine. A (Thèse de doctorat ).24