

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE 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

*La recherche des *Aspergillus* Aflatoxinogènes isolés  
des épices commercialisées en Algérie ( Khenchela )*

Présenté par :

- Boussaada Seloua
- Belouaar Ouihad
- Makhloufi Anissa

Devant le jury :

Présidente	YEKHLEF .W	MCB	Université de Khenchela
Examinatrice	NAILI. O	MCB	Université de Khenchela
Promotrice	AZZOUNE .N	MAA	Université de Khenchela

Année Universitaire : 2020/2021



## *Remerciement*

*«Louange à Allah qui nous a guidé à ceci. Nous n'aurions pas été guidés, si Allah ne nous avait pas guidés »*

*[Sourate 7. AlAraf verset 43]*

*Avant tout*

*je remercie le bon dieu de m'avoir donné le courage et la bonne volonté pour réaliser ce travail.*

*Je tiens à remercier infiniment mon adviser, directrice de la recherche Docteure AZOUN NADIA, pour sa disponibilité, son aide et son orientation.*

*Mes plus vifs remerciements vont aussi aux membres du jury YEKHLEF WAHIBA et NAILI OUMAIMA, merci de lire et d'évaluer ce travail.*

*Je remercie la responsable du laboratoire de biologie, Sarah Mizan, pour son aide et ses conseils*

*Je ne saurais oublier mes chers parents, mes frères, mes sœurs, toutes mes amies.*

*Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*Merci du fond du cœur*



# *Dédicace*



*Ce modeste travail n'est que le fruit d'un acharnement et d'une volonté qui s'agrandissaient de plus en plus, ce but tant espéré n'a pas pu se réaliser sans la présence de tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé dans les moments les plus difficiles pour cela Je dédie cet humble mémoire avec un grand amour et fierté : en premier temps à Allah de m'avoir donné la force, le courage afin de pouvoir accomplir ce travail.*

*À la plus belle perle du monde : ma mère boussaada oumhani pour ses sacrifices, amour, prière et soutien.*

*À mon père boussaada rachid, qui m'a soutenu et encouragé durant ce travail et qui m'a offert les bonnes conditions pour poursuivre mes études, que dieu le garde et le protège.*

*À mon cher mari : hicham maamria*

*À mon frère : sif eddine et mes sœurs : hayat, yasmine, ikram, lamis et widad Si j'ai pu mener ce travail à terme c'est grâce à votre présence, votre aide et votre soutien. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Que Dieu vous protège vous garde.*

*À l'âme de ma tante décédée : sahra dieu la repose et la met au paradis*

*À mes copines : Ouihad et anissa je ne saurais trouver les mots pour leur exprimer ma gratitude mon amour et ma reconnaissance À mes collègues de ma promotion en biologie et Microbiologie*



# *Dédicace*



*Ce modeste travail n'est que le fruit d'un acharnement et d'une volonté qui s'agrandissaient de plus en plus, ce but tant espéré n'a pusse réaliser sans la présence de tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé dans les moments les plus difficiles pour cela Je dédie cet humble mémoire avec un grand amour et fierté : en premier temps à Allah de m'avoir donné la force, le courage afin de pouvoir accomplir ce travail.*

*À la plus belle perle du monde : ma mère pour ses sacrifices, amour, prière et soutien.*

*À mon père Ali, qui m'a soutenu et encouragé durant ce travail et qui m'a offert les bonnes conditions pour poursuivre mes études, que dieu le garde et le protège.*

*À mes frères : Amir, Khalil et Massoud et mes sœurs : Besma, Aya et Hadil Si j'ai pu mener ce travail à terme c'est grâce à votre présence, votre aide et votre soutien. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Que Dieu vous protège vous garde.*

*À mes copines : Ouïhade et seloua je ne serais trouver les mots pour leur exprimer ma gratitude mon amour et ma reconnaissance*

*À mes collègues de ma promotion en biologie et Microbiologie surtout lobna , zineb et Takoua a tous ceux qui ont contribue de prés et de loin pour ce que ce travail soit possible.*



# *Dédicace*

---



*Ce modeste travail n'est que le fruit d'un acharnement et d'une volonté qui s'agrandissaient de plus en plus, ce but tant espéré n'a pusse réaliser sans la présence de tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé dans les moments les plus difficiles pour cela Je dédie cet humble mémoire avec un grand amour et fierté : en premier temps à Allah de m'avoir donné la force, le courage afin de pouvoir accomplir ce travail.*

*À la plus belle perle du monde : ma mère zahri sassia pour ses sacrifices, amour, prière et soutien.*

*À mon père belouaar ameur, qui m'a soutenu et encouragé durant ce travail et qui m'a offert les bonnes conditions pour poursuivre mes études, que dieu le garde et le protège.*

*À mon frères : raid et mes sœurs : douaa, Aya Si j'ai pu mener ce travail à terme c'est grâce à votre présence, votre aide et votre soutien. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Que Dieu vous protège vous garde.*

*A mes meilleurs amis : bouchra ksouri, abdi nirmin et guermouai roumeissa*

*À mes copines : anisa et seloua je ne serais trouver les mots pour leur exprimer ma gratitude mon amour et ma reconnaissance*

*À mes collègues de ma promotion en biologie et Microbiologie*



## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN:** Acide désoxyribonucléique.

**ADNr :** ADN ribosomique.

**AF:** Aflatoxine.

**AFB:** Aflatoxine B.

**AFG:** Aflatoxine G.

**AFM:** Aflatoxine M.

**aw :** Activité de l'eau.

**CCM :** Chromatographie sur couche mince.

**CE:** Commission Européenne.

**CYA:** Czapeck Yeast Extract Agar.

**DL:** Dose Létale.

**DRBC:** Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar.

**FAO:** Food and Agriculture Organization.

**HBV:** hepatitis B virus.

**IARC:** International Agency for Research on Cancer.

**ng:** nanogramme.

**nm:** nanomètre

**NRRL:** Northern Regional Research Laboratory.

**PDA:** Potato Dextrose Agar.

**rpm :** rotation par minute.

**SC :** sclérote

**UE:** Union européenne.

**UFC:** Unité Formant Colonie.

**UV:** Ultra-Violet.

**µg :** microgramme.

## RESUME

### La recherche des *Aspergillus* Aflatoxinogènes isolés des épices commercialisées en Algérie ( khenchela ):

Dans ce travail, la diversité fongique et la présence des isolats aflatoxinogènes ont été étudiées dans 40 échantillons de *Curcuma*, Gingembre, Safran et Curry, collectés dans différents points de vente (supérettes, marchés) de la région de Khenchela.

Les résultats d'analyse fongique de 40 échantillons ont montré que la densité de la flore fongique est comprise entre 0-  $35.10^3$  UFC/g. La plus forte densité ( $35.10^3$  UFC/g) a été enregistrée dans les échantillons de *Curcuma*, aucune contamination fongique n'a été enregistrée dans les échantillons de safran. Les principaux genres fongiques isolés sont *Aspergillus* et *Penicillium* avec un taux de 59.25.% et 15.75% respectivement. *Aspergillus* section *Flavi* a été isolé dans la majorité des échantillons avec des taux allant de 5,4 et 79,6% soit une moyenne de 38.8%. suivi d'*Aspergillus* section *Nigri* avec un taux de 30%. Le screening des isolats aflatoxinogènes a été réalisé sur un milieu de culture à base d'extrait de noix coco (CAM) pour 100 isolats. La production est ensuite confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM).

Pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation, il est indispensable de veiller au respect des règles de l'hygiène telles les conditions de récolte, de conditionnement, d'emballage, d'entreposage et de stockage. La multiplication des contrôles microbiologiques et toxicologiques des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines devraient assurer une meilleure qualité sanitaire de ces produits.

**Mots clés :** aflatoxines, épices, *Aspergillus* section *Flavi*, Algérie.

## ملخص

بحث حول عزل فطر الرشاشيات أفلاتوكسينوجينات للتوابل المسوقة في الجزائر (خنشلة) تم دراسة تنوع الفطريات في 40 عينة من الكرم . الزنجبيل . الزعفران والكاربي التي تم جمعها في مختلف نقاط البيع (محلات التجارية والاسواق) في منطقة خنشلة. أظهر التحليل الفطري لهذه العينات أن كثافة الاجناس الفطرية تتراوح بين 0 و  $35.10^3$  cfu/g . تم تسجيل أعلى كثافة تلوث فطري ( $35.10^3$ ) في عينات الكرم ، ولم يسجل أي تلوث فطري في عينات الزعفران . اغلب الاجناس الفطرية المعزولة هي *Aspergillus* و *Penicilium* بنسبة 59.25% و 15.75% على التوالي. تم عزل الجنس *Aspergillus* مجموعة *Flavi* في غالبية العينات بمعدلات تتراوح بين 5.4% و 79.6% أي بمعدل (38.8%). يليه جنس *Aspergillus* مجموعة *Nigr* بنسبة 30%. تم الكشف عن العزلات المنتجة للأفلاتوكسين على وسط زراعي يتكون من مستخلص جوز الهند (CAM) لـ 100 عذلة. يتم تأكيد من انتاج هذه المادة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

لتقليل من مخاطر وجود مادة الافلاتوكسين في الغذاء ، من الضروري الامتثال لقواعد النظافة . لطريقة الحصاد ، التكييف التعبئة والتخزين . لذلك يجب مضاعفة التحاليل الميكروبيولوجية والسمية للمواد الغذائية المعرضة للتلوث بالسموم الفطرية و ذلك لضمان الجودة صحية لهذه المنتجات .

**الكلمات المفتاحية:** الأفلاتوكسين ، البهارات ، *Aspergillus* ، مجموعة *Flav* ، الجزائر

## **ABSTRACT**

### **The search for isolated Aflatoxinogenic *Aspergillus* spices marketed in Algeria (khenchela):**

In this work, the fungal diversity and the presence of aflatoxinogenic isolates were studied in 40 samples of *Curcuma*, Ginger, Saffron and Curry, collected from different points of sale (markets, supermarket) in the Khenchela region.

Fungal analysis results from 40 samples showed the density of the fungal flora to be between  $0-35.10^3$  cfu / g. The highest density ( $35.10^3$  cfu / g) was recorded in the *Curcuma* samples, no fungal contamination was recorded in the saffron samples. The main fungal genera isolated are *Aspergillus* and *Penicillium* with a rate of 59.25% and 15.75% respectively. *Aspergillus* section *Flavi* was isolated in the majority of samples with rates ranging from 5.4 and 79.6%, ie an average of (38.8%). followed by *Aspergillus* section *Nigri* with a rate of 30%. The screening of aflatoxinogenic isolates was carried out on a culture medium based on coconut extract (CAM) for 100 isolates. The production is then confirmed by thin layer chromatography (TLC).

To reduce the risks associated with the presence of these mycotoxins in food, it is essential to ensure compliance with hygiene rules such as harvesting conditions, conditioning, packaging, warehousing and storage. The multiplication of controls microbiological and toxicological foodstuffs liable to be contaminated by mycotoxins should ensure a better sanitary quality of these products.

**Key words:** aflatoxins, spices, *Aspergillus* section *Flavi*, Algeria



*Index des tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Quelques mycotoxines et les moisissures productrices, produits alimentaires associés et leur distribution géographique ( <b>Smith et al., 2016</b> ).	<b>5</b>
<b>Tableau 2.</b> Températures et activités de l'eau optimales pour la production des mycotoxines ( <b>Neme et Mohammed, 2017</b> ).	<b>7</b>
<b>Tableau 3.</b> Principales aflatoxines produites par les espèces du genre <i>Aspergillus</i> ( <b>Bbosa et al., 2013</b> ).	<b>11</b>
<b>Tableau 4.</b> Données mondiales de l'occurrence y compris les rejets d'épices dues aux aflatoxines année (2009-2015)	<b>15</b>
<b>Tableau 5.</b> Teneurs maximales ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en aflatoxines pour certains produits alimentaires Destinés à la consommation humaine ( <b>CE, 2012</b> ).	<b>17</b>
<b>Tableau 6.</b> Espèces d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> et leurs principaux métabolites ( <b>Frisvad et al., 2004 ; Varga et al., 2011</b> )	<b>26</b>
<b>Tableau 7.</b> Différents échantillons d'épices en vrac collectés au niveau des différents marchés et superettes de la région de kenchela.	<b>33</b>
<b>Tableau 8 :</b> distribution de la flore fongique et fréquences des genres <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> dans les échantillons d'épices commercialisés en Algérie sur milieu CYA	<b>43</b>
<b>Tableau 9.</b> Répartition des isolats producteurs d'AFs d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB1, et de sclérotes.	<b>50</b>



*Index des Figures*

<b>Figure 1.</b> Structures chimiques des principales aflatoxines ( <b>Campagnollo et al., 2016</b> )	<b>11</b>
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique des têtes aspergillaires modifiée d'après( <b>Pitt et Hocking, 1997</b> ).	<b>25</b>
<b>Figure 3.</b> Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i> .	<b>28</b>
<b>Figure 4 :</b> Aspect de quelques épices. ( <b>Bernard, 2012</b> )	<b>29</b>
<b>Figure 5 :</b> Gingembre frais coupé (a), gingembre séché confit (b), et gingembre moulu (c) ( <b>Gingembre-biologique, 2016</b> )	<b>30</b>
<b>Figure 6 :</b> poudre de curry	<b>31</b>
<b>Figure 7.</b> Entreposage des épices par les vendeurs dans l'un des points de vente.	<b>33</b>
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour l'analyse fongique.	<b>37</b>
<b>Figure 9.</b> Schéma de la procédure de préparation des suspensions fongiques destinées à la conservation.	<b>38</b>
<b>Figure 10.</b> Schéma du protocole d'extraction des aflatoxines à partir des isolats cultivés sur milieu CAM.	<b>40</b>
<b>Figure 11 :</b> Aspect macroscopique des souches fongiques isolées des les échantillons analysés sur milieu DRBC.	<b>44</b>
<b>Figure 12 :</b> Fréquence du genre <i>Aspergillus</i> dans les échantillons analysés des épices	<b>45</b>
<b>Figure 13 :</b> Fréquence du genre <i>Penicillium</i> dans les échantillons analysés des épices	<b>45</b>
<b>Figure 14 :</b> Fréquence d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> dans les échantillons analysés des épices	<b>46</b>
<b>Figure 15 :</b> Les différents types d'isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> dans les échantillons d'épices	<b>47</b>
<b>Figure 16 :</b> Différences morphologiques observés chez les <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<b>47</b>
<b>Figure 17 :</b> Production et détermination de la nature des sclérotés au MP G×10 chez l'isolat d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<b>48</b>
<b>Figure 18 :</b> Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).	<b>49</b>
<b>Figure 19 :</b> Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus flavus</i> sur CCM	<b>49</b>
<b>Figure 20 :</b> Les différents types d'isolats producteurs d'AFs dans les échantillons analysés	<b>50</b>
<b>Figures 21 :</b> Fréquence (%) des isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> producteurs d'AFs en fonction de type du produit)	<b>50</b>



*Sommaire*

<b>Remerciement</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Index des tableaux et des figures</b>	
Introduction Generale	<b>1</b>
<b><i>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i></b>	
I. Les Mycotoxines	<b>4</b>
I.1. Définition	<b>4</b>
I.2. Facteurs affectant la mycotoxinogénèse	<b>4</b>
I.2.1. Facteurs intrinsèques	<b>4</b>
I.2.2. Facteurs extrinsèques	<b>6</b>
I. 3. Contamination des aliments par les mycotoxines	<b>8</b>
I.4. Les Aflatoxines	<b>9</b>
I.4.1. Origine, structure et production	<b>9</b>
I.4.2. Propriétés physico-chimiques	<b>10</b>
I.4.3. Méthodes d'analyse et d'extraction	<b>12</b>
I.4.4. Toxicité	<b>13</b>
I.4.5. Contamination des aliments	<b>14</b>
I.4.6. Réglementation	<b>15</b>
II. Les champignons mycotoxinogènes	<b>18</b>
II.1. Généralités	<b>18</b>
II.2. Identification	<b>19</b>

II.2.1. Identification morphologique	20
II.2.2. Identification biochimique	21
II.3. Conditions de développement des moisissures	21
II.4. Principaux genres mycotoxino gènes	21
II.4.1. Généralités	21
II.4.2. Le genre <i>Aspergillus</i>	22
II.4.3. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	24
III. Les épices	28
III.1. gingembre	28
III.2. curcuma	29
III. 3. Curry (carvi)	29
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
I. Matériel	32
I.1. Echantillonnage	32
I.2. Souches de références et standards	33
I.3. Milieux de Culture	33
I.4. Produits et appareillage	34
II. Méthodes	34
II.1. Etude de la mycobiota	34
II.1.1. Isolement et dénombrement	34
II.1.2. Identification des isolats	34
II.1.2.1. Identification morphologique	34
1. Identification Macroscopique	35
2. Identification Microscopique	35

3. Purification et conservation des isolats	37
II.1.2.2. Identification biochimique	38
1. Etude de la production des aflatoxines	38
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>RESULTATS</b>	42
I. Analyse de la flore fongique	42
I.1. Enumération de la flore totale	42
I.2. Distribution des isolats <i>d'Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et <i>d'Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	44
1.3. Distribution des espèces <i>d'Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> dans les échantillons analysés	45
II. Étude du pouvoir producteur d'AFS par les isolats <i>d'Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	47
II.1. Souches aflatoxino-gènes isolées des échantillons de curcuma, gingembre et curry	48
III. Caractérisation des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de la production de types d'AFS et de sclérotés	49
<b>DISCUSSION</b>	51
Conclusion Et Perspectives	55
Références	58
Annexe	71

A decorative red border that resembles a scroll, with rounded corners and a vertical strip on the left side that looks like a binding or a scroll edge.

# *Introduction générale*

## Introduction Générale

---

Depuis la découverte des aflatoxines en 1960, les contaminations alimentaires par les mycotoxines constituent l'un des problèmes les plus préoccupants à l'échelle mondiale. Ces toxines sont responsables non seulement de l'apparition de nombreuses maladies humaines et animales mais aussi de graves pertes économiques. La croissance des moisissures et l'accumulation de mycotoxines dans les aliments peut se produire au champ, pendant la récolte ou pendant le stockage, dès que les conditions de température et d'humidité sont favorables (Kader et Hussein, 2009; Turner *et al.*, 2005).

Les aliments les plus contaminés par les mycotoxines sont les noix, les arachides, les épices, les céréales comme le maïs et le riz et autres aliments secs (Trucksess et Scott, 2008). Dans la région méditerranéenne, les principales épices produites sont le safran, le poivre rouge, le curcuma, coriandre, poivre noir et cumin (Richard, 1992). La production nationale des épices est constituée principalement poivre rouge, poivre noir, cumin, safran et curcuma (ONS, 2014). Cependant cette production n'est malheureusement pas en mesure de couvrir la demande des consommateurs. En Algérie, la demande en épices n'a cessé de croître ces dernières années sur le marché national. Cette croissance s'explique par l'usage très fréquent de ces derniers, qui représentent des ingrédients incontournables dans beaucoup, de plats traditionnels.

Les mycotoxines ayant le plus d'impact sur la santé et l'économie sont les aflatoxines. Les conditions climatiques en Algérie, caractérisées par des températures et des taux d'humidité élevées, sont très favorables au développement des moisissures du genre *Aspergillus* et la production des aflatoxines. 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 (Lai *et al.*, 2015). Elle est connue pour ses effets tératogènes et mutagènes, causant des dommages, principalement au niveau du foie (Hamid *et al.*, 2013). En effet, elle a été classée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer dans le groupe 1 des substances cancérigènes pour l'homme (IARC, 2002).

La contamination naturelle des aliments par les mycotoxines est inévitable et les différents procédés physiques et chimiques existant contribuent à réduire seulement leurs niveaux à différents maillons de la chaîne alimentaire. C'est pourquoi plusieurs pays ont établi des limites maximales dans l'alimentation afin de minimiser leur consommation. Ainsi, la réglementation de la Commission de l'UE a fixé un niveau maximal en aflatoxines dans la majorité des épices à 5 µg/kg pour l'AFB1 et à 10 µg/kg pour la somme des quatre aflatoxines (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) (CE, 2012). En Algérie, les niveaux maximaux tolérés dans les épices sont de 10µg/kg pour l'AFB1 et de 20 µg/kg pour les aflatoxines totales

## Introduction Générale

---

(FAO, 2004). Cette législation pourrait faire de l'Algérie un pays cible aux exportations des aliments contaminés dont les fruits secs qui sont non conforme à la consommation dans d'autres pays aux normes plus strictes.


La présence des aflatoxines dans les aliments est une préoccupation majeure pour la santé humaine, de ce fait, une détection et une quantification rapides sont essentielles pour assurer une consommation plus saine. Les méthodes analytiques basées sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sont les plus utilisées pour quantifier les aflatoxines dans les matrices alimentaires.

En Algérie, les données sur l'occurrence des aflatoxines dans les aliments en général et les épices en particulier sont limitées, c'est pourquoi nous nous sommes fixés comme objectifs:

- L'étude des niveaux de contamination par les champignons potentiellement toxigènes dans le gingembre, curcuma, safran et curry.
- L'isolement, la quantification et l'identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* ayant la capacité à produire les aflatoxines.

Ce travail a été organisé en trois grands chapitres. Le premier chapitre est consacré à une analyse bibliographique sur les mycotoxines et les champignons toxigènes. Quelques informations sur les épices y sont également rapportées. Dans le chapitre II (la partie expérimentale), nous allons décrire la démarche générale adoptée pour l'isolement et le dénombrement des champignons, les différentes étapes d'identification des moisissures et des espèces aflatoxigènes.

Le troisième chapitre est réservé aux résultats expérimentaux obtenus et leur discussion. Ce mémoire s'achève par la présentation d'une conclusion générale qui récapitule notre étude et met en valeur les principaux résultats obtenus avec quelques perspectives.

A decorative red border that forms a scroll shape, with the top and bottom edges curving inward at the corners and the left edge curving outward to form a vertical strip.

*Revue  
Bibliographique*

## I. Les Mycotoxines

### I.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).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques de faible poids moléculaire produits par des champignons filamenteux, plus particulièrement par ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Marin *et al.*, 2013). Ces métabolites sont non-essentiels au cycle de la vie du champignon mais une fois produits, ils pourraient lui conférer certains avantages compétitifs (Fox et 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 (Tableau 1) (Ji *et al.*, 2016; Campagnollo *et al.*, 2016).

### I.2. Facteurs affectant la mycotoxinogénèse

La production des mycotoxines peut avoir lieu à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini. Leur production peut survenir avant la récolte, lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation (Pfohl-Leszkowicz, 1999). 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 toxino-génèse. La sécrétion des métabolites secondaires par les moisissures toxino-gènes dans les aliments dépend des facteurs environnementaux ou extrinsèques mais également d'autres facteurs, dits intrinsèques (Olsen *et al.*, 2003; Blumenthal, 2004).

#### I.2.1. Facteurs intrinsèques

Il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. Une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces du même genre et parfois par des espèces de genres différents. Par exemple l'ochratoxine A (OTA) est produite par *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum*, *A. ochraceus* et *A. carbonarius* (Pardo *et al.*, 2005). D'autre part, une même espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines. En effet, l'acide pénicillique et l'OTA sont produits par *A. ochraceus*. De même, *Aspergillus flavus* peut produire les aflatoxines, l'acide cyclopiazonique et l'aspertoxine. Cependant, certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques, comme les aflatoxines (*A. flavus* et *A. parasiticus*) et les sporidesmines

## Revue Bibliographique

(*Pithomyceschartarum*) (Fitzgerald et al., 1998). Parmi les espèces réputées toxigènes, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité à produire la (les) mycotoxine(s). De ce fait, la présence des champignons toxigènes sur une denrée n'est pas nécessairement le signe d'une contamination par des mycotoxines, la production de mycotoxines par le champignon aura lieu uniquement si les conditions environnementales favorables à cette contamination sont réunies (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

**Tableau 1.** Quelques mycotoxines et les moisissures productrices, produits alimentaires associés et leur distribution géographique (Smith et al., 2016).

Mycotoxine	Moisissures productrices	produits alimentaires	Distribution géographique
Aflatoxines	<i>Aspergillus</i> ( <i>bombycis</i> , <i>flavus</i> , <i>nomius</i> , <i>ochraceoroseus</i> , <i>parasiticus</i> , <i>parvisclerotigenus</i> , <i>pseudotamarii</i> , <i>rambellii</i> , <i>toxicarius</i> ).	Céréales et produits à base de céréales (principalement le maïs), noix, fruits secs, épices, lait et produits laitiers, viande, œufs.	Régions tempérées, tropicales et subtropicales (Sud de l'Asie et Afrique).
Ochratoxine A	<i>Aspergillus</i> ( <i>alliaceus</i> , <i>auricomus</i> , <i>carbonarius</i> , <i>cretensis</i> , <i>flocculosus</i> , <i>glaucus</i> , <i>lacticoffeatus</i> , <i>meleus</i> , <i>niger</i> , <i>ochraceus</i> , <i>pseudoelegans</i> , <i>roseoglobulosum</i> , <i>sclerotioniger</i> , <i>sclerotiorum</i> , <i>steynii</i> , <i>sulphureus</i> , <i>westerdijkiae</i> ); <i>Penicillium</i> ( <i>nordicum</i> , <i>verrucosum</i> ).	Céréales et les produits céréaliers (principalement le riz et blé), café, fèves de cacao; Vin, bière, fruits secs, épices, viande.	Régions tempérées, régions tropicales (Amérique, Europe du Nord et de l'Ouest, Afrique et Sud d'Asie).
Trichothécènes Zéaralénone	<i>Fusarium</i> ( <i>acuminatum</i> , <i>armeniaceum</i> , <i>culmorum</i> , <i>crookwellense</i> , <i>equisetii</i> , <i>graminearum</i> , <i>kyushuense</i> , <i>langsethiae</i> , <i>poae</i> , <i>pseudograminearum</i> , <i>sambucinum</i> , <i>scirpi</i> , <i>sporotrichioides</i> , <i>venantum</i> ). <i>Fusarium</i> ( <i>crookwellense</i> , <i>culmorum</i> , <i>equiseti</i> , <i>graminearum</i> , <i>incarnatum</i> ,	Céréales et les produits à base de céréales.	Régions tempérées du nord (Europe, Amérique et Asie).

	<i>pseudograminearum</i> , <i>semitectum</i> , <i>sporotrichioides</i> , <i>verticillioides</i> ).		
Fumonisines	<i>Fusarium</i> ( <i>anthophilum</i> , <i>dlamini</i> , <i>fujikuroi</i> , <i>globosum</i> , <i>napiforme</i> , <i>nygamai</i> , <i>oxysporum</i> , <i>polyphialidicum</i> , <i>proliferatum</i> , <i>pseudonygamai</i> , <i>thapsinum</i> , <i>verticillioides</i> ).	Céréales et les produits à base de céréales.	Régions tempérées du nord (Europe, Amérique et Asie).

### I.2.2. Facteurs extrinsèques

La production des mycotoxines est fortement influencée par l'interaction complexe de plusieurs facteurs extrinsèques ou environnementaux comme la température et l'activité de l'eau (Bouseta *et al.*, 2005).

#### 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 2). La disponibilité en eau nécessaire à la toxino-génèse 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). Chez *Aspergillus flavus*, la formation des aflatoxines nécessite une valeur d'*aw* proche de 0,85 mais la croissance du microorganisme a lieu à des valeurs d'*aw* plus basses de l'ordre de 0,73 (Magan *et al.*, 2011).

#### 2- Température

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des moisissures. La formation des mycotoxines est directement affectée par la température. 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).

En général, la température optimale de la toxino-génèse est voisine de la température optimale de croissance. C'est notamment le cas pour l'élaboration des aflatoxines par *Aspergillus flavus*, de l'ochratoxine A par *A. ochraceus*, de la stérigmatocystine par *A. versicolor*, de la patuline par *Penicillium granulatam*, de l'acide pénicillique et de l'acide cyclopiazonique par *Penicillium granulatam*. Pour d'autres mycotoxines, telles que la

## Revue Bibliographique

---

zéaralénone élaborée par *F. roseum*, la température optimale de la toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

**Tableau 2.** Températures et activités de l'eau optimales pour la production des mycotoxines (Neme et Mohammed, 2017).

Mycotoxine	Température (°C)	Activité de l'eau (aw)
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

### 3- pH

Comme pour l' *aw*, la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. Les moisissures se développent normalement pour de larges gammes de pH compris entre 3 et 8 (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Un faible pH joue un rôle dans la régulation de la production des stérigmatocystine et des aflatoxines par les *Aspergillus*. Les faibles valeurs de pH sont également favorables à la production de fumonisine par *Fusarium proliferatum* et de l'ochratoxine par *Aspergillus ochraceus* (Gardiner *et al.*, 2009).

### 4 – Composition gazeuse

La production des mycotoxines est sensible à la variation de la composition de l'air. De ce fait, le maintien d'une concentration faible en O<sub>2</sub> et/ou une augmentation du taux de CO<sub>2</sub> sont efficaces pour prévenir la formation des mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

L'augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> (20%), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production des aflatoxines. Dans le cas de *P. verrucosum*, une augmentation de 50% de la teneur en CO<sub>2</sub> diminue la production de l'ochratoxine (Giorni *et al.*, 2008). Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse (Le Bars et Le Bars, 1987).

### 5- La nature du substrat

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène. Cependant la composition qualitative et quantitative en certains nutriments

## Revue Bibliographique

---

(sucre, notamment) intervient dans ce type de contamination. Cette spécificité de substrat provient des différences physiques (activité de l'eau, conductivité thermique, oxygénation) et chimiques (composition en lipides, protéines, acides aminés, acide gras, minéraux). Par exemple, *P. verrucosum* est le producteur principal d'OTA dans les céréales tandis que *P. nordicum* contamine souvent les produits riches en protéines, des produits fermentés à base de viande et de fromages (Lund et Frisvad, 2003).

### 6- Interactions microbiennes

La présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production des mycotoxines. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Pfohl-Leszkowicz, 1999). (Bouraima et al. 1993) ont rapporté une compétition entre *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux champignons conduit essentiellement vers la production de l'aflatoxine, les ochratoxines sont très peu produites ou totalement absentes. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans la biogenèse des aflatoxines, *A. flavus* utilise la phénylalanine du support sur lequel il se développe.

### I. 3. 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. La contamination par les mycotoxines se produit dans les denrées alimentaires d'origine végétale, en particulier les céréales, les noisettes, les amandes, les fourrages, 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). L'exposition humaine aux mycotoxines peut être causée par la consommation directe d'aliments d'origine végétale contaminés par des mycotoxines (arachides, pistaches, amandes, les épices surtout dans la préparation des plats froids (dohara du Biskra)...) soit indirectement à travers des produits d'origine animale (viande, lait, œufs). Les mycotoxines entraînent des pertes économiques considérables chaque année. Leur présence provoque une diminution de la qualité et de la disponibilité en volume des grains récoltés. L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) estime qu'environ 25% des récoltes mondiales sont contaminées par les mycotoxines (Ji et al., 2016; Eivazzadeh-Keihan et al., 2017).

### I.4. Les Aflatoxines

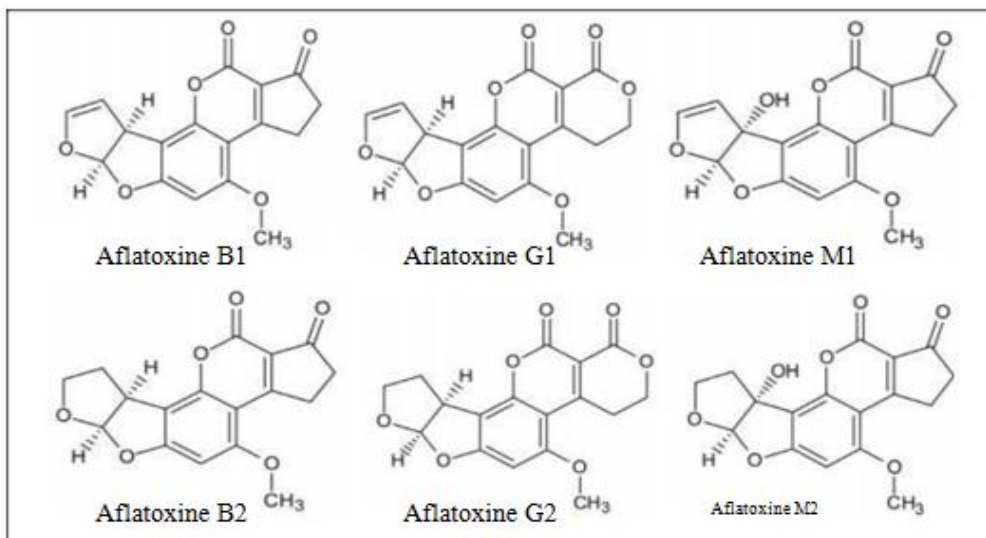
#### I.4.1. Origine, structure et production

Le nom aflatoxine est un acronyme formé de la combinaison de la lettre « A » pour *Aspergillus* et « FLA » pour *flavus*. Ce nom est issu de l'espèce impliquée dans la contamination des aliments responsables de la Turkey « X » disease : *Aspergillus flavus*. On y associe par la suite le mot anglais « TOXIN » signifiant poison (**Bhat et al., 2010**).

Les aflatoxines sont les mycotoxines les plus produites par le genre *Aspergillus*. Elles sont produites par au moins une vingtaine d'espèces appartenant à trois principales sections : *Flavi*, *Nidulantes* et *Ochraceorosei* (**Baranyi et al., 2015**). Les espèces incluses dans la section *Flavis* sont: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarisii*, *A. togoensis*, *A. transmontanensis*, *A. mottae* et *A. sergii*; les membres de la section *Ochraceorosei* sont représentés par *A. ochraceoroseus* et *A. rambelii*; et enfin les membres faisant partie de la section *Nidulantes* sont: *A. stellatus*, *A. olivicola* et *A. venezuelensis* (**Campagnollo et al., 2016**).

Parmi toutes les mycotoxines, le groupe des aflatoxines est le plus connu, le plus étudié et le plus distribué dans le monde. C'est d'ailleurs celui qui a le plus d'impact sur la sécurité alimentaire. L'aflatoxine est un métabolite toxique hautement cancérigène produit principalement par les champignons *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. *Aspergillus flavus* produit l'AFB1 et l'AFB2 alors qu'*A. parasiticus* et *A. nomius* produisent quatre types d'aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) (Figure 1). Parmi ces aflatoxines, l'AFB1 est la plus fréquemment retrouvée dans la nature (**Sidhu et al., 2009**).

Au moins 18 différents types d'aflatoxines ont été identifiés (**Tableau 3**). Cependant, celles qui suscitent le plus d'attention du point de vue sécurité alimentaire sont les aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1 (**Campagnollo et al., 2016**). L'AFM1 est un dérivé monohydroxylé secrété dans le lait formée de l'AFB1 au cours du métabolisme hépatique. Ces toxines ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait "Milk" des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (**Udomkun et al., 2017**). L'AFB1 est le composé le plus abondant dans les aliments contaminés, mais aussi le plus toxique suivi par ordre décroissant de toxicité l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. L'AFB1 est considérée comme le plus puissant agent hépatocancérigène pour les mammifères et a été classée comme agent cancérigène pour l'homme (groupe 1) par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC) (**Neme et Mohammed, 2017**).



**Figure 1.** Structures chimiques des principales aflatoxines (**Campagnollo et al., 2016**)

### I.4.2. Propriétés physico-chimiques

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol) caractérisées par une structure polycyclique furanocoumarine. Elles ont été classées dans différents groupes en raison de leur fluorescence (vert ou bleu) sous la lumière UV (bleue pour les AFB "blue" et verte pour les AFG "green", l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve) et leur migration sur CCM (**Eivazzadeh-Keihan et al., 2017**).

Les aflatoxines sont très solubles dans différents solvants tels que le méthanol, le chloroforme et le benzène. Elles sont très peu solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants non polaires. En outre, elles sont vulnérables à la lumière UV mais très stable à des températures élevées (supérieures à 100 °C) (**Eivazzadeh-Keihan et al., 2017**; **Baranyi et al., 2015**). L'AFG2 est dénaturée à partir de 237°C, l'AFG1 se décompose entre 244-246°C,

## Revue Bibliographique

**Tableau 3.** Principales aflatoxines produites par les espèces du genre *Aspergillus* (Bbosa *et al.*, 2013).

Furanocoumarines	Type d'aflatoxine	Espèce aspergillaire
Groupe des difurocoumarocyclopentones	Aflatoxine B1	<i>A. flavus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. ochraceoseresus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. rambelii</i> , <i>Emericellavenezuelensis</i>
	Aflatoxine B2	<i>A. flavus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
	Aflatoxine B2a	<i>A. flavus</i>
	Aflatoxine M1	Métabolite de l'AFB1 (produite par <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> )
	Aflatoxine M2	Métabolite de l'AFB2 dans le lait des animaux nourris avec des aliments contaminés
	Aflatoxine M2a	Métabolite de l'AFM2
	Aflatoxicol	Métabolite de l'AFB1 (produite par <i>A. flavus</i> )
	Aflatoxicol M1	Métabolite de l'AFM1
	Aflatoxine G1	<i>A. flavus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
	Aflatoxine G2	<i>A. flavus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> ,

## Revue Bibliographique

Groupe des difurocoumarolactones		<i>A. parasiticus</i>
	Aflatoxine G2a	Métabolite de l'AFG2
	Aflatoxine GM1	<i>A. flavus</i>
	Aflatoxine GM2	Métabolite de l'AFG2
	Aflatoxine B3	non définie
	Parasiticol (P)	<i>A. flavus</i>
	Aflatrem	<i>A. flavus, A. minisclerotigenes</i>
	Aspertoxin	<i>A. flavus</i>
	Aflatoxine Q1	Métabolite de l'AFB1

tandis que l'AFB1 et l'AFB2 s'avèrent être encore plus résistantes, se décomposant respectivement à partir de 268 et 286°C (IARC, 2002).

Les aflatoxines sont des molécules stables et très résistantes aux différents procédés de transformation alimentaire comme la torréfaction, l'extrusion et la cuisson (Marin *et al.*, 2013). La décomposition des aflatoxines a lieu à de très hautes températures qui sont difficilement compatibles avec les procédés de fabrication ou de transformation des aliments. Les aflatoxines sont très stables à l'acidité et à la chaleur et instables en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10). Les aflatoxines sont dégradées par l'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) et l'hypochlorite de sodium (NaClO) (Mohammedi *et al.*, 2010; Cole et Cox, 1981).

### I.4.3. Méthodes d'analyse

Il existe plusieurs méthodes chromatographiques qui permettent la détection des mycotoxines dans les souches et les aliments. Au cours de ces dernières années, de nombreuses méthodes d'analyse ont été proposées pour la détection et la quantification des aflatoxines. Les méthodes comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance équipée d'un détecteur de fluorescence (HPLC-FLD) et la chromatographie en phase liquide (spectrométrie de masse en tandem) (LC-MS/MS) ont été largement utilisées pour le criblage des aliments contaminés par les aflatoxines.

La chromatographie en couche mince (CCM) est une méthode très ancienne, utilisée pour la séparation et l'identification des composés organiques. C'était l'une des techniques de séparation les plus répandues pour l'analyse des aflatoxines. De plus, en 1990, la CCM a été

qualifiée comme méthode officielle et méthode de choix pour identifier les aflatoxines à des concentrations de l'ordre de 1 µg/g (**Iqbal et al., 2015**).

Malgré l'existence de toutes ces techniques, l'analyse par HPLC-FLD reste la plus utilisée pour la détection multiple des mycotoxines. Une analyse des AFB1, B2, G1, G2 avec des faibles limites de détection peut être obtenue par HPLC-FLD dans plusieurs aliments (**Selvaraj et al., 2015**). Les performances analytiques de ces techniques varient largement en fonction de la matrice analysée (produit alimentaire), de la nature de la mycotoxine et de la technique d'extraction.

#### **I.4.4. Toxicité**

L'Homme s'expose aux aflatoxines par voie orale en ingérant des aliments contaminés. Cette contamination peut être directe par la consommation des denrées alimentaires végétales (voie primaire), ou indirecte par le biais de produits d'origine animale (voie secondaire) (**Nemeet Mohammed, 2017**).

La toxicité des aflatoxines se manifeste sous la forme de toxicoses appelées « aflatoxicoses ». Selon la concentration et la durée de l'exposition, les aflatoxines peuvent être à la fois à l'origine des intoxications aiguës et chroniques. L'AFB1 est l'un des agents cancérigènes les plus puissants connus, par conséquent, l'exposition à long terme (chroniques), même à des niveaux extrêmement faibles est dangereuse pour la santé (**Prandini et al., 2009**). La sévérité des symptômes est nuancée par des différences de sensibilité en fonction de la dose reçue, de la durée d'exposition, de l'espèce, de l'âge, du sexe et de l'état physiologique.

**« L'exposition aux doses massives d'aflatoxines peut dans certains cas provoquer une aflatoxicose aiguë conduisant à la mort des animaux (Erkekoğlu et al., 2008).**

L'organe cible de la toxicité et de la cancérogénicité des aflatoxines est le foie. Une intoxication aiguë aux aflatoxines provoque une nécrose hépatique et une hyperplasie biliaire. Les premiers symptômes observés après une intoxication aiguë sont ; la fièvre, le malaise et l'anorexie. La progression de l'aflatoxicose induit des douleurs abdominales, des vomissements et des hépatites. Cependant, les cas d'intoxication aiguë chez l'homme sont exceptionnels et rares (**Raiola et al., 2015**). Certaines études ont montré une grande synergie entre l'hépatite B (virus HBV) et l'ingestion d'aflatoxine dans l'apparition du cancer du foie. Dans le cas d'une personne atteinte du HBV, l'aflatoxine est 30 % plus dangereuse que chez une personne non atteinte par le virus, et le risque relatif d'atteinte par le cancer du foie passe de 5 à 60 fois lorsqu'une aflatoxicose est combinée au virus HBV (**Bourais et Aziz, 2006**).

Une exposition chronique aux aflatoxines entraîne de nombreuses maladies humaines. Les aflatoxines sont considérées comme des molécules immunosuppressives, hépatotoxiques,

mutagènes, tératogènes et cancérogènes. Chez les animaux, l'exposition aux aflatoxines entraîne une altération de la fonction hépatique et une réduction de l'apport alimentaire (**Flores-Flores et al., 2015**).

Les nourrissons peuvent également être exposés aux aflatoxines par le biais de la mère. Une exposition des jeunes enfants à des concentrations supérieures à la limite quotidienne maximale admissible provoque divers types de cancer et des décès en fonction du type, de la dose et de la période d'exposition (**Atongbiik Achaglinkame et al., 2017**). Les aflatoxines sont capables de traverser la barrière placentaire humaine. Les expositions répétées aux aflatoxines in utero et durant l'enfance pourraient prédisposer un individu au cancer du foie (**Partanen et al., 2010; Raiola et al., 2015**).

### **I.4.6. Contamination des aliments**

Les aflatoxines sont généralement rencontrées dans les denrées alimentaires en provenance des régions chaudes et humides, notamment les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du sud. Elles contaminent surtout les fruits secs, les graines oléagineuses, mais aussi les graines de coton et de tournesol, ainsi que les céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. Les aflatoxines peuvent être retrouvées dans les épices (piment rouge, poivre, safran, gingembre et curcuma), les fruits secs et le tabac (**Brochard et le Bacle, 2009**).

Les échanges commerciaux dans le monde sont soumis à des contrôles stricts concernant les taux des aflatoxines. Le tableau 4 représente les produits les plus contaminés en général et les lots les plus rejetés aussi.

La présence des aflatoxines peut être détectée dans les produits et aliments d'origine animale comme la viande, les œufs, la volaille et le lait (**Neme et Mohammed, 2017**). Leur présence a déjà été constatée dans les viandes de volailles, de porc, de bovin et les charcuteries provenant de certains pays tel que le Pakistan, l'Égypte et la Jordanie suite à une contamination des aliments pour animaux à des niveaux élevés (**Iqbal et al., 2014; Refai et al., 2003; Herzallah, 2009**).

## Revue Bibliographique

**Tableau 4.** Données mondiales de l'occurrence y compris les rejets d'épices dues aux aflatoxines année 2009-2015

épices	Origine	Concentration maximale (µg/kg)		Nombre total des échantillons analysés
		AFB1	Somme des AFs	
cucuma	États-Unis	0.22-305.7	0.02-336.6	855
piment	indonesie	0.0169-14624	0.0169-1489.4	20081
gingembre	canada	0.029-51.8	0.029-362.9	256
poivre rouge	Egypte	0.02-33.7	0.02-40.1	385
muscade	Turquie	0.0203-1026	0.0241-1200	71
coriandre	Singapour	0.5-0.7	0.5-0.7	107
curry	inde	0.5-2.3	0.5-2.3	2
Ail séché	Autriche	0.7	0.7	1
fénugrec	Royaume uni	16	1.6	1
girofle	Chine	0.7	29	1

### I.4.7. Réglementation

En raison de la haute toxicité des aflatoxines, de nombreux pays ont établi des réglementations strictes afin de contrôler leur présence dans les aliments et d'interdire le commerce des produits contaminés. Un sondage établi par la FAO en 2003 a révélé qu'une centaine de pays, représentant environ 87% de la population mondiale, avaient instauré une

## Revue Bibliographique

---

règlementation pour les mycotoxines dans les aliments destinée à la consommation humaine et animale (**Smith et al., 2016**).

La réglementation (limites acceptables) varie d'un pays à un autre et dépend habituellement du niveau de développement économique d'un pays, de l'étendue de la consommation et de la sensibilité à la contamination des cultures à réglementer. La limite de sécurité établie pour les aflatoxines dans les produits destinés à la consommation humaine varie de 4 à 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . L'UE a fixé les normes les plus strictes, pour tout produit destiné à la consommation humaine directe avec des concentrations de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  et 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour l'AFB1 et la somme des aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2) respectivement (Tableau 5) (**Udomkun et al., 2017**). Concernant les aflatoxines totales (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2) dans les aliments destinés à la consommation humaine directe, la limite maximale établie par l'UE est de 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les arachides, les noix, les fruits secs, les céréales et leurs produits transformés. Par contre elle est de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les noix, le maïs et le riz soumis à un triage ou à un autre traitement physique avant consommation ainsi que pour les épices, les figes sèches, les amandes, les pistaches, les noisettes et les noix du Brésil destinées à la consommation humaine directe. Pour les arachides, les amandes, les pistaches, les abricots, les noix, les noisettes et les noix du Brésil soumi à un triage ou à un autre traitement physique avant consommation la limite maximale est de 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (**Smith et al., 2016**).

La présence de l'AFM1 dans les produits laitiers en particulier dans le lait suscite une grande inquiétude. Même si l'AFM1 est considérée comme une substance cancérigène génotoxique moins dangereuse que l'AFB1, il est nécessaire de contrôler sa présence dans le lait et par conséquent, dans les produits laitiers destinés à la consommation humaine en particulier celle des enfants. Concernant l'AFM1, les valeurs fixées par la Commission Européenne sont très strictes en comparaison aux autres produits alimentaires destinés à la consommation humaine. Cette limite est de 50  $\text{ng}/\text{kg}$  pour l'AFM1 dans le lait (**Prandini et al., 2009 ; Shephard, 2009**).

En Afrique la plupart des réglementations existantes en matière des mycotoxines se limitent aux aflatoxines. En Algérie, les limites de la teneur des aflatoxines totale (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) en 2003 étaient de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  et celle de l'AFB1 seule de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour les épices (**FAO, 2004**).

**Tableau 5.** Teneurs maximales ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en aflatoxines pour certains produits alimentaires Destinés à la consommation humaine (CE, 2012).

<b>Denrées</b>	<b>Aflatoxine B1</b>	<b>Aflatoxines B1+B2+G1+G2</b>
Fruits séchés (autre que les figues sèches) destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine	5	10
Fruits séchés (autre que les figues sèches) et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées Alimentaires	2	4
figues sèches	6	10
Amandes, pistaches destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées Alimentaires	8	10
Noisettes et noix de Brésil destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées Alimentaires	5	10

## Revue Bibliographique

Epices	10	20
Toutes les céréales et tous les produits dérivés de céréales, y compris les produits transformés	2	4
Maïs et riz destinés à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées Alimentaire	5	10

## II. Les champignons mycotoxinogènes

### II.1. Généralités

Les moisissures couramment appelés «champignons», représentent des agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser divers substrats (Chabasse et al., 2002). Ce sont des champignons microscopiques, ubiquistes, eucaryotes, hétérotrophes, uni ou pluricellulaire, filamenteux ou levuriforme (Nishio *et al.*, 2008). Les moisissures sont considérées comme des microorganismes opportunistes. Un grand nombre parmi eux sont des parasites de plantes (phytopathogènes) causant la majorité des maladies économiquement importantes (Chabasse *et al.*, 2002).

Une large gamme de produits alimentaires peut être contaminée par les champignons. Les principaux substrats sur lesquels ils prolifèrent sont les cultures oléagineuses, protéagineuses et céréalières mais on les retrouve également dans les fourrages ainsi que dans le café, le cacao, le riz, la bière et le vin (Ruppel *et al.*, 2004).

L'appareil végétatif des champignons est appelé thalle, constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 µm de diamètre. Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule (noyau, mitochondrie, cytoplasme). Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium. La colonisation est réalisée par extension et ramification des hyphes. Ces derniers, puisent l'eau et les substances organiques dans les différents substrats qu'ils colonisent pour leur développement (Portnoy et Jara, 2015).

Les champignons se propagent sur différents substrats, par l'intermédiaire de spores qui sont des corpuscules de 2 à 250 µm de diamètre. Les spores sont disséminées principalement par l'air ambiant. Lorsqu'elles se déposent sur un substrat organique, elles germent et redonnent un mycélium si les conditions d'humidité et de température y sont favorables. Elles pénètrent par voie chimique (production d'enzymes, de toxines) ou par voie mécanique en exerçant une pression sur le substrat (**Chabasse *et al.*, 2002**). Les spores peuvent également élaborer des substances chimiques susceptibles de demeurer à l'intérieur des spores, ou d'être libérées dans les matériaux qu'elles colonisent ou encore d'être libérées dans l'air ambiant.

La classification des champignons est basée sur les caractéristiques de leurs structures de reproduction qui peuvent être à caractère sexué(champignon téléomorphe ou parfait) et/ou asexué (champignon anamorphe ou imparfait). Ces deux formes de reproduction peuvent coexister chez un même champignon dit holomorphe (**D'Halewyn, 2002**).

Différents groupes de moisissures ont été défini suivants leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leur spore. Les Zygomycètes possèdent des spores contenues à l'extérieur d'une cellule renflée, les Ascomycète ont des spores regroupées dans des sortes de sacs « asques », les Basidiomycètes qui ont des spores portées par des basides, et les Chytridiomycètes à spores flagellées mobiles (**Kiffer et Morelet, 1997; Cahagnier *et al.*, 1998**). Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont insérées dans la cinquième classe, les Deutéromycètes (champignons imparfaits) avec un système d'identification particulier essentiellement basé sur le mode de formation des spores, appelées conidies. Les Deuteromycota sont divisés en trois classes : les Blastomycètes, les Hyphomycètes et les Coelomycètes (**Chasseur et Nolard, 2003**).

### **II.2. Identification**

Les critères utilisés pour l'identification des moisissures peuvent être morphologiques (macroscopique ou microscopique), biochimiques, ou génétiques en fonction de la finesse de l'identification recherchée. En pratique, la procédure la plus utilisée est basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Cependant, Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire. Toutefois, la complexité du règne fongique fait qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (**Chabasse *et al.*, 2002**).

### II.2.1. Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (**Cahagnier et Richard-Molard, 1998**).

#### · Critères d'identification macroscopique

Lors de l'analyse macroscopique des champignons filamenteux, plusieurs aspects sont observés. L'aspect des colonies représente un critère important d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses. Par contre, Les champignons luviformes donnent des colonies lisses, glabres (absence ou pauvreté du mycélium aérien), humides, d'aspect brillant ou mat. La consistance des colonies est également à observer, car elle peut être variable (molle, friable, élastique ou dure). Les autres caractères cultureux à déterminer sont ; la couleur du thalle (la pigmentation du mycélium, couleur des conidies), la couleur du revers de la colonie, l'odeur et la présence d'exsudat. La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres tels que la vitesse de croissance des colonies ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification des moisissures (**Chabasse et al., 2002**).

#### · Critères d'identification microscopique

Pour l'analyse microscopique des champignons, plusieurs structures sont observées comme l'appareil végétatif, les organes de fructification et les spores.

Le thalle végétatif peut être septé (diamètre étroite régulier de 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) ou siphonné (filaments peu ou pas ramifiés, diamètre large et irrégulier de 5 à 15  $\mu\text{m}$ ), avec une paroi pigmentée (mélanisée) ou non (hyaline). Les spores peuvent être endogènes (endospores) ou exogènes (conidiospores ou conidies), unicellulaires et de petite taille (améropores), bicellulaires (didymospores), pluricellulaires à cloisons transversales (phragmospores), pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (dictyospores) ou étroites et effilées (scolécospores). L'identification microscopique nécessite l'examen des organes de fructifications ; présence ou non d'organes protecteurs des conidies, modes de formation des conidies (issues directement du thalle, solitaires (aleuriospores) ou en chaînes (arthrospores), ou produites par bourgeonnement et regroupées soit en grappes, en masse, en têtes ou en chaînes basipètes ou acropètes. Ces techniques d'identification nécessitent une expérience dans la taxonomie des champignons et présentent l'inconvénient d'être longues, fastidieuses et

quelquefois incomplètes. De plus, les caractéristiques morphologiques et physiologiques sont influencées par les conditions de culture et peuvent amener à de mauvaises identifications (Chabasse *et al.*, 2002).

### II.2.2. Identification biochimique

Depuis quelques années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des microorganismes selon des caractéristiques biochimiques (Verscheure *et al.*, 2002).

La production d'un métabolite secondaire particulière permet une identification efficace des moisissures. Les métabolites secondaires par exemple, peuvent être très intéressants pour la séparation des espèces du genre *Aspergillus*. Bien que l'identification polyphasique soit recommandée, les profils biochimiques (production des métabolites secondaires) peuvent être parfois suffisants pour identifier certaines espèces. Les champignons synthétisent un grand nombre de métabolites secondaires dont, les mycotoxines. Cependant, les extrolites les plus utilisés lors de l'identification sont, les aflatoxines, l'acide cyclopiazonique et l'acide aspergillique (Samson *et al.*, 2006). Les isolats d'*Aspergillus* produisent une gamme diversifiée de métabolites secondaires qui caractérisent les différentes sections. Pratiquement tous les isolats des espèces appartenant à la section *Flavi* produisent de l'acide kojique (Varga *et al.*, 2011a). Alors que la plupart des espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* produisent l'acide pénicillique. Cependant, afin d'obtenir des résultats fiables, les milieux de culture, les conditions de croissance, et les procédures d'extraction doivent être normalisés, suivant des recommandations sur la façon d'extraire, de séparer et d'identifier les métabolites secondaires (Samson *et al.*, 2014)

## II.4. Principaux genres mycotoxinogènes

### II.4.1. Généralités

Les champignons filamenteux peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes au sein de l'environnement humain. Ces micro-organismes sont impliqués dans différents domaines tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et dans le secteur médical. Néanmoins, ils représentent un risque dans le domaine de l'industrie agroalimentaire par contamination des aliments. En effet, les moisissures peuvent être à l'origine d'importantes dégradations des propriétés physicochimiques entraînant une altération des produits alimentaires. La prolifération des moisissures pathogènes peut entraîner une production de métabolites secondaires comme les mycotoxines qui sont responsables d'un taux élevé de toxicité. La présence de ces métabolites représente un risque majeur pour la santé humaine (Rodriguez *et al.*, 2015).

Les champignons toxigènes sont classés en deux groupes majeurs : les contaminants du champ pouvant infecter les plantes et ceux du stockage capables de se développer après la récolte, au cours du séchage, du stockage, du transport et de la distribution (**Jouany et al., 2009**). Parmi les contaminants du champ, on retrouve *Fusarium graminearum* produisant le deoxynivalénol et le nivalénol et *F. verticillioides* produisant les fumonisines. Ce sont des phytopathogènes opportunistes des plantes sénescentes ou stressées. *A. flavus* (produit les aflatoxines), est également considéré comme un contaminant pouvant coloniser les plantes au champ. Toutefois, ce dernier est aussi capable de produire des mycotoxines pendant le stockage (**Alonso et al., 2013**).

Les principaux genres producteurs des aflatoxines sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, les arachides et dans de nombreux autres produits d'origine végétale et animale (**Delage et al., 2003**).

### II.4.2. Le genre *Aspergillus*

#### II.4.2.1. Définition

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures cosmopolites à filaments hyalins et cloisonnés. Ils appartiennent à la division des Ascomycotina et à l'ordre des Eurotiales. Depuis la première description du genre *Aspergillus* en 1729 par Michelli, le nombre d'espèces décrites n'a cessé de croître. Dans une récente publication, Samson et al. (2014) ont décrit 339 espèces morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches dans le genre *Aspergillus*, dont la classification taxonomique est en perpétuelle évolution depuis l'utilisation des outils moléculaires (**Gautier et al., 2016**).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais ils sont plus souvent associés aux régions à climat chaud. Très répandus dans la matière organique en décomposition, dans le sol ou en surface (composts végétaux, fourrages humides, ...), *Aspergillus* spp. représentent 1 à 7 % des champignons environnementaux, participant au recyclage du carbone et de l'azote par métabolisme aérobie (**Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002**).

Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies humaines et animales (mycotoxicoses) (**Samson et al., 2014**). Parmi les mycotoxines produites par ce genre, les aflatoxines et les ochratoxines sont celles qui représentent le plus de risques pour la santé. Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et l'animal à cause de leur capacité à envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses tel que les mycoses pulmonaires (**Morin, 1994**).

L'identification des *Aspergillus* se base principalement sur des critères morphologiques. Cependant, l'application des outils de caractérisation moléculaire a montré que cette identification strictement phénotypique pouvait conduire à des erreurs d'identification (Balajee *et al.*, 2006). Pour tenir compte des résultats de caractérisation moléculaire, des sous-genres appelées sections ont été créés. Les moisissures du genre *Aspergillus* sont actuellement réparties dans 6 sections principales : *Usti*, *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Clavati* et *Fumigati* (Balajee *et al.*, 2005).

### II.4.2.2. Caractères macroscopiques et microscopiques

#### ✓ Caractères macroscopiques

L'examen morphologique constitue une étape importante pour la détermination des espèces d'*Aspergillus*. 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. Dans l'environnement, l'appareil végétatif des *Aspergillus* spp. constitue le thalle mycélien (Samson *et al.*, 2014).

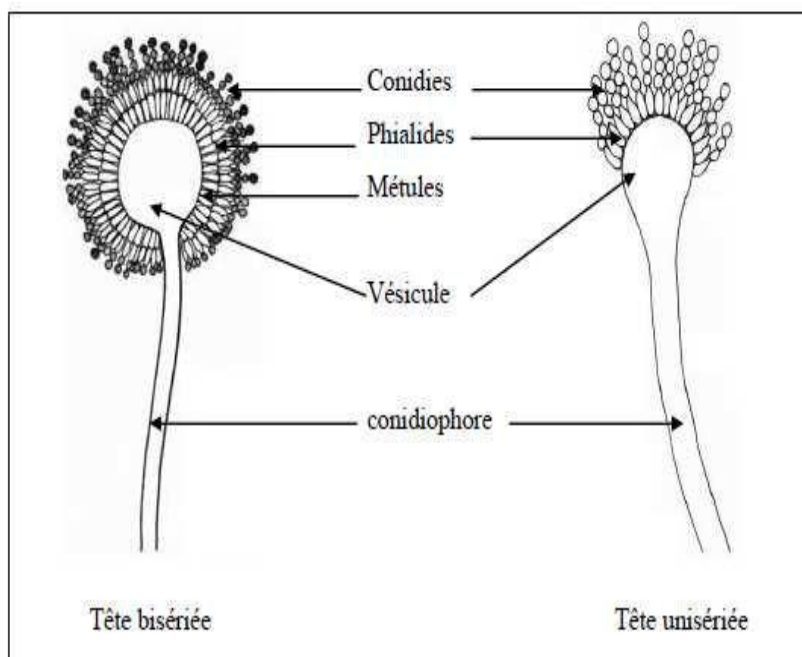
Macroscopiquement, la colonie apparaît duveteuse ou poudreuses, de croissance relativement rapide en fonction des espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à une température de 22 à 25°C. Les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à une température de 37 à 40°C (Morin, 1994). Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur milieu Sabouraud additionnés d'antibiotiques. Après 96 heures d'incubation, les colonies prennent leur teinte caractéristique due à la maturation des structures conidiogènes (Chabasse *et al.*, 2002). Les colonies sont généralement de couleurs vives et très variées. La couleur des colonies permet d'orienter l'identification des espèces : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

#### ✓ Morphologie microscopique

Classiquement, les filaments aspergillaires sont de diamètre fin (2 à 5 µm) 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). À son extrémité, le conidiophore se renfle en vésicule sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Ces dernières peuvent être insérées directement sur la vésicule (tête unisériée), ou portées par des petits articles stériles insérés sur la vésicule, les métules (tête bisériée) (Figure 2). Les conidies

sont unicellulaires, de forme variable suivant l'espèce (rondes, oblongues, échinulées ou lisses, pigmentées ou hyalines ...) et restent accrochées les unes aux autres, les plus récemment néoformées étant à la base de la chaîne (**Badillet *et al.*, 1987; Raper et Fennell, 1965**).

recommandations sur la façon d'extraire, de séparer et d'identifier les métabolites secondaires (**Samson *et al.*, 2014**).



**Figure 2.** Représentation schématique des têtes aspergillaires modifiée d'après (**Pitt et Hocking, 1997**).

### II.4.3. *Aspergillus* section *Flavi*

*Aspergillus* section *Flavi*, regroupe 22 espèces dont les plus préoccupantes sont *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. Cependant, d'autres espèces appartenant à ce groupe sont utilisées dans l'industrie alimentaire comme *A. oryzae* et *A. sojae* (**Amare et Keller, 2014**).

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. Les espèces appartenant à cette section sont étroitement liées et difficiles à distinguer du fait de la grande similarité entre elles et l'instabilité des caractères morphologiques qui les caractérisent. C'est pour cette raison que l'identification se base parfois sur la nature des mycotoxines produites (**Giorni *et al.*, 2007**).

Dans le genre *Aspergillus*, la section *Flavi* représente une préoccupation majeure dans l'industrie agroalimentaire. Les espèces appartenant à cette section sont capables de causer une détérioration des produits stockés conduisant parfois à la production des mycotoxines (**Baquião**

*et al.*, 2013). Les deux espèces aflatoxinogènes majeures restent *A. flavus* et *A. parasiticus*, qui sont le plus souvent responsables de la production de quantités importantes d'aflatoxines dans les aliments (**Tableau 6**). Ces deux espèces présentent un certain nombre de différences morphologiques et moléculaires.

### ✓ *Aspergillus flavus*

De tous les *Aspergillus*, *A. flavus* est l'espèce la plus associée à la contamination (pré-récolte) de certaines cultures. Cette espèce peut contaminer plusieurs aliments comme le maïs, les arachides, les noix, ainsi que d'autres cultures. Sa croissance dans les produits agricoles s'accompagne souvent d'une production des aflatoxines (**Chang et Ehrlich, 2010**).

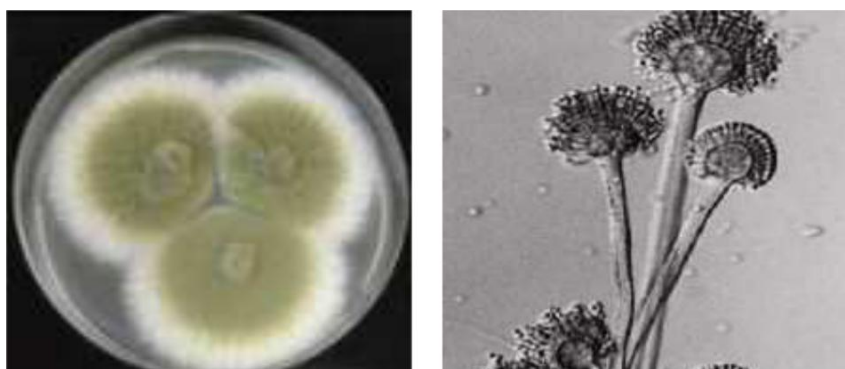
Les colonies d'*A. Flavus* sont vert-jaunâtre à vert-olive, floconneux, relativement planes, dense vers le centre et lâche en périphérie (Figur1).

L'exsudat est discret, les revers sont incolores à rosâtres sur milieu Czapek et jaunâtres sur MEA. Sur milieu *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA), un revers orange caractéristique est observé (**Pitt et Hocking, 1997**). Une croissance, peut être observée à un intervalle de température compris entre 19 et 35°C. Les températures optimales de croissance sont comprises entre 29 °C et 35 °C avec une production maximale d'aflatoxine située à 24 °C (**Campagnollo et al., 2016**). Ces champignons peuvent se développer à une basse *aw* de l'ordre de 0,78 et à un pH allant de 2,1 à 11,2. Ils sont de ce fait présents dans les régions chaudes comme les régions tropicales et sub-tropicales (**Ayerst, 1969; Olutiola, 1976**).

**Tableau 6.** Espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* et leurs principaux métabolites (**Frisvad et al., 2004 ; Varga et al., 2011a**)

Espèce d' <i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i>	Aflatoxines B	Aflatoxines G
<i>Aspergillus arachidicola</i>	+	+
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	-
<i>Aspergillus bombycis</i>	+	+
<i>Aspergillus caelatus</i>	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+/-	-
<i>Aspergillus lanosus</i>	-	-
<i>Aspergillus leporis</i>	-	-
<i>Aspergillus minisclerotium</i>	+	+
<i>Aspergillus nomius</i>	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	+	+/-
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	+	-
<i>Aspergillus sojae</i>	-	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	-	-
<i>Aspergillus toxicarius</i>	+	+
<i>Petromyces albertensis</i>	-	-
<i>Petromyces alliaceus</i>	-	-
<i>A. coremiiformis</i>	-	-
<i>A. pseudocaelatus</i>	+	+
<i>A. pseudonomius</i>	+	-

Les têtes aspergillaires ont une vésicule globuleuse ou subglobuleuse (10 à 65  $\mu\text{m}$  de diamètre). Elles sont radiées et majoritairement bisériées donnant des phialides à disposition radiaire ou en colonne. Les conidies sont subsphériques à ellipsoïdales, lisses ou légèrement rugueuses et mesurent entre 3 à 4,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les conidiophores sont longs (jusqu'à 1mm de longueur) et les plus âgés sont rugueux (**Hedayati et al., 2007; Samson, 2010; Pitt et Hocking, 1997**). Dans les conditions environnementales défavorables, certaines colonies peuvent former des sclérotés qui sont des formes de résistance dissimulées dans le sol et les débris organiques. Les sclérotés sont souvent de couleur brune ou noire, de taille et de forme variables. Quand les conditions climatiques et nutritionnelles s'améliorent, les sclérotés peuvent germer et redonner un mycélium (**Amare et Keller, 2014**). En fonction de la taille des sclérotés on peut distinguer deux types d'isolats. La première catégorie produit des sclérotés de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400  $\mu\text{m}$ . La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de diamètre inférieur à 400  $\mu\text{m}$  de type « S » (Small) (**Nesci et Etcheverry, 2009**).



**Figure 3.** Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus flavus*.

### *Aspergillus parasiticus*

Les colonies d'*A. parasiticus* sont de couleur vert sombre, lierre et granuleuses floconneuses profondes et plus denses que celles d'*A. flavus* sur milieu MEA. Le revers est clair sur les milieux Czapek et MEA. Les têtes aspergillaires sont majoritairement unisériées caractérisées par des vésicules sphériques de 30-35  $\mu\text{m}$  de diamètre, recouvertes au trois quart, donnant des phialides verdâtres de 7-11  $\mu\text{m}$  portant des conidies de 4-6  $\mu\text{m}$  de diamètre, ce qui la diffère parfois d'*A. flavus* caractérisée par des conidies plus petites. Les conidies sont globuleuses et échinulées voire épineuses. Les conidophores sont incolores, de taille variable (300-700  $\mu\text{m}$ ) et leur paroi est lisse ou rugueuse dans la partie distale. Les sclérotés sont parfois produits, ils sont sphériques, de 400-800  $\mu\text{m}$  de diamètre, souvent blancs au début et deviennent noirs avec le temps (**Hedayati et al., 2007; Samson et al., 2010 ; Pitt et**

**Hocking, 1997**). *A. parasiticus* se développe sur une grande variété de substrats naturels dès que les conditions de température et d'humidité sont favorables. Ce champignon peut produire des mycotoxines dans les aliments et peut poser de sérieux risques pour la santé. Les aflatoxines produites par cette espèce sont les AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 (**Garcia et al., 2011**).

### III. Les épices

Le mot « épice » est né vers le XIIe siècle dans la langue française, de l'étymologie latine species qui signifie « espèces » (**Marie-Pierre. A, Francois .G,1777**)

Les épices sont des substances végétales aromatiques utilisées pour l'assaisonnement des mets. Généralement elles sont vendues déshydratées, entières ou en poudre. Idéales pour les régimes minceur, ces substances végétales sont acaloriques et apportent beaucoup de saveurs (**Laurence. L,2015**)



**Figure 4** : Aspect de quelques épices.( **Bernard, 2012**)

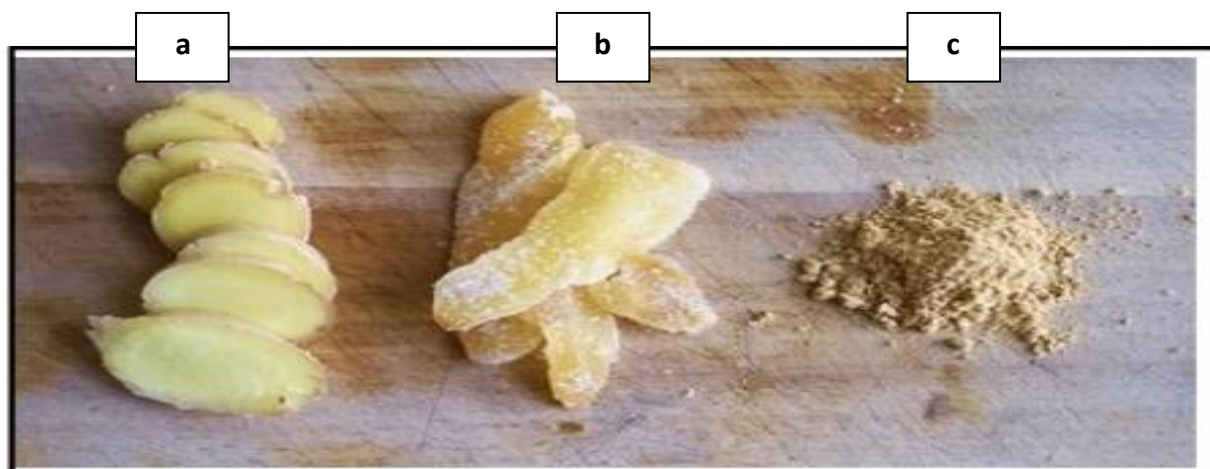
#### III.1Gingembre :

Le nom grec ziggiberis, qui découlerait du nom arabe zangabîl. Le terme latin zingiber apparaît plus tard, et est à l'origine du nom de genre botanique Zingiber. Il est adapté en vieux français en « gingibre », pour finalement s'écrire « gingembre » à partir du XIIIe siècle (**PinsonC.2012**)

Le terme gingembre viendrait de singabera signifiant « en forme de cornes » en prâkrit, une langue ancienne de l'Inde. Il serait à l'origine étymologique de zingiberis en grec, avant de devenir zingiber en latin. Originaire de l'Inde et de la Malaisie, le gingembre est une plante herbacée, vivace à port de roseau.

Son rhizome irrégulier est appelé main ou patte. Sur le rhizome naissent des rameaux aériens : les uns sont stériles (1,50 de hauteur) et les autres sont fertiles (20 cm de hauteur).

Ces rameaux se terminent par une inflorescence ovoïde composée de bractées imbriquées. Les fleurs sont jaunes à lèvres pourpres. (Laura Asther, 2012)



**Figure 5 :** Gingembre frais coupé (a), gingembre séché confit (b), et gingembre moulu (c)

<http://www.gingembre.biologique.bio/category/histoireorigines>

### II-3- Curcuma

Le terme curcuma est d'origine irano-indienne. Il dérive du sanscrit kartouma qui a donné kurkumen persan ancien, kourkoum en arabe et curcuma en latin (Delaveau, 1987). Le curcuma est une herbe vivace à grandes feuilles en gainantes et elliptiques. Les fleurs jaunes sont groupées en épis. On utilise les rhizomes principaux (curcuma rond) ou les rhizomes latéraux (curcuma long).

Le curcuma est employé en Inde, en Chine et en Asie du sud-est depuis l'Antiquité. Les Arabes l'introduisent au début du Moyen Âge, où il est surtout utilisé pour la teinture de la laine et de la soie, pour sa belle couleur jaune. (André Cassan, 2010).

### II-4- Curry(Carvi)

Le curry est un mélange d'épices : essentiellement du curcuma (20 à 30 %) associé à de la coriandre, du cumin, de la cardamome et divers poivre.

Ses bienfaits proviennent du curcuma et plus spécifiquement d'une de la curcumine. Cette dernière est considérée comme un anticancéreux sur le plan préventif, elle diminuerait aussi le mauvais cholestérol et augmenterait le bon cholestérol. La curcumine a permis de soulager des personnes souffrant de rhumatismes inflammatoires. En revanche. A cause de son mauvaise absorbance au niveau des intestins, le curcuma est associé à une molécule de pipérine afin d'améliorer son assimilation ( Isabelle Le Coquil ,2017).



**Figure 6** : poudre de curry (<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Curry> )

A decorative red border that resembles a scroll, with rounded corners and a slight shadow effect, framing the text.

*MATERIELS ET  
METHODES*

## Matériels Et Méthodes

---

Ce travail de mémoire a été réalisé au Laboratoire de Biologie de kenchela.

La première partie représentée par l'isolement, l'identification morphologique et la caractérisation biochimique des moisissures a été effectuée au niveau de laboratoire de kenchela. La deuxième partie de ce mémoire se résume en une validation de la méthode d'extraction des aflatoxines dans les extraits méthanoliques des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* étudiés, et la quantification qualitative des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM).

### I. Matériel

#### I.1. Echantillonnage

Au cours de cette étude, 40 échantillons d'épices en vrac (gingembre ; safran, curcuma, carvi) ont été collectés au niveau de différents marchés et supérettes de la région de kenchela (Figure7). Dans le tableau 7 , sont représentés les différents échantillons, leur nombre et le lieu de prélèvement.

La collecte des échantillons a été réalisée durant la période allant du début du mois de Mai de l'année 2021. Les échantillons des épices en vrac contenus dans des sacs ou récipients en plastique sont mis dans des sacs en papiers. Ces derniers sont acheminés au laboratoire de biologie université kenchela dans les heures qui suivent le prélèvement. (tableau 7)



**Figure 7.** Entreposage des épices par les vendeurs dans l'un des points de vente.

## Matériels Et Méthodes

**Tableau 7.** Différents échantillons d'épices en vrac collectés au niveau des différents marchés et supérettes de la région de kenchela magasin (توابل بسكرية).

Échantillon d'épices				
		Nombre	Date de prélèvement	provenance
En vrac	Curcuma	10	Mois de Mai	Pays asiatiques
	Safran	10		
	Gingembre	10		
	Curry	10		
	Total	40		

### I.2. Souches de références et standards

Deux souches de référence ont été utilisées dans cette étude. Il s'agit des souches *Aspergillus flavus* NRRL 3251T et *Aspergillus parasiticus* CBS 100926T, fournies par l'INRA de Toulouse.

Des solutions standard d'AFB1 (200 µg/L), AFG1 (200 µg/L), ont été utilisées. A partir de chacune de ces solutions, des dilutions ont été préparées dans les conditions appropriées pour obtenir les concentrations désirées.

Les aflatoxines sont des substances hautement toxiques et dangereuses. Pendant la durée de leurs manipulations, il est strictement recommandé de suivre certaines précautions générales. Ainsi, des lunettes de sécurité et des gants jetables ont été utilisés. La décontamination de la verrerie utilisée et des paillasses a été réalisée avec une solution d'hyochlorite de sodium.

### I.3. Milieux de Culture

Il existe une grande variété de milieux qu'on peut utiliser pour l'isolement et l'étude des contaminations fongiques dans les denrées alimentaires. Cependant, les plus cités dans la littérature sont, le DG18 (Hocking et Pitt, 1980) pour sa faible activité d'eau (action inhibitrice sur les Mucorales et les bactéries) et le Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) (King et al., 1979). Le DRBC est utilisé pour réduire le développement des champignons à croissance rapide dits envahissants (*Rhizopus*, *Mucor*) et permettre la croissance d'autres espèces fongiques appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

## Matériels Et Méthodes

---

Dans notre cas, les milieux de culture qui ont été utilisés sont; le DRBC, PDA (Potato dextrose agar), CYA (Czapek, Yeast, Agar) et CAM (Coconut Agar Medium). La composition de ces milieux de culture figure dans l'annexe.

### II. Méthodes

#### II.1. Etude de la mycobiota

L'analyse de la flore fongique a été effectuée en trois étapes qui consistent en:

- Un dénombrement des moisissures par la technique des suspensions dilution après ensemencement sur milieu DRBC.
- Une étude des caractères macroscopiques et microscopiques.
- Une étude de la production des aflatoxines, chez les souches d'*Aspergillus* section *Flavi* en utilisant un milieu de culture approprié (CYA).

##### II.1.1. Isolement et dénombrement

La méthode des suspension-dilution a été utilisée pour l'isolement de la flore fongique dans les différents échantillons (**Pitt et Hocking, 2009**). Dix grammes de chaque échantillon finement broyé et homogénéisé ont été dilués dans 9ml 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 échantillons. Les boites de Pétri ensemencées ont été incubées à 25°C et à l'abri de la lumière pendant 7 jours. La lecture des boites est effectuée après 5 et 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. Quand l'échantillon est peu contaminé par les moisissures c'est-à-dire que le nombre de colonies par boîte est inférieur à 10, les boites de la plus faible dilution sont utilisées pour le dénombrement.

##### II.1.2. Identification des isolats

###### II.1.2.1. Identification morphologique

La première étape de la caractérisation d'une espèce fongique est l'identification morphologique. Elle passe par une examination des caractères macroscopiques (aspect général de la souche cultivée sur milieu de culture CYA ), et une observation microscopique des du mycélium. Les champignons ont été identifiés selon les critères décrits par (**Pitt et Hocking, 1997 et Doster et al. 2009**). Les résultats de l'identification des espèces fongiques sont exprimés en pourcentage (taux de contamination).

## Matériels Et Méthodes

---

### 1. Identification macroscopique

Les souches isolées ont été identifiées par observation des caractères macroscopiques après leur mise en culture sur les milieux PDA et CYA. Les clés d'identification majeures utilisées étaient : la couleur des colonies, la texture de la surface de la colonie, la vitesse de croissance (diamètre des colonies), l'aspect du revers de la colonie et la production des pigments. Les isolats rattachés à *Aspergillus* section *Flavi* ont été repiqués sur un milieu d'identification (CYA).

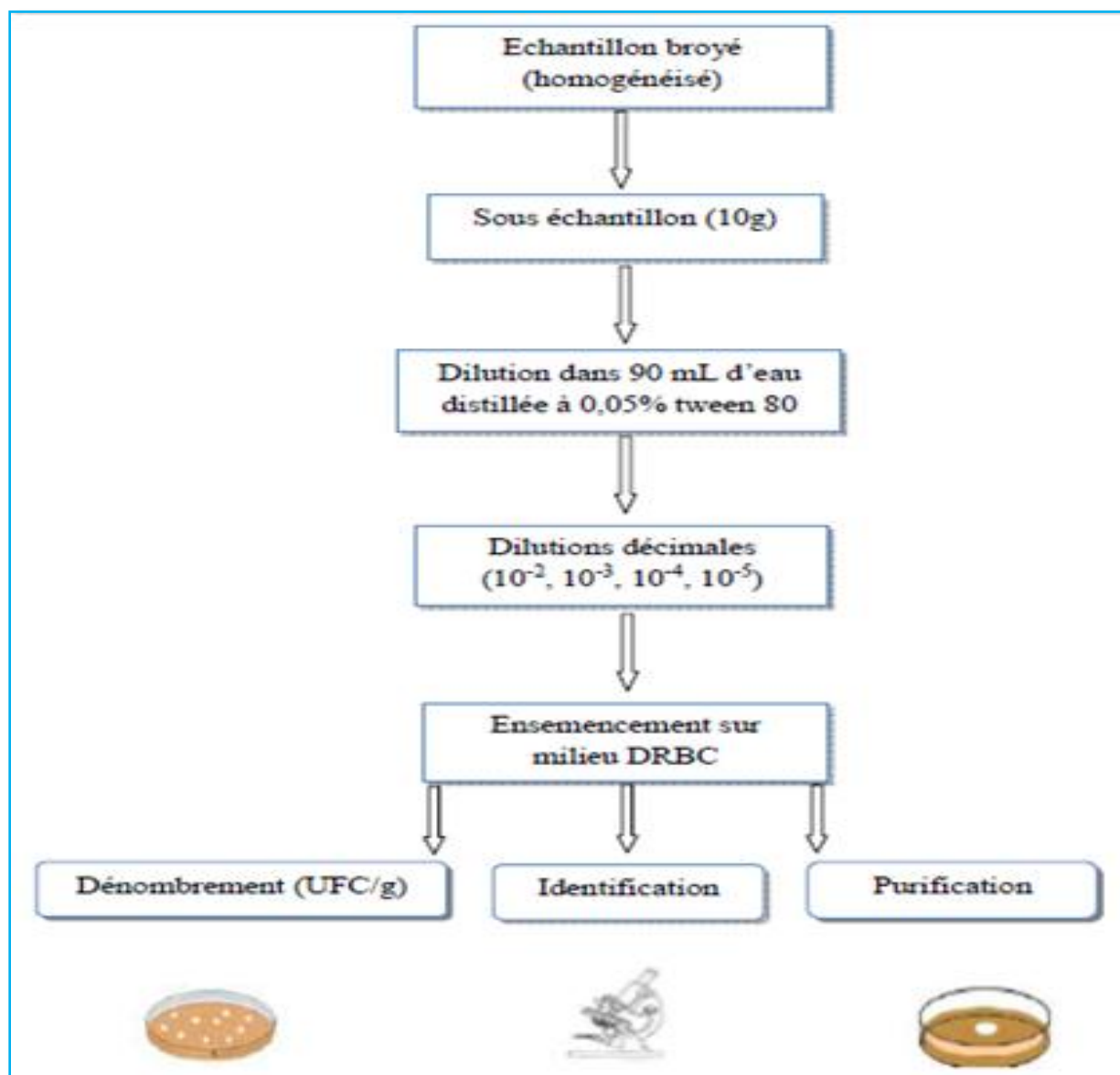
### 2. Identification microscopique

L'identification microscopique des moisissures a été réalisée à l'aide d'un frottis par observation de plusieurs caractéristiques comme l'organisation du mycelium, la taille et couleur des conidies et du conidiophore. Dans le cas des *Aspergillus* la présence ou l'absence de mutules, arrangement et forme des phialides, forme et taille de la vésicule ont été examinés.

Pour la préparation des frottis, une fraction de la colonie comportant les structures conidiogènes est prélevée sur des cultures jeunes, obtenues après 4 à 5 jours d'incubation. Le prélèvement est réalisé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. L'observation est faite au microscope photonique au grossissement Gx40. Pour les *Aspergillus*, les différentes sections et espèces ont été identifiées. Pour les autres moisissures l'identification s'est limitée à la détermination du genre. Les moisissures ont été examinées au microscope en tant que frottis humides ou après prélèvement direct avec un ruban Adhésif.

#### · *Prélèvement direct avec ruban Adhésif*

Un morceau de ruban adhésif transparent d'environ 3cm est appliqué délicatement sur la colonie à l'aide d'une pince, pour assurer une bonne adhésion on passe le pouce sur le ruban adhésif de manière à obtenir l'empreinte de la colonie. Le ruban adhésif est ensuite placé sur une lame en verre qui sera utilisée pour une observation microscopique au grossissement Gx40.



**Figure 8.** Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour l'analyse fongique.

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. Dans ce cas, les spores de morphologie caractéristique peuvent être identifiées sans équivoque (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*...), alors que les spores de faibles diamètres et présentant des ornements ne peuvent pas être différenciées (*Penicillium*, *Aspergillus*).

### · *Préparation de frottis humides*

Elle a été effectuée en prélevant une fraction de mycélium avec une aiguille stérile. Cet inoculum a été déposé sur une lame contenant une petite goutte d'eau, en remuant

## Matériels Et Méthodes

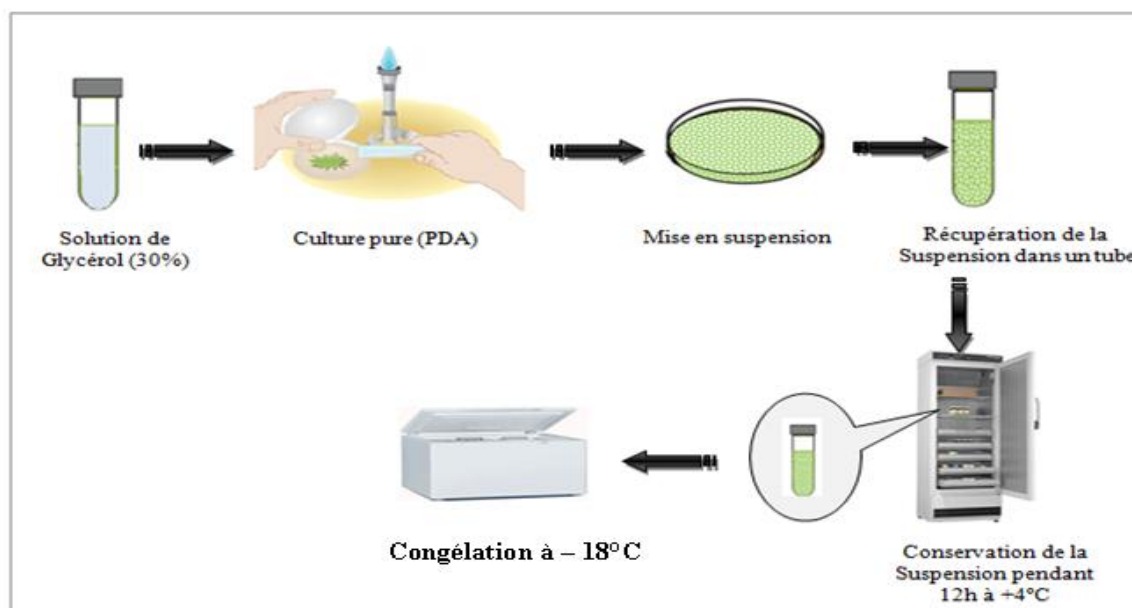
---

délicatement pour avoir une préparation homogène. L'ensemble à été recouvert d'une lamelle puis observé rapidement au microscope photonique.

### 3. Purification et conservation des isolats

Après identification des espèces fongiques, les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* section *Flavi* ont été purifiées sur milieu PDA et conservées pour les études ultérieures. La purification des souches se fait par repiquage sur un milieu stérile suivie d'une incubation à 28°C pendant 7 jours jusqu'à l'obtention d'une culture bien sporulée. Cette opération a été répétée plusieurs fois pour chaque souche jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Au cours de ce travail, plusieurs colonies appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* ont été isolées.

Les souches purifiées ont été conservées par congélation à -18 °C dans une solution de glycérol à 30% (Figure 9). Pour la préparation des suspensions des souches fongiques, un millilitre de la solution de conservation stérile (autoclavé) à été déposé sur chaque colonie, les spores sont ensuite suspendues par le reflux d'une micropipette. Les suspensions obtenues ont été transférées dans des tubes Eppendorff stériles. Ces suspensions ont été laissées pendant 1 heure à température ambiante puis conservées à (+4 °C) pendant une nuit. Les suspensions de spores ont été finalement conservées à (-18 °C) jusqu'à leur utilisation. La conservation par congélation permet de constituer un stock d'isolats disponibles préservés des contaminations bactériennes et fongiques, des modifications génomiques ou de vieillissement possible au cours des repiquages successifs.



**Figure 9.** Schéma de la procédure de préparation des suspensions fongiques destinées à la conservation.

### 3. Etude de la production des aflatoxines

Les Aflatoxines possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement dans l'UV proche de 365 nm. À cette longueur d'onde les isolats producteurs d'aflatoxines B et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, et sont caractérisées 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)

#### Détection de la fluorescence sur milieu de culture

Les souches d'*AspergillusFlavus* 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).

## Matériels Et Méthodes

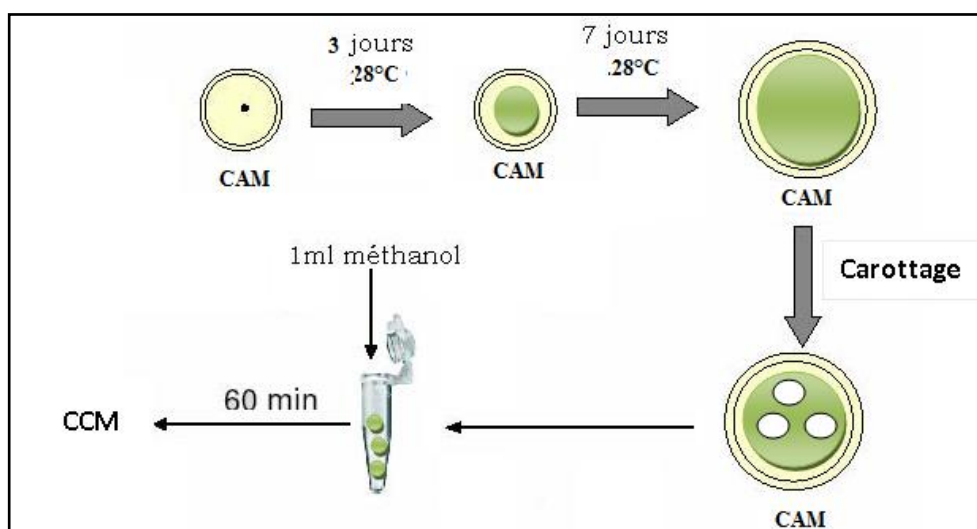
---

Dans le milieu CAM les aflatoxines combinées aux matières grasses du noix de coco, donnent une fluorescence visible sous U V 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 sur la lumière UV.

### **Extraction des aflatoxines du milieu de culture CAM**

La présence et la production des aflatoxines par les *Aspergillus Flavus* a été confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM), les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au méthanol.

Après l'incubation des souches *d'Aspergillus flavus*, 3 rondelles de 5mm de diamètre de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de pétri (60 mm de diamètre), les carottes découpées sont introduites dans des microtubes Eppendorf de 2 ml. L'extraction des aflatoxines a été réalisée suivant la méthode de ( **Bragulat et al., 2001**) avec l'addition de 1 mL de méthanol suivie d'une incubation pendant une heure à température ambiante. Après centrifugation (13000 rpm), les surnageants ont été récupérés puis conservés à -80°C et l'abri de la lumière .



**Figure 10 .** Schéma du protocole d'extraction des aflatoxines à partir des isolats cultivés sur milieu CAM. ( **Bragulat *et al.*, 2001**)

### ✓ Détection et confirmation de la production d'AFs par CCM

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

Elle consiste à déposer un aliquote de 10 à 15 µl de l'extrait à analyser sur les plaques (20 x 20 cm, 0,25 mm d'épaisseur) de gel de silice. A cet effet, les spots (aliquotes) sont déposés à 2cm du bord. Dans chaque plaque 8 à 9 échantillons sont spotés, espacés de 2 cm. La séparation ou développement est effectuée, dans une cuve en verre fermée (20 x 20 cm), par le contact de la plaque avec la phase mobile. Les solvants de développement sont le chloroforme et l'acétone (95:5 v/v).


### ✓ 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 seringue, déposer un aliquote de 10 à 15 µl sur la plaque de CCM à 2 cm du bord inférieur soigneusement en évitant d'abîmer la surface de la plaque. Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de séparation des AFs. Sur une même plaque plusieurs échantillons peuvent être spotés avec des intervalles de 1,5 à 2cm.
- Un volume, de 15 µl d'une solution standard de 1 µg/ml d'AFB1 est spoté au même temps que les extraits des échantillons analysés, et un extrait d'aflatoxine G1, obtenu à partir d'*A. parasiticus* CBS 100926T a été utilisé comme témoin.

## Matériels Et Méthodes

---

- Pour éviter d'avoir de grosses taches sur la plaque, le volume à déposer est spot 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 AFs B et G 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.

A decorative red border resembling a scroll, with rounded corners and a small grey circle at the top right corner.

*RESULTATS ET*  
*DISCUSSION*

## Résultats et discussions

---

Ce travail de mémoire, a consisté en l'étude de la contamination fongique dans quatre types d'épices commercialisés en Algérie et plus précisément dans la région de Khenchela. Ces aliments sont des substrats adéquats au développement et à la prolifération des moisissures et représentent par conséquent un risque de contamination par les mycotoxines.

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 ces aliments 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.

### I-Résultat

#### 1. Analyse de la flore fongique et les principaux genres

Les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine peuvent être colonisées par différents micro-organismes et particulièrement par les moisissures. Les moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs et de l'humidité, d'où la grande variété des substrats alimentaires pouvant être contaminés (AFSSA, 2009).

La caractérisation des moisissures nécessite l'utilisation des méthodes permettant d'isoler, sélectionner et identifier ces champignons.

##### 1.1 Enumération de la flore totale

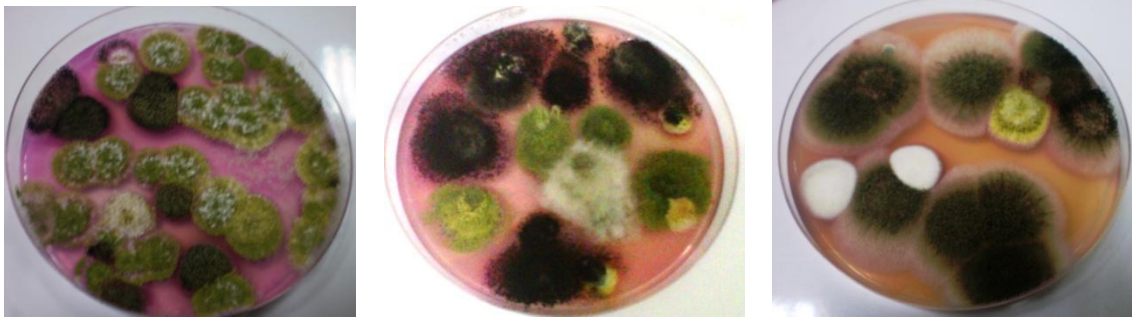
Dans notre travail, 40 échantillons (Curcuma, Gingembre, Safran et Curry) collectés dans différents points de vente de la région de Khenchela ont été analysés.

Dans les quatre aliments étudiés, il a été possible d'isoler et de dénombrer différents champignons sur le milieu DRBC.

Les résultats de l'analyse fongique sont consignés dans le Tableau 8. Globalement, les résultats obtenus montrent une forte contamination des échantillons de curcuma, gingembre, curry par *Aspergillus* et *Penicillium*. Ces deux genres fongiques représentent respectivement 79 et 21% de la flore fongique totale. La quasi-totalité des échantillons sont contaminés par ces deux types de champignons. Dans les échantillons de safran, aucune propagule fongique n'a été révélée à la dilution 10<sup>-1</sup>. Le nombre de cfu/g révélé par la méthode d'ensemencement direct « Direct Plating » est inférieur à 10. La densité de la flore fongique varie considérablement d'un échantillon à un autre. Elle est comprise entre 35.10<sup>3</sup> et 0.10<sup>3</sup> cfu/g de produit. La plus forte densité (35.10<sup>3</sup> cfu/g) a été enregistrée dans les échantillons de Curcuma. Le curry et le gingembre présentent des densités moyennes de 29.10<sup>3</sup> cfu/g et

## Résultats et discussions

14.10<sup>3</sup>cfu/g respectivement (Figure 11 et tableau 8). La plus forte contamination a été notée dans les 2 échantillons de curcuma collectés à Bouhmama (35%), et à Tazoughart (28%). *Aspergillus* est le genre dominant dans la majorité des échantillons analysés, il a été isolé dans la majorité des échantillons avec des taux allant de 17 à 90% soit une moyenne de (59.25%). Les fréquences de ce genre fongique dans le curcuma, curry, gingembre, et safran sont de 80%, 71%, 86% et 0% respectivement (figure 11 et Tableau 8).

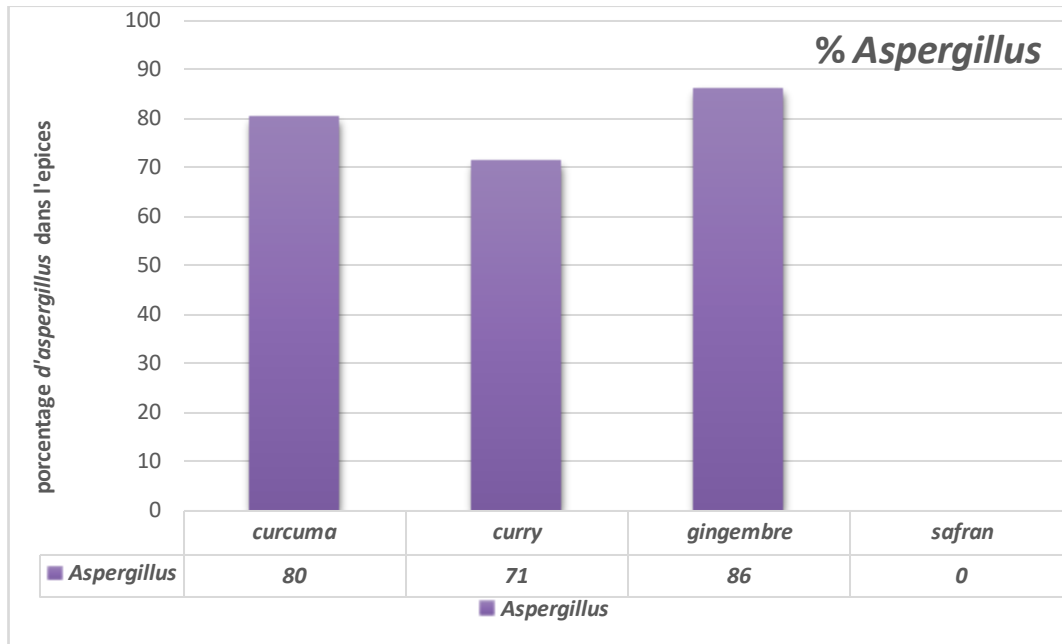


**Figure 11 :** Aspect macroscopique des souches fongiques isolées des les échantillons analysés sur milieu DRBC.

**Tableau 8:** distribution de la flore fongique et fréquences des genres *Aspergillus*, *Penicillium* dans les échantillons d'épices commercialisés en Algérie

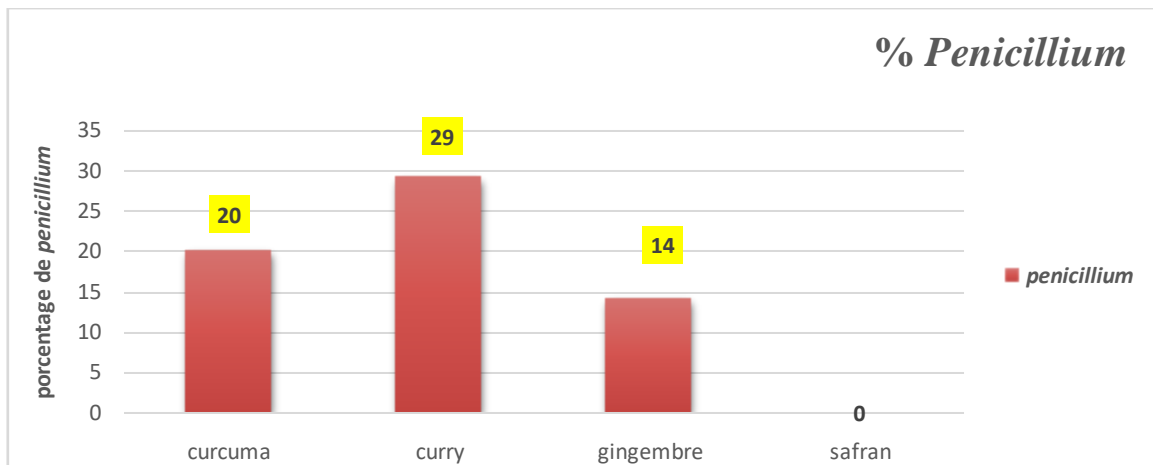
produits	Flore fongique totale (cfu/g)	<i>Aspergillus</i> %	<i>Penicillium</i> %
<b>Curcuma</b>	35.10 <sup>3</sup>	80%	20%
<b>curry</b>	29.10 <sup>3</sup>	71%	29%
<b>gingembre</b>	14.10 <sup>3</sup>	86%	14%
<b>safran</b>	0	0%	0%
<b>totale</b>	19.5.10 <sup>3</sup>	59.25%	15.75%

## Résultats et discussions



**Figure 12 :**Fréquence du genre *Aspergillus* dans les échantillons analysés

Le genre *Penicillium* à été aussi isolé à des proportions très variables allant de 14 à 29%, soit une moyenne de (21%). Ce genre est dominant surtout dans les échantillons de curry (29%), curcuma (20%) et gingembre (14%) (Figure 13). Dans les échantillons de safran ce genre représente moins de 1% de la flore fongique totale. Les autres moisissures ayant été isolés sont *Rhizopus* et *Mucor*.



**Figure 13 :**Fréquence du genre *Penicillium* dans les échantillons analysés

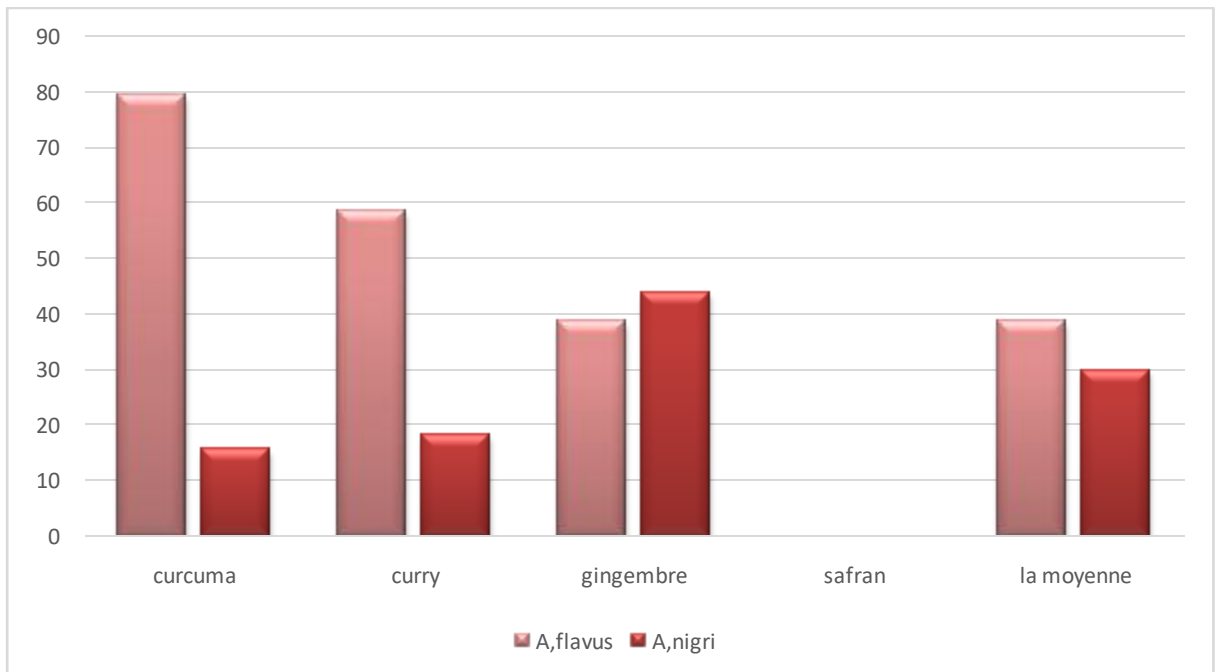
### 1.2. Distribution des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri*

Les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* représentent une moyenne de 38,8% et 30% du genre *Aspergillus* respectivement. Les proportions d'*Aspergillus* section *Flavi* par rapport à la flore fongique totale varient entre 5,4 et 79,6%

## Résultats et discussions

soit une moyenne de 38.8%. Le curcuma (79,6%) est à moindre degré le curry (58,7%), gingembre (38,7%) sont les plus contaminés par les isolats de cette section.

En outre, le gingembre est le plus contaminés par *Aspergillus* section *Nigri* (44,4%), suivies curry (18,3%) et le curcuma (15,7%). Les autres isolats du genre *Aspergillus* appartiennent essentiellement à la section *Terrei* et à la section *Circumdatine* ne sont pas configurés dans les figures. On note une dominance de la section *Favi* dans toutes les échantillons par apport la section *Nigri*. Ainsi les taux de contamination des échantillons par les isolats de la section *Flavi* les plus élevés sont surtout enregistrés à Chechar, Bouhmama, et Tazougart. Les taux de contamination les plus faibles sont enregistrés dans les échantillons de Khenchela et Zoui, (Figure 14).



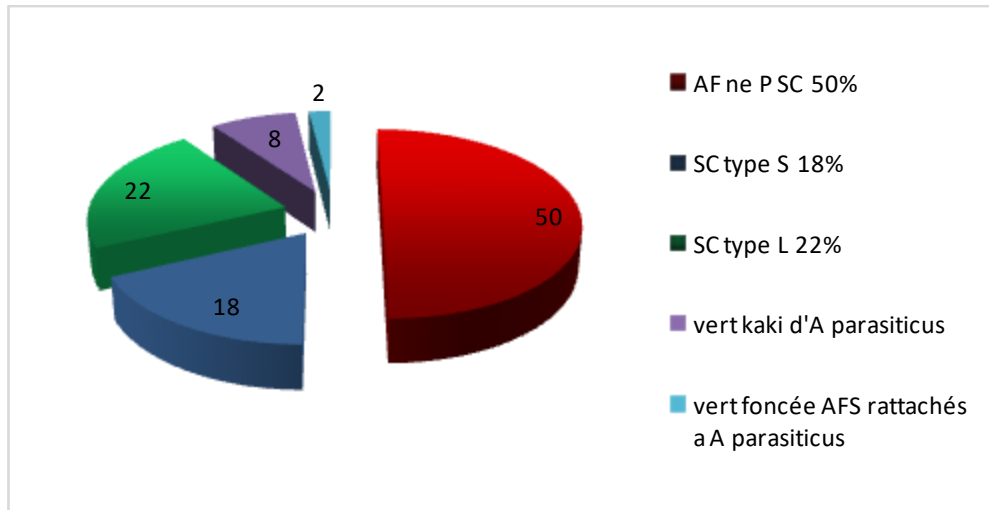
**Figure 14 :** Fréquence d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* dans les échantillons analysés

### 1.3. Distribution des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* dans les échantillons analysés

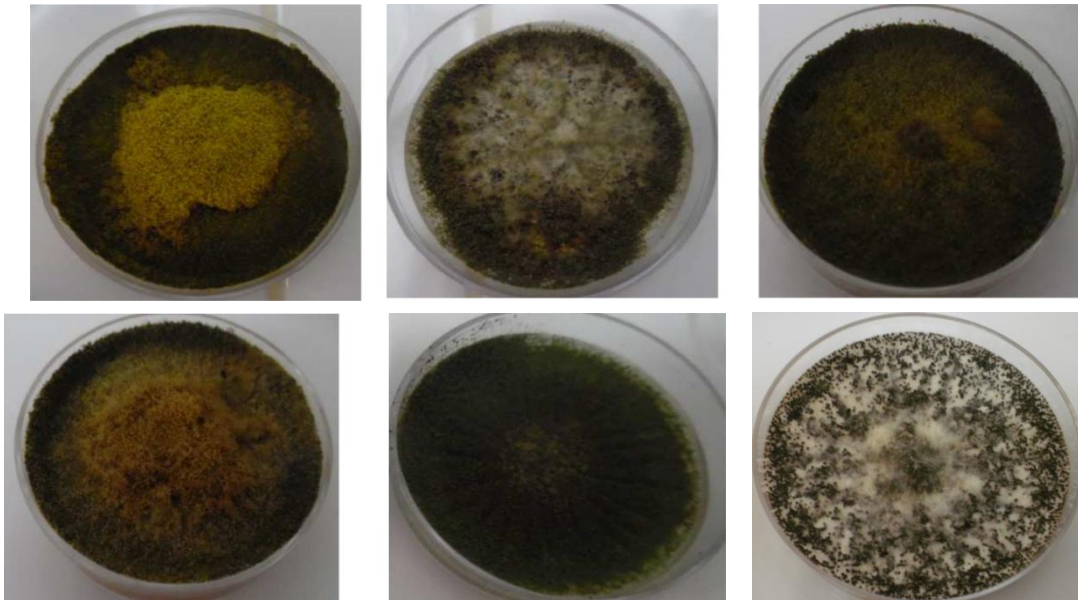
Au cours de cette étude, 100 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* ont fait l'objet d'une identification morphologique et de l'étude du pouvoir de production d'AFs. Les principaux résultats sont présentés dans les (figures 12,13,14). Parmi ces isolats, 90 (90%) présentaient les caractères du groupe d'*Aspergillus flavus*. Ce groupe est formé de 50 isolats (50%) ne produisent pas de sclérotés ; 40 isolats (40%) produisant les sclérotés dont 18 (18%) produisent les sclérotés de type « S » (<400 µm) et 22 (22%) produisent les sclérotés de type

## Résultats et discussions

« L » (400 µm). Nous reviendrons plus loin sur la taxonomie de ces isolats d'une manière plus détaillée. 8 isolats (8%) présentaient des conidies rugueuses et un mycélium d'aspect poudreux et de couleur vert olive tirant sur le brun (vert kaki) caractéristique d'*A. tamarii*. En plus, ces isolats ne poussent pas à 42 °C, caractère qui les distingue également des autres espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (Ehrlich *et al.*, 2007). Ils sont ainsi rattachés à cette espèce. Deux isolats sur les 100 (2%) ayant la couleur vert-foncée, produisant les 4 AFs sont rattachés à *Aspergillus parasiticus* (Figure 15)



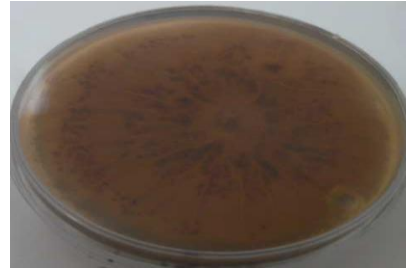
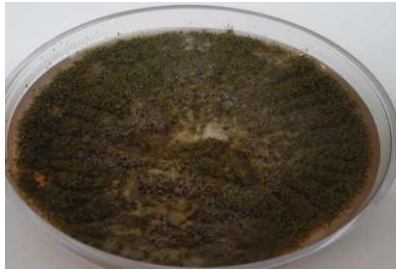
**Figure 15 :** Les différents types d'isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* dans les échantillons d'épices



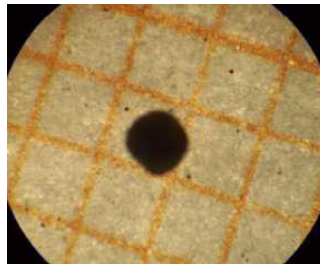
**Figure 16 :** Différences morphologiques observées chez les *Aspergillus* section *Flavi* sur milieu CYA

## Résultats et discussions

---



Production de sclérotés par *Aspergillus flavus* après 21 jours d'incubation sur milieu CYA.

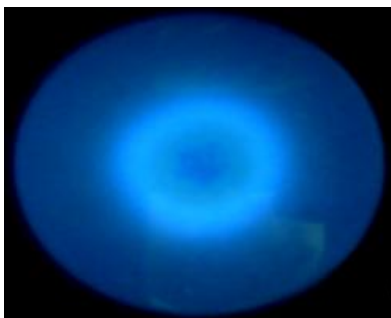


Nature des sclérotés (type L)

**Figure 17** : Production et détermination de la nature des sclérotés au MP G×10 chez les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

### 2. Étude du pouvoir producteur d'AFs par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

Nous avons étudié le pouvoir producteur d'AFs de 100 souches appartenant à la section *Flavi* isolées des échantillons de curcuma, curry et gingembre. Le screening des isolats aflatoxinogènes a été réalisé sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) dans lequel la fluorescence des AFs est mise en évidence sous U.V. à 365 nm. La production d'AFs est ensuite confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM). Les résultats ont révélé un taux de production de 37,6 et 40%, respectivement sur milieu CAM et sur CCM. La fluorescence des AFs sur milieu de culture est illustrée sur la **figure 18** et par CCM sur la figure 19. Sept isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur milieu CAM.

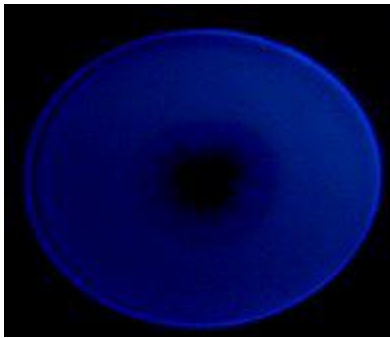


**A** : Fluorescence bleue sous UV (365 nm)



**B** : Revers jaune orangé

**Isolat producteur d'AFs**



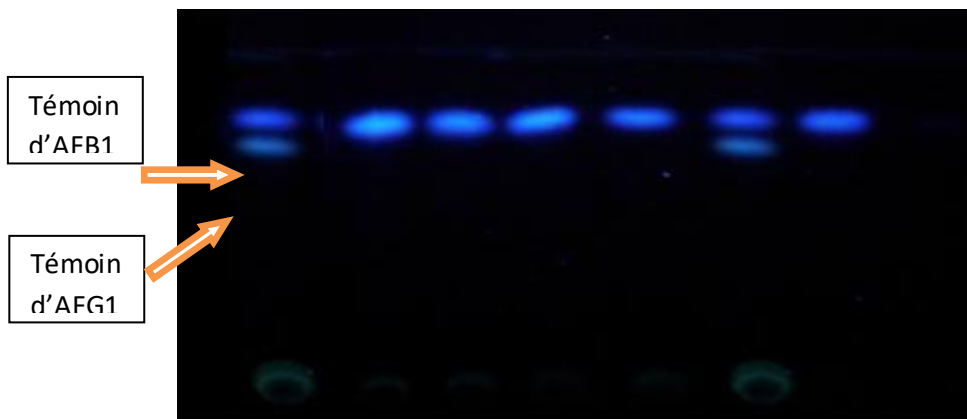
C : Absence de fluorescence sous UV (365nm)



D : Revers beige

### Isolat non producteurs

**Figure 18** : Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).



**Figure 19** : Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus flavus* sur CCM.

### 2.1. Souches aflatoxinogènes isolées des échantillons de curcuma, gingembre et curry

Sur les 100 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* isolés des échantillons analysés, 50 ont révélé des producteurs d'AFs. Parmi ces isolats producteurs : 30 isolats (60%) d'*A. flavus* non producteurs de sclérotés, 10 isolats (20%) d'*A. flavus* produisant les sclérotés de type « L », 8 isolats (16%) de type « S » et 2 isolats (4%) d'*A. parasiticus* (Figure 20).

Nous remarquons que les échantillon de curcuma sont les plus contaminés par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs (30%) suivies des échantillons de curry (18%) et des échantillons de gingembre (12,1%).

## Résultats et discussions

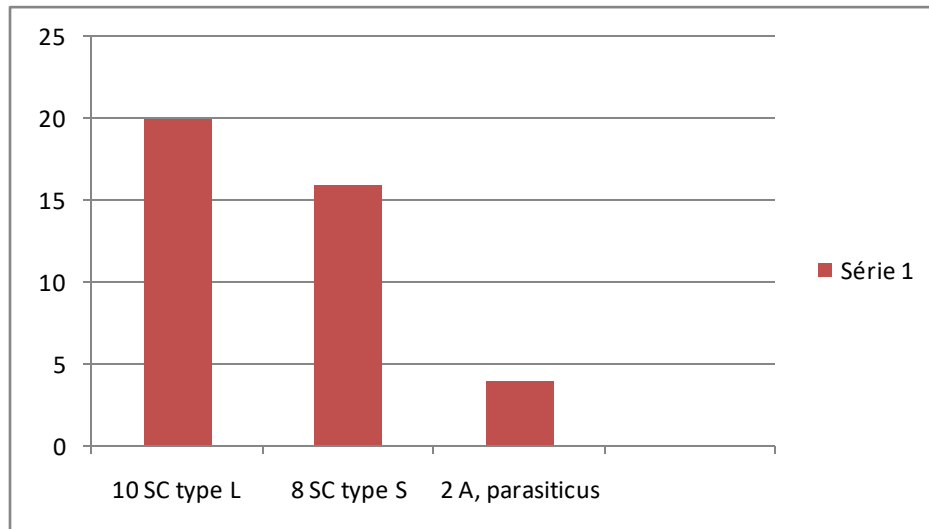
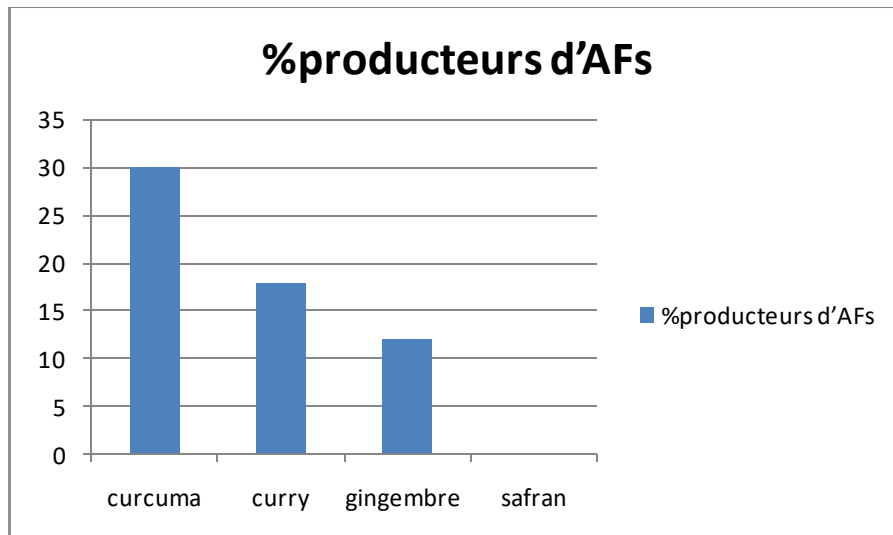


Figure 20 : Les différents types d'isolats producteurs d'AFs dans les échantillons analysés



Figures 21 : Fréquence (%) des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs en fonction de type du produit

### 3. Caractérisation des *Aspergillus* section *Flavi* en fonction de la production de types d'AFS et de 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, et des sclérotés. Ceci ne nous permet évidemment pas de faire une délimitation très précise de nos isolats.

## Résultats et discussions

Sur la base du profil de mycotoxines produites, en plus des caractères morphologiques, les 90 isolats aflatoxinogènes appartenant à la section *Flavi* ont été subdivisés en 5 groupes (Tableau 9).

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

**Tableau 9.** Répartition des isolats producteurs d'AFs d'*Aspergillus* section *Flavi* en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB1, et de sclérotés.

Chémotypes	AFB	AFG	Sclérotés <sup>a</sup>		Nombre d'isolats (%) <sup>b</sup>
			S	L	
<b>I</b>	+	-	-	-	30 (60)
<b>II</b>	+	-	+	-	5 (10)
<b>III</b>	+	+	+	-	3 (6)
<b>IV</b>	+	+	-	-	2 (4)
<b>V</b>	+	-	-	+	10(20)

Le type S (sclérotés < à 400 µm) et le type L (> 400 µm). <sup>b</sup> Pourcentage par rapport à 100 isolats testés.

AFB1: aflatoxine B1 ; AFG : aflatoxine G

### II. DISCUSSION

Les résultats de l'analyse fongique ont montré une forte contamination des échantillons par les moisissures. Plusieurs travaux ont également signalé qu'un grand nombre de champignons peuvent être isolés des épices (**Di Bella et al., 2019**). La forte contamination des échantillons de curcuma, gingembre, curry par *Aspergillus* et *Penicillium* a été rapportée par plusieurs auteurs (Man et al., 2016). Nos résultats confirment le statut de flore de « stockage » de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Contrairement aux champignons de « champ », *Alternaria*, *Cladosporium* et *Fusarium*, qui exigent une forte humidité. La contamination des denrées alimentaires par les moisissures peut survenir tout au long de la filière : production, stockage, transport, transformation et conditionnement (**Doré et al., 2002**). Ainsi, des champignons du sol ou des débris de plantes pourront disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions sont favorables.

La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud est très connue (**Pitt et Hocking, 1997**). *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (**Gourama et Bullerman, 1995**) et il est par conséquent très répandu dans la nature et tout particulièrement dans les régions à climat chaud (**Mantle, 2002; Hocking et Pitt, 2003**). Une grande hétérogénéité a été observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons de même origine et de même catégorie. Cette fluctuation n'est pas liée à un paramètre particulier. En effet, la qualité du grain après récolte est influencé par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc.). Le grain stocké est lui-même considéré comme un écosystème particulier (**Magan et Aldred, 2005**). En outre, la faible contamination des échantillons de safran s'expliquerait probablement par l'ajout des colorants chimiques. Ces derniers inhibent la croissance de la flore fongique. l'office national de sécurité sanitaire des produit alimentaires (**ONSSA, 2018**) a confirmé que des non-conformités ont été décelées lors de contrôles sur les safran vendus en vrac ne porte aucune indication d'étiquetage, d'autre part la teneur trop élevée en matière étrangères et de colorants artificiels ont été déclarés.

Dans cette étude nous avons révélé une très forte contamination des curcuma (30%) et des curry (18%) par *Aspergillus* section *Flavi*.. Selon les études menées dans les régions à climat chaud, les espèces de cette section et de la section *Nigri* sont les plus fréquemment isolées dans les graines de céréales et les épices (**Abarca et al., 2001; Magnoli et al., 2003**). Nos résultats ont également montré que la plupart des échantillons de curcuma et de curry

## Résultats et discussions

---

sont contaminés par les espèces de la section *Flavi*. Toutefois leurs fréquences est plus importante que dans les échantillons de gingembre. ont rapporté des fréquences d'isolement d'*Aspergillus* section *Flavi* de 84% dans les curcuma et 76% dans les curry et safran.

*Aspergillus flavus* est l'espèce la plus commune, se produisant dans la plupart de la denrée dans les pays tropicaux. Cette espèce est très commune sur le maïs, les oliagineuses les épices et les graines de coton (**Molyneux et al., 2007**). *Aspergillus parasiticus* est rencontré plutôt dans les arachides, mais est rarement rencontrée dans les autres denrées. Elle est plus limitée géographiquement par rapport à *A. flavus*, mais elle produit les AFs de type B et G, et pratiquement tous les isolats connus sont toxinogènes (**Frisvad et al., 2007**).

Le résultat concernant le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes doit prendre en compte le seuil limite de détection. Car ce pourcentage a été déterminé sur la base de la mise en évidence de la fluorescence sur CAM et CCM. Ce pourcentage peut être revu à la hausse si les isolats sont analysés par HPLC avec un seuil de détection plus sensible. (**Riba et al., 2010**) ont montré que le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par HPLC est de 30 et 72%, respectivement. La majorité (60%) des isolats aflatoxinogènes produisent l'AFB avec présence ou non de sclérotés 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 B2, mais cette production est extrêmement variable (**Richard et al., 1992; Horn et Dorner, 1999**). En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (**Pitt, et al., 1993; Horn et al., 1996**). De nombreux auteurs soulignent une corrélation positive entre la production d'AFs de type B et la production de CPA. Ainsi, (**Pildain et al., 2008**) soulignent que le CPA est produit non seulement chez les souches productrices d'aflatoxine B comme *A. flavus* et occasionnellement chez *A. pseudotamarii* mais aussi chez *A. minisclerotigenes* et *A. parvisclerotigenus* productrices des deux types d'AFs (AFB et AFG).

Dans une étude sur les *Aspergillus* section *Flavi* des sols de culture de maïs en Iran, soulignent, comme nous, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les AFs, le CPA et les sclérotés (groupe I). 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 sclérotés (**Cotty, 1989; Criseo et al., 2001**).

## Résultats et discussions

---

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 50 isolats aflatoxinogènes, 8% d'entre eux produisent des sclérotés de type « S ». Ces isolats sont fortement producteurs d'AfB1 révélée sur CCM et produisent également l'AFG révélée par HPLC. Nos isolats produisant l'AfB et l'AFG 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 ( **Cardwell 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**), l'ont considéré comme une nouvelle espèce dont certains isolats produisent les AFs B et G. Les derniers travaux sur la taxonomie des *Aspergillus* section *Flavi* rattachent ce type d'isolat soit à espèces *A. minisclerotium* soit à *A. parvisclerotigenus* qui diffèrent en elles du point de vue métabolites produits ( **Pildain et al., 2008**). Il faut signaler aussi que l'incidence des isolats aflatoxinogènes est aussi liée à la nature du substrat ( **Horn, 2003**).

A decorative red border that resembles a scroll, with rounded corners and a vertical strip on the left side that looks like a binding or a scroll edge.

*Conclusion et  
perspectives*

L'évaluation du niveau de contamination par les champignons toxigènes est importante, car elle permet de fournir des informations aussi bien sur la qualité des produits alimentaires que d'éventuelle présence de mycotoxines. Beaucoup d'intérêt est accordé à la détection et à la quantification des espèces d'*Aspergillus* section Flavi responsables de la contamination par les AFs des épices et d'autres céréales (**Zinedine et al., 2009**).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier la flore fongique et les espèces aflatoxinogènes dans les épices commercialisés en Algérie.

Les résultats obtenus montrent que le curcuma, curry et gingembre 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. 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 cinq groupes différents dont la majorité (60%) présentait les caractères d'*A. flavus* typique produisant l'AFB sans sclérotés. Certains (10%) sont rattachés aux espèces d'*A. flavus* atypique ayant la capacité de produire de petits sclérotés (<400 µm). Deux isolats rattachés à *A. parasiticus* et trois 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 milieux de culture à base d'extrait de noix de coco, a permis de montrer que cette technique, qui présente l'avantage d'être simple et moins coûteuse, est aussi performante que la détection par CCM. Ainsi, on peut préconiser l'utilisation du milieu à l'extrait de noix de coco comme méthode rapide de détection des isolats producteurs d'AFs tout en tenant compte du seuil de détection.

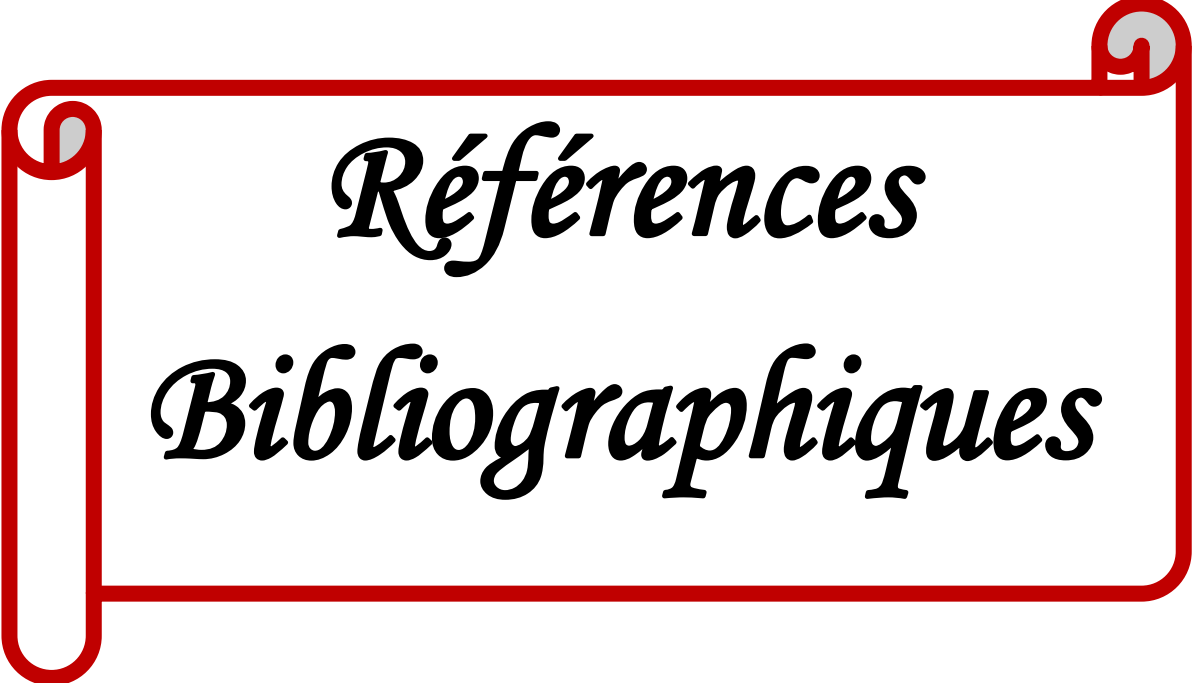
Cependant, la CCM peut être utilisée pour la quantification et la confirmation des résultats obtenus sur milieu à base d'extrait de noix de coco.

Sur le plan de la sécurité sanitaire des aliments, notre travail est une contribution à une analyse des risques liés à la contamination de quelques produits de large consommation par les souches Aflatoxinogènes. Avant toute extrapolation de nos résultats, il convient de noter que ceux-ci ne représentent pas une large gamme de situations. Il serait intéressant, en perspective, d'effectuer les travaux suivants:

## Conclusion générale

---

- étendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons ;
- étudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxigènes et l'influence des conditions de stockage (température, humidité) sur la toxigenèse;
- appliquer les techniques moléculaires afin d'identifier d'une manière plus précise les isolats toxigènes;
- en vue d'une lutte biologique contre les champignons toxigènes, il serait intéressant d'étudier l'influence de la compétition ou de la synergie entre champignons qui partagent les mêmes niches écologiques, notamment le genre *Aspergillus*, sur la production des mycotoxines. Pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation il est impératif de veiller au respect de règles d'hygiène telles les conditions d'emballage, d'entreposage et de stockage et multiplier les contrôles microbiologiques et toxicologiques des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines. A cet effet, des laboratoires spécialisés en la matière doivent être mis en place sur tout le territoire du pays

A decorative red border that resembles a scroll, with rounded corners and a slight shadow effect, framing the text.

*Références  
Bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of food protection*, 64, 903-906.
- AFSSA. 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final
- Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcero AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Cavaglieri LR. 2013. Fungi and mycotoxins in silage an overview. *Journal of applied microbiology*, 115: 637–643.
- Amare MG, Keller NP. 2014. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, 66:11-8.
- André Cassan ; Mme Jeanne Parello-Marneix. Directeur de la publication. Édité par l'Institut Klorane, Fondation d'Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végétal. Isabelle Escartin avec la participation de C. Lacoste (IUFM) .Art & Caractère (SIA), 81 500 Lavour. L'Institut Klorane.
- *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin :
- Atongbiik Achaglinkame M, Opoku N, Kweku Amagloh F. 2017. Aflatoxin contamination in cereals and legumes to reconsider usage as complementary food ingredients for Ghanaian infants: A review. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 10: 1-7.
- Ayerst, G. (1969). - The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research*, 5,127-141.
- Badillet G, de Briève C, Guého E .1987. Champignonscontaminants des cultures, champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris. 68– 76.
- Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 4: 625-32.
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr K A. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell*, 5170: 5-12.
- Baquião CA, Melo de Oliveira MM, Alves Reis T, Zorzete P, Atayde DD, Correa B. 2013. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 139: 1127–1132.
- Baranyi N, Kocsube S, Varga J .2015. Aflatoxins climate change and biodegradation. *Current Opinion in Food Science*, 5: 60-66
- Barros, G., Torres, A. et Sofia Chulze, S. (2005). - *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *Journal of Science Food and Agriculture*, 85, 2349–2353.

## Références bibliographiques

---

- Bayman, P., et Cotty, P.J. (1991).- Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canadian Journal of Botanic*, 69(8), 1707–1711
- Bbosa GS, Kitya D, Odda J, Ogwal-Okeng J. 2013. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 5: 14-34
- BERNARD, A., (2012). Les épices c'est malin, cannelle clou de girofle, poivre, leurs biens faits et toutes leurs utilisations méconnues pour la santé. *La beauté et la maison*, 16
- Bhat R, Rai RV, Karim AA. 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and
- 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.
- Bouraima Y, Ayi-Fanou L, Kora I, Sanni, A, Creppy EE. 1993. Mise en évidence de la contamination des cereals par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Benin. In Creppy, EE., Castegnaro, M., Dirheimer (Eds). *Human ochratoxicosis and its pathologies*, 231: 101- 110.
- Bourais I, Aziz A. 2006. Aflatoxines toxiques redoutables dans nos aliments. *Les technologies de laboratoire - N° 0/2006*, 4-8
- Bouseta A, El Ayachi N, Bouya D, Benzekri A, Iraqi R, Collin S. 2005. Influence de l'activité de l'eau, de la température et du temps d'incubation sur la croissance et la production de déoxynivalénoïl par des isolats de *Fusarium culmorum*. *Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire*, Fès, Maroc.
- Bragulat MR, Abarca MS, Cabañes FJ. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 139-144.
- Brochard G, le Bacle C. 2009. Mycotoxines en milieu de travail. *Document pour le médecin du travail*, n°119: 299-323.
- Bullerman LB, Bianchini A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 140-146.
- Cahagnier B, Dragaci S, Frayssinet C, Frémy JM, Hennebert GL, Lesage - meessen L, Multon JL, Richard-Molard D, Roquebert MF . 1998. *Moisissures des aliments peu hydratés*. Lavoisier Tec&Doc. France, 225p.
- Cahagnier B, Richard-Molard D .1998. *Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures*. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. Lavoisier. p :39-41.

## Références bibliographiques

---

- 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.
- Calvo, A.M., Bok, J., Brooks, W., et Keller, N.P. (2004). - veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4733–4739.
- Campagnollo CFB, Ganev KC, Khaneghah AM, Portella J, Cruz AG, Granato D, Corassin CH, Oliveira CAF, de Souza Sant’Ana A. 2016. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: a review. *Food Control*, 68: 310-329.
- Cardwell, K.F., et Cotty, P.J. (2002). - Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin West Africa. *Plant Diseases*, 86, 434–439.
- Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. 2002. Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. 2e édition. Paris: Lavoisier, Tec. &Doc, p. 127-79.
- Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. 2002. Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. 2e édition. Paris: Lavoisier, Tec. &Doc, p. 127-79.
- CE (2012). Commission Regulation (EU) No 1058/2012 of 12 November 2012 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for aflatoxins in dried figs. *Official Journal of the European Union*, L313:14-15.
- CE (2012). Commission Regulation (EU) No 1058/2012 of 12 November 2012 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for aflatoxins in dried figs. *Official Journal of the European Union*, L313:14-15.
- Chabasse D, Bouchara JP, Gentile L, Brun S, Cimon B. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale*, 25 : 1-159
- Chang P.K, Ehrlich K.C. et Hua S.S.T (2006).- Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 172–177.
- Chang PK, Ehrlich KC. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 189-199

## Références bibliographiques

---

- Chasseur C, Nolard N. 2003. Les champignons de l'habitat. Introduction à la mycologie, risques pour la santé, expertises in Centre Scientifique et Technique de la Construction Magazine, 3-16.
- Chermette R, Bussieras J. 1993. Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. 179 pp
- Clinical Microbiology and Infection, 22: 662-669.
- Cole RJ, Cox RH. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites, (New York), Academic Press, 1-66.
- Cotty P. J. (1989). - Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 79, 808–814.
- Cotty P. J. (1989). - Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 79, 808–814.
- Criseo, G., Bagnara, A., et Bisignano, G. (2001). - Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 291–295.
- D'Halewyn MA, Leclerc JM, King N, Bélanger M, Legris M, Frenette M. 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. In: Poulin M (Ed.), Institut National de la Santé Publique du Québec. INSPQ, Québec, 1-16
- Davis, N. D., Iyer S. K., et Diener, U. L. (1987). - Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 1593–1595.
- Delage N, D'Harlingue A, Colonna Ceccaldi B, Bompeix G. 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food control*, 14: 225-227
- DELAVEAU, P. (1987). Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel, Paris, 130-136
- Di Bella, G. et al. (2019) Organic contamination of Italian and Tunisian culinary herbs and spices. *J. Environ. Sci. Health B*. 17, 1–12, <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1571364>.
- Doré, T., Le Bail, M., et Verger, P. (2002).- Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. *Cahiers Agricultures*, 11(13), 177–185.
- Doster MA, Cotty PJ, Michailides TJ. 2009. Description of a distinctive aflatoxin-producing strain of *Aspergillus nomius* that produces submerged sclerotia. *Mycopathologia*, 168: 193-201.

## Références bibliographiques

---

- Dr Laurence Lévy-Dutel, Patricia Bargis Avec la collaboration du Épices, aromates, condiments et herbes aromatiques, édition Groupe Ayrolle, 2015.
- Ehrlich, K.C. Kobbeman, K., Montalbano, B.G. et Cotty, P.J. (2007).- Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 153–159.
- Ehrlich, K.C. Kobbeman, K., Montalbano, B.G. et Cotty, P.J. (2007).- Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 153–159
- Eivazzadeh-Keihan R, Pashazadeh P, Hejazi M, Guardia MDL, Mokhtarzadeh A. 2017. Recent advances in Nanomaterial-mediated Bio and immune sensors for detection of Aflatoxin in food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 87: 112-128.
- Eivazzadeh-Keihan R, Pashazadeh P, Hejazi M, Guardia MDL, Mokhtarzadeh A. 2017.
- Erkekoğlu P, Şahin G, Baydar T. 2008. A Special Focus on Mycotoxin Contamination in Baby Foods: Their Presence and Regulations. *FABAD journal of pharmaceutical sciences*, 33: 51-66.
- FAO (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. FAO food and nutrition paper, N° 81, Rome.
- Fente, C. A., Ordaz, J. J., Vazquez, B. I., Franco, C. M. et Cepeda, A. (2001). - New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(48), 58–62.
- Fitzgerald JM, Collin RG, Towers NR. 1998. Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 17-21.
- Flores-Flores ME, Lizarraga E, Lopez de Cerain A, Gonzalez-Penas E. 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53: 163-176
- Fox EM, Howlett BJ. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11:481-487.
- Frisvad JC, Mick Frank J, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in mycology*, 50: 23-43
- Frisvad, J. C., Thrane, U., et Samson, R. A. (2007). -Mycotoxin producers. In J. Dijksterhuis et R. A. Samson (Eds.), *Food mycology. a multifaceted approach to fungi and Food* (pp. 135–159). Boca Raton: CRC Press.

## Références bibliographiques

---

- Frisvad, J.C., Skouboe, P. et Samson, R.A. (2005). - Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3 Omethylsterigmatocyst In: *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 442–453.
- Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 57-81.
- Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. 2011. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 28: 406-417
- Gautier M, Normand AC, Ranque S. 2016. Previously unknown species of *Aspergillus*.
- Giorni P, Battilani P, Pietri A, Magan N. 2008. Effect of aw and CO<sub>2</sub> level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 109–113.
- Giorni P, Magan N, Pietri A, Bertuzzi T, Battilani P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food*, 113: 330-338.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., et Battilani, P. (2007).- Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330–338.
- Gourama, H., et Bullerman, L.B. (1995). - *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, aflatoxigenic fungi of concern in foods and feed – a review. *Journal of Food Protection*, 58, 1395–1404.
- Hamid AS, Tesfamariam IG, Zhang Y, Zhang ZG. 2013. Aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review). *Oncology Letters*, 5: 1087-1092.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.
- Herzallah SM. 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem*, 114(3):1141-1146.
- Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Vandegrift, E. et Shannon, G. (1970). - Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. Pages 202–210 In: *Toxic Micro-organisms*. M. Herzberg, ed. U. S. Gov. Print. Office, Washington, D.C

## Références bibliographiques

---

- Hocking A.D. et Pitt J.I. (2003).- Mycotoxigenic fungi, In: Hocking, A.D. (Ed.), Foodborne microorganisms of public health significance, 6th Ed. Australian Institute, Sydney.
- Hocking AD, Pitt JI. 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 488-492.
- Horn, B. W., et Dorner, J. W. (1999). - Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1444–1449.
- Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W., Powell, J.H. et Layton, R. C. (1996). Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia*, 88(4), 574–587
- Horn, BW. (2003). -Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology. – Toxin Reviews*, 22, 351–379.
- Hua Sui-Sheng, T. (2002). - Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonin In: and 16th Aflatox Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA.
- IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Vol. 82. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Iqbal SZ, Jinap S, Peroz A, Razis AFA. 2015. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 46: 110-119.
- Iqbal SZ, Nisar S, Rafique Asi M, Jinap S. 2014. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control*, 43: 98-103
- Isabelle Le Coquil – Diététicienne- Tél : 06.47.08.53.24 Club Cœur et santé 24 mars 2017
- Ji C, Fan Y, Zhao L. 2016. Review on biological degradation of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol, *Animal Nutrition Journal. Animal Nutrition*, 2: 127-133.
- Jouany JP, Yiannikouris A, Bertin G. 2009. Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminants products. *Options Méditerranéennes. Serie A*, 85: 205-224.
- Kader AA, Hussein AM. 2009. Harvesting and postharvest handling of dates. ICARDA, Aleppo, Syria, 15p

## Références bibliographiques

---

- Kiffer E, Morelet M. 1997. Les deutéromycètes. Institut National de la Recherche Agronomique. 306p.
- King AD, Hocking AD, Pitt JI. 1979. Dichloran-rose Bengal medium for the enumeration of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 959-964
- Kurtzman C.P., Horn, B.W. et Hesseltine, C.W. (1987). - *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie vanLeeuwenhoek*, 53, 147–158.
- Kurtzman C.P., Horn, B.W. et Hesseltine, C.W. (1987). - *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147–158.
- Lai X, He Z, Liu R, Liu C. 2015. Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 176-180.
- Laura Asther. Eléments complémentaires à la conférence « Sur la route des épices », décembre 2012
- Le Bars J, Le Bars P. 1987. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section Midi-Pyrénées.
- Lewis DC, Goodrich-Schneider R. 2012. Mycotoxins in Fruit and Fruit Products. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 125: 252-257
- Lund F, Frisvard JC. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1117-1123
- Magan N, Medina A, Aldred D. 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, 60: 150–163.
- Magan, N. et Aldred, D. (2005). - Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, S1, 10–16.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. et Dalcerro, A. (2003). - Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179–184.
- Man, A, Mare, A, Toma, F, Curticapean, A. & Santacroce, L. (2016)
- Mantle, P.G. (2002). - Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 50, 143–146.

## Références bibliographiques

---

- Marie-Pierre Arvy, Francois Gallouin, Epices, aromates et condiments, édition belin,1777.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60: 218–237.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60: 218–237.
- Mohammedi Z, Bachik S, Belkaroube N. 2010. Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. *Les technologies de laboratoire*, 5: 10-15.
- Molyneux, R. J., Mahoney, N., Kim, J. H., et Campbell, B. C. (2007). -Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 72–78.
- Morin O. 1994. *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, 8-600-A-10.
- mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 31–40.
- Neme K, Mohammed A. 2017. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78: 412-425.
- Nesci A, Etcheverry M. 2009. Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal ecology*, 2: 44-51.
- Nishio Z, Iriki N, Takata K, Ito M, Tabiki, Murray TD. 2008. Influence of coldhardening and soil matric potential on resistance to speckled snow mold in wheat. *Plant disease*, 92:1021-1025
- Olsen M, Jonsson N, Magan N, Banks J, Fanelli C, Rizzo A, Haikar A, Dobson A, Frisvad J, Holmes S, Olkku J, Persson SJ, Börjesson T. 2003. Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999- 00433.
- Olutiola, P.O. (1976). -Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 67, 265–268.
- ONS (2014). Office National des Statistiques. Evolution Des Echanges Exterieurs De Marchandises De 2003 A 2013. Collections Statistiques N° 188/2014 Série E: Statistiques Economiques N° 79.
- Pardo E, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2005. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology*, 22: 383-389.

## Références bibliographiques

---

- Partanen HA, El-Nezami HS, Leppänen JM, Myllynen PK , Woodhouse H J, Vähäkangas KH. 2010. Aflatoxin B1 transfer and meta bolism in human placenta. *Toxicological Sciences*, 113: 216–225.
- Peterson, S.W. (2000). - *In*: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification*, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163–178.
- Peterson, S.W. (2000). - *In*: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification*, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163–178.
- Pfohl-Leszkowicz A. 1999. Définition et origine des mycotoxines. *In* : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*, (Eds) Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 3-15.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). - *Ecotoxicogénèse*. *in* : *Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risqué*, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17–35.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A., (2008). - Two novel aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 725–735.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A., (2008). - Two novel aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 725–735.
- Pildain, M.B., Vaamonde, G. et Cabral, D. (2004). - Analysis of population structure of
- Pinson C. *Curcuma et gingembre – un concentré de bienfaits pour votre santé et votre beauté*. Eyrolles Ed. 2012. 169p.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and Food spoilage*, 2nd ed. Blackie Academic and Professional, London. 540 p
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and Food spoilage*, 2nd ed. Blackie Academic and Professional, London. 540 p.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition, Springer New York, NY, USA, 540 pp.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition, Springer New York, NY, USA, 540 pp.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., et Tanboon-Ek, P. (1993). - The normal mycobiota of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 211–226.

## Références bibliographiques

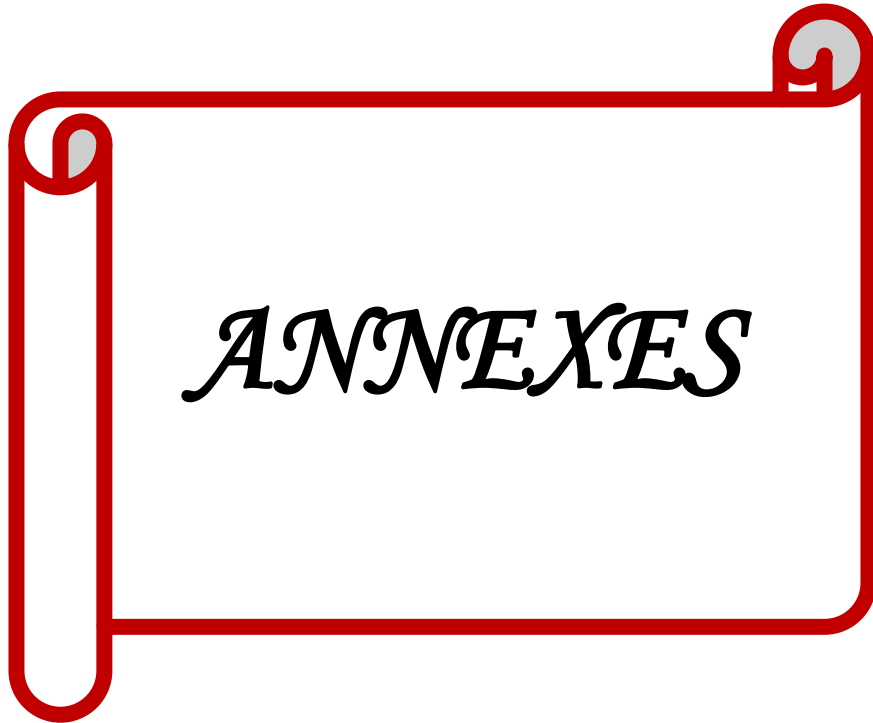
---

- Portnoy JM, Jara D. 2015. Mold allergy revisited. *Annals of Allergy. Asthma and Immunology*, 114: 83-89
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. 2009. On occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 984-991.
- Raiola A, Tenore GC, Manyes L, Meca G, Ritieni A. 2015. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: an overview. *Food and Chemical Toxicology*, 84: 169-180
- Raper K, Fennell DJ. 1965. The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore. 686p
- Recent advances in Nanomaterial-mediated Bio and immune sensors for detection of Aflatoxin in food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 87: 112-128.
- Refai MK, Niazi ZM, Aziz NH, Khafaga NEM. 2003. Incidence of aflatoxin B1 in the Egyptian cured meat basterma and control by  $\gamma$ -irradiation. *Food Nahrung*, 47(6):377-382.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A. et Sabaou, N. (2010)
- Richard, J.L., Bhatnagar, D., Peterson, S. et Sandor, G. (1992). -Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia*, 120,183–188.
- Richard, J.L., Bhatnagar, D., Peterson, S. et Sandor, G. (1992). -Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia*, 120,183–188
- Rodríguez A, Rodríguez M, Andrade MJ, Córdoba JJ. 2015. Detection of filamentous fungi in foods. *Current Opinion in Food Science*, 5: 36-42.
- Ruppel P, Delfosse PH, Hornick JL. 2004. La contamination de la filière laitière par les mycotoxines: un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148: 141-146
- Saito, M. et Tsuruta, O. (1993).- A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proc of the Japanese Association of Mycotoxicology Mycotoxicology*, 37, 31–36.
- Samson RA, Houbroken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. 2010. Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series 2. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands
- Samson RA, Visagie CM, Houbroken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsub S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78: 141–173.

## Références bibliographiques

---

- Samson, R.A., Houbraken, J.A., Kuijpers, A.F.A., Frank, M.J. et Frisvad, J.C. (2004).
- Selvaraj JN, Lu Z, Yan W, Yue-JU Z, Fu-guo X, Xiao-feng D, Yang L. 2015. Mycotoxin detection-Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture*, 14: 2265-2281.
- Shephard GS . 2009. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395:1215-1224.
- Smith MC, 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: 1-36
- Trucksess MW, Scott PM. 2008. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25: 1-12
- Turner PC, Sylla A, Gong YY, Diallo MS, Sutcliffe AE, Hall AJ, Wild CP. 2005. Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in West Africa: a community-based intervention study. *Lancet*, 365: 1950-1956.
- Udomkun P, Nimo Wiredu A, Nagle M, Müller J, Vanlauwe B, Bandyopadhyay R. 2017. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – a review. *Food Control*, 76: 127-138
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez, Pinto, V., Comerio, R. et Degrossi, C. (2003). - Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 79–84.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA. 2011a. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69: 57-80.
- Verscheure M, Lognay G, Marlier M. 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 6: 131-142.
- Yu J. 2012. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 4: 1024-1057.
- Zinedine, A., (2009). -Détermination des mycotoxines dans les aliments commercialisés au Maroc et étude sur les bactéries lactiques et leur pouvoir de conservation et de biotransformation. Diplôme d'habilitation à Diriger des Recherches. INRA, Toulouse, France.



**COMPOSITIONS DES MILIEUX DE CULTURES UTILISENT**

**1. Milieu d'isolement DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar)**

Glucose.....	10 g
Peptone .....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Rose Bengale.....	25 mg
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)...	2 mg
Chloramphénicol.....	100 mg
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH final 5,6 ± 0,2	

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

- Le dichloran est additionné sous forme solubilisée à raison de 1 ml/litre de milieu d'une solution de 0,2% dans l'éthanol.

**2. Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)**

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

**3. Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium)**

Cent grammes (100 g) de la noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 5 minutes Avec 300 ml d'eau distillée portée à ébullition. Le mélange est 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 20 g d'agar puis complété à 1000 ml par l'eau distillée. 3 g de β-cyclodextrine (β-cyd) sont ajoutés à un litre de milieu.

**4. Czapek concentré**

NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
KCl.....	5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	5 g

## Annexe

---

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

### 5. Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar)

Pomme de terre .....200 g

Agar .....15 g

Glucose .....20 g

Eau distillée .....1000 ml

pH final 5,6 ± 0,2

**N.B.** Tous les milieux sont stérilisés par durant 20 min à 120°C



Trois milieux de culture utilisés : DRBC, CAM, CYA