



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérien démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي
Université Mohamed el Bachir El Ibrahimi

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers

قسم العلوم الطبيعية والحياة

Département des sciences de la nature et de la vie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : science de la nature et la vie

Spécialité : toxicologie

Intitulé

**Étude des moisissures productrices des mycotoxines
isolée à partir des grains de blé dur**

Présenté par : BELMEHDI Sara

BEDDAR Ghania

Soutenu le : 03-07-2019

Devant le jury

Président :	Mme : SIOUDA	MCB	UNVBBA
Encadrant :	Mme ABED	MAB	UNV BBA
Examineur :	Mme ROUAIGUIA	MAA	UNV BBA

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

Tout d'abord, louange à « ALLAH » Tout- puissant, qui était avec nous tout au long de nos vies et nous a inspiré les bons pas et les justes réflexes, et qui nous a guidé dans notre étude et nous a donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont a madame **ABED Hanane** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération a madame **SIOUDA** Professeur à UNV de Bordj Bou Arreridj et madame **ROUAIGUIA** Professeur à UNV de Bordj Bou Arreridj d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Phytopathologie, Biochimie et de Microbiologie mes dames **Wassima, Wahiba, et le monsieur Khalil** Pour leur gentillesse et serviabilité.*

DÉDICACE

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parent : Moussa et Nouara pour leurs amours, leurs encouragements, leurs
patiences et leurs conseils

Mon mari : Mourad m' avoir soutenu pendant toute cette épreuve, pour son gentillesse, son
patience, son encouragement et pour son amour.

Mes frères : Mouhamed et Abdelmalek

Ma petite sœur : Assia

Mes beaux parents : Abdelmadjid et Zahia et sa mère Drifa

Mon beaux frères : Abdelhakim, Abdelbasset et Abdelhak et sans oublié leurs femmes et leurs
enfants « khaled, Hadjer, Meriem, Khadija et le bébé Ilias »

Mes chers amis : Amina, Nabila et Selma

A tous mes collègues de la promotion « toxicologie »

A toute ma famille « BELMEHDI » et ma belle famille « AMARA »

Et aussi mon binôme Ghania et sa famille « BEDDAR »

Dédicaces

Au terme de ce travail je dédie cette thèse :

A LA MEMOIRE DE MA TRES CHERE MERE CHALABIA : *La femme, qui a œuvré pour ma réussite et qui a tant sacrifié pour nous. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour elle.*

A MON TRES CHER PERE MOHAMED : *A qui je dois beaucoup, Tu m'as inculqué la passion du savoir, tu as toujours éclairé ma voie par tes conseils et pour qui aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et la reconnaissance pour l'ampleur des sacrifices que tu as endurés pour nous éduquer. J'espère être à la hauteur de tes espérances. Je suis fière et contente de réaliser une partie de ce que tu as tant espéré et attendu de moi. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

A MON TRES CHER MARI ABDELHAK : *Je te remercie de tout mon cœur pour ton soutien et ta patience, merci d'être toujours à mes côtés. Je prie Dieu le tout puissant pour qu'il te donne bonheur et prospérité.*

A MA PETITE FILLE ASMA : *je vous présente ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.*

A MA COPINE SARA : *je vous remercie d'être avec moi dans toutes les difficultés.*

A MA BELLE-MERE ZAHRA, DJAMILA ET MON BEAU PERE IBRAHIM: *merci de te trouver près de moi.*

A MES CHERS FRERES ET SŒURS ANTER, WASSILA, ABDELHAMID, MILOUD ET LEUR FAMILLES : *Ceux qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

MES BEAUX FRERES ET MES BELLES SŒURS ET LEUR FAMILLE : ABDERZAK, RAZIKA, HAYET, CHERIF

A MON NEVEU : ABDELGHANI

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS ET PROCHES : *ma famille : BEDDAR et ma belle famille : BERKA*

GHANIA

Listes des figures

Figure 1 : Quelques structures des principales mycotoxines.

Figure 2 : Principales voies de distribution, d'absorption et d'excrétion des mycotoxines.

Figure 3 : Structure générale des trichothécènes.

Figure 4 : Structure chimique de la zéaralénone.

Figure 5 : Structure de la fumonisine FB1.

Figure 6 : Isolement des moisissures sur le milieu PDA.

Figure 7 : Les étapes de l'extraction des mycotoxines à partir des substrats de blé non-traité.

Figure 8 : Extraction des mycotoxines.

Figure 9 : Incubation des flacons dans un agitateur pendant 14 jours.

Figure 10 : Filtration des champignons, A : champignon F1 ; B : champignon F2 ; C : champignon F3 ; D : champignon F4.

Figure 11 : Préparation de la plaque CCM.

Figure 12 : Le *Fusarium* dans le blé dur contaminé.

Figure 13 : L'aspect macroscopique des *Fusarium*.

Figure 14 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé dur.

Figure 15 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *Fusarium*.

Figure 16 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *Fusarium*.

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines dans la chaîne alimentaire.

Tableau II : Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement.

Tableau III.- Effets probables des principales mycotoxines sur l'homme.

Tableau IV : Les principales mycotoxines et leurs valeurs toxicologiques de référence.

Tableau V : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé dur.

Tableau VI: Les résultats de l'analyse de substrat de blé sur CCM.

Tableau VII : Les résultats de l'analyse de substrat de blé sur CCM.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique.
A	<i>Alternaria</i> .
Asp	<i>Aspergillus</i> .
Aw	Activité de l'eau.
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
°C	Degré Celsius.
CCLS	Coopération des Céréales et des Légumes Secs.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince.
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance.
CYA	Czapek Yeast agar.
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
F	<i>Fusarium</i> .
IARC	Agence International pour la recherché contre le cancer.
JECFA	Joint Expert Committee of Food Additives.
LMR	Limites Maximale de résidus.
NRPS/PKS	Non-ribosomal Peptides Synthétase /Polycétide Synthase.
OEPP	Organisation Européenne de Méditerranéenne pour la Protection des Plantes.
OTA	Ochratoxine A.
PDA	Potato Dextrose Agar.
P	<i>Penicillium</i> .
SCF	Scientific Committee for Food.
UV	Ultra Violet.

Glossaire des termes

La qualité organoleptique : on qualifie d'organoleptique tout ce qui est susceptible d'exciter un constitutif les qualités organoleptiques d'un aliment ou d'une boisson.

Les conditions aseptiques : distingue ce qui est aseptisé, sans infection, stérile, qui est dépourvu de micro-organismes ou encore qui n'est pas dû à un micro-organisme.

Les moisissures filamenteuses : est une catégorisation morphologique et non taxonomique, Elle désigne de manière générale tout champignon (parasite et/ou saprophyte) qui présente un aspect cotonneux lors de sa croissance (ces filaments ou hyphes, étant composés de matière organique).

Une pression sélective : désigne un phénomène qui se traduit par une évolution des espèces vivantes soumises à certaines contraintes environnementales. De façon imagée, on peut voir ces contraintes environnementales comme une force qui "pousse" l'espèce à se transformer dans une direction donnée, d'où le terme de pression.

Mycélium : est l'appareil végétatif des champignons ou de certaines bactéries filamenteuses comme les Actinomycètes. Il est composé d'un ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, que l'on trouve dans le sol ou le substrat de culture. Il est formé de cellules très allongées et cloisonnées.

Sommaire.

Remerciement.

Dédicace.

Liste des abréviations ;

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Sommaire.

Introduction.....	1
Chapitre I : Généralité sur les moisissures du blé.....	3
I.1 : Les moisissures.....	3
I.2 : La mycoflore du blé.....	3
I.2.1 : Flore des champs.....	3
a) Le genre <i>Alternaria</i>	4
b) Le genre <i>Fusarium</i>	4
I.2.2 : Flore intermédiaire.....	4
I.2.3 : Flore de stockage.....	4
a) Le genre <i>Aspergillus</i>	4
b) Le genre <i>Penicillium</i>	5
Chapitre II : Les mycotoxines.....	6
II.1 : La nature et l'origine des mycotoxines.....	6
II.2 : Conditions des toxicogénèse.....	6
II.2.1 : Facteurs intrinsèques.....	7
II.2.2 : Facteurs extrinsèques.....	7
II.3 : Les voies de pénétration chez l'homme et l'animal.....	8
II.4 : Biotransformation et mode d'action des mycotoxines.....	9
II.5 : Les maladies provoqués par les mycotoxines.....	10
II.6 : Réglementation de l'étude des mycotoxines.....	11
Chapitre III : Les principaux mycotoxines.....	13
III.1 : Les fusariotoxines.....	13
III.1.1 : Trichothécènes.....	13
III.1.1.1 : Les propriétés physico-chimiques de la trichothécène.....	13
III.1.1.2 : Toxicologie.....	14
III.1.2 : Zéaralénone.....	14

III.1.2.1 : Les propriétés physico-chimiques de la zéaralénone.....	14
III.1.2.2 : toxicologie	15
III.1.3 : Les fumonisines	15
III.1.3.1 : Les propriétés physico-chimiques de la fumonisines	15
III.1.3.2 : toxicologie	16
Chapitre IV : Matriels et Méthodes	17
IV.1. Etude mycologique des grains de blé.....	17
IV.1.1. Echantillonnage	17
IV.1.2. Isolement de la flore fongique.....	17
IV.1.3. Purification des isolats.....	19
IV.1.3.1. Etude des caractères culturaux.....	19
IV.1.4. Identification microscopique.....	19
IV.1.4.1. Méthode de Ruban adhésif.....	19
IV.1.4.2. Méthode de lactophénol bleu de coton.....	19
IV.1.5. Etude mycotoxicologique.....	20
IV.1.5.1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat.....	20
IV.1.5.2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation.....	24
IV.1.5.2.1 Préparation du milieu de fermentation.....	24
IV.1.5.2.2. Ensemencement du milieu de fermentation.....	24
IV.1.5.2.3. Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation.....	24
IV.1.5.3 Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	26
Chapitre V : les résultats.....	27
V.1. Etude mycologique des grains de blé dur.....	27
V.1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de Blé.....	27
V.1.2. Identification des souches fongiques isolée.....	27
V.1.2.1. Identification macroscopique.....	27
V.1.2.2. Identification microscopique.....	29
V.2. Etude mycotoxicologique.....	31
V.2.1. Révélation des mycotoxines au niveau des échantillons de blé.....	31
V.2.2 Analyse des mycotoxines au niveau des souches par CCM.....	33

Discussion	35
Conclusion et perspectives	38

Introduction

Les problèmes de sécurité alimentaire sont essentiellement associés à la présence de contaminants issus des activités humaines, tels que les pesticides, qui permet de favoriser la production de mycotoxines dans les céréales.

Les mycotoxines sont des substances toxiques produites par les moisissures. L'aflatoxine, une des mycotoxines les plus connues et les plus toxiques, est entre dans l'alimentation. Les moisissures des familles *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* sont les principaux producteurs de mycotoxines dans les denrées alimentaires. (**Thevenot et al.**, 2016)

Ces substances peuvent être toxiques et provoquer des maladies. Elles représentent ainsi un risque pour la santé humaine. Les syndromes qui peuvent survenir sont notamment le retard de croissance, la perte d'appétit, l'intoxication ou la maladie. (**Thevenot et al.**, 2016)

Une première condition pour limiter autant que possible la présence des mycotoxines dans l'alimentation est de prévenir le développement des moisissures à tout moment de la production et de la transformation. Le stockage de la récolte représente également un moment critique; la température et le taux d'humidité doivent être contrôlés en permanence. Les mycotoxines sont des composés très stables qui résistent à la plupart des procédés de préparation et de transformation. Cela signifie que les mycotoxines peuvent encore être présentes alors mêmes que la moisissure qui les a produites ne peut plus être décelée.

L'objectif de ce travail porte sur l'étude mycologique et mycotoxicologique des grains de blé dur non traités. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie (Université Mohamed el Bachir el Ibrahimi BBA).

Ce travail est divisé en trois parties, la première partie est consacrée à une analyse bibliographique sur les moisissures et les mycotoxines produites.

La deuxième partie est consacrée aux matériels et méthodes utilisés dans cette étude. La démarche globale consiste à isoler et dénommer les moisissures contaminant le blé. Le dosage par CCM des *Fusarium* dans le blé a également été réalisé.

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

Chapitre I : généralité sur les moisissures de blé

I.1 Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ces sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (**Nicklin *et al.*, 2000**). Ces microorganismes microscopiques produisent une grande variété des métabolites secondaires, certaines d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines. À côté de ces intérêts bénéfiques, les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Leur développement indésirable sur les aliments peut entraîner de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaire, altération des qualités organoleptiques, réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés, Cependant l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines. (**Pitt *et al.*, 2000**)

I.2 La mycoflore du blé

Plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses ont été trouvées sur les grains des céréales comme contaminants extérieures. Les graines sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre (A_w), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (**Jouany *et al.*, 2002**). Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25%), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (**Molinie *et al.*, 2005**).

Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes, connus sous le nom de moisissures de champ, de stockage et la flore intermédiaire (**Magan *et al.*, 1988**).

I.2.1. Flore des champs

Les grains de blé sont contaminés par les microorganismes dans le champ, et cette microflore est dominée par des moisissures (**Deak, 2008**). Les spores des champignons de

Chapitre I : généralité sur les moisissures de blé

champ envahissent les grains et croissent dans le champ ou attendent le battage (**Dendy et al.**, 2000).

En fonction des conditions précises, ces champignons peuvent mourir lentement au cours du stockage ou peuvent survivre pendant de longues périodes. La survie est plus longue à basse température et à faibles niveaux d'humidité (**Roberts**, 2005). Les genres les plus rencontrés sont :

a) Le genre *Alternaria*

Il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides (**Dendy et al.**, 2000). Les espèces les plus fréquentes sont : *A. alternata* est connue par la production des mycotoxines ; *A. tenuissima* est capable de produire des toxines tel que l'acide ténuazonique (**Andersen et al.**, 2002).

b) Le genre *Fusarium*

Les espèces rencontrées sont surtout : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* (**Van der Burgt et al.**, 2009). Les *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines.

I.2.2. Flore intermédiaire

C'est une catégorie à comportement plus diversifié et regroupe des germes de développement limité, au début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Les genres les plus rencontrés sont : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (**Godon et al.**, 1997).

I.2.3. Flore de stockage

Les facteurs environnementaux peuvent exercer une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques espèces mycotoxigéniques (**Magan et al.**, 2003). Les moisissures de blé stocké sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés (**Mathew et al.**, 2011). Les principaux genre rencontrés sont :

a) Le genre *Aspergillus*

Chaque espèce de moisissures de stockage a ces conditions de développement (**Christensen *et al.*, 1969**). Dans le blé stocké, les moisissures du genre *Asp* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (**Feillet , 2000**). Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans le grain de blé stocké sont surtout : *A. flavus*, *A. niger* et *A. fumigatus* (**Mathew *et al.*, 2011**).

b) Le genre *Penicillium*

Les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (**Neergaard, 1977 ; Boudreau *et al.*, 1992**). Les espèces les plus communes sont essentiellement : *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. hordei*, *P. freii*, *P. melanoconidium*, *P. polonicum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. crustosum* (**Dijksterhuis *et al.*, 2007**).

Chapitre II : les mycotoxines

II.1 La nature et l'origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, toxiques, de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons), excrétées par certaines moisissures qui se développent sur divers produits agricoles sous des conditions environnementales particulières (**Krska**, 2009). A ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (**Pamel et al.**, 2010). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (**Ruppel et al.**, 2004). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, stérigmatocystine), d'autres des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique) et les derniers sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, fusarénone, (figure 1) ;(**Leclerc et al.**, 2005).

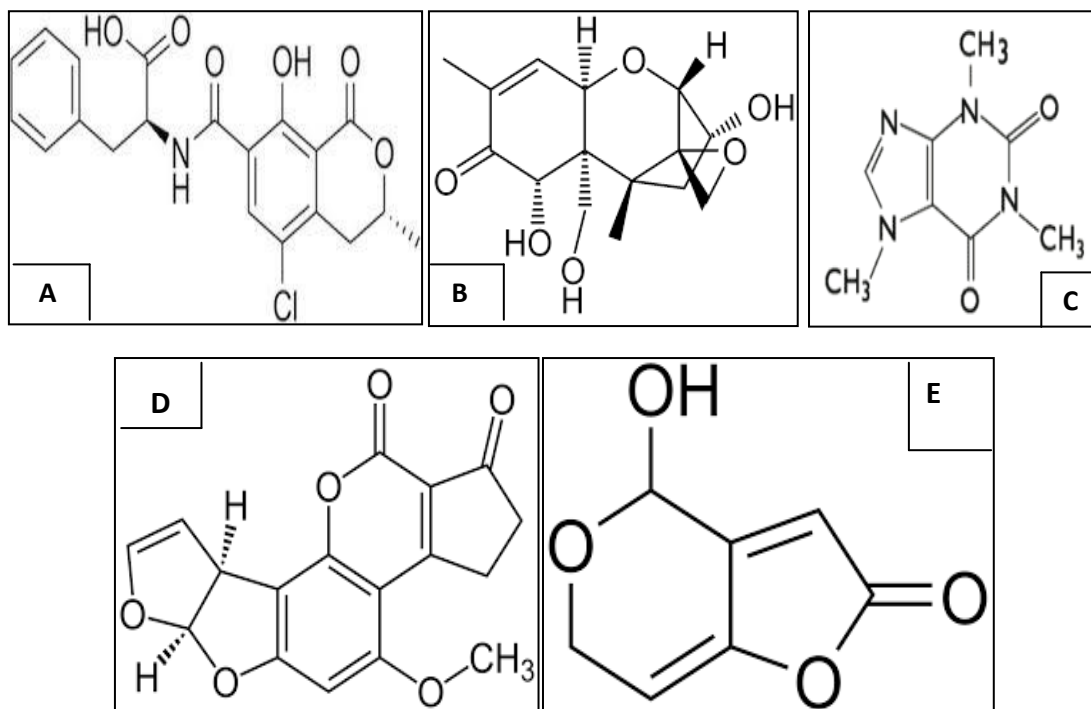


Figure 1 : Quelques structure des principaux mycotoxines (**Azzoune**, 2011)

A : ochratoxine ; **B** :désoxynivalénol ; **C** : alcaloïde ; **D** :aflatoxine ; **E** : patuline

II.2 Conditions des toxinogénèse

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (**Pfohl- Leszkowicz**, 1999). La sécrétion des métabolites

Chapitre II : les mycotoxines

toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (lié à la souche fongique) ; extrinsèques (conditions de l'environnement).

II.2.1 Facteurs intrinsèques

Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques (Tableau I). Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines. De plus, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Le Bars *et al.*, 1987).

Tableau I : Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines dans la chaîne alimentaire (Atoui, 2006).

Facteurs	Physiques	chimiques	biologiques
	<ul style="list-style-type: none">-Humidité-Rapidité de séchage-Ré-humidification-Humidité relative- Température- Damage mécanique- Mélange de grains- Temps	<ul style="list-style-type: none">- CO₂- O₂-Nature du substrat-Nutrition minérale-Traitement chimique	<ul style="list-style-type: none">- Stress de plante- Vecteurs invertébrés- Infection fongique- Différences entre les variétés des plantes- Différences entre les souches fongiques- Charge en spores- Système microbiologique

II.2.2 Facteurs extrinsèques

La production de mycotoxines par les moisissures est fortement dépendante des conditions climatiques, notamment de la température et de l'humidité, mais aussi des nutriments présents. En effet, diverses conditions doivent être réunies pour entraîner la production des mycotoxines le climat, la nature du substrat, les pratiques agronomiques, le conditionnement des produits, l'utilisation de produits fongicides, les facteurs environnementaux. (Tableau I),(Heit ,2015).

II. 3 Les voies de pénétration chez l'homme et l'animal

Trois voies d'absorption sont: l'inhalation, l'ingestion d'aliments contaminés ou, plus rarement, le contact en cas de plaie. Dans le milieu professionnel, la voie aéroportée est la principale et la seule cause de contamination. Des publications incriminent les mycotoxines comme facteurs déclenchant ou aggravants d'alvéolites allergiques, des cancers broncho-pulmonaires, hépatiques et rénaux...etc. L'activité physiopathologique des mycotoxines dépend de facteurs multiples, susceptibles de modifier ou de potentialiser leurs effets comme la nature chimique et la concentration en mycotoxines, la durée d'exposition, la sensibilité individuelle ou d'espèce. Lors de l'absorption de particules organiques et de poussières contaminées par des mycotoxines, ces dernières sont alors solubles dans l'eau pulmonaire des alvéoles et passent dans la circulation. Ce type de contamination n'est cependant pas contagieux. Pour les agriculteurs, le risque de contamination par inhalation dans leur milieu de travail prédomine, notamment lorsque les toxines sont présentes dans la poussière de céréales (Heit 2015). Les mycotoxines subissent quelques étapes de métabolisation et d'excrétion différentes, selon leurs caractéristiques physico-chimiques, avant d'être excrétés par les voies urinaires ou/et fécales (Figure2).

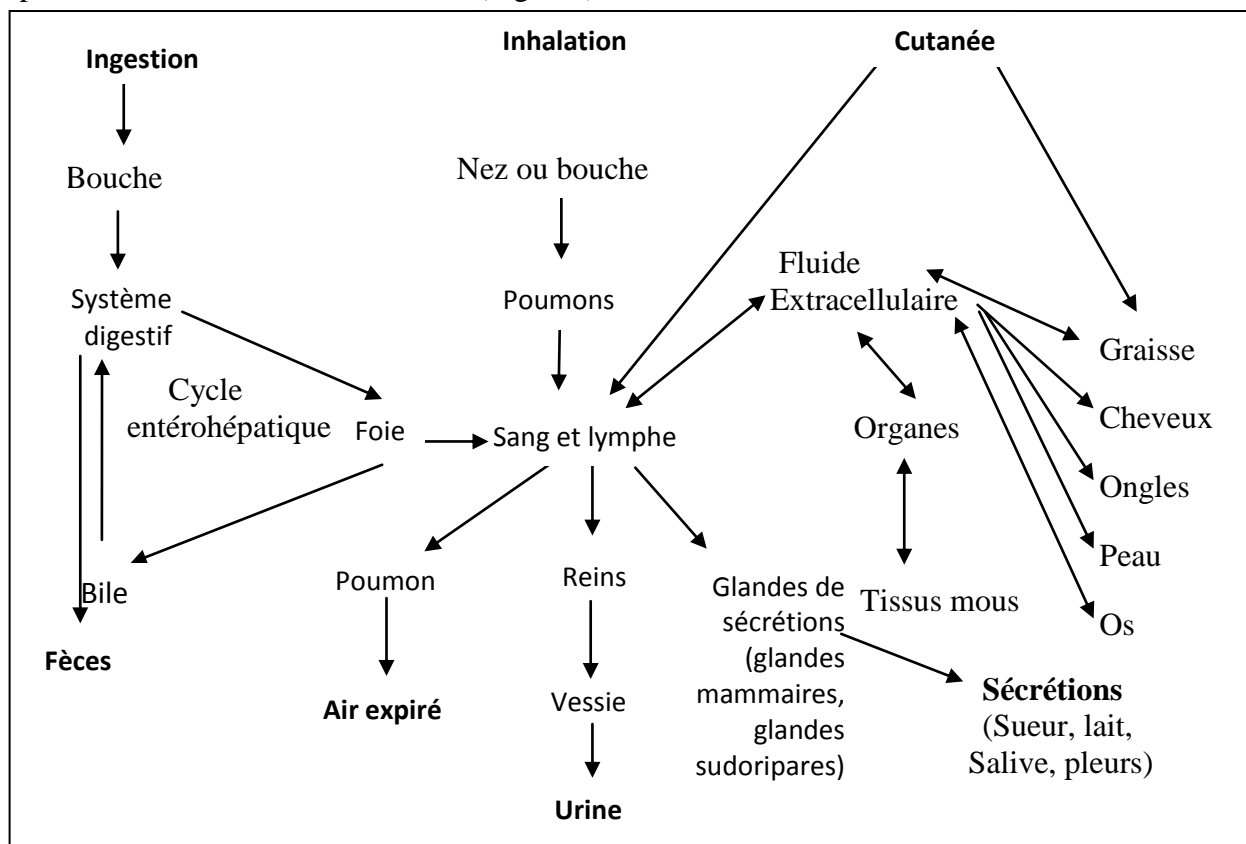


Figure2: Principales voies d'absorption, de distribution, métabolisme et d'excrétion des mycotoxines (Jard 2009).

II.4. Biotransformation et mode d'action des mycotoxines

Comme toutes substances xénobiotiques, les mycotoxines subissent des biotransformations dans les organismes animaux ou humains (Tableau II). Ces bioconversions siègent essentiellement dans le foie et au niveau du tractus gastro-intestinal; elles sont la conséquence de l'action des enzymes tissulaires ou de la microflore. Les métabolites formés correspondent le plus souvent à des produits d'oxydation d'origine hépatique, tels que les hydroxy aflatoxines (aflatoxines M1, P1, Q1) ou les hydroxy-ochratoxines. Les estérases participent à la formation de nombreux dérivés d'hydrolyse des trichothécènes ou de la fumonisine B1. Dans le cas de la zéaralénone, les dérivés essentiels sont les zéaralénols formés par les hydroxystéroïdes déshydrogénases hépatiques. Les transférases hépatiques et intestinales sont impliquées dans la conjugaison des métabolites ; elles sont généralement considérées comme des enzymes de détoxification en participant à l'élimination des toxines sous forme de composés hydrosolubles : glucurono-conjugués des trichothécènes désacétylés ou des hydroxyaflatoxines, conjugués au glutathion des époxydes réactifs (aflatoxines, acide pénicillique). Cet aperçu permet de situer l'importance des biotransformations qui vont, en fait, orienter le statut des résidus de toxines ou de métabolites toxiques pouvant être retrouvés, après consommation par l'animal d'élevage, dans les tissus (abats, muscles) ou les produits d'excrétion (lait, œufs) consommables par l'homme. Les trichothécènes ne semblent pas poser de problème en termes de résidus tissulaires, la zéaralénone pourrait s'avérer préoccupante chez le porc ou la volaille susceptible de présenter des concentrations hépatiques élevées en toxine parentale ou en a-zéaralénol. Concernant la fumonisine B1, la plupart des études toxicocinétiques démontrent une absorption gastro-intestinale limitée de cette molécule et un faible transfert vers les compartiments internes.

Les mycotoxines sont regroupées en fonction de leur origine biosynthétique en trois catégories principales, à savoir les terpènes, les polycétides et les peptides cycliques non ribosomiques. En outre, une quatrième catégorie regroupant les peptides hybrides NRPS/PKS (non-ribosomal peptides synthétase/ polycétide synthétase) qui contiennent à la fois des unités peptidiques et polycétides, a été identifiée (**Tannous, 2015**)

Chapitre II : les mycotoxines

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

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

II.5 Les maladies provoquées par les mycotoxines

La FAO rapporte qu'environ un quart des récoltes de la planète sont susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines. Leurs propriétés toxiques bien établies aujourd'hui, sont carcinogènes, tératogènes, trémorigènes, diabétogènes, hépatotoxiques, néphrotoxiques, hémato-toxiques, mutagènes, immunotoxiques, allergiques, neurotoxiques, immunosurpresseurs, nécrosants, etc (Tableau III)(**Tabibel et al.**, 2016).

Tableau III.- Effets probables des principales mycotoxines sur l'homme (**Tebibel et al.**, 2016).

Chapitre II : les mycotoxines

Aflatoxine B1	Cancérogène: cancer du foie (hépatocarcinome) et des voies biliaires, cancer broncho-pulmonaire et bronchonique. Mutagène: anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN.
Ochratoxine A (OTA)	Cancérogène: cancer du rein. Mutagène: anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN Immunosuppresseur Néphrotoxique: Néphropathie endémique, néphropathie interstitielle chronique
Patuline	Immunosuppresseur: diminution du nombre de lymphocytes du sang (lymphopénie) si intoxication chronique. Neurotoxique: troubles nerveux (action anti acétylcholinestérase).
Fumonisines	Cancérogène: association avec des cancers de l'œsophage.
Trichotécènes	Mutagène: anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN (toxine T2). Immunodépresseur: altération de la phagocytose, inhibition de la synthèse protéique (Toxine T2 et désoxynivalénole). Respiratoire: pneumopathie interstitielle.
Zéaralénone	Ostrogénique: puberté précoce et gynécomastie.

II.6 Réglementation de l'étude des mycotoxines

Depuis plusieurs années la prise de conscience du risque sanitaire associé à la présence de mycotoxines dans les aliments se généralise. De plus en plus les mycotoxines sont systématiquement recherchées et font l'objet d'une norme. Habituellement, la réglementation fixe pour les principales mycotoxines, les concentrations maximales admises en alimentation humaine et animales (Tableau IV). En général, les maximums admissibles sont très différents d'un pays à l'autre (Tebibel *et al.*, 2016).

Tableau IV : Les principale mycotoxines et leurs valeurs toxicologiques de référence (Tannous, 2015).

Chapitre II : les mycotoxines

Mycotoxines	Dose journalière tolérable par Kg de poids corporel SCF/JECFA
Ochratoxine A	0,005/0,0143µg/kg/jour
Fumonisines	2 µg/kg/jour
Trichothécènes(DON)	1 µg/kg/jour
Zéaralénone	0,2/0,5µg/kg/jour
Patuline	0,4 µg/kg/jour

En Algérie, l'arrêté correspondant au 11 octobre 2006 rendant obligatoire la méthode de dosage de l'aflatoxine B1 et la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les céréales et produits alimentaires. En fixent les LMR (limite maximale de résidus) dans les produits d'alimentation humaine est de 10µg/Kg pour l'aflatoxine B1 et de 20 µg/Kg pour la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (**Chetatha**, 2013).

III.1. Les fusariotoxines

Les mycotoxines produites par les moisissures du genre *Fusarium* sont nombreuses et variées et elles sont regroupées sous le terme de fusariotoxines. Les formes et familles identifiées aujourd'hui sont les trichothécènes, les fumonisines, la zéaralénone, la moniliformine, la beauvericine et l'équisétine. Elles contaminent majoritairement les céréales et par voie de conséquence, les produits en dérivant (**Heit**, 2015).

III.1.1 Trichothécènes

Les trichothécènes sont des mycotoxines très répandues dans le monde. L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme s'effectue soit par les denrées brutes (céréales, farines...), soit par des produits élaborés (céréales de petits déjeuners, gâteaux...), mais aussi éventuellement par des produits d'origine animale, si ce dernier a consommé une nourriture contaminée (**Balzer, et al.**, 2004).

III.1.1.1 Propriétés physico-chimiques de trichothécènes

Les trichothécènes sont des molécules non volatiles (Figure 3). Elles sont insolubles dans l'eau mais hautement solubles dans l'acétone, l'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol... Ces molécules sont stables à la lumière, aux UV, à l'air, ainsi qu'à des pH neutres et acides, ce qui implique l'absence d'hydrolyse dans l'estomac après ingestion. Ces mycotoxines ne sont pas détruites par autoclavage, mais elles requièrent un chauffage à 480°C pendant 10 min ou 260°C pendant 30 min pour obtenir une inactivation complète. L'utilisation de solutions d'hypochlorite de sodium (3 à 5%) est également efficace pour les inactiver (**Heit** 2015).

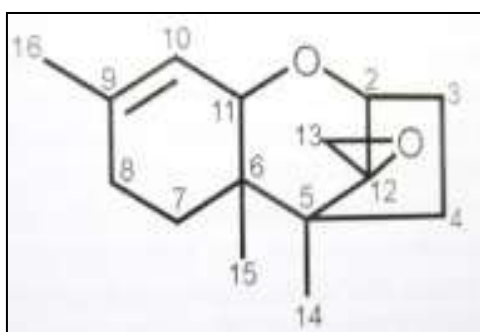


Figure 3 : Structure générale des trichothécènes (**Heit**, 2015).

III.1.1.2 Toxicologie

La toxicité des trichothécènes est due principalement à la fonction époxyde en 12-13. La réduction de cette fonction diminue considérablement la toxicité des molécules. Le nombre et la position des groupes hydroxyles ou des estérifications peuvent également affecter la toxicité des molécules. En effet, cela peut déterminer si la toxine inhibe la synthèse protéique à l'étape d'initiation ou lors de l'étape d'élongation-terminaison (Heit, 2015).

III.1.2 Zéaralénone

La zéaralénone est produite par des Fusaria, peuvent se retrouver dans les céréales notamment lorsque celles ci ont été stockées dans de mauvaises conditions à des températures relativement basses et exposées à l'humidité (Tozlovanu,2008). La zéaralénone est produite principalement par *F. graminearum*, mais aussi *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* et *F. crookwellense* (Heit, 2015).

La zéaralénone et ses dérivés sont considérés comme des myco-œstrogènes non-stéroïdiens de par leur ressemblance avec des œstrogènes, tels que le 17-β-œstradiol. Son action toxique a lieu par fixation aux récepteurs à œstrogènes (Heit, 2015).

III.1.2.1 Propriétés physico-chimiques de la zéaralénone

À température ambiante, la zéaralénone se présente sous forme de cristaux blancs. Elle est également insoluble dans le sulfure et le tétrachlorure de carbone. Elle est faiblement soluble dans les solvants apolaires (Figure 4) tels que l'hexane, l'heptane ou l'éther de pétrole de par ses substituants alcool et cétone. La solubilité de cette mycotoxine augmente avec la polarité des solvants : benzène, chloroforme, acétate d'éthyle, acétonitrile, acétone...la zéaralénone est thermostable. Elle est également fluorescente et apparaît de couleur bleu-vert après une excitation à 360 nm et d'un vert plus intense à 260 nm (Heit, 2015).

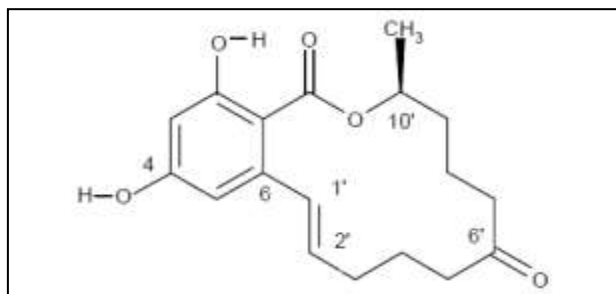


Figure 4 : Structure chimique de la zéaralénone (Heit, 2015)

III.1.2.2 Toxicologie

La zéaralénone induit des cancers hépatiques et de la glande pituitaire, mais à des doses nettement supérieures aux doses engendrant un effet hormonal. Pour cette raison, elle n'est pas considérée comme étant elle-même cancérigène. Les effets seraient dus à l'effet hormonal. Néanmoins, la zéaralénone est génotoxique et forme des adduits à l'ADN (Tozlovanu, 2008).

III.1.3 les Fumonisines

Elle est principalement produite par *Fusarium verticillioides* (Tozlovanu, 2008). Les fumonisines ont une structure proche de celle de la sphingosine, composant cellulaire constituant le squelette carboné des sphingolipides (figure 5). Ainsi, ces molécules sont des diesters répartis en 4 groupes (A, B, C et P). Contrairement à la plupart des mycotoxines, elles n'ont pas de structure cyclique, mais elles sont constituées d'une chaîne aminopolyhydroxyalkyle de 19 ou 20 carbones diestérifiée. Les fumonisines du groupe B, majoritaires, sont caractérisées par un groupement amine en position C2, et sont des diesters d'acide-1, 2,3-propane tricarboxylique et de longues chaînes polyhydroxyamines. Ce groupe B se compose de 4 fumonisines : FB1 à 4, qui se distinguent par la position des groupements hydroxyle (Figure 5) (Heit, 2015).

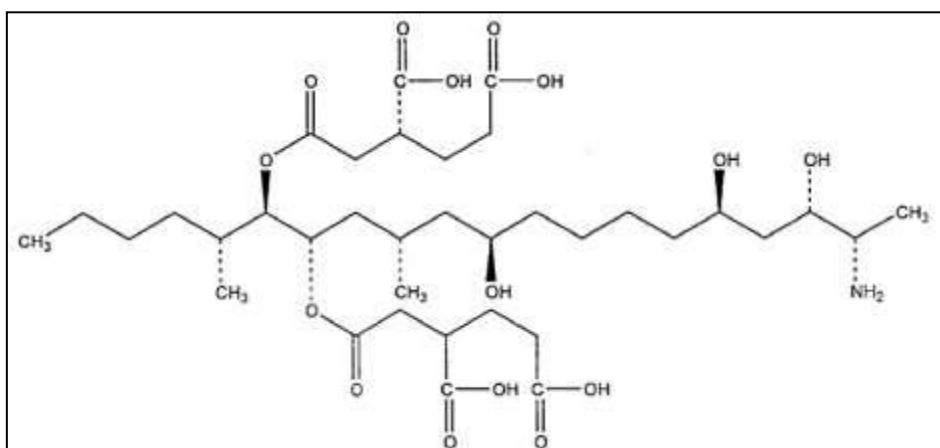


Figure 5: Structure de la fumonisine FB1 (Heit, 2015).

III.1.3.1 Les propriétés physico-chimiques de la fumonisines

De par la présence de 4 fonctions acides carboxyliques, les fumonisines sont des molécules hydrophiles, ce qui les rend donc difficiles à étudier. Ces composés sont polaires et ils sont solubles dans l'eau et les solutions aqueuses de méthanol et d'acétonitrile, dans

Chapitre III : les principaux mycotoxines

lesquelles ils sont généralement extraits. Elles sont en revanche insolubles dans les solvants apolaires. Par ailleurs, c'est en raison de la faible solubilité lipidique de ces mycotoxines.

Ces mycotoxines sont également thermostables. Cependant, elles peuvent être dégradées à plus de 90% après chauffage à 175°C pendant 60 min. Elles sont aussi relativement stables lorsqu'elles sont chauffées à pH neutre. Les fumonisines comportant des longues chaînes aliphatiques polyhydroxylées, elles ne possèdent pas propriétés d'absorption de la lumière UV (Ultra Violet) et elles ne sont pas fluorescentes. Une dérivatisation est alors nécessaire pour une détection optique par CLHP (chromatographie liquide à haute performance) (Heit, 2015).

III.1.3.2 Toxicologie

Les fumonisines ont une action toxicologique différente selon leur type. La FB1 présente la plus forte toxicité de cette classe de mycotoxines. Elle provoque une carcinogénicité et elle est hépatotoxique et néphrotoxique. De par sa forte toxicité, elle est classée dans la catégorie 2B (probablement cancérigène) par l'IARC (Agence International pour la Recherche contre le Cancer) depuis février 2002 Seule la FB1 est classée dans ce groupe. (Heit, 2015).

IV.1 Etude mycologique des grains de blé

IV.1.1 Echantillonnage

Les analyses effectuées ont porté sur les grains de blé non traités de deux échantillons qui nous ont été fournis par CCLS (Coopération des Céréales et des Légumes Secs) de la Wilaya de Bordj Bou Arreridj. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier stériles où ils sont soumis à des analyses microbiologiques et mycotoxicologiques.

IV.1.2 Isolement de la flore fongique

Les grains de chaque échantillon de blé ont été désinfectés en surface dans l'eau de javel (5°) puis dans l'éthanol, pendant une minute. Après deux rinçages à l'eau distillée stérile, les grains ont été séchés avec du papier filtre stérile pour être, ensuite, ensemencés (**Ghiasian *et al.*, 2004**). Sous des conditions aseptiques, les grains désinfectés ont été placés directement, à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Figure 6) à raison de dix grains par boîte. L'ensemble est incubé à 25 °C pendant 4 à 6 jours (**Ghiasian *et al.*, 2004**).

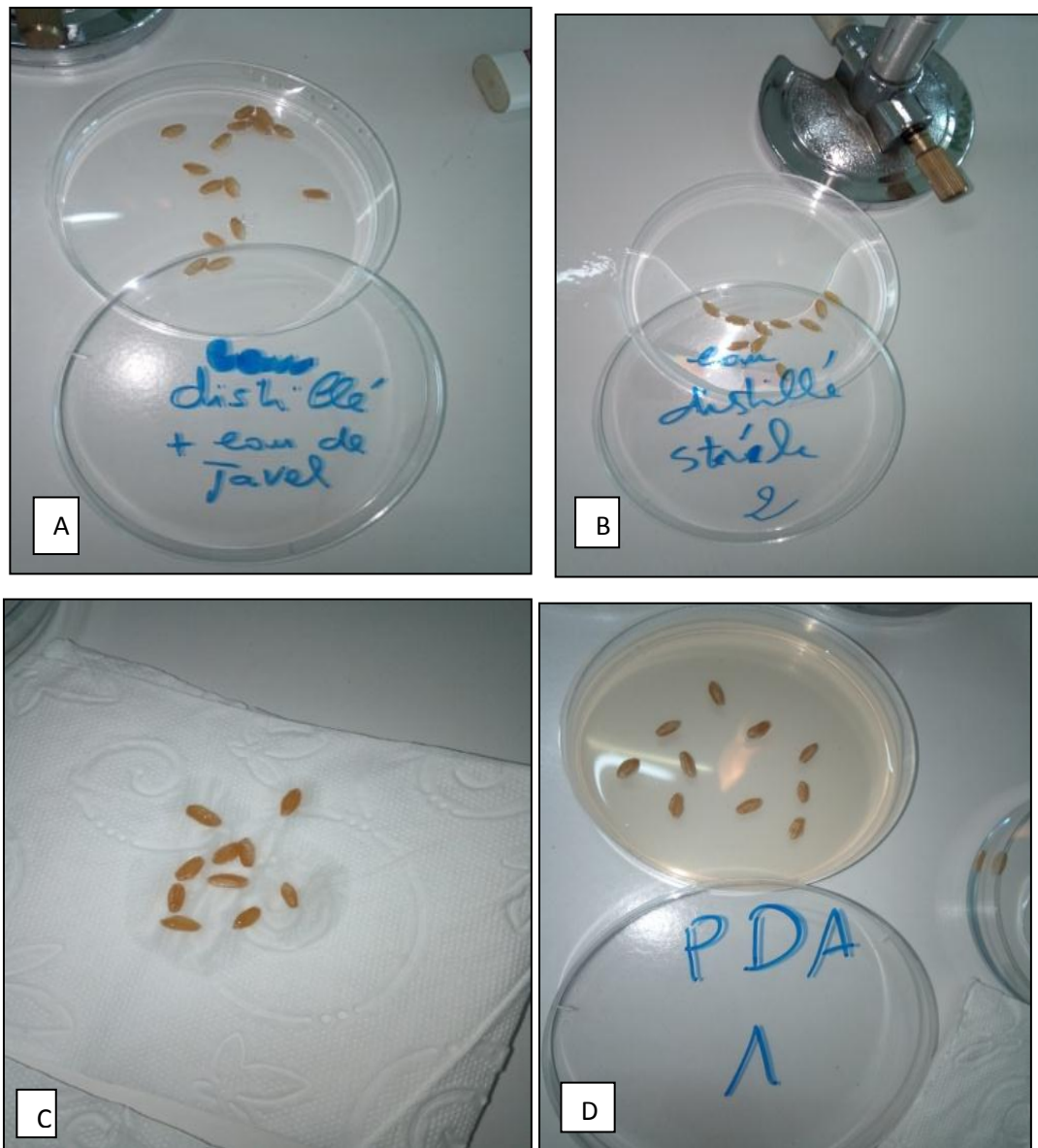


Figure 6 : Isolement des moisissures sur le milieu PDA. A) désinfection superficiel ,
B) rinçage, C) séchage, D) ensemencement.

IV.1.3 Purification des isolats

Des observations quotidiennes ont été effectuées dès la germination des grains jusqu'à l'apparition de mycélium. Chaque mycélium développé a été repiqué, à l'aide d'un fil de platine stérile, au centre de boîte de Pétri contenant un milieu PDA, puis incubé à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 6 jours. L'identification des champignons contaminant les grains de blé repose sur :

IV.1.3.1 Etude des caractères macroscopiques

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques a porté sur tous les groupes de moisissures isolées. Les caractères étudiés sont basés sur le:

- mycélium : la couleur et la texture du thalle, la couleur du revers de la colonie et la vitesse de croissance apicale

IV.1.4 Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les méthodes les plus utilisées sont celles du ruban adhésif, méthode de lactophénol.

IV.1.4.1. Méthode de Ruban adhésif

Un petit morceau du ruban adhésif est appliqué par la face collante sur la colonie puis déposé sur une lame porte-objet. Puis observation au microscope à immersion à l'objectif ($\times 100$).

IV.1.4.2. Méthode de lactophénol bleu de coton

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant ensuite recouvrir avec une lamelle couvre-objet qui fait écrasée la préparation.

IV.1.5. Etude mycotoxique

IV.1.5.1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat

25 g de l'échantillon de blé dur finement broyé ont été additionnés à 100 ml d'un mélange de solvants (chloroforme – méthanol V/V). Le mélange a été agité pendant 10 min et la phase liquide a été séparée du culot par filtration. Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant au liquide récupéré à chaque fois après filtration.

Le filtrat a été ensuite concentré jusqu'à un volume de 2 à 3 ml par évaporation au rotavapeur. L'extrait obtenu a été étalé sur un gel d'agar à 2 % et à pH 7 coulé préalablement sur boîtes de pétri puis solidifié. Les boîtes ont été laissées entrouvertes afin de permettre l'évaporation du solvant d'extraction, puis elles ont été gardées à 4°C pendant 24 heures (Figure 7). Après la diffusion des mycotoxines à l'intérieur de la gélose, la surface a été essuyée à plusieurs reprises avec du papier filtre imbibé d'hexane pour éliminer les macromolécules de la matière organique.

Le gel d'Agar a été ensuite découpé en petits carreaux et mélangé avec 100 ml de chloroforme. Le tout a été agité pendant 10 minutes puis filtré (Figure 8). Le liquide obtenu a été ensuite additionné à 50 et 30 ml de chloroforme et agité à chaque fois qu'il est récupéré après filtration. Les filtrats obtenus ont été également mélangés puis concentrés à l'aide d'un rotavapeur jusqu'à un volume de 2 à 3 ml (Figure 8).

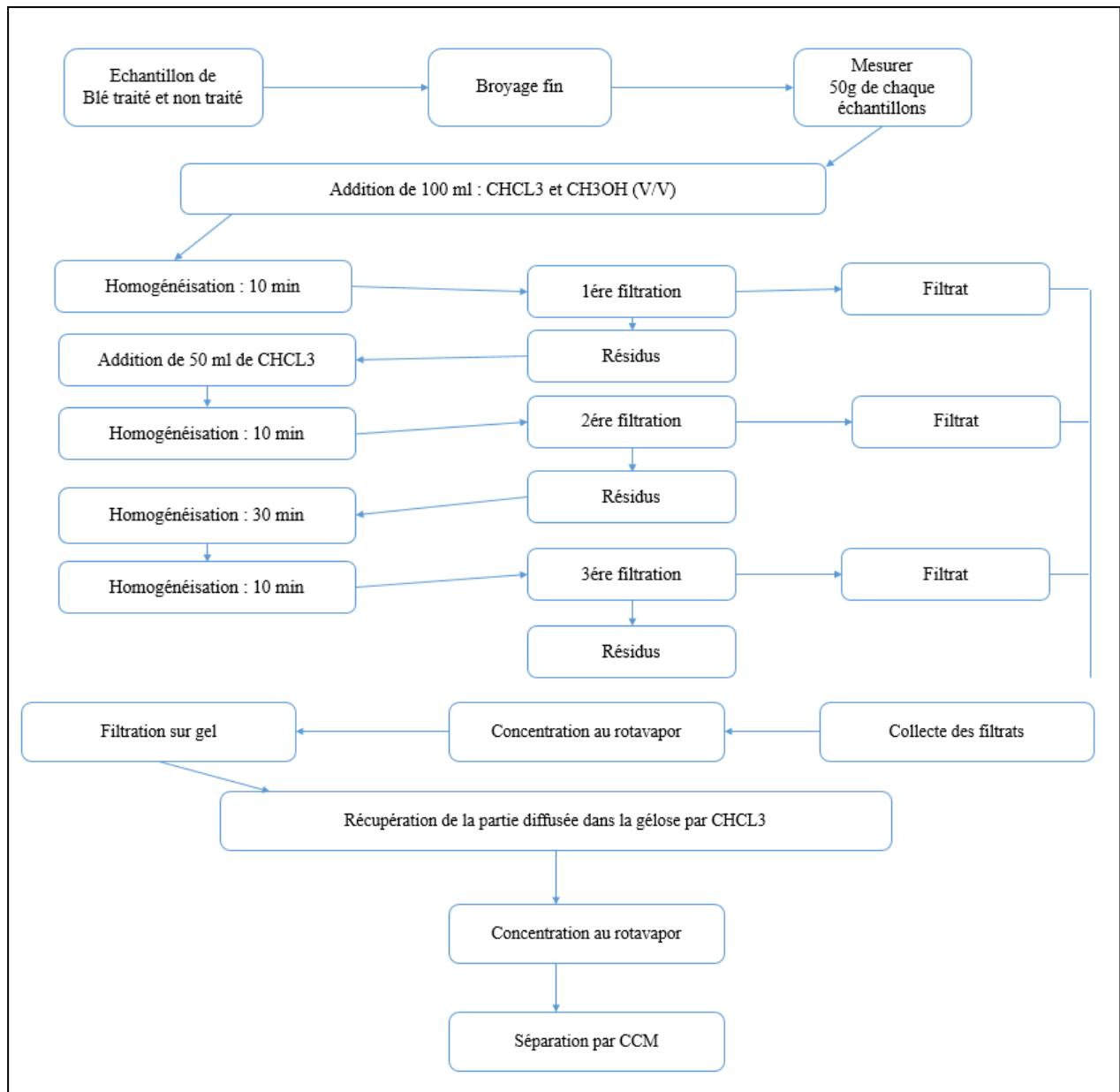


Figure 7 : Les étapes d'extraction des mycotoxines à partir les substrats de blé dur.

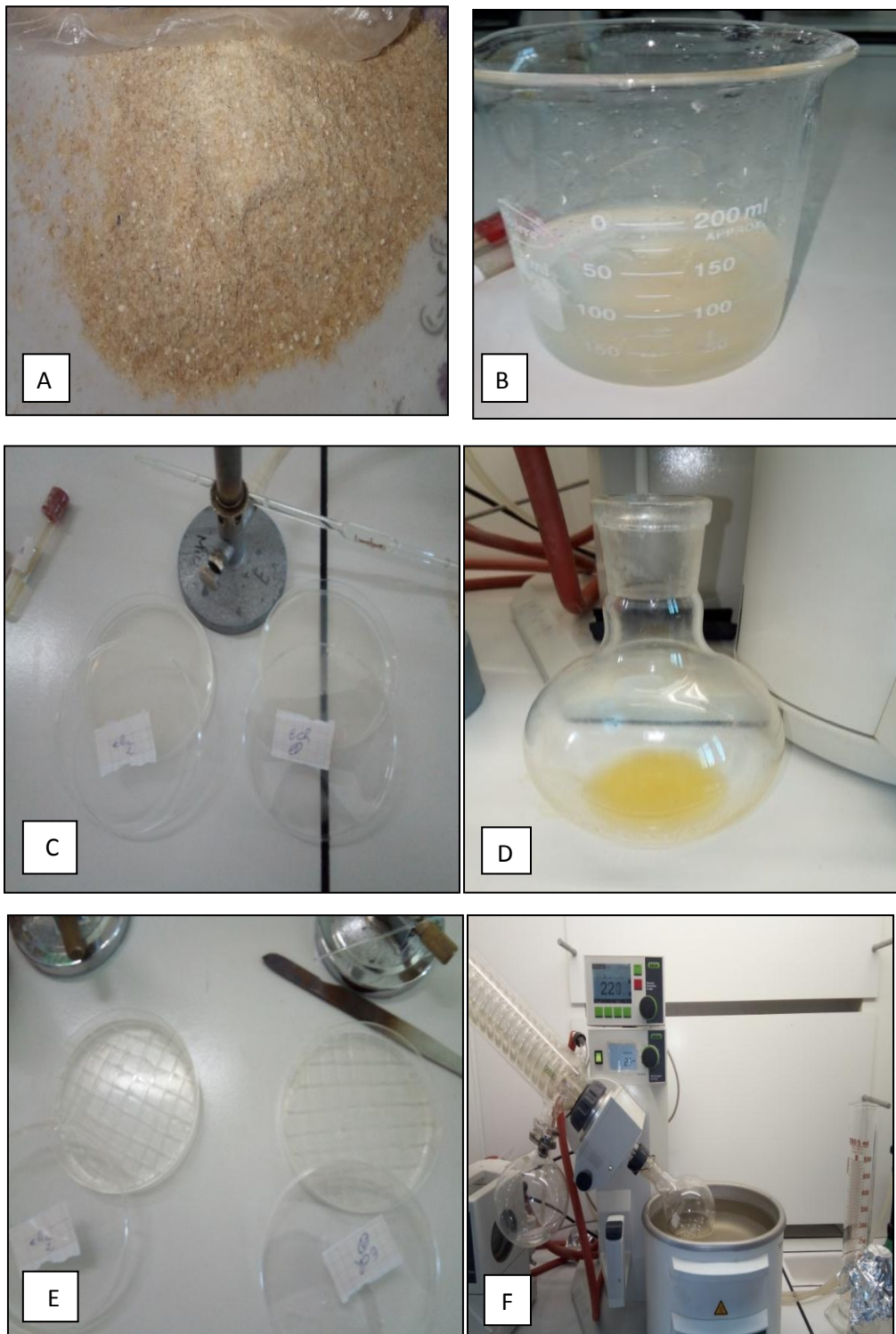


Figure 8 : Extraction des mycotoxines A) broyage de blé, B) le solvant+le blé
C) concentration de l'extrait, D) étalement de l'extrait, E) découpage de milieu F, F)
évaporation de l'extrait.

IV.1.5.2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation

La production des métabolites secondaires (mycotoxines) par les souches isolées (*Fusarium*) a été mise en évidence par une extraction et purification à partir d'une culture de fermentation, suivie par la détection qualitative de ces mycotoxine par chromatographie sur couche mince (CCM).

IV.1.5.2.1 Préparation du milieu de fermentation

Le milieu (CYA) additionné de 2.5% extrait de levure a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des mycotoxines. La fermentation a été réalisée dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture et le pH a été ajusté à 5,5.

IV.1.5.2.2. Ensemencement du milieu de fermentation

Les souches sélectionnées (détectées dans l'échantillon) ont été ensemencées en surface dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 30 ml de PDA gélosé. Après 10 jours d'incubation à 25°C, les souches étudiées sporulent et leurs spores ont été récupérées par l'ajout de 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique. Les suspensions sporale obtenues ont été diluées avec de l'eau distillée stérile. Chaque flacon contenant le milieu de culture a été inoculé par 1 ml de la suspension sporale. Les flacons ont été incubés en statique à 28°C, pendant 14 jours et à l'obscurité (Figure 9).



Figure 9 : incubation des flacons dans un agitateur pendant 14 jours

IV.1.5.2.3. Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu CYA à travers du papier filtre. Les 50 ml du filtrat obtenu ont été additionnés à 100 ml de chloroforme, le mélange a été rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en

Chapitre IV : Matériels et méthodes

utilisant une ampoule à décantation Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation. La phase chloroformique a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 45 °C (Figure10).

Après le séchage, l'extrait a été remis en suspension dans 500 μ l de méthanol et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieures par CCM.

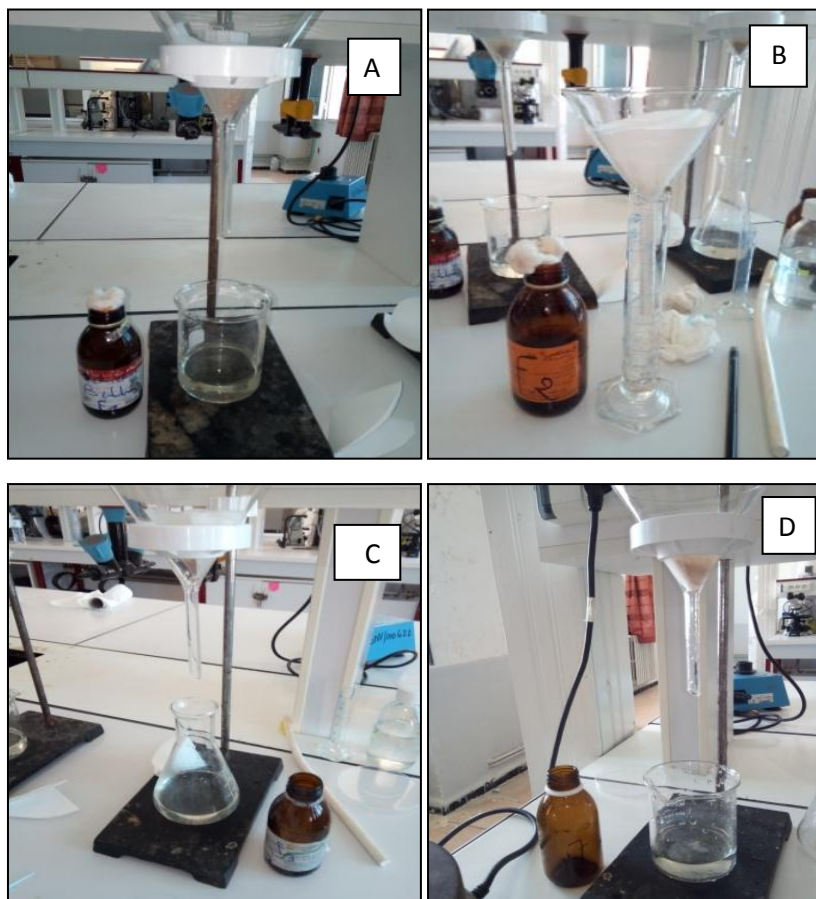


Figure 10 : filtration des champignons, A : champignon F1 ; B : champignon F2 ; C : champignon F3 ; D : champignon F4

IV.1.5.3 Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines de *Fusarium* et leur identification avec une bonne précision. Elle a été faite sur une plaque de gel de silice sur laquelle est déposé un spot de 20 μ l de chaque extrait concentré. L'utilisation de deux solvants d'éluion pour le développement de CCM. Le 1^{er} solvant est constitué par le chloroforme et le méthanol (90/10) volume par volume et le 2^{ème} solvant composé par (toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (40/32/8 v/v/v). Les plaque a été ensuite placée dans les deux solvants différents le 1^{er} est constitué par le méthanol et le second par le toluène. Après migration et évaporation du produit d'éluion à sec, la plaque a été examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques (Figure 11).

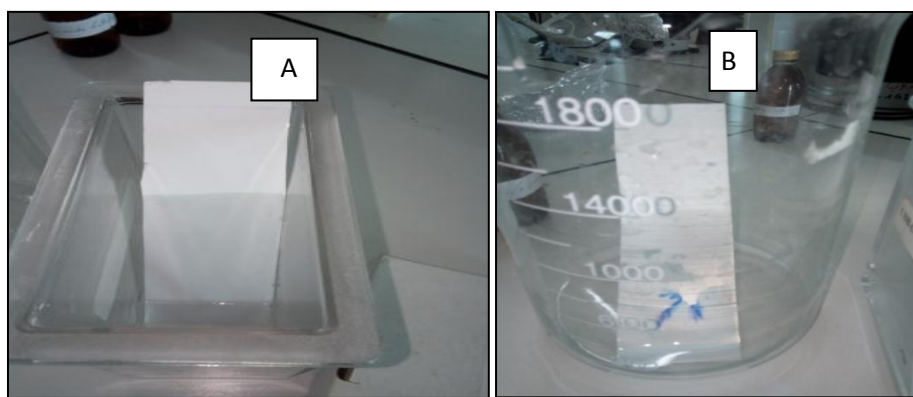


Figure 11 : Préparation de la plaque CCM, A : solvant 1 : chloroforme et méthanol, B : solvant 2 : toluène, acétate d'éthyle et acide formique

V.1. Etude mycologique des grains de blé dur

V.1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de Blé

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les deux échantillons de blé dur analysés sont contaminés par plusieurs genres des moisissures. Le genre le plus prédominant est *Fusarium*. Les autres moisissures viennent aux *Penicillium* ; *Aspergillus* et *Alternaria*. Les souches sélectionnées pour les testes suivantes appartiennent au genre *Fusarium* (Figure 12).



Figure 12 : le *Fusarium* dans le blé dur contaminé

V.1.2. Identification des souches fongiques isolées

L'identification des souches fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de **Botton** (1990).

V.1.2.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée sur les quatre souches par l'observation, à l'œil nu, des caractères cultureux (Aspect de la colonie, couleur et la vitesse de la croissance, Tableau V). L'ensemencement des grains de blé sur milieu PDA, a donné des colonies plus ou moins différentes, mais répondant d'une manière générale aux morphotypes mycéliens connus de *Fusarium* (Figure 13).

En effet, les isolats codés F1 et F4 ont donné un mycélium très abondant épais et dense de couleur blanc-crème. Alors que le F2 a donné un morphotype ras muqueux avec une rareté assez prononcée du mycélium aérien. Cependant le F3 se présente sous forme de mycélium aérien cotonneux très abondant, épais et dense de couleur rosâtre. La croissance mycélienne

Chapitre V : Résultats

est excellente sur le milieu PDA, nous avons enregistré des diamètres supérieurs à 80mm pour les isolats fongique F1, F3, et F4, alors que le F2, il se distingue par un diamètre de la colonie inférieur ou égale à 30 mm (Tableau V).

Tableau V : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé dur.

Les souches fongiques	Aspect de mycélium	couleur	Vitesse de croissance
F1	Cotonné	Blanc	Rapide > 80mm
F2	Ras	crème	Lente = 30mm
F3	cotonné	Rose	Rapide > 80mm
F4	Cotonné	Jaune	Rapide =80mm

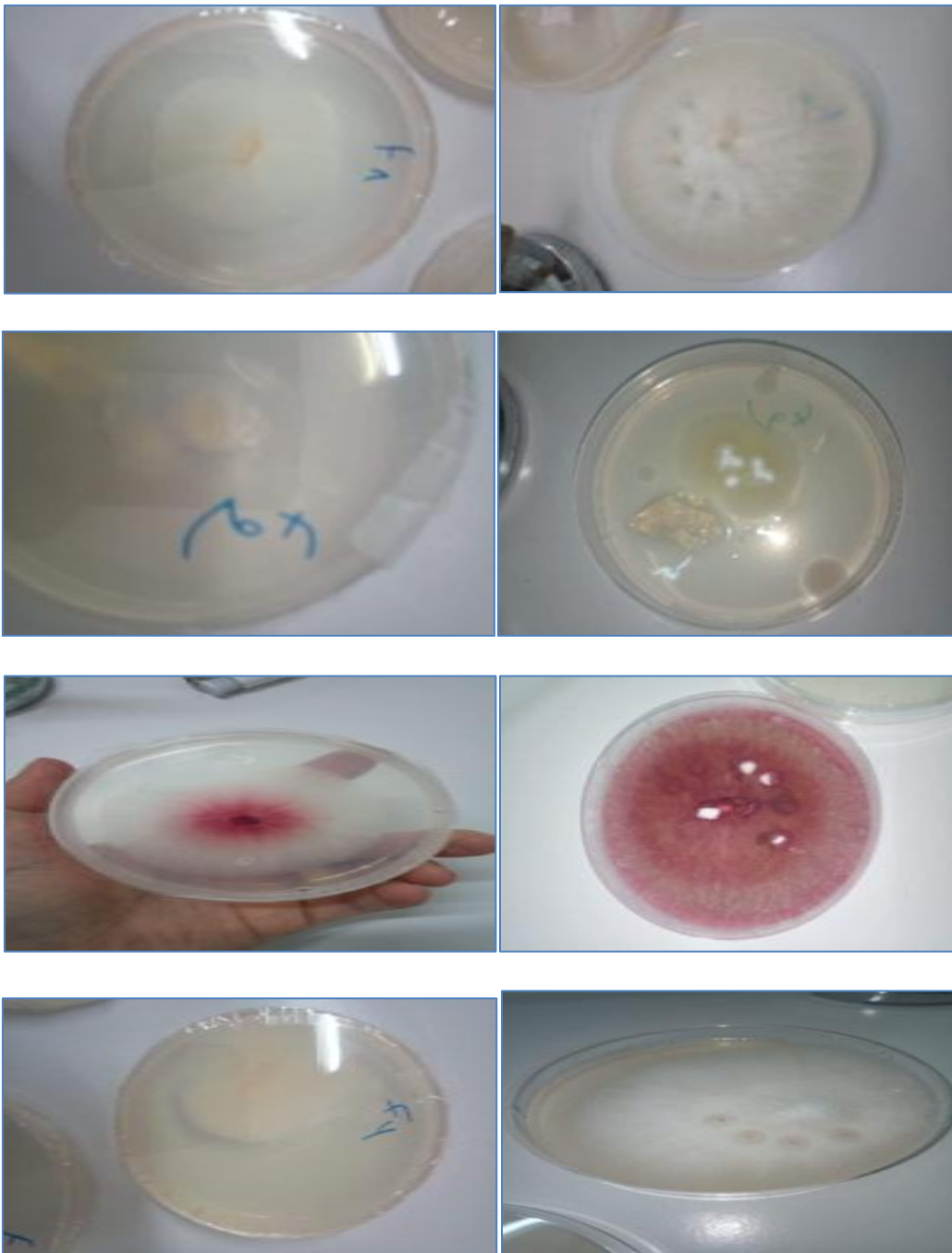


Figure 13 : L'aspect macroscopique des *Fusarium*

V.1.2.2. Identification microscopique

Les moisissures isolées sélectionnée ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100. Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique des *Fusarium* (absence ou présence de cloisons, couleur) et des spores (Figure 13). Nous avons remarqué que les 4 isolats étudiés donnent naissance après une semaine de culture de microconidies en abondance, largement supérieures en nombre par rapport aux macroconidies qui sont épaisses et dispersées. De même, après trois semaines environ culture, l'observation microscopique révèle la présence de chlamydospores suite à l'appauvrissement du milieu de culture en nutriments (Figure 14).

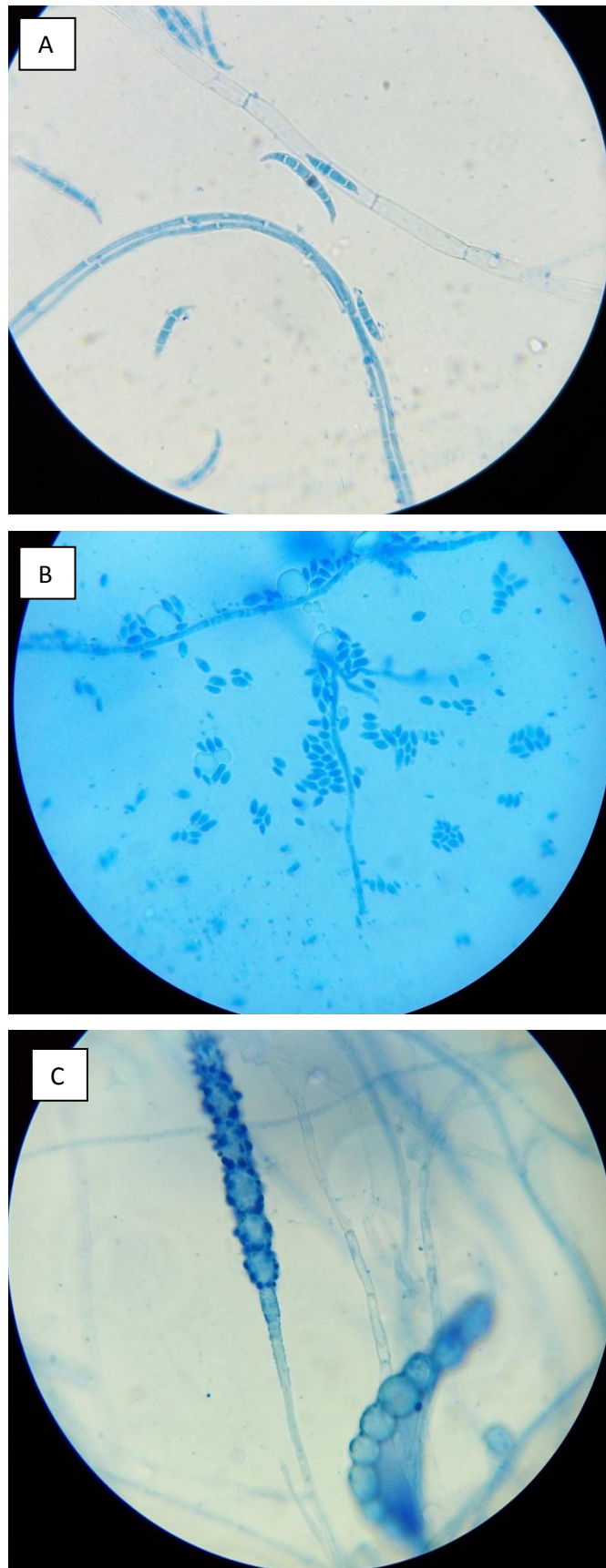


Figure 14 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé dur. A) Mycélium cloisonné et les macroconidies, B) Microconidies, C) Clamydospores.

V.2. Etude mycotoxicologique

V.2.1. Révélation des mycotoxines au niveau des échantillons de blé

L'extraction des métabolites secondaires au niveau de substrat de blé a été réalisée par 2 solvants organiques chaque échantillon, leur séparation a été faite sur la chromatographie sur couche mince (CCM) avec une révélation par radiation des UV à une longueur d'onde égale de 365 nm.

D'après les résultats obtenus via l'utilisation de solvant 1 (chloroforme, méthanol V/V), nous avons trouvé trois spots colorés représentant les mycotoxines. En effet, le premier échantillon montre la présence deux taches l'une est bleue verte avec un $R_f = 0,48$, fluorescente sous UV à longueur d'onde égale 365nm, et la deuxième tache a une couleur bleue verte de $R_f = 0,55$. En revanche, le deuxième échantillon qui montre la présence d'une seule tache d'une couleur bleue verte fluorescente sous UV de $R_f = 0,45$ (Figure15, TableauVI).

Concernant l'utilisation de solvant 2 (toluène, acétate d'éthyle, acide formique), la chromatographie sur couche mince de l'échantillon 1 qui a permis de séparer 4 spots, apparus sous formes des taches colorées après révélation sous lumière UV (figure 15). Les trois spots apparus de couleur bleu vert fluorescent sous UV avec les rapports frontaux suivants : 0,07 ; 0,25 ; 0,34 respectivement. Le quatrième spot d'une couleur orange de $R_f = 0,11$. Cependant pour l'échantillon 2, nous avons séparées un spot de couleur orange avec un $R_f = 0,18$ (Tableau VI).

Tableau VI: Les résultats de l'analyse de substrat de blé sur CCM.

Solvant	Echantillons	Nbr des spots	Couleur	Rapports frontaux
Solvant (1)	Echantillon 1	2	Bleu vert fluorescent	$R_{f1} = 0,48$ $R_{f2} = 0,55$
	Echantillon 2	1	Bleu vert fluorescent	$R_f = 0,45$
Solvant (2)	Echantillon 1	4	-3 Bleu vert fluorescent -1 orange	$R_{f1} = 0,07$ $R_{f2} = 0,25$ $R_{f3} = 0,34$ $R_f = 0,18$
	Echantillon 2		-1 orange	$R_f = 0,18$

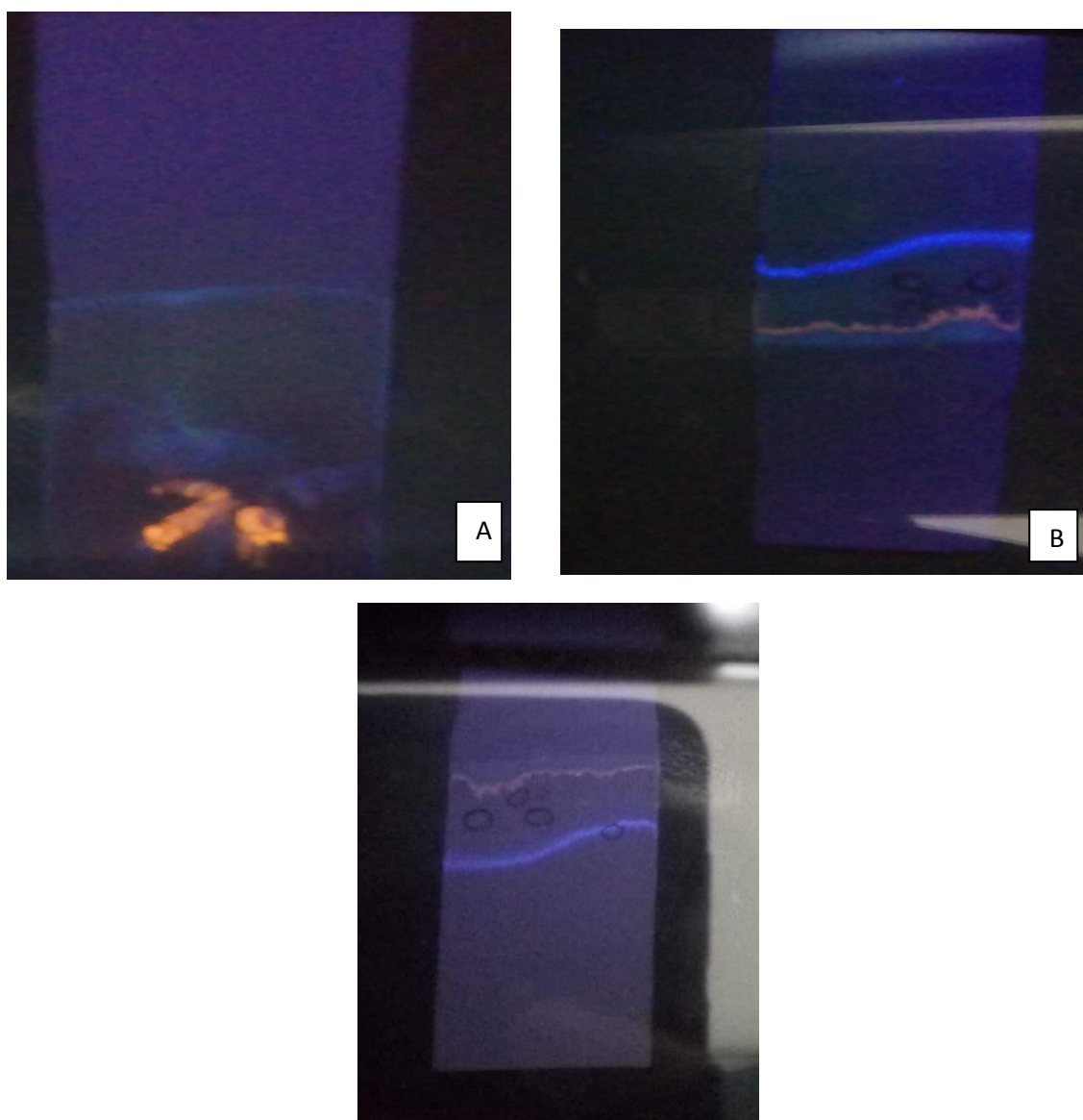


Figure16 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *Fusarium* A solvant 1, B solvant 2.

Chapitre V : Résultats

V.2.2 Analyse des mycotoxines au niveau des souches par CCM :

Pendant les 14 jours d'incubation, les flacons inoculés par les *Fusarium* ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques. L'extraction des métabolites secondaires des *Fusarium* a été réalisée par 2 solvants organiques. Leur séparation a été faite sur CCM avec une révélation par radiation des UV à une onde de 365 nm (Figure 16). En effet, les résultats obtenus par le solvant 1 montre que les quatre espèces de *Fusarium* capable de produire des toxines. La chromatographie sur couche mince de l'extrait de nos isolats qui a permis de séparer 4 spots semblables, apparus sous formes des taches colorées après révélation sous lumière UV par une couleur bleue vert fluorescente et avec des rapports frontaux 0,27 ; 0,16 ; 0,34 et 0,35 respectivement (Tableau VII)

En revanche, les résultats obtenus par le solvant 2 montrent la présence des mêmes taches de premier solvant mais avec des rapports frontaux élevées, F1(0,39) ; F2(0,23) ; F3 (0,39) et F4 (0,55).

Tableau VII : Les résultats de l'analyse de substrat de blé sur CCM

Solvant	Echantillons	Nbr des spots	Couleur	Rapports frontaux
Solvant (1)	F1	1	bleue vert	Rf1=0,27
	F2	1	bleue vert	Rf2=0,16
	F3	1	bleue vert	Rf3=0,34
	F4	1	bleue vert	Rf4=0,35
Solvant(2)	F1	1	bleue vert	Rf1=0,39
	F2	1	bleue vert	Rf2=0,23
	F3	1	bleue vert	Rf3=0,39
	F4	1	bleue vert	Rf4=0,55

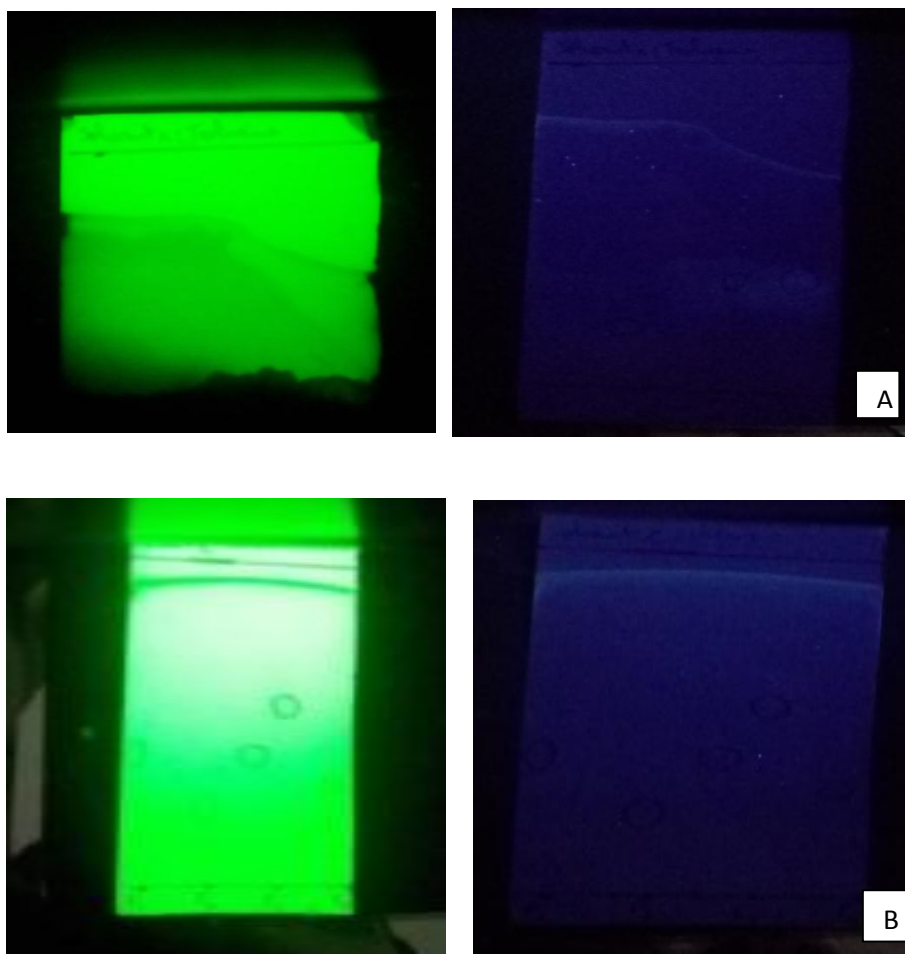


Figure 17 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par fusarium (solvant1)

Discussion

Les céréales sont des denrées alimentaires fréquemment contaminées par les moisissures, La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, ou au cours du stockage des grains.

L'altération de céréales stockées a fait l'objet de nombreuses études ayant mis en évidence que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales expliquée par des variations dans les paramètres technologiques du grain et par les pertes considérables (**Molinie et al.**, 2005).

Lors de la contamination du blé, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production des toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en mycoflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage des grains (**Zia-Ur-Rahman**, 2006).

Une analyse mycologique des grains de blé dur a été effectuée. Les principaux genres fongiques identifiés dans les échantillons analysés sont : *Penicillium* ; *Alternaria* ; *Aspergillus* et *Fusarium*. Ils ont caractérisés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. Globalement, les résultats obtenus montrent une nette dominance de genre *Fusarium* (4 souches). Dans l'ensemble, le taux de contamination élevé, ainsi que la biodiversité assez importante constatés dans les deux échantillons du blé dur peuvent être expliqués probablement par la qualité, la durée et les conditions de stockage (Davis et al., 1987). La dominance du genre *Fusarium* dans la flore contaminant des céréales a été reportée dans plusieurs travaux (**Le Bars et al.**, 1987 **Riba et al.** , 2005). Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (**Withlow et al**, 2001).

Le dosage qualitatif (par CCM) des mycotoxines au niveau des échantillons de blé s'est révélé positive pour les deux échantillons.

D'après les résultats obtenus via l'utilisation de solvant 1 en utilisant le mélange de solvants : chloroforme/méthanol (90/10) volume par volume, entraine une migration suffisante des molécules avec les rapports frontaux suivante : 0,55 ; 0,48. Les tâches prennent une couleur bleue verte fluorescente sous UV à longueur d'onde égale 365 nm.

Discussion

La CCM des mycotoxines via l'utilisation de solvant 2 (toluène, acétate d'éthyle, acide formique) volume par volume permet de séparer 4 spots (trois en couleur bleue verte et une de couleur orange) et les déplace à une distance d'environ 0,07 ; 0,25 ; 0,34 et 0,11 respectivement. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par (**Tepsic et al.**, 1997; **Kosalec et al.**, 2005) qui ont déduit que les taches ayant des $R_f = 0,45 ; 0,50$ respectivement correspondent à la gliotoxine, la verruculogène. Concernant la tache orange, **Narasimha et al (2009)** ont déduit que c'est la zéaralénone.

Dans un deuxième volet et afin de déterminer la mycotoxinogénèse des souches sélectionnées de *Fusarium*. Nous avons cultivées nos souches sur le milieu CYA, c'est un milieu sélectif pour la production des mycotoxines.

Les deux milieux (PDA, CYA) utilisés au cours de cette étude ont été décrits par plusieurs auteurs pour l'isolement des moisissures contaminants les aliments (**Azzoun**, 2012 ; **Gacem**, 2011). Ces deux milieux nous ont donnée une croissance variable, cela est peut être expliqué par la différence dans la composition des deux milieux de cultures et le choix des substrats préférés par les souches fongiques, tel que rapporté par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la protection des plantes (**OEPP**, 2003), que le milieu PDA est préparé à base d'élément organique et le milieu CYA est préparé à base d'élément minéral.

L'examen des chromatoplaques des extraits de filtrats de culture sur milieu CYA que les quatre isolats ont secrété des mycotoxines.

La chromatographie sur couche mince en utilisant le solvant 1 a permis de séparer 4 spots semblables, apparus sous formes des taches colorées après révélation sous lumière UV par une couleur bleue vert fluorescente et avec des rapports frontaux $F_1(0,27)$; $F_2(0,16)$; $F_3(0,34)$ et $F_4 (0,35)$ respectivement. En revanche, les résultats obtenus par le solvant 2 montrent la présence des mêmes taches de premier solvant mais avec des rapports frontaux élevées, $F_1(0,39)$; $F_2(0,23)$; $F_3 (0,39)$ et $F_4 (0,55)$. Nous avons observé que le solvant 2 est le plus performant pour la séparation des mycotoxines. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Menazel (2010)**.

Discussion

Selon les rapports frontaux des spots et leurs couleurs, nous avons estimé la présence de toxine T2 et diacetoxy scirpenol (DAS). Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par (Narasimha *et al.* , 2009).

Conclusion et perspectives

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (**Slama et al.**, 2005). Parmi ces céréales, le blé occupe la première place pour la production mondiale.

D'après l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, environ 25% des récoltes mondiales des produits alimentaires sont contaminées par les mycotoxines (FAO 2004). De nombreuses denrées d'origine végétales, dont les céréales, les fruits, les épices, les légumes, secs et les fourrage, ainsi que, les aliments issus de ces filières, sont exposés aux contaminations par les mycotoxines (**Azzoune**, 2011).

Les grains de céréales forment un excellent substrat pour les moisissures ou la flore fongique de stockage constitue un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines. Selon l'analyse mycologique des échantillons de blé dur , plusieurs souches ont été détectées. L'étude de la mycoflore des grains analysés a montré que le taux de contamination du blé est très élevé.

L'analyse des mycotoxines produites par CCM a révélé la production des différents mycotoxine exemple le *Fusarium*.

En perspective, il est intéressant d'effectuer les travaux suivants:

- Étendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons
- Étudier d'une manière plus approfondie sur les facteurs toxinogène.
- rechercher des micro-organismes luttés contre les mycotoxines.

Références Bibliographiques

- **Andersen B., Kroger E and Roberts R.G., (2002)** Chemical and morphological segregation of *Alternaria Arborescens*, *Alternaria Infectoria*, *Alternaria Tenuissima*. and species-groups. *Mycol Res*, P: 170-180.

- **Atoui A., (2006)** Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: étude moléculaire et physiologique. *Thèse de doctorat d'université : Microbiologie et biocatalyse industrielles. Toulouse : Institut National Polytechnique. France.* P:17.

- Balzer A., Tardieu D., Bailly D., et Guerre P., (2004)** Les trichthécènes : nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *Revue Méd. Vét* 155, 6, 299-314. P : 299,

- Chetatha M., (2014)**: contribution à l'étude mycologique et mycotoxicologique du café commercialisé dans la région de Laghouat. *mémoire magister de l'UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID.* P : 20.

- **Christensen Clyde M and Kaufmann Henry H.;**(1969) Grain storage. The role of fungi in quality loss. *Minnesota archive Editions.* P: 153 .

- Davis N. D. Diener D. Eldridge (1966)** production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Selisynthetic Medium, *Applied Microbiology, American Society for Microbiology* , Vol. 14 N° 3

- **Deàk T., (2008)** Handbook of food spoilage yeasts. *CRC Press. Second Edition.* P: 325.

- Dendy D.A.V and Dobraszczyk., (2000)** Cereals and Cereal Products: *Technol.Chemistry.* Springer. p: 370.

- **Dijksterhuis J and Samson Robert A. (2007)** Food mycology. A multifaceted Approach to fungi and food. CRC Press; p: 403.

- **FAO (2007)** Statistical database of the food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org>. (Consulté le 11/01/2010).

- **Feillet P., (2000)** Le grain de blé : Composition et utilisation. *Edition Quae. INRA. Paris.* p: 308.

- **Godon B and Loisel W., 1997** : Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. *Edition Technique et Documentation Lavoisier., Paris.* p: 819.

- Heit S., (2015)** Identification des fusarium et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. *Thèse de l'université de Lorraine Faculté de Pharmacie.* P :23, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 38, 39, 41.

- Jard G., (2009)** Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. *Thèse du doctorat de l'université de Toulouse l'Institut National Polytechnique de Toulouse.* P : 9

- **Jouany J., P and Yiannikouris A., (2002)** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales.* p: 3-16.

- **Krska R., (2009)** Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* p: 1203–1204.

- **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 MidiPyrénées" à Toulouse.*

- **Leclerc F.C., Papon N., Noel T., Villard J., (2005)** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires.* p : 61-66.

- **Magan N., Hope C.V. and Aldred D., (2003)** Post – harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Euro. J. Plant. Pathol* 109, p: 723-730.

- **Magan N., Lacey J., (1988)** Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology Elsevier.* P: 245- 256.

- **Mathew S., Thomas G and Tufail A., (2011)** An Evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal.J.Biotechnol., Microbiol.* p :131–138.

- **Molinie A., Faucet V., Castegnaro M and Pfohl-Leszkowicz A., (2005)** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. *Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. F. Chem.* p: 391-400.

- Neergaard P., 1977:** Seed pathol (11). *MacMillan.* P: 1187.

- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T and Killington R., (2000)** L'essentiel en microbiologie. *Edition Berti.* p : 210-217.

- **Pamel E.V., Vlaemyck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A and Daeseleire E., (2010)** Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p: 1-11.

- **Pfohl-Leszkowicz A., (1999)** Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. *Lavoisier, Paris.*

- Pitt J. and Hoking A. (1997)** fungi and food spoilage Blackie Academic And Profesional. *New South Wales, Australia.*

- **Roberts T.A., (2005)** Microorganisms in foods. Microbial Ecology of food Commodities. *Second Edition. Springer.* P: 776

- **Ruppel P., Delfosse Ph and Hornick, J.L., (2004)** La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* p: 141-146.

- **Tannous J., (2015)** Patuline, mycotoxine de *penicillium expansum*, principal pathogène post-récolte des pommes : nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approche préventive. *Thèse du doctorat de l'université de Toulouse (INP de Toulouse)*. P: 9, 11

- TBIBEL. G.N¹., BOURAS N^{2,3}., OULED ELHADJ MOHAMED D⁴., vol6, n°1, juin (2016) 32-49.,** les mycotoxines: un danger de santé public. *Algerian journal of arid environment*. P : 34, 35, 43, 44,

- **Thevenot D¹., Berciani J²., Roux-Marchand T²., Corvisier P²., (2016)** connaissance, gestion maîtrise du risque mycotoxines dans les aliments pour animaux . *conférence 16 prague, rep. Technique*. P : 1

- **Tozlovanu M., (2008)** Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxine néphrotoxique et cancérigène (notamment l'ochratoxine A): validation de bio marqueurs d'exposition et effet. *Thèse de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse*. P : 41, 44,

- Van der Burgt, G.J.H.M and Timmermans B.G.H., (2009)** Fusarium in wheat. Effects of soil fertility strategies and nitrogen levels on mycotoxins and seedling blight. *LBL Publication*.

Résumé

Les grains de céréales forment un excellent substrat pour les moisissures ou la flore fongique de stockage constitue un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines. Dans ce cadre s'inscrit notre travail, où deux échantillons de blé dur ont été fournies par CCLS de la wilaya de Bordj Bou Arerridj (est de l'Algérie) sont étudiées. L'étude de la mycoflore des grains analysés a montré que le taux de contamination est élevé. Tandis que le genre *Fusarium* représente le genre le plus dominant dans les deux échantillons analysés avec une fréquence allant de 50% de la flore totale identifié sur le milieu PDA. Les autres moisissures sont de trois genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *alternaria*. L'analyse des substrat de blé par CCM a révélé la production de gliotoxine, la verruculogène. La production des mycotoxines par les souches sélectionnées sur le milieu CYA de fermentation permet la détection de deux types de mycotoxines sont la toxine T2 et la toxine DAS via l'utilisation de CCM.

Les mots clés : blé, moisissures, mycotoxines, CCM.

Abstract

Cereal grains form an excellent substrate for mold or fungal storage flora is an important factor of deterioration and secretion of mycotoxins. In this framework is our work, where two samples of durum wheat were produced by CCLS of the wilaya of Bordj Bou Arerridj (east of Algeria) are studied. The study of the mycoflora of the analyzed grains showed that the contamination rate is high. While the genus *Fusarium* represents the most dominant genus in the two samples analyzed with a frequency ranging from 50% of the total flora identified on the PDA medium. Other molds are of three genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *alternaria*. The analysis of wheat substrate by TLC revealed the production of gliotoxin, the verruculogen. The production of mycotoxins by selected strains on CYA fermentation medium allows the detection of two types of mycotoxins are T2 toxin and DAS toxin via the use of TLC.

Key words: wheat, mold, mycotoxins, ccm.

المخلص

تشكل الحبوب الجافة أهم مصدر لتكاثر الأعفان أثناء التخزين وهي العامل الأساسي في تدهور وإفراز السموم. في هذا الإطار تمت دراسة عينتين من القمح الصلب المتحصل عليها من قبل تعاونية الحبوب والخضر الجافة بولاية برج بوعريريج (شرق الجزائر) أظهرت دراسة الميكوفلورا في الحبوب التي تم تحليلها أن معدل التلوث مرتفع في حين أن جنس *Fusarium* يمثل أكثر الأنواع المهيمنة في العينات التي تم تحليلها بتردد يصل إلى 50 بالمائة من مجموعة الفطريات المعزولة على وسط الزرع PDA. كما تم عزل أجناس أخرى متمثلة في *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*.

وكشف تحليل طحين القمح على ألواح السيليكا وجود الجليكوتوكسين، فيروكلوجين. في حين أثبتت دراسة الفطريات المختارة على إنتاج السموم على وسط التخمر CYA، وجود نوعين من السموم هما سم T2 و DAS على ألواح السيليكا الرقيقة.

الكلمات المفتاحية: القمح، الأعفان، السموم الفطرية، الكروماتوغرافية هلي ألواح السيليكا الرقيقة.