
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ M'HAMED BOUGUERRA DE BOUMERDES

Faculté des sciences, département de biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Sciences biologiques

Option: **Biochimie et Microbiologie Appliquée**

Par

Nadia AZZOUNE

**ETUDE DES POPULATIONS DU GENRES *ASPERGILLUS* ET
PENICILLIUM ET DE LEURS MYCOTOXINES ISOLEES DES EPICES
ET DES LEGUMES SECS**

Soutenu le 24/05/2011 devant le jury:

FAZOUANE	Fethia	Professeur	UMBB	Présidente
LOUANCHI	Meriem	MC/ A	INA	Examinatrice
BADIS	Abdelmalek.	MC/ A	Uni Blida	Examineur
RIBA	Amar	MC/A	UMBB	Rapporteur

Année universitaire : 2010-2011

REMERCIEMENT

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

Nous voudrions signifier notre gratitude au Professeur Nasseridine SABAOU du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse à l'E.N.S de Kouba, Alger, qui nous a accueillis dans son laboratoire et mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de nos expériences et aussi de nous avoir énormément encouragé.

Nous exprimons aussi notre respect sans égal à notre promoteur RIBA Amar Maître de conférences, à l'UMBB, et le Co-promoteur MOKRANE Salim, Maître de conférences à l'E.N.S de Kouba, Alger. Nous leur reconnaissons ici le professionnalisme, le savoir incontestable, la noblesse, la gentillesse et la générosité. Quoiqu'on les félicite on ne le fera jamais assez.

Nous remercions également :

- M^{me} FAZOUANE. Fethia, professeur à l'UMBB qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

- M^{me} LOUANCHI Meriem Maître de conférences A à l'ENSA El-Harrach et Mr BADIS Abdelmalek Maître de conférences A à l'Université Saad Dahleb Blida, d'avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de soutenance.

A toute l'équipe du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse à l'E.N.S de Kouba, et du laboratoire de toxicologie ENSA de Toulouse pour leurs aide précieux.

Enfin, nous tenons à remercier vivement et exprimer notre reconnaissance et notre profond respect à tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire

A tous ceux qui nous ont soutenus, nous dirons merci.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier les moisissures qui contaminent les épices et les légumes secs commercialisées en Algérie et d'évaluer le pouvoir producteur d'aflatoxines (AFs) et d'ochratoxine A (OTA) des isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Un total de 70 échantillons (44 échantillons d'épices et 26 échantillons de légumes secs) a été prélevé dans différents points de vente de quatre villes d'Algérie (Biskra, Batna, Alger et Oran). L'analyse de la flore fongique a montré une nette dominance du genre *Aspergillus* (56,4%), suivie du genre *Penicillium* (25,2%), le reste des autres genres de la flore fongique est de 18%. Les principales espèces isolées appartiennent aux sections *Flavi*, et *Nigri* du genre *Aspergillus*, ces deux dernières étant les plus dominantes avec 28,9% et 25% respectivement du total d'*Aspergillus*. L'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines des 252 isolats testés a révélé un pourcentage d'isolats aflatoxinogènes de 38,9% sur CCM. La production d'aflatoxines varie considérablement d'un isolat à l'autre. La quantification de l'aflatoxine B1 (AFB1) par HPLC a révélé des quantités allant de 8,66 à 15313,22 µg/kg du milieu CAM. Par ailleurs, l'analyse par chromatographie sur couche mince a montré que 9,6% des isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* produisent l'ochratoxine A (OTA) sur un totale de 146 isolats. Le dosage de l'AFB1 dans 25 échantillons (21 échantillons d'épices et 4 échantillons de légumes secs) a permis de détecter des quantités allant de 0,08 à 24,34 µg/kg dans 13 échantillons d'épices (61,9%), cependant l'analyse des échantillons des légumes secs a révélée une absence totale de l'AFB1.

Mots clés : champignons, *Aspergillus*, aflatoxines, ochratoxines A, épices, légumes secs. Algérie

Abstract

This work is in an attempt to study the molds contaminating both spices and dried legumes commercialized in Algeria, and to evaluate Aflatoxins (AFs) and Ochratoxin A (OTA) production by a number of selected isolates belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. A total of 70 samples (44 of spices and 26 of dried legumes) are collected from four different public markets in Algeria (Biskra, Batna, Algiers, and Oran). The mycoflora analysis showed a net dominance of the genus *Aspergillus* (56.4%), followed by *Penicillium* (25.2%), most of isolated species fit in sections *Flavi* and *Nigri* with a percentage of about 28.9 and 25.0 of total *Aspergilli* respectively. The production ability of both Aflatoxins and Ochratoxin A are determined via thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) techniques. Results indicate that among the 252 tested isolates on TLC, 38.9% reveal aflatoxinogenic, with a considerable variation of aflatoxin production. Aflatoxin B1 (AFB1) quantification is carried out by HPLC which reveal quantities ranging between 8.66 to 15313.22 µg/Kg of CAM medium. Moreover, the results of CCM analysis showed that 9.6% of *Aspergillus* and *Penicillium* isolates are Ochratoxin A producers. Furthermore, the AFB1 quantification in 25 samples (21 of spices and 4 of dried legumes) allow detecting quantities ranging from 0.08 to 24.34 µg/Kg in 13 samples of spices (61.9%). However, the analysis of dried legumes samples discloses a full absence of AFB1.

Keywords: Fungus, *Aspergillus*, aflatoxins, ochratoxin A, spices, dried legumes, Algeria.

ملخص:

يهدف هذا العمل إلى دراسة الفطريات الملوثة للبهارات والبقوليات الجافة المسوقة في الجزائر، إضافة إلى تقدير القابلية على إنتاج كل من السمّين الفطريين AFB1 والـ OTA من قبل العزلات التابعة للجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* وهذا بطريقتي كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).

تم جمع 70 عينة (44 عينة منها من البقوليات الجافة و26 عائدة للبهارات) من الأسواق التابعة لمناطق مختلفة من الجزائر. أوضح تحليل الفلورة الفطرية سيطرة مطلقة للجنس *Aspergillus* بنسبة 56.4 % يليه الجنس *Penicillium* بنسبة 25.2 % . تمثل عزلات *Aspergillus* مجموعة *Flavi* و عزلات *Aspergillus* مجموعة *Nigri* 28,9 % و 25 % على التوالي من جنس *Aspergillus* مع ملاحظة وجود سيطرة للنوعين.

أوضحت نتائج الكشف على وسط خلاصة جوز الهند أن 38,9 % من مجموع العزلات قيد الدراسة لها القابلية على إنتاج الأفلاتوكسينات، تم تأكيد هذه النتائج بتقنيتي كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، حيث أوضحت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عدم وجود تجانس في القدرة على إنتاج الأفلاتوكسينات من قبل مختلف العزلات، إذ تبين أن 26.5 % هي عالية الإنتاجية و 23.5 % ضعيفة الإنتاجية في حين قدرت نسبة العزلات متوسطة الإنتاجية بحدود 50 %.

استخدمت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) المجهزة بخلية تحويل من نوع KOBRA Cell للتقدير الكمي للسم الفطري AFB1 وهذا في 28 عذلة منتقاة عائدة للنوع *Aspergillus* مجموعة *Flavi* ، أوضحت النتائج تباينا كبيرا في كمية الـ AFB1 المنتجة حيث تراوحت ما بين 8.66 و 15313.22 ميكروغرام/كيلوغرام.

كذلك أوضحت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أن 9,6 % من العزلات قيد الدراسة لها القدرة على إنتاج السم الفطري OTA.

من جهة أخرى اتضح عند التقدير الكمي للـ AFB1 في 21 عينة من البهارات و 4 عينات من البقوليات الجافة غياب كلي لوجود هذا السم الفطري في هذه الأخيرة (البقوليات الجافة)، في حين اتضح وجوده بتراكيز تراوحت ما بين 0.08 و 24.34 ميكروغرام/كلغ في 13 عينة (61.9 %) من عينات البهارات.

Liste des abréviations et nomenclatures

AFs : aflatoxines

AFB1: aflatoxine B1.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

a_w : Activité de l'eau.

CAM : Coconut Agar Medium.

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CE: Commission Européenne.

C.I.R.C: Centre International pour la Recherche sur le Cancer

CPA : acide cyclopiazonique.

CYA: Czapeck Yeast Extract Agar.

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar.

FAO: Food and Agriculture Organization.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IARC: International Agency for research on cancer.

IGS: Intergenic Spacer

ITS: Internal Transcribed Spacer.

NRRL : Northern Regional Research Laboratory.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

OTA: Ochratoxine A.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

UFC: Unité Formant Colonie

UV: Ultra-Violet.

μg : microgramme (10^{-6} g).

Partie II

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

1. Echantillons des épices et de légumes secs.....	41
2. Milieux de cultures.....	43
3. Souches de référence.....	43
4. Appareillage, produits chimiques et standards analytiques.....	43

II. Méthodes d'identification et d'analyse

1. Isolement et dénombrement de la flore fongique.....	43
2. Identification des isolats fongiques.....	45
3. Etude de pouvoir producteur d'aflatoxines	46
3.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture.....	46
3.2. Extraction d'aflatoxines du milieu de culture.....	46
3.3. Détection et confirmation de la production d'aflatoxines par chromatographie.....	47
3.3.1 Détection des aflatoxines sur chromatographie sur couche mince.....	47
3.3.2. Confirmation et quantification des aflatoxines par HPLC	48
4. Production et détection d'acide cyclopiazonique (CPA) et des sclérotés.....	49
4.1. Production d'acide cyclopiazonique (CPA).....	49
4.2. Production des sclérotés sur milieu CYA.....	50
5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A.....	50
5.1. Culture et extraction sur milieu CYA	50
5.2. Détection de la production d'ochratoxine A par CCM.....	50
6. Extraction d'aflatoxine B1 à partir des échantillons	51

Partie III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Analyse de la flore fongique des échantillons d'épices et de légumes secs

1. Analyse de la flore totale des échantillons d'épices.....	53
1.1. Principaux genres dans les échantillons d'épices.....	55
1.2. Distribution des espèces de différentes sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons d'épices.....	57
2. Analyse de la flore totale des échantillons de légumes secs.....	60
2.1. Principaux genres	60

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

1. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines.....	61
1. 1. Production d'aflatoxines par les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	61

1.2. Quantification par HPLC des AFs produites par les isolats aflatoxinogènes.....	64
2. Production de l'acide cyclopiazonique par les isolats aflatoxinogènes.....	64
3. Production de sclérotés par les isolats aflatoxinogènes.....	66
III. Caractérisation des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de la production d'AFs, CPA et sclérotés	
IV. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A par les isolats <i>d'Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i>	70
V. Contamination des échantillons d'épices et des légumes secs par l'aflatoxine B1	
1. Contamination des échantillons d'épices par l'aflatoxine B1.....	72
2. Contamination des échantillons de légumes secs par l'aflatoxine B1.....	76
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE.....	77
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	80
ANNEXES	

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales mycotoxines et les moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Bennet et Klich, 2003).....	4
Tableau 2. Origine chimique des mycotoxines (Ueno et Ueno, 1978).	5
Tableau 3. Points de fusion, données spectrales des aflatoxines et leurs Rf. (Dutton <i>et al.</i> , 1985).....	11
Tableau 4. Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide aspergillique par les principales espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (Frisvad. <i>et al.</i> , 2004).....	14
Tableau 5. Teneurs maximales en aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'Union Européenne (règlement 1881/2006/CE.....	16
Tableau 6. Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (FAO. (2004).....	17
Tableau 7. Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg (Règlement (C.E) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006).....	17
Tableau 8. Production d'AFs B et G, de CPA et d'autres métabolites par les espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (D'après Pildain <i>et al.</i> , 2008).....	24
Tableau 9. Espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> et leurs métabolites (Frisvad <i>et al.</i> ,2004)	29
Tableau.10. Principales épices et leurs utilisations synthétisées d'après les données de Teuscher <i>et al</i> (2005).....	35
Tableau 11. Contamination des herbes et des épices (Mckee., 1995).....	36
Tableau 12. Valeurs nutritionnelles des grains des légumineuses (composition moyenne en g/100g) (Vierling, 2008).....	40
Tableau 13. Origines et dates de prélèvement des échantillons des épices et légumes secs.....	42

Tableau 14. Distribution de la flore fongique et les fréquences des principaux genres isolés des 44 échantillons d'épices	54
Tableau 15. Pourcentage des isolats de différentes sections d' <i>Aspergillus</i> isolées des 44 échantillons d'épices.....	59
Tableau 16. Distribution des principaux genres fongiques isolés des 26 échantillons de légumes secs collectés au niveau des commerces et de l'ITGC*.....	60
Tableau 17. Répartition des isolats aflatoxinogènes d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de l'intensité de fluorescence.....	62
Tableau 18. Caractéristiques des 28 isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> issus des échantillons d'épices et légumes secs.....	65
Tableau 19. Répartition des 98 isolats aflatoxinogènes selon la production de CPA.....	66
Tableau 20. Répartition des 98 isolats aflatoxinogènes selon la production de CPA et de sclérotés	69
Tableau 21. Caractéristiques des 28 isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de la production d'AFs, de CPA et de sclérotés	71
Tableau 22. Nombre des isolats d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> ochratoxinogènes isolés des échantillons d'épices.....	73
Tableau 23. Résultats de la contamination par l'AFB1 des 21 échantillons d'épices.....	75

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Structures chimiques et masses molaires (en g) des différentes aflatoxines (Dutton et al., 1985).....	10
Figure 2. structure chimique générale de l'ochratoxine A et ces dérivés.....	13
Figure 3. Structure chimique de l'acide cyclopiazonique (CPA).....	14
Figure 4. (A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): Les basidiomycètes	19
Figure 5 Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	21
Figure 6. Aspects macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i>	26
Figure 7. Aspects macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus ochraceus</i>	30
Figure 8. Aspects macroscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> sur milieu CYA (Abarca et al., 2004).....	32
Figure 9. Aspect macroscopique du genre <i>Penicillium</i>	33
Figure 10. Procédés de traitement et d'utilisation des épices en charcuterie.....	38
Figure 11. Consommation mondiale en épices brutes en 1992 (Chabane., 2000).....	39
Figure 12. Vente des épices et légumes sec au marché du Réghaia.....	41
Figure 13. Technique de dénombrement par étalement en surface	44
Figure 14. Schéma des connexions de la KOBRA Cell à l'HPLC.....	49
Figure 15. Protocole d'extraction des aflatoxines d'un échantillon d'Épice.....	52
Figure 16. Colonies des moisissures poussant sur milieu DRBC après 5 jours d'incubation à 28°C.....	53
Figure 17. Densité de la flore fongique totale (ufc/g) des différents échantillons d'épices analysés.....	54
Figure 18. Fréquence du genre <i>Aspergillus</i> dans les 44 échantillons d'épices analysés...56	
Figure 19. Fréquence du genre <i>Penicillium</i> dans les 44 échantillons d'épices.....	56
Figure 20 : Flore fongique totale dans les 4 régions (Biskra, Batna, Alger et Oran).....	5
Figure 21. Fréquence d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> dans les échantillons d'épices analysés	59
Figure 22. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix coco.....	62
Figure 23. Images sous UV 365 nm montrant les taches bleues plus d'aflatoxines produites par les isolats aflatoxinogènes.....	63

Figure 24. Fréquence (%) des isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> producteurs d'AFs en fonction de type de produit.	63
Figure 25. Présentation de deux types d'isolats producteurs des sclérotés de type « S » et « L ».....	67
Figure 26. Répartition des 98 isolats aflatoxinogènes selon la production des sclérotés....	67
Figure 27. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse des extraits méthanoliques de sept isolats d' <i>Aspergillus</i> et un isolat de <i>penicillium</i> par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV).....	73
Figure 28. Taux de contamination des échantillons d'épices par l'AFB1.....	75

INTRODUCTION GENERALE

D'après l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, environ 25% des récoltes mondiales des produits alimentaires sont contaminés par les mycotoxines (FAO, 2004). De nombreuses denrées d'origine végétale, dont les céréales, les fruits, les épices, les légumes secs et les fourrages, ainsi que les aliments issus de ces filières, sont exposés aux contaminations par les mycotoxines. Ces substances issues du métabolisme secondaire de certaines espèces de moisissures qui se développent sur un aliment sont répandues à tous les stades de la chaîne alimentaire. Parmi les 400 mycotoxines repertoriées, les aflatoxines et l'ochratoxine A produites par le genre *Aspergillus*, présentent une importance considérable sur le plan sanitaire et agroéconomique en raison de leurs effets hautement toxiques et de leurs fréquences élevées. En effet, ces substances présentent des propriétés cancérigène, mutagène, hépatotoxique, tératogène et immunotoxique. L'aflatoxine B1 (AFB1) est considéré comme étant le plus puissant cancérigène naturel pour l'homme (C.I.R.C, 2002).

Afin d'analyser les risques de contamination par les mycotoxines et de définir les mesures permettant de les maîtriser, il est nécessaire d'étudier d'une manière approfondie les espèces fongiques potentiellement toxigènes, d'évaluer leurs capacités de production des mycotoxines et de doser ces mycotoxines dans les produits. Le genre *Aspergillus* est à l'origine de la contamination de nombreuses denrées d'origine végétale par les aflatoxines et l'ochratoxine A. En Algérie, les premiers travaux réalisés sur les mycotoxines ont porté sur la recherche de ces deux mycotoxines dans la filière blé (Riba, 2008). Ce présent travail vise à étudier les champignons producteurs de ces mycotoxines dans les épices et les légumes secs commercialisés.

Ce travail est divisé en trois parties dont la première est consacrée à une analyse bibliographique sur la contamination des denrées alimentaires par les moisissures et leurs mycotoxines. Dans cette partie, une description détaillée de la taxonomie et de l'écologie des champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A sera également donnée.

La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes utilisés dans cette étude. La démarche globale consiste à isoler et dénombrer les moisissures contaminant les épices et les légumes secs en utilisant la technique des suspensions- dilutions et ensemencement sur milieu gélosé. Les principaux genres potentiellement toxigènes sont ensuite identifiés morphologiquement. La capacité de production *in vitro* des aflatoxines et de l'ochratoxine A des isolats appartenant au genre *Aspergillus* est ensuite déterminée par analyse chromatographique. Le dosage par HPLC des aflatoxines dans les échantillons d'épices et de légumes secs a également été réalisé.

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

I. GENERALITES SUR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES

1. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux, ubiquitaires (Pitt *et al.*, 2000). Au sein du règne des champignons renfermant suivant les auteurs 65000 à 100.000 espèces différentes, les moisissures constituent un ensemble hétérogène d'environ 20.000 espèces. Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à trois classes : zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes (Berthier et Valla, 2001). Les moisissures peuvent devenir visibles, lorsque leur développement est important, ce sont de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères, capables de se développer sur des substrats nutritifs variés et tout particulièrement sur les denrées alimentaires, il s'agit d'organismes hétérotrophes.

Ces microorganismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, etc). Ainsi certains de ces microorganismes sont utilisés dans les processus biotechnologiques pour la synthèse des différents acides, comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes (protéases et pectinases) (Perry *et al.*, 2004). D'autres sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire, pour l'affinage des fromages et l'amélioration des qualités organoleptiques de certains produits alimentaires (saucisse). Dans le domaine pharmaceutique, les moisissures sont utilisées surtout pour la production d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines etc) (Botton, 1990). Environ 22% des antibiotiques identifiés et 40% des enzymes produites industriellement sont élaborés par les espèces fongiques (Strohl, 1997).

A coté de ces intérêts bénéfiques, les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Leurs développement indésirable sur les aliments peut entraîner de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaires, altération de qualités organoleptiques (odeur et saveur), réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés (Pitt *et al.*, 2000). Cependant l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines.

Parmi les 300 métabolites d'origine fongique, seule une trentaine est connue pour être des mycotoxines (Bhatnagar *et al.*, 2002). Plusieurs types de ces mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires, dont les principales sont représentées dans le tableau 1.

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

Mycotoxines	Champignons	Denrées
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> et <i>A. ochraceoroseus</i> .	Arachides, céréales, graines de coton, épices et fruits.
Ochratoxines A, B, C.	<i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Penicillium viridicatum</i> .	Légumes, céréales et graines de café.
Zéaralénone.	<i>Fusarium graminearum</i> et <i>F. sporotrichoïdes</i>	Maïs, blé, orge, etc.
Fumonisines.	<i>Fusarium moniliforme</i> .	Maïs et autres céréales.
Trichothécènes (Toxine T-2)	<i>Fusarium</i> spp.	Maïs et blé.
Alcaloïde de l'ergot.	<i>Claviceps purpurea</i> et <i>C. paspali</i> .	Blé et dérivés et seigle.
Patuline.	<i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp.	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).
Citrinine.	<i>Penicillium. rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> et <i>Aspergillus. ochraceus</i> .	Orge, blé, riz, soja et seigle.

2. Les mycotoxines : origine et conditions de toxinogénèses

2.1. Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaires toxiques, élaborés par quelques moisissures. Elles sont issus principalement de 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994).

Les mycotoxines sont synthétisées pendant la phase diophase après les stades de multiplication et de croissance. Elles ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du microorganisme. Il est admis que la production des mycotoxines n'est pas liée à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines) (Yiannikouris et Jouany, 2002).

Les mycotoxines possèdent des structures chimiques leur conférant une bonne stabilité et de ce fait, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire totalement (Park et al., 2002).

2.2. Origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des substances chimiques complexes. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, salframine, gliotoxine, roquefortine, sporidesmine, Fumitrimorgines), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, déoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine). (Tableau 2).

Tableau 2. Origine chimique des mycotoxines (Riba, 2008).

Mycotoxines dérivées des acides aminés	Mycotoxines dérivées des polycétoacides	Mycotoxines dérivées des terpènes
Alcaloïdes de l'ergot.	Aflatoxines.	Diacétoxyscirpénol (DAS).
Acide cyclopiazonique (CPA).	Acide pénicillique.	Déoxynivalénol.
Acide aspergillique.	Citrinine.	Fusarénone.
Fumitrimorgines.	Ochratoxines.	Roridines.
Gliotoxine.	Patuline.	Toxine T2.
Roquefortine.	Rubratoxines.	Verrucarines, etc.
Slaframine.	Stérigmatocystine.	
Sporodesmine, etc.	Zéaralénone, etc.	

2.3. Conditions de toxinogénèse

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Elles peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait de traitements technologiques. La sécrétion de métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (liés à la souche fongique), extrinsèques (conditions de l'environnement).

2.3.1. Facteurs intrinsèques

Le potentiel génétique est un facteur important. Au sein du même genre, on peut distinguer des espèces connues pour être toxigènes et d'autres non. Au sein d'une même espèce toxigène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. Par exemple, toutes les souches d'*Aspergillus parasiticus* produisent les aflatoxines par contre chez *Aspergillus flavus* la production est variable selon les souches. Par ailleurs un champignon peut produire plusieurs mycotoxines à la fois. Par exemple la production d'AFs et de CPA par *A. flavus*. En plus, une même mycotoxine peut être produite par des espèces différentes voire même par deux genres différents (ex. l'ochratoxine A produite par *Aspergillus* et *Penicillium*) (Mitchell *et al.*, 2004).

2.3.2. Facteurs extrinsèques

Les facteurs de l'environnement qui contrôlent le développement de la toxinogénèse des moisissures sont nombreux à savoir la température, activité de l'eau (a_w), le pH, la composition gazeuse, et la nature du substrat.

2.3.2.1. Température

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance. A l'image du champignon producteur, les mycotoxines peuvent être produites sur une large gamme de température. Par exemple, les aflatoxines peuvent être synthétisées entre 12-42°C avec un optimum entre 24-28°C (Reiss *et al.*, 1998). *Aspergillus flavus* et *A. niger* peuvent se développer entre 8 et 45 °C (Pitt et Hocking, 1997). A 5°C, *Aspergillus* ne peut produire ni les aflatoxines, ni l'OTA, alors que *Penicillium* et *Fusarium* sont capables de produire les mycotoxines (Northolt et Bullerman, 1982; Weidenbörner 1998).

2.3.2.2. Activité en eau (a_w)

La disponibilité en eau nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszcowicz, 2001). Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une A_w de 0,80 par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque l' a_w est $\geq 0,85$ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005). De même, la formation des aflatoxines par *A. flavus* nécessite une valeur d' a_w comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance du micro-organisme producteur peut avoir lieu à des valeurs d' a_w plus basses. Certaines moisissures xérophiles (*Aspergillus flavus* ou *Penicillium restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuterie sèches à des a_w allant de 0.65– 0.75. Certains facteurs, tels que la pression osmotique, le substrat et la température, en réduisant l'humidité relative, peuvent conditionner l' a_w dans le milieu. Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne

peut se développer lorsque l' a_w est inférieure à 0,6, donc les produits alimentaires ayant une $a_w \leq 0,6$ ne sont généralement pas altérés (Troller, 1980).

2.3.2.3. Le pH

Comme pour la température et l' a_w , la gamme de pH permettant la toxino­gène­se est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique.

La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 4 à 9 avec un optimum de 4,5 à 6,5 et la production des mycotoxines à lieu aux voisinages des pH optimaux de croissance (Weidenbörner, 1998).

2.3.2.4. Composition gazeuse

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet dé­pres­seur important sur la toxino­gène­se. Taniwaki *et al.* (2001) ont montré qu'une teneur de 40% en CO₂ et 1% en O₂ réduit de 65% la croissance d'*A. flavus* et une inhibition totale de la production d'aflatoxine B1. En outre, la production d'aflatoxine B1 sur de l'arachide, modérément réduite entre 21 et 5 % d'O₂, n'est pratiquement inhibée que lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1%.

L'augmentation de la teneur en CO₂ (20 %), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. De même, la production de la patuline et d'acide pénicillique est réduite à de basses concentrations d'oxygène sans affecter la croissance du champignon producteur.

2.3.2.5. Nature du substrat

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant exclusivement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base (oléagineux, céréales, produits laitiers etc.). En effet, les céréales, et les oléagineux, plus riches en sucres, et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (Le Bars, 1998). Ainsi, la biogène­se des AFs, de l'OTA, de la stérigmatocystine, et de l'acide pénicillique, est favorisée, tout d'abord par la présence de glucides dans le substrat, puis de lipides et enfin la présence de protides qui ont une moindre influence (Lacey, 1989). La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

2.3.2.6. Facteurs biologiques

Les insectes et les acariens sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Dans le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (aflatoxine B1, ochratoxine A, citrinine dans le maïs ou l'orge).

Les échantillons envahis par une seule espèce présentent généralement une imprégnation toxique bien plus importante que les échantillons ayant une mycoflore complexe. Par contre, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine.

Bouraima *et al.* (1993) ont rapporté une compétition entre *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux champignons conduits essentiellement vers la production de l'aflatoxine, les ochratoxines sont très peu produites ou totalement absentes. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans la biogénèse des aflatoxines, *A. flavus* utilise la phénylalanine du support sur lequel il se développe. Lorsqu'il est plus abondant, il détournerait à son profit toute la phénylalanine ; l'OTA, un analogue de la phénylalanine ne pourrait alors être produit.

3. Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires

Beaucoup d'aliments peuvent être contaminés par les mycotoxines notamment les produits d'origine végétale, comme les céréales et leurs produits dérivés. Les autres produits d'origine végétale susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines sont : les fruits secs (les noix, les amandes, les arachides, les pistaches, les raisins...), les légumes secs (graines oléagineuses, et haricots ...), les épices, le café, le cacao, les fourrages, les jus et les produits de fermentation. Parmi les aliments et les produits d'origine animale, le lait, les produits laitiers, les œufs, les viandes, les abats, la charcuterie et tout ce qui en dérive peuvent être souillés par les mycotoxines.

L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme s'effectue ; soit par des denrées consommées directement (arachides, pistaches, amandes, etc), soit indirectement par des produits dérivés à partir desquels sont élaborés des aliments finis (semoule, farine, biscuits...). En outre, les mycotoxines peuvent se transmettre par des produits d'origine animale, si l'animal a consommé une nourriture contaminée par des mycotoxines.

II. LES PRINCIPALES MYCOTOXINES

Les propriétés chimiques et biologiques des mycotoxines et leurs effets toxiques sont variables. Du point de vue toxicité seules quelques mycotoxines attirent l'attention des chercheurs. Ce sont les aflatoxines (AFs), les ochratoxines (OTA), les fumonisines, la zéaralénone (ZEA), les trichothécènes (déoxynivalénol (DON), toxines T-2, et HT2) et la patuline.

1. Les aflatoxines

1.1. Définition et structure chimique

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

Les aflatoxines font partie d'un groupe de polycétones dérivé de furanocoumarine produit par de nombreuses espèces du genre *Aspergillus* comme *A. flavus* et *A. parasiticus*. Elles sont les plus toxiques et concérigènes. Au moins 16 structures d'aflatoxines et leurs analogues sont caractérisés mais seulement 4 sont des aflatoxines majeures, AFB1, AFB2, AFG1, et AFG2, contaminant des produits agricoles et posant des problèmes pour la santé humaine et animale (Park et Liang., 1993). L'AFB1 est partiellement métabolisée en un dérivé hydroxylé, communément appelé "Milk Aflatoxin 1" ou aflatoxine M1 (AFM1), lors de l'ingestion de produits contaminés par les animaux.

Les aflatoxines sont caractérisées au niveau chimique par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactones hexatomiques (AFG). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau. Les structures chimiques et les masses molaires de ces différents dérivés sont représentées dans la figure 1.

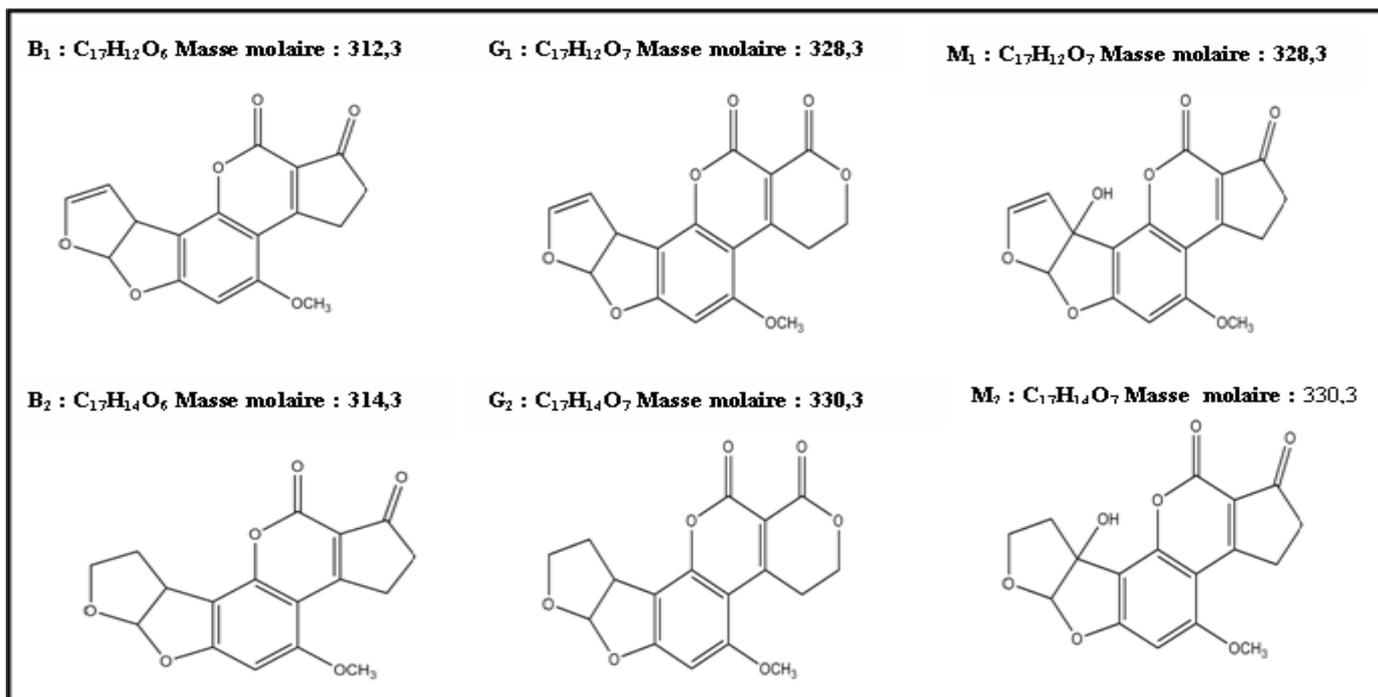


Figure 1. Structures chimiques et masses molaires (en g) des différentes aflatoxines (Dutton *et al.*, 1985)

1.2. Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour *Blue* et G pour *Green*). L'aflatoxine M1 présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. L'AFB1 est un composé thermorésistant stable même à des températures de 250 °C pendant 30 minutes à l'état cristallisé. Les points de fusion, les données spectrales des différentes aflatoxines et rapport de front (Rf) sont résumés dans le tableau 3.

1.3. Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires

Les aflatoxines sont associées principalement à des denrées alimentaires d'origines subtropicale et tropicale. Elles contaminent surtout les arachides, les pistaches, les amandes, mais aussi les graines de coton et de tournesol, ainsi que certaines céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. Les aflatoxines peuvent également être retrouvées dans les épices (piment rouge, poivre), les fruits secs et le tabac (Vargas *et al.*, 200). L'aflatoxine M1, dérivé de L'AFB1, peut être retrouvée dans le lait maternel et ses dérivés issus d'animaux consommant des aliments contaminés par l'AFB1.

Tableau 3. Points de fusion, données spectrales des aflatoxines et leurs Rf. (Dutton *et al.*, 1985).

Aflatoxines	Point de fusion	Absorption maximale à la lumière UV dans le méthanol		Rf Chloroforme/méthanol (97/3)
		Coefficient d'extinction molaire		
		à 265 nm	à 360– 362 nm	
B1	268– 269	12 400	21 800	0,56
B2	286– 289	12 100	24 000	0,53
G1	244– 246	9 600	17 700	0,48
G2	237– 240	8 200	17 100	0,46
M1	299	14 150	21 250 (357 nm)	0,40
M2	293	12 100 (264 nm)	22 900 (357 nm)	0,30

L'accumulation des aflatoxines dans les viandes et les produits de charcuteries semble être peu probable (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

1.4. Effets toxiques d'aflatoxines

La découverte des aflatoxines a excité l'intérêt des scientifiques à l'égard de la toxicité de ces substances. Les premières observations ont révélé qu'à fortes concentrations, les aflatoxines sont des poisons violents, et qu'administrées à petites doses à des animaux du laboratoire, elles produisent un cancer du foie. Chez l'homme, les risques liés à la consommation d'aflatoxine ont été bien étudiés, et le C.I.R.C a classé l'aflatoxine comme agent cancérigène du foie (Wogan, 2000). Les études épidémiologiques réalisées dans le monde ont montré que les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (Henry et Bosch, 2001). Cette situation est souvent rencontrée dans les pays en voie de développement, pour lesquels il n'existe pas de législation régulant les concentrations d'aflatoxines dans l'alimentation, et dans lesquels la vaccination contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et/ou politique.

2. L'ochratoxine A

2.1. Définition et structure chimique

L'ochratoxine A est une mycotoxine d'importance mondiale produite par des champignons microscopiques qui sont des contaminants courants des produits alimentaires. En 1965, elle a été découverte pour la première fois chez *A.ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Elle est constituée d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4 dihydroisocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C7, au groupement amine de la L-β- phénylalanine (O'Callaghan *et al.*, 2003). L'ochratoxine A appartient à la famille des polycétoacides et plus précisément au groupe des ochratoxines. Ce groupe comprend une structure générale qui peut en fonction des groupements R donner en plus de l'OTA différents analogues de structures (Figure 2).

2.2. Propriété physicochimique de l'OTA

L'OTA est un solide blanc de masse moléculaire de 403,8 g/mol, c'est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1. A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle devient soluble et stable en solution aqueuse. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 5500 /mol/cm dans le méthanol. En raison de sa structure, l'OTA se révèle stable et résiste généralement aux procédés de transformations industrielles.

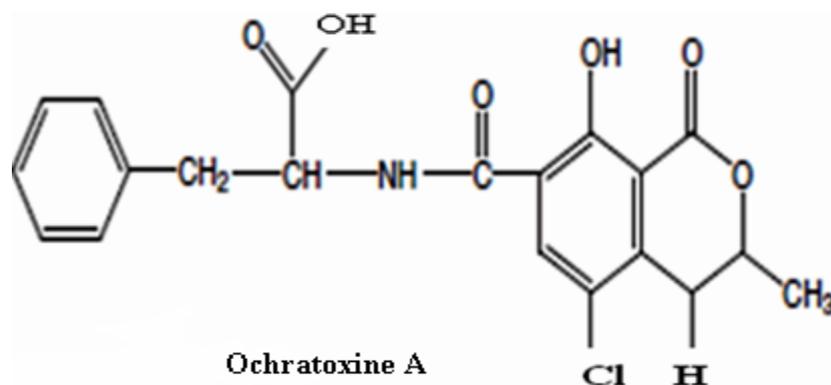
2. 3. Contamination des denrées alimentaires en OTA

L'ochratoxine A est détectée dans pratiquement toutes les céréales (maïs, blé, sorgho, riz, seigle, orge et avoine) et a été retrouvée dans de nombreuses autres denrées (graines de soja, haricots, grains de café vert, produits cacaotés, vin, jus de raisins, raisins secs, épices et herbes). On trouve aussi des petites quantités de cette mycotoxine dans les pommes de terre et les lentilles (Baydar *et al.*, 2005).

Contrairement aux aflatoxines, retrouvées plus souvent dans des céréales issues des régions chaudes, l'ochratoxine A est retrouvée dans les céréales de toutes les régions car elle peut être produite par l'*Aspergillus ochraceus* dans les régions chaudes et par le *Penicillium* dans les climats tempérés.

L'ochratoxine A entre dans la chaîne alimentaire de l'homme soit par consommation directe de produits contaminés comme les céréales et ses dérivés (pain et produits à base de farine de céréales), raisin et ses produits (jus de raisin), cacao et café, fruits, etc, soit par voie indirecte lors de la consommation de produits issus d'animaux nourris avec des grains contaminés (abats et viandes, lait). Le passage de l'ochratoxine A dans le lait de vache est

possible mais en quantité infime; en effet, les ruminants seraient capables de dégrader l'ochratoxine A grâce à leur microflore digestive, une faible quantité d'OTA est transférée dans le lait (Creppy, 2002).



Nom communs	R1	R2	R3	R4	R5
OTA	Phe*	Cl	H	H	H
OTB	Phe	H	H	H	H
OTC	Phe ethyl ester	Cl	H	H	H
OT α	OH	Cl	H	H	H
OT β	OH	H	H	H	H

*Phe : phénylalanine

Figure 2. Structure chimique générale de l'ochratoxine A et ces dérivés

3. Acide cyclopiazonique (CPA)

L'acide cyclopiazonique (CPA) est une toxine produite par certaines souches d'*A. flavus*. Le CPA est un indole acide tetramique (Figure 3) toxique pour l'Homme et l'animal. En effet, il provoque des lésions du foie, des reins, du pancréas et du cœur (Purchase, 1971). Les aflatoxines et le CPA peuvent être retrouvés dans les mêmes produits alimentaires. Ces deux mycotoxines ont d'ailleurs été isolés dans les tourteaux d'arachides ayant provoqué la « maladie X du dindon » (Dorner *et al.*, 1983; Horn et Dorner, 1999). *Aspergillus flavus* produit généralement les aflatoxines de type B1 et B2 et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais la production de ces toxines est extrêmement variable (Horn et Dorner, 2002). Certaines isolats de type « S » peuvent produire également (en plus de B1 et B2) les aflatoxines G1 et G2 (Geiser *et al.*, 2000; Cardwell et Cotty, 2002). Par contre, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les quatre types d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) mais pas le CPA comme le montre le tableau 4 (Dorner *et al.*, 1983; Horn *et al.*, 1996; Varga *et al.*, 2003). Généralement, *A. parasiticus* est fortement productrice

d'aflatoxines, et des isolats non producteurs sont rares chez cette espèce (Horn *et al.*, 1996; Tran-Dinh *et al.*, 1999).

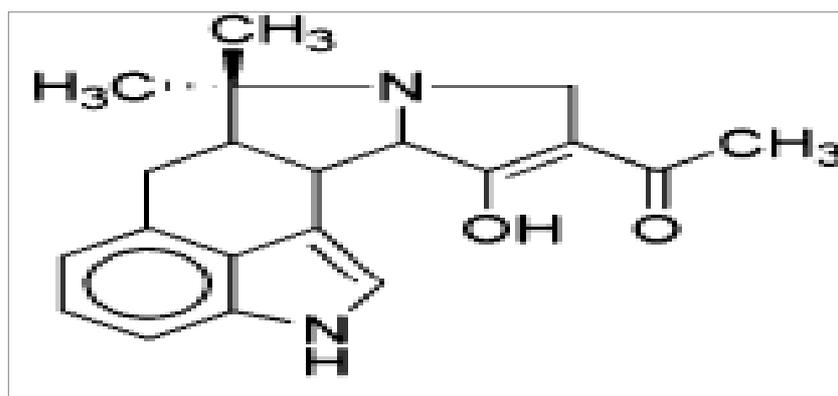


Figure 3. Structure chimique de l'acide cyclopiazonique (CPA).

Tableau 4. Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide aspergillique par les principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (Frisvad. *et al.*, 2004).

Espèces	Aflatoxines		Acide cyclopiazonique	Acide aspergillique
	B	G		
<i>Aspergillus arachidicola</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus toxicarius</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus bombycis</i>	+	+	-	+/-
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus caelatus</i>	-	-	+	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+/-	-	+/-	+
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	+	-	+/-	-
<i>Aspergillus lanosus</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus leporis</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	+	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus nomius</i>	+	+	-	+
<i>Aspergillus sojae</i>	-	-	-	+
<i>Aspergillus tamarii</i>	-	-	+/-	-
<i>Petromyces albertensis</i>	-	-	-	-
<i>Petromyces alliaceus</i>	-	-	-	-

+ : producteur. - : non producteur. ± : production variable selon les souches.

4. Réglementation

Depuis une dizaine d'années la prise de conscience du risque sanitaire associé à la présence de mycotoxines dans les aliments se généralise (Van Egmond, 1991). Conscients de ces effets graves que peuvent avoir ces toxines naturelles, Plusieurs pays ont établi ou proposé des limites réglementaires concernant les mycotoxines dans les aliments.

4.1. Réglementation relative aux aflatoxines

Le règlement 1881/2006/CE a fixé les limites maximales présentées dans le Tableau 5 pour les aflatoxines potentiellement présentes dans les denrées alimentaires. Bien que l'AFB1 soit de loin le composé le plus toxique, et le plus fréquent, la présence des autres aflatoxines dans les denrées alimentaires ne peut pas être négligée, et leurs teneurs respectives varient d'une denrée à l'autre ; c'est pourquoi le règlement 1881/2006/CE prévoit, pour des raisons de sécurité, de limiter à la fois la teneur en AFB1 et la teneur en aflatoxines totales (B1+B2+G1+G2) dans les denrées alimentaires. De même, bien que l'aflatoxine M1 soit un produit de métabolisation de l'AFB1, présent dans le lait des animaux ayant consommé des aliments contaminés par l'AFB1, et bien que cette aflatoxine M1 soit une substance cancérogène génotoxique moins dangereuse que l'AFB1, il est impératif de limiter sa présence dans le lait et les produits laitiers qui sont consommés par les êtres humains, et notamment par les enfants en bas âge. En ce qui concerne l'Algérie, les limites maximales tolérées d'aflatoxines dans les produits d'alimentations humaine et animale (FAO, 2004) sont données dans le tableau 6.

4.2. Réglementation relative à l'ochratoxine A

Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, des teneurs maximales ont été fixées pour l'OTA (tableau 7). La présence d'ochratoxine A a également été constatée dans, le cacao, produits de base de cacao et les épices. Certains signes récents attestent qu'aucune mesure préventive et aucun contrôle officiel, ne sont en place pour contrôler la présence d'OTA dans ces produits. Dans un souci de protection de la santé publique, Il convient de poursuivre la surveillance de la présence d'OTA dans ces denrées alimentaires pour lesquelles aucune teneur maximale n'a été fixée et, si des teneurs en OTA anormalement élevées devaient être constatées de manière répétée, il pourrait être jugé opportun d'en fixer une. Il y a donc lieu de modifier le règlement (CE) n° 1881/2006 en conséquence. La plupart des réglementations existantes en matière de mycotoxines en Afrique se rapportent aux aflatoxines. L'Algérie n'a, à notre connaissance, pas encore fixé les teneurs maximales en ochratoxine A dans les aliments.

Tableau 5. Teneurs maximales en aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'Union Européenne (règlement 1881/2006/CE).

Alimentation	Toxine	Denrée alimentaire	Teneur maximale en µg/kg
Humaine	Aflatoxine B1	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs.	2,5 - 8 selon le produit et son stade de transformation
		Certaines épices.	5
		Préparations à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge.	0,1
Humaine	Aflatoxines B1+B2+G1+G2	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs.	4,1 - 15 selon le produit et son stade de transformation
		Céréales.	4 - 10 selon le produit et son stade de transformation
		Certaines épices.	10
Humaine	Aflatoxine M1	Lait. Préparations pour nourrissons et enfants en bas âge.	0,05 0,025
		Matières premières des aliments pour animaux.	20
Animale	Aflatoxine B1	Aliments complets/complémentaires.	5 – 20 selon les espèces animales

Tableau 6. Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (FAO. (2004)^a.

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

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

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

Tableau 7. Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg (Règlement (C.E) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006).

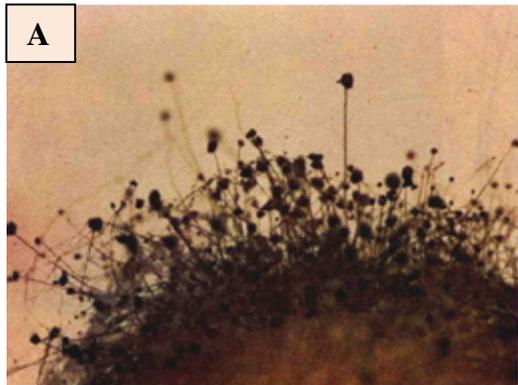
Denrée alimentaire	Teneur maximale (µg/kg)
Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin).	5
Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation directe).	3
Préparation à base de céréales pour enfants en bas âge et aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons.	0,5
Raisins secs (Corinthe, sultanines et autres raisins secs).	10
Grains de café torréfié et café torréfié moulu.	5
Café soluble (instantané).	10
Vin (rouge, blanc et rosé et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins).	2
Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué.	2

III. LES CHAMPIGNONS TOXINOGENES

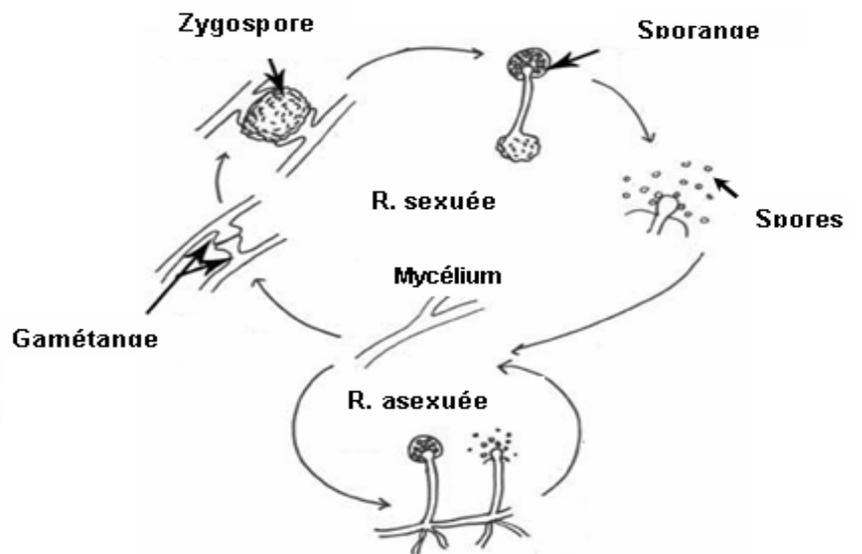
1. Classification des champignons

D'après Hawksworth *et al.*, In « Dictionary of Fungi (1995) », le règne des champignons est divisé en quatre « phylum »: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, et *Basidiomycota*. Les champignons peuvent se classer dans différentes familles. Les chytridiomycètes et les oomycètes sont caractérisés par la présence de spores munies de flagelles (un pour les chytridiomycètes, deux pour les oomycètes). Cependant, aujourd'hui la nomenclature ne retient dans le règne des champignons que les chytridiomycètes, en raison de la présence de chitine dans leur paroi et de leur nutrition qui se fait par absorption. (Chabasse *et al.*, 2002). Les zygomycètes possèdent un mycélium siphonné (non septé) et sont caractérisés par leur aptitude à fusionner leur mycélium pour former une gamétangie qui donnera des zygospores (figure 4A). Les ascomycètes et les basidiomycètes produisent des spores sexuées, respectivement dans des sacs appelés asques ou à l'extérieur des sacs appelés basides (figure 4B, 4C)). La germination des ascospores ou des basidiospores donne des filaments cloisonnés. Ils ont également un mode de reproduction asexuée, qui implique la production de conidiospores. Les autres champignons qui ne montrent pas de phase sexuelle sont habituellement classés parmi les deutéromycètes. Ces champignons imparfaits, regroupent les formes dépourvues de reproduction sexuée (reproduction uniquement par voie végétative) et ne sont plus reconnus en tant que division autonome. On place maintenant les formes asexuées dans les divisions auxquelles appartiennent leurs phases sexuées (soit *Ascomycota* ou *Basidiomycota*). La morphologie de la plupart des deutéromycètes ressemble beaucoup plus aux formes anamorphes des ascomycètes.

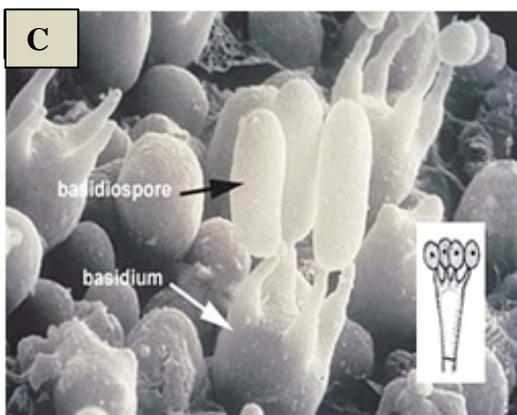
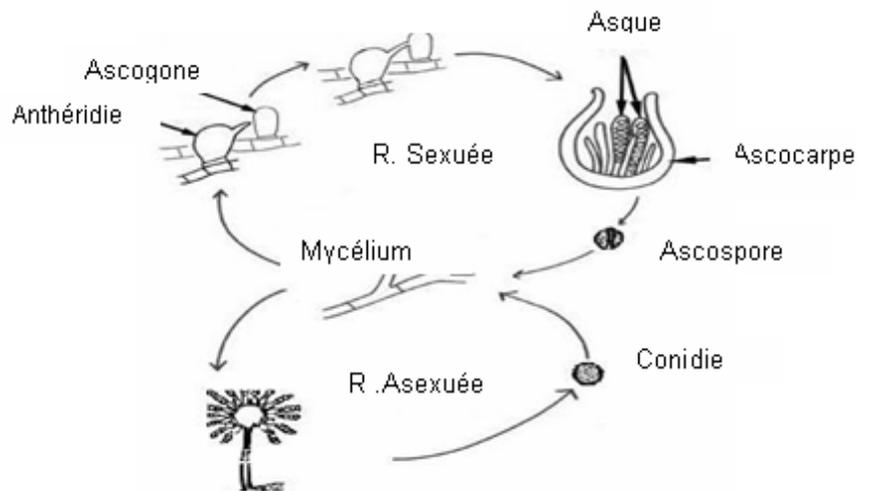
Les données biochimiques ou moléculaires permettent généralement d'attribuer ces champignons imparfaits à l'un ou l'autre de ces groupes. Dans le cas contraire, ils sont conservés provisoirement dans un ensemble artificiel (sans valeur hiérarchique dans la systématique) dénommé « ensemble des champignons mitosporiques » (Bouchet *et al.*, 1989).



Mucor



Aspergillus sp



Melanogaster sp

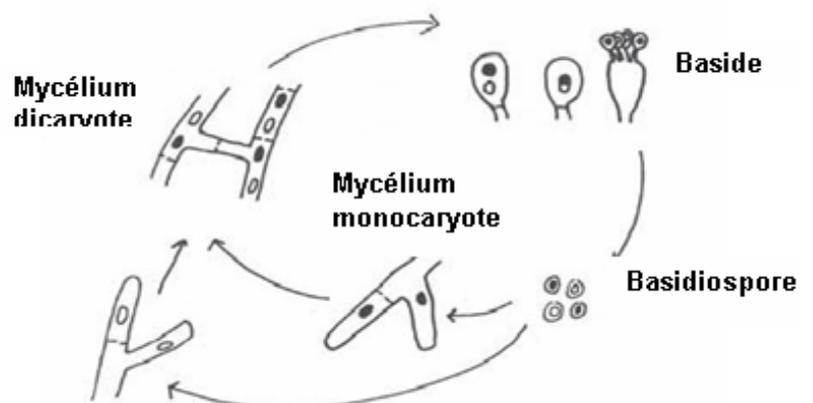


Figure 4. (A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): les basidiomycètes

2. Identification des champignons

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

2.1. Caractères morphologiques

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

2.2. Caractères moléculaires

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant pas obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006 ; Hinrikson *et al.*, 2005). Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la région ITS1-5,8s- ITS2 et IGS (Hinrikson *et al.*, 2005).

3. Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes (Ordre des Eurotiales, famille des Trichocomaceae). Le mycélium, hyalin ou coloré, portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965) (Figure 5). Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002); ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales, les épices, etc. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994).

Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines (AFs), les ochratoxines (OTA) et la patuline, ont une incidence économique et sanitaire. Ces mycotoxines ont été

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

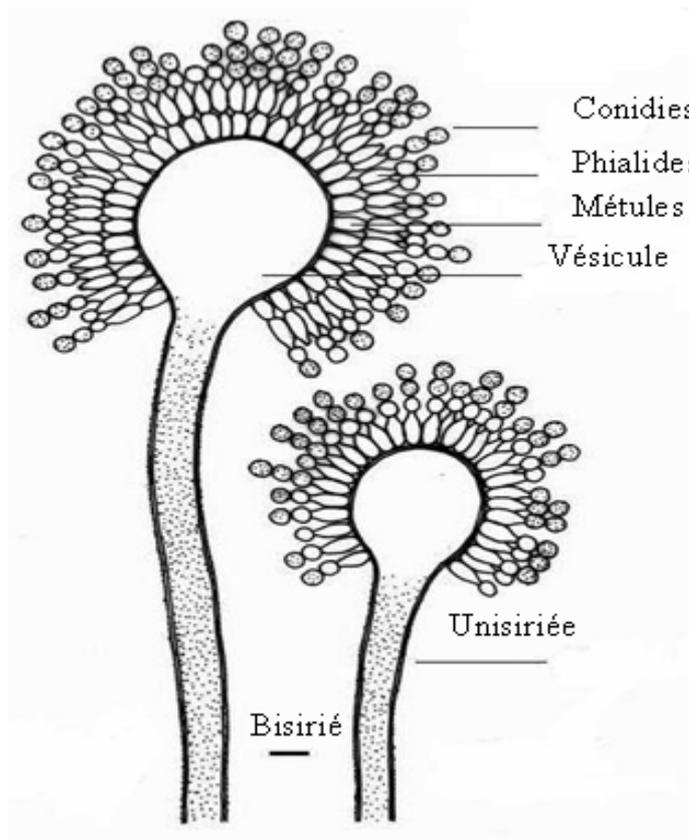


Figure 5. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*

3.1. Identification du genre *Aspergillus*

3.1.1. Description macroscopique

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-30°C ; les espèces thermotolérant (*A.fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *Aspergillus*

section *Fumigati*, vert-jaune pour *Aspergillus* section *Flavi*, brun cannelle pour *Aspergillus* section *Terrei*, jaune à ocre pour *Aspergillus* section *Circumdati*, noir pour *Aspergillus* section *Nigri* et blanche pour *Aspergillus* section *Candidi*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993). Certaines espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de former des amas mycéliens compacts, souvent durs, globuleux, ellipsoïdaux ou allongés, appelés sclérotés, qui aident le champignon à survivre dans des conditions hostiles (Wicklow et Shotwell, 1983).

3.1.2. Description microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur la quelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Badillet *et al.*, 1987 ; Raper et Fennell, 1965). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir. L'ensemble vésicule ± métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*

4. Classification des espèces d'*Aspergillus*

En 1729, Micheli fut le premier à mettre en place une taxonomie du genre *Aspergillus* et en 1926 Thom et Church établirent la première classification complète du genre. Publiée en 1965, la monographie de Raper et Fennell « the genus *Aspergillus* » reconnaît près de 132 espèces réparties en 18 groupes. Cette classification, basée surtout sur les caractères culturels et morphologiques, est encore valable et utilisée par de nombreux mycologues.

Ce n'est qu'en 1985 que Samson et Pitt ont proposé la création de sous-genres et de section. Complétant les descriptions morphologiques essentielles, l'analyse phylogénique des séquences de l'ADNr entreprise par Peterson, (2000) a conduit à une classification aboutissant à un total de 18 sections (*Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Terrei*, *Fumigati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Versicolores*, *Candidi*, *Wentii*, *Usti*, *Restricti*, *Flavipedes*, *Cremeri*, *Cervini*, *Sparsi*, *Ornati* et « *Warcupiella* group »). Cette classification est la plus admise par la plupart des mycologues.

4.1. *Aspergillus* section *Flavi*

Les membres d'*Aspergillus* section *Flavi* (groupe d'*A. flavus*) occupent des niches écologiques très diverses. Les espèces de cette section peuvent être présentes dans la nature soit comme des saprophytes dans le sol ou comme des parasites des plantes, des insectes et des animaux (Horn et Dorner, 1998). Dans cette section, *A. flavus* et *A. parasiticus* retiennent le plus d'attention car elles sont non seulement pathogènes pour certaines plantes (arachides, maïs et coton), mais elles produisent les aflatoxines (Smith et Moss 1985). De plus, ce sont les espèces les plus fréquentes. Les espèces non productrices d'aflatoxines telles que *A. oryzae*, *A. sojae* et *A. tamarii* sont utilisées dans les processus de fermentation (Geiser *et al.*, 1998).

4.1.1. Les espèces de la section *Flavi* et la production des aflatoxines

De très nombreuses études ont été menées sur ce groupe (Samson et Pitt, 2000). D'après Samson *et al.* (2006), il y'a 18 espèces appartenant à la section *Flavi* (Tableau 4), dont neuf espèces sont aflatoxinogènes. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, et *A. nomius* sont les espèces productrices d'aflatoxines les plus communes, *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et B2 alors qu'il ne produit habituellement ni l'aflatoxine G1 ni G2. *Aspergillus parasiticus* produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2). Enfin, *A. nomius*, une souche rare très proche d'*A. flavus*, est capable de produire les aflatoxines B et G (Kurtzman *et al.*, 1987). Les espèces de cette section sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 28°C (Domsch *et al.*, 1980). Ces champignons peuvent se développer dans un milieu présentant une activité de l'eau (a_w) située entre 0,78 et 0,80 avec un pH allant de 2,1 à 11,2 (Ayerst, 1969 ; Olutiola, 1976). Ils sont plus présents dans les régions tempérées chaudes comme les régions tropicales et sub-tropicales.

La taxonomie de ces espèces est compliquée de part la grande similarité qui existe entre elles et vu l'instabilité des différents caractères morphologiques qui caractérisent chacune d'elle. Donc, morphologiquement, il est très difficile de distinguer entre les différentes espèces appartenant à cette section, c'est pourquoi la différenciation est basée non seulement sur les caractères morphologiques mais aussi sur une approche polyphasique (profil des métabolites) (Frisvad *et al.*, 2004) et sur les caractères moléculaires (séquençage de la région ITS1-ITS2, β -tubulines). Dans les derniers travaux réalisés par Pildain *et al.* (2008), 12 métabolites ont été étudiés pour distinguer entre les différentes espèces du genre *Aspergillus* section *Flavi*. Ces métabolites sont: AFB1, AFG1, CPA, acide aspergillique, asperfurane, parasiticolides, chrysogine, aflavarines, paspalinine, aflatrems, nominine et l'acide Kojique (Tableau 8).

Tableau 8. Production d'AFs B et G, de CPA et d'autres métabolites par les espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (D'après Pildain et al., 2008).

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

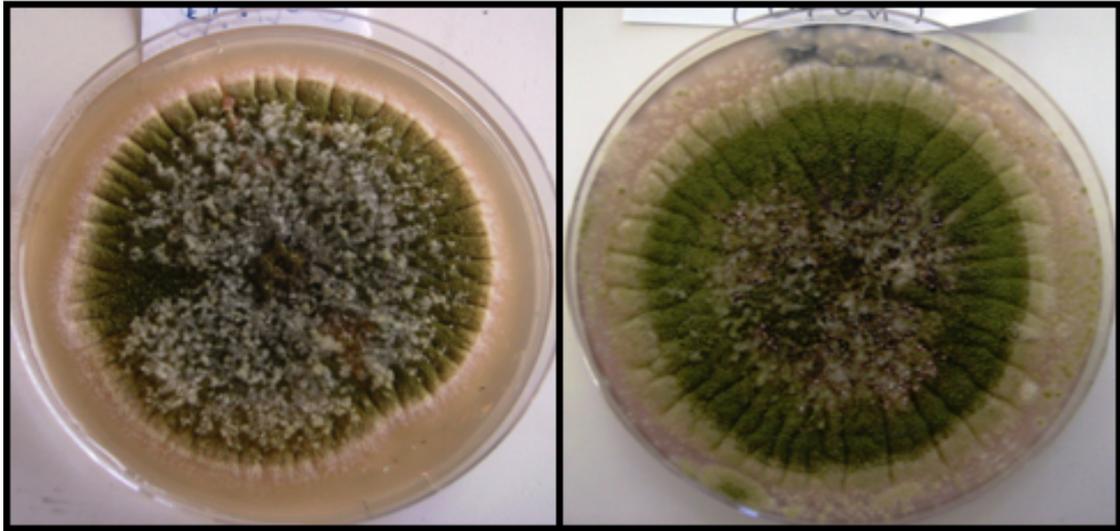
A: aflatoxine B1; **B:** aflatoxine G1; **C:** acide cyclopiazonique; **D:** acide aspergillique; **E:** asperfurane; **F:** parasiticolides; **G:** chrysogine; **H:** aflavarines; **I:** paspalinine; **J:** aflatremes; **K:** nominine. **L:** acide Kojique.

L'identification moléculaire peut permettre une différenciation rapide des différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que celle d'autres moisissures, pathogènes ou opportunistes (Dial, 2007). Les sondes d'oligonucléotide, dirigées vers la région ITS2 de l'ADN ribosomal de l'*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus*, et *A. versicolor* ont permis la différenciation de 41 isolats et n'ont donné aucune réaction faussement positive avec 33 espèces d'*Acremonium*, *Exophiala*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ou d'autres espèces d'*Aspergillus* (de Aguire, *et al.*, 2004). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (Boysen *et al.*, 2000 ; Hageskal *et al.*, 2006).

De nombreux travaux visent aussi à utiliser les progrès de la biologie moléculaire afin de dépister rapidement les souches fongiques toxigènes (Niessen, 2007). Ces travaux sont basés sur une approche moléculaire multi-locus (séquençage de plusieurs gènes cibles comme la β -tubuline, la calmoduline, l'actine). Les études d'El achkar *et al.*, (2007) ont montré que le séquençage de gène de la β -tubuline a pu différencier la totalité des 30 espèces de moisissures, les mêmes résultats ont été obtenus par Glass et Donaldson, (1995).

4.1.1.1. *Aspergillus flavus*

Etant donné sa dominance et son importance dans la production d'aflatoxines, nous décrivons ci-après les caractères d'*A. flavus*. Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, plus dense vers le centre, lâche en périphérie. Des colonies granuleuses sur Malt Agar (MA) montrant un revers incolore à beige clair, fertile sur toute la surface alors que sur milieu *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA), un revers orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique (25 à 60 μ m de diamètre). Ces têtes sont uni ou bisériées, selon leur degré de maturation radiées, de couleur vert jaune à vert olive. La vésicule est sphérique entièrement recouverte ou au trois quart, donnant des phialides verdâtres, de dimensions (6-10 μ m x 4-5.5 μ m) à disposition radiaire ou en colonne. Les conidies gris pâle sont subsphériques à ellipsoïdales, échinulées et mesurent 3 à 4.5 μ m de diamètre. Les conidiophores sont longs (jusqu'à 1mm de longueur) et les plus âgés sont rugueux. Les sclérotés sont souvent produits chez les isollements jeunes, de taille et de formes variables, souvent brunes à noirs (Pitt et Hocking, 1997) (Figure 6). *Aspergillus flavus* est une espèce génétiquement très complexe et a été subdivisée en deux catégories, selon les caractères morphologique et génétique, et le profil de production des mycotoxines (Samson *et al.*, 2006). Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première catégorie produit des grands sclérotés, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 μ m. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 μ m



A: aspect macroscopique d'*Aspergillus flavus* sur milieu CYA.

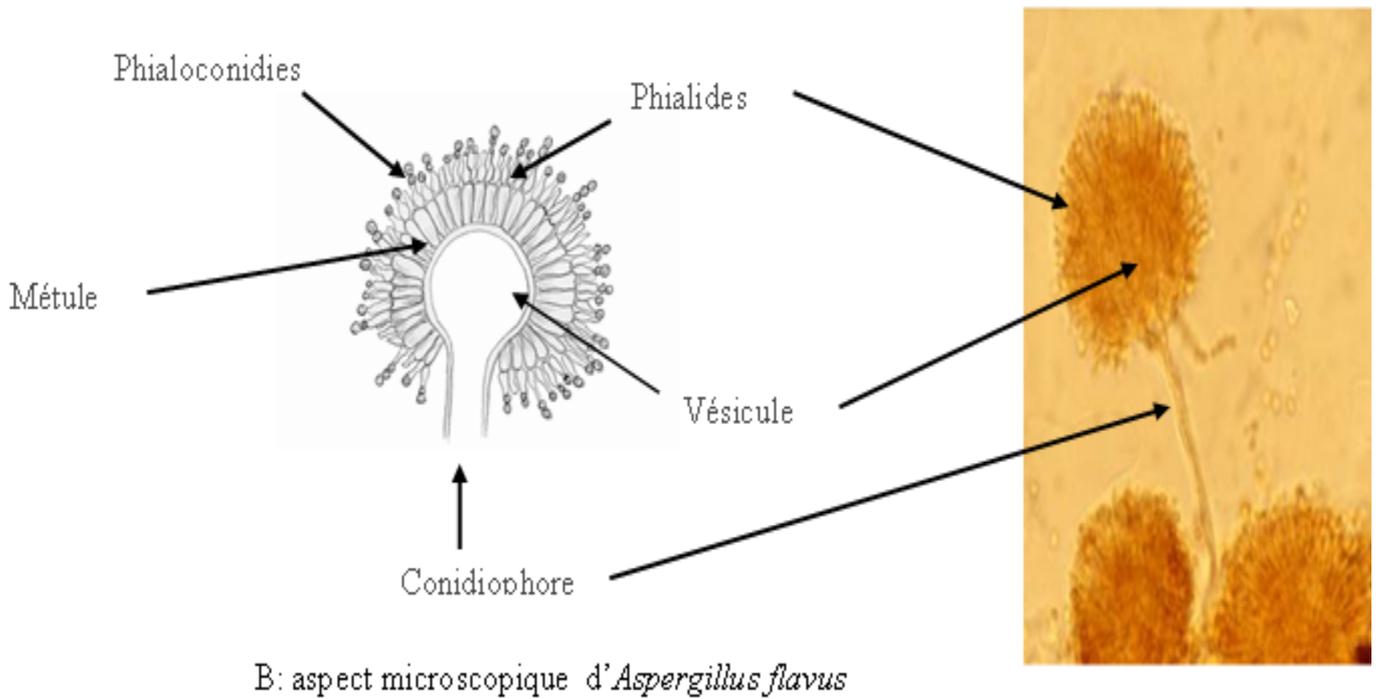


Figure 6. Aspects macroscopique et microscopique d'*Aspergillus flavus*.

(Cotty, 1989). Selon Geiser *et al.* (1998, 2000) et Vaamonde *et al.* (2003), *A. flavus* est divisé en deux groupes. Le groupe I comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le groupe II comprend uniquement le type « S » capable de produire les aflatoxines B et G. D'après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des isolats producteurs et des isolats non producteurs.

4.1.1.2. *Aspergillus parasiticus*

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

4.2. *Aspergillus* Section *Circumdati*

Ce groupe est particulièrement bien connu pour sa production de l'ochratoxine A (Van der Merwe *et al.*, 1965). Les espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* possèdent des conidies de couleur jaunes à ocre et des sclérotés de couleur brun clair à brun foncé, et produisent au moins un des métabolites suivants: ochratoxines, acide pénicillique, xanthomegnines ou melleine (Samson *et al.*, 2006).

4.2.1. Les espèces de la section *Circumdati*

Sur la base de la production de métabolites et le séquençage partiel du gène codant pour la β-tubuline, 19 espèces ont été distinguées (Samson *et al.*, 2006). Ces espèces ne sont pas différenciables par les caractères macro et micromorphologiques. Les espèces de la section *Circumdati* et leurs différents métabolites sont présentés dans le tableau 9.

4.2.1.1. *Aspergillus ochraceus*

Aspergillus ochraceus est largement répandu dans l'environnement. Ce champignon a été fréquemment isolé à partir des végétaux en décomposition, de sol, de déserts. *Aspergillus ochraceus* est principalement responsable de la pourriture des semences et des graines. Il peut produire plusieurs métabolites secondaires dont les mycotoxines comme les ochratoxines, l'acide pénicillique, la xanthomegnine, et la melleine (herbicide). Il contamine plusieurs produits agricoles comme les céréales, le café, les épices, les cacahuètes et le maïs (Kozakiewicz, 1989;

Wilson *et al.*, 2002). *Aspergillus ochraceus* est considéré comme la principale espèce productrice d'ochratoxine A dans les climats chauds.

Sur milieu Malt Extract Agar (MEA), la colonie est de texture granuleuse et de couleur ocre à chamois claire. Le revers est brun clair (Cahagnier *et al.*, 1998). Sur milieu Czapek Yeast extract Agar (CYA), le diamètre de la colonie est de 40 à 52 mm après 7 jours d'incubation à 25°C. Le stipe est rugueux et pigmenté, de 400 à 1000 µm de long. Les vésicules sont sphériques à légèrement allongées portant des métules (bisériée), de diamètre de 20 à 35 µm. Les conidies sont globuleuses, lisses ou faiblement échinulées de 2,5 à 3,5 µm de diamètre (Figure 7) (Pitt et Hocking, 1997; Cahagnier, 1998). Les espèces de cette section sont rencontrées surtout dans le café, mais aussi dans le riz (Uchiyama *et al.*, 1976), le blé et le maïs à des teneurs relativement faibles (Wallace et Sinha, 1962).

4.3. *Aspergillus* section *Nigri*

Parmi les champignons filamenteux, *Aspergillus* section *Nigri* est un groupe qui joue un rôle très important en bioindustrie (Campbell-Platt et Cook, 1989). Plusieurs souches de cette section sont utilisées dans l'industrie des fermentations pour la production d'acides et d'enzymes d'hydrolyse. *Aspergillus awamori* et *A. niger* sont utilisées pour la production d'enzymes extracellulaires (amylases et lipases) et d'acides organiques (acide citrique et gluconique), utilisés comme additifs alimentaires. Cependant, la production de l'OTA par les aspergilli noirs dont *A. niger* et *A. carbonarius* n'est pas sans importance, car ce groupe de champignons est très répandu dans les aliments. En effet, parmi les champignons rencontrés dans les denrées alimentaires, *A. niger* est le plus répandu dans les climats chauds, que ce soit au champ ou durant le stockage. *A. niger* est isolé couramment des arachides, noix de pécan, pistaches, noisettes, noix, noix de coco et coprah. Cette espèce est également rencontrée dans les céréales et les graines oléagineuses notamment le maïs, le blé, le riz stocké et échaudé, l'orge, le soja, le sorgho et les haricots secs (Pitt et Hocking, 1997).

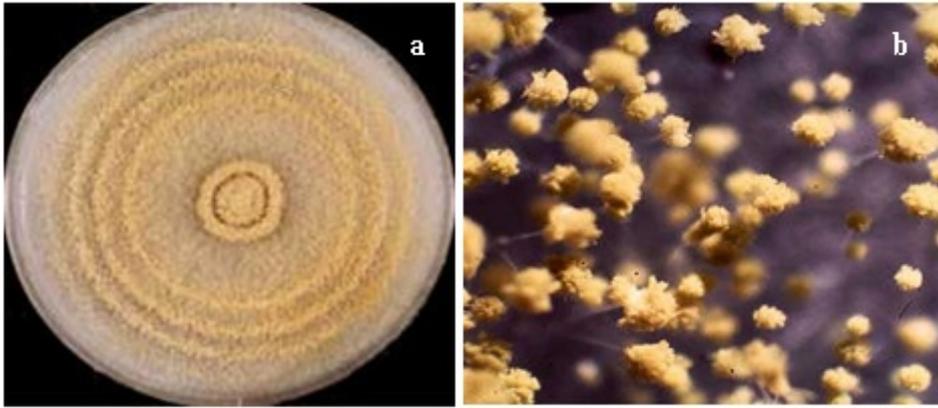
4.3.1. Description morphologique de la section *Nigri*

Les *Aspergillus* noirs, définis « groupe d'*A. niger* », présentent des colonies foncées, souvent noires, et des conidiophores unisériés ou bisériés (Figure 8). Ils ont été isolés dans une grande variété de produits de par le monde et sont considérés comme des champignons ubiquitaires responsables de la dégradation des aliments et de la biodégradation d'autres matériaux.

Tableau 9. Espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* et leurs métabolites (Frisvad *et al.*,2004)

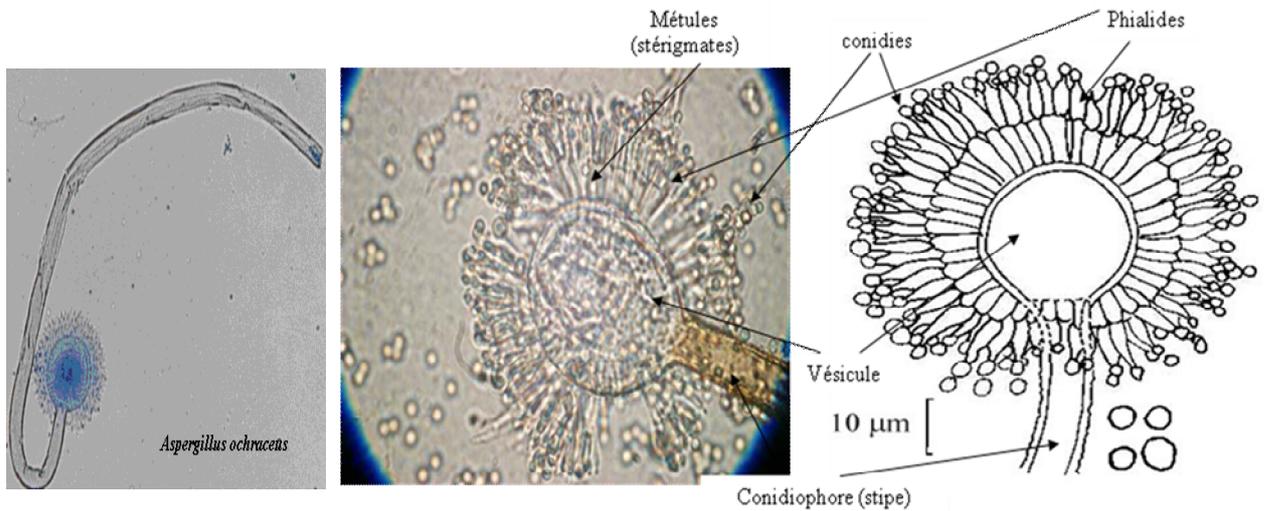
Espèce	Ochratoxine A	Acide pénicillique	Xanthomégnines	Melléine
<i>A. auricomus</i>	-	+	+	+
<i>A. bridgeri</i>	-	+	+	-
<i>A. cretensis</i>	+	+	-	+
<i>A. elegans</i>	-	-	+	-
<i>A. flocculosus</i>	+	+	+	+
<i>A. insulicola</i>	-	+	+	+
<i>A. melleus</i>	-	+	+	+
<i>A. neobridgeri</i>	-	+	+	-
<i>A. ochraceus</i>	+/-	+	+	+
<i>A. ostianus</i>	-	+	+	+
<i>A. persii</i>	-	+	+	-
<i>A. petrakii</i>	-	+	+	+
<i>A. pseudoelegans</i>	+	+	-	+
<i>A. roseoglobulosus</i>	+	+	+	-
<i>A. sclerotiorum</i>	+/-	+	+	-
<i>A. steynii</i>	+	-	+	+
<i>A. sulphureus</i>	+	+	+	-
<i>A. westerdijkiae</i>	+	+	+	+
<i>A. muricatus</i>	+	+	+	-

* gras : se sont des espèces ochratoxinogènes



a: aspect macroscopique du mycélium produisant des sclérotés (point bruns).

b: conidiophores et têtes conidiennes (GX70).



Aspect microscopique de la tête conidienne (Gx650).

Structure détaillée de tête conidienne

Figure 7. Aspects macroscopique et microscopique d'*Aspergillus ochraceus* (www.univ-brest.fr/.../Myco/fiches/aspeochra.htm)

4.3.2. Les espèces de la section *Nigri* et leurs pouvoirs producteurs d'ochratoxine A

Raper et Fennell (1965) a retenu 12 espèces dans ce groupe. Depuis, de nombreuses études se sont enchaînées sur la taxonomie de ce groupe et plusieurs changements ont été apportés sur la taxonomie des espèces. Les dernières études datent de l'année 2004 et 2006 (Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2004 ; Samson *et al.*, 2006), a distingué la section *Nigri* en deux grands groupes:

- Le groupe formant les espèces unisériées

Il est représenté par *Aspergillus japonicus* et *A. aculeatus*. Raper et Fennell (1965) ont considéré ces 2 taxons comme 2 espèces distinctes. Pitt et Hocking (1997) considèrent qu'*A. japonicus* et *A. aculeatus* présentent des différences assez importantes du point de vue morphologique et production de métabolites pour ne pas les considérer comme deux espèces différentes. Les études basées sur la RFLP ont pu montrer des différences entre les 2 taxons (Pařenicová *et al.*, 2000). Cependant le séquençage de la région ITS1-5,8S -ITS2 de l'ADNr n'a pas abouti à différencier *A. japonicus* de *A. aculeatus*; il a juste permis de séparer les unisériées des bisériées (2 clades distincts).

- Le groupe formant les espèces bisériées

Il renferme *A. carbonarius* et *A. niger* « aggregate ». *Aspergillus carbonarius* peut facilement être distingué des autres espèces par la taille de ses conidies qui est supérieure à 6 µm de diamètre. *A. niger* « aggregate » forme un groupe d'espèces extrêmement difficile à différencier morphologiquement. De nombreux travaux sur les caractères morphologique, biochimique et moléculaire ont tenté de distinguer entre les espèces de ce groupe. Sur la base de l'étude des caractères phénotypiques, la production de métabolites et le séquençage du gène de la β-tubuline, 15 espèces sont actuellement acceptées provisoirement dans la section *Nigri* (Samson *et al.*, 2006): Deux espèces unisériées: *A. japonicus* et *A. aculeatus* et treize espèces bisériées dont *A. carbonarius* et 12 espèces d'*A. niger* « aggregate ». Parmi les 15 espèces de la section *Nigri*, quatre sont ochratoxinogènes: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. lacticoffeatus* et *A. sclerotiumniger*.

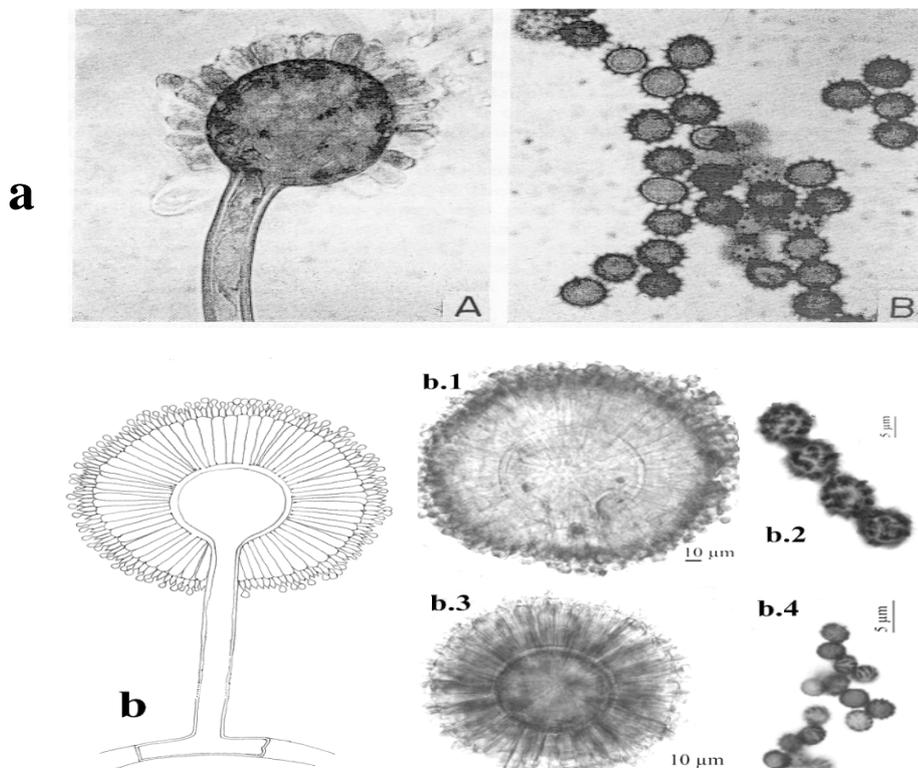
D'autres espèces du genre *Aspergillus* ont été également rapportées ochratoxinogènes, ces espèces sont:

Aspergillus terreus : colonie brun-beige à brun-orangé, avec têtes conidiennes bisériées en forme de longues colonnes

Aspergillus fumigatus: colonies bleu-vert à turquoise, veloutées et à bordure blanche, avec un revers incolore à gris-vert pâle. Au microscope: têtes unisériées, vésicules piriformes allongées très caractéristiques avec des phialides portées sur la moitié supérieure et un stipe lisse. Cette espèce est thermotolérante (température optimale: 37-43°C).



Aspects macroscopiques d'*Aspergillus* section *Nigri* sur milieu CYA



a: tête unisérié. Tête conidienne (A) et conidies (B) d'*A.japonicus* var. *aculeatus*

b : *A. carbonarius* : tête conidienne bisériée (b.1) et conidies (b.2) ; *A. niger* aggregate : tête conidienne bisériée (b.3) et conidies (b.4).

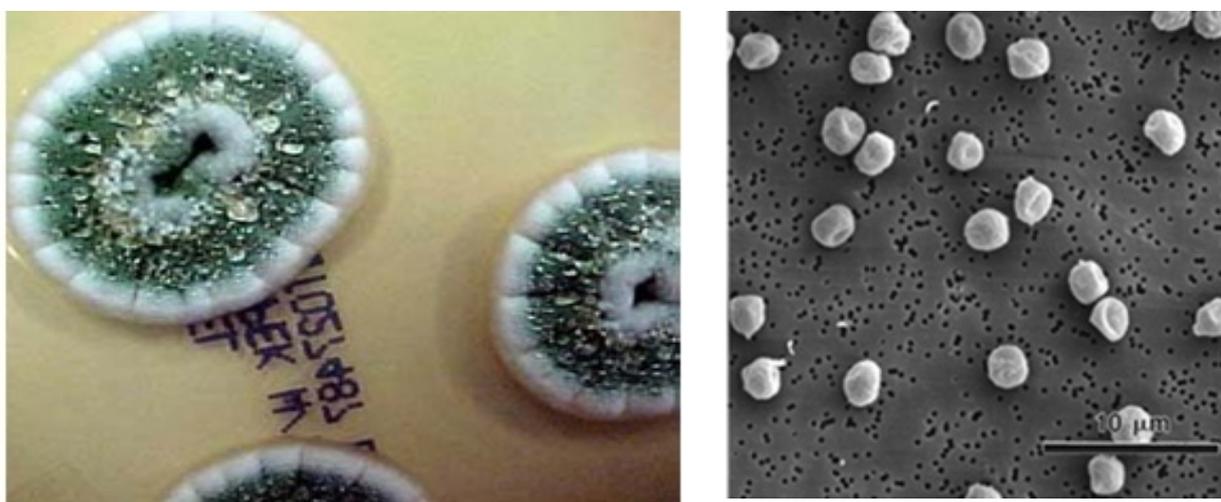
Figure 8. Aspects macroscopique et microscopique d'*Aspergillus* section *Nigri* sur milieu CYA (Abarca *et al.*, 2004)

5. Autres genres ochratoxinogènes

5.1. *Penicillium verrucosum*

Différentes études s'intéressant aux champignons isolés de plusieurs aliments ont montré le faible pourcentage des *Penicillium* producteurs d'OTA (Pitt, 1987; Mills *et al.*, 1989). Longtemps confondu avec *P. viridicatum* (Ciegler *et al.*, 1973), *P. verrucosum* a fini par en être différencié et reconnu comme l'unique espèce ochratoxinogène au sein du genre *Penicillium* (Frisvad et Samson, 1991; Frisvad *et al.*, 1999). C'est une espèce ubiquiste. Elle se développe sur de nombreux substrats organiques, notamment les céréales et les produits laitiers. Ce champignon est le principal producteur d'OTA en climat tempéré. Il pousse entre 0 et 30°C avec une température optimale de 20°C. Le pH optimal se situe entre 6 et 7 mais il peut croître avec une activité de l'eau (A_w) de 0.80. Toutefois, on peut retrouver un taux significatif d'OTA à 4°C et avec une (A_w) > 0.86 (Sweeney et Dobson, 1998).

Sur milieu CYA, les colonies présentent un diamètre de 28-32 mm, le mycélium est de texture veloutée à granuleuse ou moins souvent floconneuse. La marge est blanche, étroite (1-2mm) et fine. La conidiogénèse est modérée à forte, jaune-vert. Il y a une production d'exsudat jaune pâle, marron pâle ou rose pâle. Le revers est orange-brun pâle. Les phialides sont ampulliformes à col et les conidies sont sphériques (Pitt, 1987) (figure 9).



Colonie de *P. Verrucosum* après 7 jours sur milieu CYA Conidies de *P. Verrucosum* 1400X

Figure 9. Aspect macroscopique du genre *Penicillium verrucosum*

IV. LES ÉPICES ET LES LEGUMES SECS

1. Les épices

Les épices et les herbes aromatiques, sont des produits d'origine végétale utilisés dans notre alimentation pour assaisonner les plats ; elles apportent une saveur originale à la préparation culinaire, dans laquelle ils sont incorporés. Elles sont pour une bonne part responsable des plaisirs de la table et n'ont aucune valeur nutritionnelle. (Richard., 1992).

Le mot épice du mot latin (*species*) qui veut dire les « fruits de la terre ». Les épices, contrairement aux herbes, sont issus d'une partie de la plante, écorce (cannelle), bourgeon (clou de girofle), fleurs (safran), fruit (piment de Jamaïque), racines (gingembre), grain (cumin). Elles proviennent des régions tropicales et semi-tropicales et elles sont très aromatiques du fait de leurs fortes compositions en huiles volatiles (Delaveau, 1987).

1. 2. Les principales épices et leurs compositions et utilisation

Les épices sont constituées de composés organiques dont l'oléorésine, qui contient les principes actifs lesquels se répartissent en trois catégories à savoir: les éléments volatils de l'huile essentielle (cinnamaldehyde, safranal, limonene, carvone, cuminaldehyde, myristicine, eugénol, anéthole, menthol) qui confèrent aux épices l'odeur, les pigments apolaires qui sont responsables de la couleur et les composés sapides (capsaïcine, pipérine, gingerol, sinalbine, curcumine, capsanthine, crocetine) qui confèrent aux épices leur saveur (Richard, 1992).

Le domaine de leur utilisation en l'état ou sous forme de poudre ou d'extraits et extrêmement vaste. Nous citons entre autre l'emploi culinaire, pharmaceutique, industriel (parfumerie, cosmétologie) industries agroalimentaires (comme la charcuterie industrielle).

Les principales épices et leurs utilisations sont données dans le tableau 10. Les épices sont nécessaires dans la plupart des segments de l'industrie alimentaire, en particulier dans la transformation des viandes, poissons, légumes, soupes, produits de boulangerie et autres aliments préparés. Dans la plupart des cas, l'industrie de la viande est la plus grande utilisatrice d'une large gamme d'épices. La consommation d'épices dans les industries non alimentaires, tels que les secteurs pharmaceutiques et de parfumerie, n'est pas élevée (Fazli, 1992).

1.3. Contamination des épices

Les épices comptent parmi les produits de la chaîne alimentaire les plus contaminés. La contamination des épices est tributaire d'un bon nombre de facteurs dont, l'origine des plantes, l'écologie du milieu, les conditions de transport (hygrométrie et température), ainsi que le mode de récolte, de collecte, de préparation, du séchage, du stockage et du conditionnement (Richard., 1992) (Tableau 11).

Tableau 10. Principales épices et leurs utilisations synthétisées d'après les données de Teuscher *et al* (2005).

Famille botanique	Epices	Nom latin	Molécules	Utilisation en médecine traditionnelle	Utilisation culinaire
<i>Lauraceae</i>	Cannelle	<i>Cinnamomum</i> sp.	cinnamaldehyde	carminative astringent	Aromatisée les plat salé et sucré, tajine
<i>ombellifères</i>	Carvi	<i>Carum carvi</i>	Carvone	Contre les maux de tête	Pain, pâtisserie, rôtis
	Anis	<i>Pimpinella anisum</i>	Anéthole	Apéritif et digestif	Pain, pâtisserie, volaille
	Coriandre	<i>Coriandrum sativum</i>	coriandrole	Apéritif, antibactérien	Potage, viande, salade
	Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>	cuminaldehyde	Apéritif, contre le ballonnement	Volaille, kebabs, légumes
	Fenouil	<i>Foeniculum vulgare</i>	anéthole	Soulage les flatulences de nourrissons	Salade, soupe de poisson, confiserie
<i>pépiraceae</i>	Poivre noir	<i>Piper nigrum</i>	pipérine	Contre les nausées, antibactérien	Curry (mélange du poivre avec le curcuma)
<i>solanaceae</i>	Piment rouge	<i>Capcicum sp</i>	capsaïcine	Préparation des emplâtres	Soupe à saveur brûlante, harissa
<i>Iridaceae</i>	safran	<i>Crocus sativus</i>	safranal	Contre le ballonnement	Colorant
<i>zingibaraceae</i>	gingembre	<i>Zingiber officinale</i>	gingirole	Apéritif, digestif	Boissons rafraîchissantes, viande, poisson

Parmi les contaminants identifiés dans les épices, on relève des bactéries, des champignons toxigènes (aflatoxine, ochratoxine), des pesticides, des solvants et des métaux lourds. Parmi les microorganismes identifiés dans les épices et herbes aromatiques séchées, on relève : *A. flavus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, etc (Mckee, 1995).

Tableau 11. Contamination des herbes et des épices (Mckee., 1995)

Epices	UFC/g*	Herbes	UFC/g
cumin	>10 ⁷	aneth	>10 ⁶
curcuma	>10 ⁷	basilic	>10 ⁷
gingembre	>10 ⁷	persil	>10 ⁵
paprika	>10 ⁷	thym	>10 ⁶
poivre	>10 ⁸		

*UFC : Unité Formant Colonies

La FDA (Food & Drug Administration) a rapporté qu'entre les années 1970 et 2002, vingt-et-un échantillons d'épices importées aux États-Unis d'Amérique ont été refusés en raison d'une teneur élevée en salmonelle. Le paprika était l'épice la plus contaminée (Vij *et al.*, 2006).

Dans ce domaine, le traitement par les radiations ionisantes, qui se développe de plus en plus, et le traitement à l'oxyde d'éthylène sont les meilleures techniques de décontamination tant sur le plan des qualités organoleptiques que nutritionnelles. Or le traitement à l'oxyde d'éthylène est interdit depuis le 31 décembre 1990. Seuls les procédés d'ionisation illustrés dans la figure 10 restent autorisés. Actuellement on peut affirmer que l'état sanitaire des produits sur le marché est à peu près satisfaisant (Richard., 1992).

4.1. Le commerce des épices

Le commerce international des épices est estimé actuellement à environ 400.000 tonnes par an, qui correspond à 1,5 milliard de dollars par an. La valeur totale dépend dans une large mesure des prix en vigueur de poivre, qui est l'épice leader sur le marché mondial. Ce commerce a augmenté régulièrement au cours des deux dernières décennies, cependant, les marchés au Moyen-Orient, en particulier l'Arabie Saoudite ont connu une importante augmentation du commerce des épices, en termes de valeur, principalement en raison des importations considérables de cardamome et de poivre. Ces marchés détiennent une part de plus de 80% de la consommation mondiale totale de la cardamome. (Fazli., 1992).

Le Maroc, l'Algérie et la Libye sont de grands acheteurs de poivre, mais la demande de ces derniers est étroitement liée à la fluctuation des prix. (Fazli., 1992) (Figure 11).

2. Les légumes secs

Les légumes secs (ex : pois chiche, haricot, lentille, fève, petits pois) sont des graines, issues exclusivement de plantes de la famille des légumineuses récoltées à maturité pour la consommation humaine. Ce sont des aliments riches en glucides, environ 60 %, essentiellement de l'amidon, et en protéines, environ 20 %. Toutefois en raison de leur déficience en certains acides aminés, on aura avantage à les associer à des céréales, en particulier dans les régimes végétariens. Ils sont intéressants aussi pour leurs apports en fibres et éléments minéraux, notamment en fer et en calcium. Leur faible teneur en eau permet un stockage relativement facile. L'utilisation des pesticides en particulier les fumigants et depuis peu, l'ionisation limitent la contamination et les pertes lors de l'entreposage. (Vierling., 2008). Les graines des légumineuses représentent une source potentielle de nutriments et de protéines en particulier. D'un point de vue chimique, ils apportent à poids égal autant de calories que les céréales. Leurs teneurs en protéines sont élevées de 17 à 25 soit deux fois celles des céréales (Aykroyd et Doughty, 1982). La teneur en lipides est variable entre 1,4% et 2,0 % à l'exception du pois chiche qui représente une source relativement riche en lipide 3,4 % (Vierling, 2008). Leurs apports en éléments minéraux sont intéressants, elles sont particulièrement riches en calcium et en fer (Grusak, 2000). Leurs teneur en potassium est considérable, alors que la teneur en sodium est faible sauf lorsqu'il s'agit de conserve de pois ou d'haricot (Besançon, 1978). Leur teneur en fibre est environ 10 à 17 % dont près des 2/3. Les légumineuses sont retrouvées dans le régime alimentaire de plusieurs millions de personnes dans le monde. Elles sont cultivées partout, mais plus particulièrement en Inde, en Chine, au Canada, en Australie, au Brésil et au Nigeria (Gower., 2002). Ces denrées alimentaires sont consommées dans tous les continents, mais la demande à l'importation provient principalement des pays du Moyen-Orient, de l'Afrique du nord, de l'Amérique latine et de sous continent indien (Gower., 2002). En Algérie, les légumineuses alimentaires sont depuis toujours présentes dans nos systèmes agraires et représentent une portion de l'alimentation humaine, surtout pour les ménages aux revenus limités. Elles sont, représentées par le pois chiche, les lentilles, le pois sec, les haricots secs et la fève/fèverole sont cultivées partout en Algérie, de la zone littorale jusqu'aux Hauts-Plateaux, voir meme dans certaines régions sahariennes (Zaghouane, 1997). Cette culture a un intérêt national car elle permet de satisfaire les besoins, et de réduire les importations de ces denrées. La production des légumineuses en Algérie reste toujours faible, les importations ont largement augmenté pour satisfaire une consommation humaine sans cesse croissante, la demande est passée de 14000 tonnes à 175000 tonnes en l'espace de 10 ans (1990-2000).

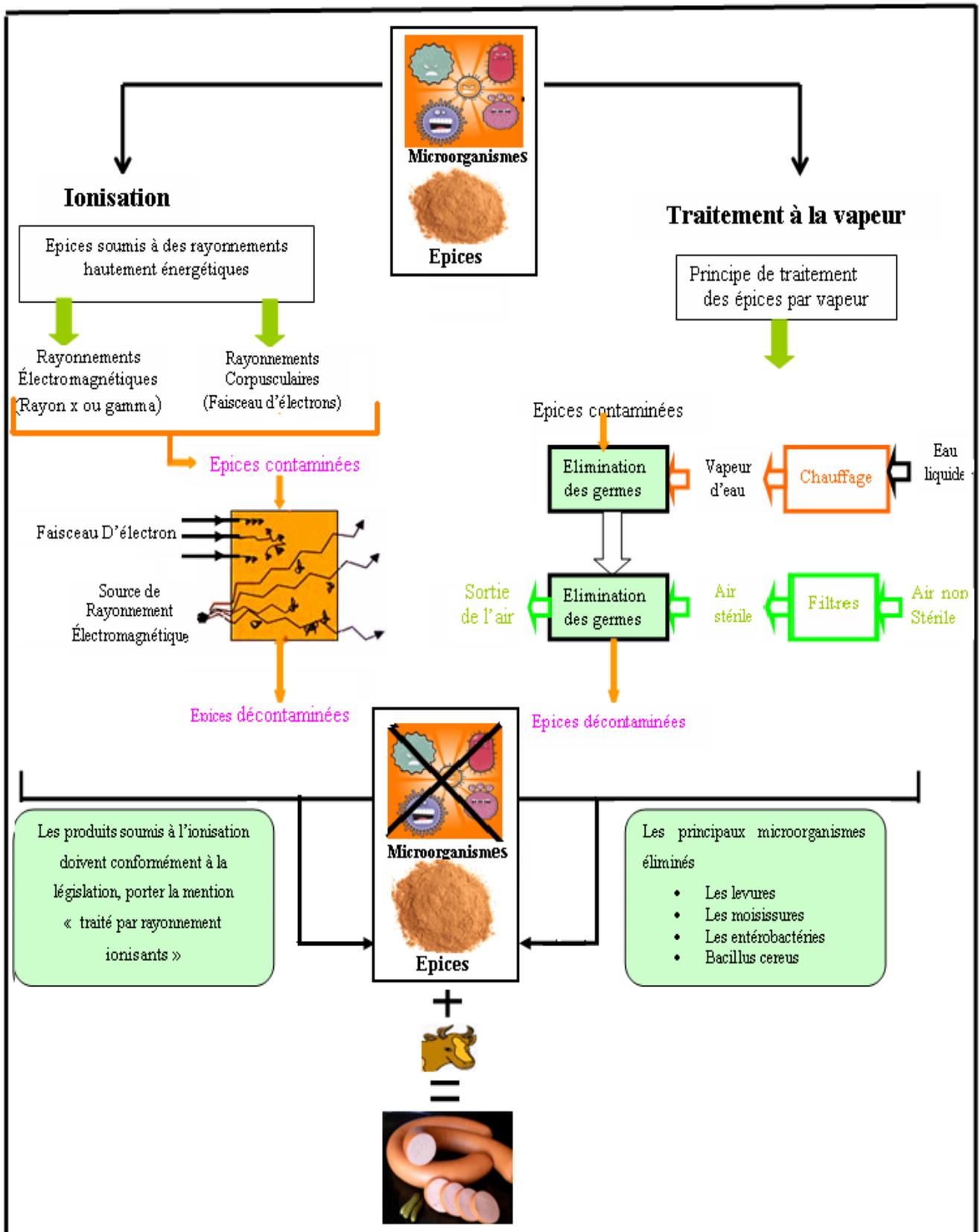


Figure 10. Procédés de traitement et d'utilisation des épices en charcuterie

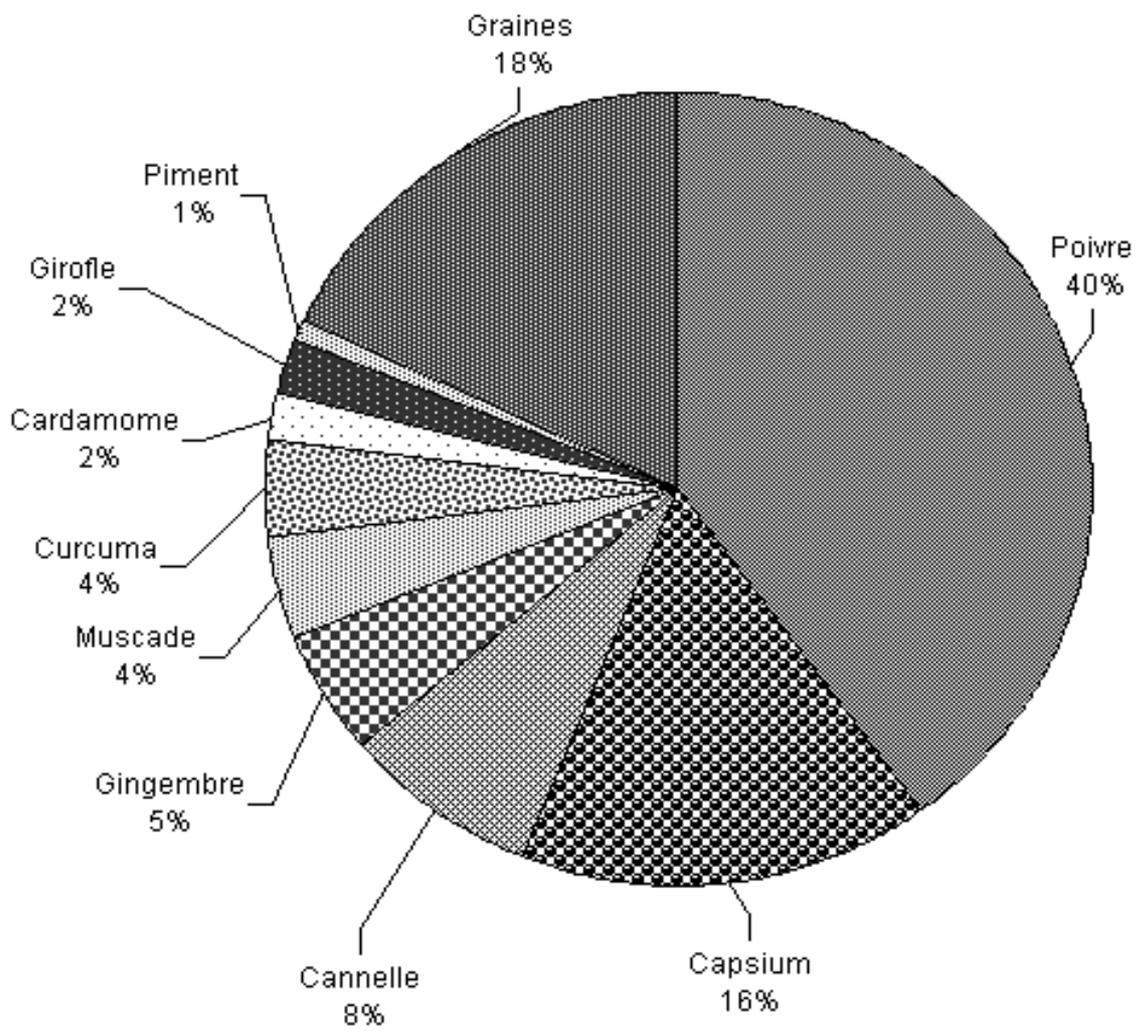


Figure 11. Consommation mondiale en épices brutes en 1992 (Chabane., 2000)

Tableau 12. Valeurs nutritionnelles des grains des légumineuses (composition moyenne en g/100g) (Vierling, 2008)

Légumes secs	Pois chiche	Lentille	Pois sec	Haricot	Fève
	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens esculenta</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Vicia faba</i>
composants					
Eau	11	11,8	11	11,8	11
Protéines	19,8	23,5	22,9	21,3	23
Lipides	3,4	1,4	1,5	1,5	2
Glucides	48,6	50,8	46,7	47,8	60
Amidon	47,7	50,8	44,1	46,2	-
Fibres totales	9,5	10,6	16,6	17	8
minéraux	2,72	3,2	2,7	2,5	2,5

I. Matériel

1. Echantillons d'épices et de légumes secs

Au cours de cette étude, 70 échantillons d'épices et de légumes secs commercialisés en Algérie (44 échantillons d'épices et 26 échantillons de légumes secs) ont été collectés au niveau des marchés des différentes régions d'Algérie (Figure 12). Dans le tableau 13, sont représentés les différents échantillons, leur nombre et les lieux de prélèvement.

La collecte des échantillons a été réalisée durant la période allant du début du mois d'avril de l'année 2009. Les échantillons en vrac contenus dans des sacs ou récipients en plastique, sont mis dans des sacs en papiers et acheminés au laboratoire de biochimie et microbiologie appliquée dans les heures qui suivent le prélèvement.



Figure 12. Vente des épices et légumes sec au niveau des marchés des différentes régions d'algérie

Tableau 13. Origines et dates de prélèvement des échantillons des épices et légumes secs

Différents types d'échantillons	Date de prélèvement et provenance		Total
Épices (n=4)	Provenance	Date	
Cumin Coriandre Poivre noir Carvi Poivre Rouge Poivre Rouge Doux Graines d'Anis Graines de fenouil safran Cannelle Gingembre	Marché de ville de Biskra Marché de ville de Batna Marché de Réghaia Marché de ville d'Oran	Avril 2009	44
Légumes secs	Provenance	Date	
Pois chiches (n=6) Petit pois (n=5) Fèves (n=5) Lentilles (n=5) Haricots (n=4) Féverole (n=1)	Marché de ville de Biskra Marché de ville de Batna Marché de Réghaia Marché de ville d'Oran ITGC*	Avril 2009	26
Total			70

*ITGC : Institut Technologique des Grandes Cultures de cinq Maisons, Commune d'El Harach

2. Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour les isollements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques ainsi que pour la production des aflatoxines et de l'ochratoxine A sont les suivants : (annexe I)

- Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (Raper et Fennell, 1965) (pour la conservation des isolats).
- Milieu DRBC (Dichloran, Rose Bengal, Chloramphénicol) (King *et al.*, 1979) (pour les isolement).
- Milieu CYA (Czapek, Yeast, Agar) (Pitt et Hocking, 1997) (pour la production des sclérotés, CPA et de l'OTA).
- Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (Davis *et al.*, 1987) (pour la production d'AFB1).

3. Souches de références

Les études du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxines des isolats a nécessité l'utilisation de 4 souches de références : *Aspergillus flavus* NRRL 3251^T et *A. parasiticus* CBS 100926^T, fournies respectivement par l'INRA de Toulouse et le Pr. Jens C. Frisvad (Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark), *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174, et *Aspergillus carbonarius* NRRL 369 fournies par l'INRA de Toulouse.

4. Appareillage, produits chimiques et standards analytiques

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

II. Méthodes d'isolement et d'analyse

1. Isolements et dénombrement de la flore fongique

Au cours de notre étude nous avons utilisé la technique de suspension dilution et ensemencement sur milieu gélosé. Le milieu utilisé est le DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol). Ce milieu permet d'inhiber la croissance des champignons envahissant tel que le mucor et le rizopus, et de réduire la taille de mycélium de façon à mettre en évidence la plus part des champignons contaminant le produit analysé.

Dix grammes de l'échantillon à analyser sont mis dans un erlenmeyer stérile de 250ml contenant 90 ml d'eau additionnée à tween 80 à raison de 50ul de tween par 5ml d'eau.

Après agitation de 10min, des dilutions décimales sont réalisées à partir de la solution mère. Un volume de 100ul estensemencé dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu DRBC. Trois répétitions sont réalisées par dilution (Figure 13). L'incubation a lieu à 28°C pendant 5 à 7 jours à l'obscurité.

La numération est effectuée en choisissant les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 10 et 100 environ. Le nombre de moisissures est exprimé en unité de formation de colonie par gramme d'échantillon (ufc/g).

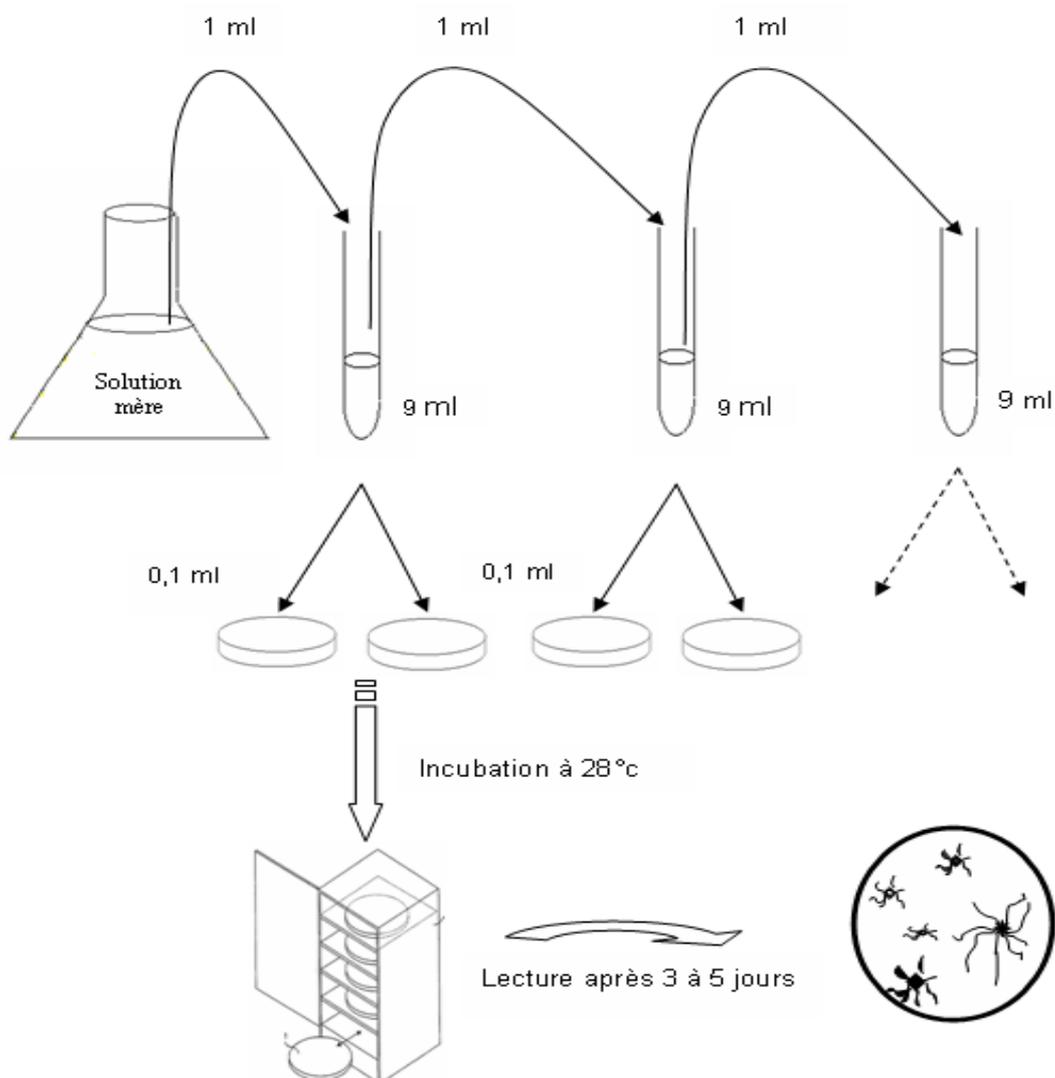


Figure 13. Technique de dénombrement par étalement en surface

2. Identification des isolats fongiques

2.1. Identification macroscopique

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'oeil nu puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction des caractères morphologiques du mycélium.

Parmi les champignons en croissance, les moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques. Seuls ces champignons sont alors repiqués sur un milieu de purification et incubés pendant 7 jours à 28°C.

2.2. Identification microscopique

L'observation microscopique se base sur le mode de groupement des conidies (spores), le mode de conidiogenèse, l'agencement des cellules conidiogènes, l'ornementation cela se fait par deux méthodes :

2.2.1. Préparation microscopique

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

2.2.2. Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent

Une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent que l'on plaque légèrement à la surface de la culture, puis que l'on colle sur une lame de microscope, l'observation microscopique se fait au grossissement x10 et x 40.

Les moisissures sont identifiées d'après leurs caractères morphologiques, l'aspect des colonies, leur couleur ainsi que les renseignements retenus lors de l'observation au microscope.

2. 3. Repiquage des souches d'*Aspergillus* sp et quelques *Penicillium* sp

Le repiquage consiste à transférer aseptiquement la souche identifiée comme *Aspergillus* sp ou *Penicillium* sp sur un milieu PDA.

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

3. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines

Les aflatoxines possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement dans l'U.V proche (365 nm). A cette longueur d'onde, elles sont fluorescentes: couleur bleue pour les aflatoxines B, verte pour les aflatoxines G. Le criblage des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'aflatoxines est réalisé par détection de la fluorescence à 365 nm sur milieu de culture à base de noix de coco, selon la technique décrite par Davis *et al.* (1987) et Fente *et al.* (2001). La production est confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM) selon Calvo *et al.* (2004).

3.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture

Les souches fongiques sont ensemencées par point central (1 souche par boîte) sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déshiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (Fente *et al.*, 2001), additionné de 0,3% de β -cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. La β -cyclodextrine et ses dérivés méthylés ont été utilisés par de nombreux auteurs (Franco *et al.*, 1998; Chiavaro *et al.*, 2001; Criseo *et al.*, 2001; Fente *et al.*, 2001 et Rojas *et al.*, 2005) pour la détection des souches aflatoxinogènes. Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de la noix de coco, donnent une fluorescence visible sous lumière U.V. (365 nm) surtout sur le revers de la colonie (Davis *et al.*, 1987). En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les isolats producteurs d'aflatoxines B et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visibles sous la lumière U.V. (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour.

3.2. Extraction des aflatoxines du milieu de culture

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM et par HPLC, les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au chloroforme (ou le méthanol). Selon la méthode décrite par Calvo *et al.* (2004) quatre rondelle 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 pesées (environ 0,70 g) puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml, l'extraction des aflatoxines est réalisée par l'addition de 1 ml de méthanol (CH₃OH), toute en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction.

Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une microsiringue puis injecté dans un autre tube Eppendorf, ensuite le conservé à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C pour une analyse ultérieure.

3.3. Détection et confirmation de la production d'aflatoxines par chromatographie

Les extraits précédemment obtenus, sont analysés par la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

3.3.1. Détection des aflatoxines par Chromatographie sur couche mince

Cette technique est très utilisée pour la révélation des aflatoxines. C'est la méthode chromatographique de séparation la plus simple. Un volume de 15ul d'une solution standard d'aflatoxine B1 est appliqué en meme temps que les extraits à analyser. Un extrait d'aflatoxine G1, obtenu à partir d'*A. parasiticus* CBS 100926 (après extraction selon la méthode décrite ci-dessus). 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 (chloroforme /acétone 90 :10: v/v).

3.3.1.1. Préparation des plaques

Déposer 30g de gel de silice G-60 dans une fiole conique. Ajouter 60 ml d'eau, boucher et agiter énergiquement. Etaler à l'aide d'un étaloir réglé d'une manière à obtenir une couche uniforme de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur. Laisser sécher à l'air. Au moment de l'utilisation activer les plaques en les plaçant pendant une heure dans un four à 110°C.

3.3.1.2. 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 microsiringue, déposer un aliquote de 15 µl sur la plaque de CCM à 2 cm du bord inférieur. Sur la même plaque plusieurs échantillons peuvent être spotés avec des intervalles de 1,5 à 2cm.
- ✓ Des standards, d'AFB1 et d'AFG1 sont spotés au même temps que les échantillons
- ✓ pour éviter d'avoir de grosses taches sur la plaque, le volume à déposer est spoté délicatement à petites gouttes puis séchées à l'aide d'un sec cheveu.
- ✓ Saturer la phase mobile pour éviter l'évaporation du solvant en utilisant une feuille de papier imbibée de la phase mobile sur la paroi de la cuve
- ✓ Déposer la plaque verticalement dans la cuve à chromatographie qui contient la phase mobile composée de chloroforme/acétone (90 :10 v/v), le solvant migre jusqu'à ce qu'il atteigne la ligne limite du bord supérieur.

-
- ✓ Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à température ambiante pendant 15 minutes.

L'observation des plaques sous UV (à 365nm) permet de visualiser l'aflatoxine B sous forme d'une tache bleue avec un $R_f = 0,42$, l'aflatoxine G tache verte avec un $R_f = 0,34$. La quantité d'aflatoxine peut être estimée en comparant la taille et l'intensité de la tache par rapport à un standard dont la concentration en aflatoxine est connue.

3.3.2. Confirmation et quantification d'aflatoxine par HPLC

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

Lors de la première utilisation, la colonne chromatographique est lavée toute une nuit par le passage d'un mélange d'acétonitrile-eau (85/15, v/v) à un débit de 0,20 ml/min. Elle est ensuite conditionnée pendant 45 min par passage de la phase mobile utilisée pour l'analyse à un débit de 0,5 ml/min. Les aflatoxines sont analysées sur un chromatographe de marque Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japon) dont les caractéristiques sont décrites en annexe III. La phase mobile est composée de méthanol-acétonitrile-eau (20:20:60 v/v). Pour la dérivation, à un litre de phase mobile, 119 mg de bromure de potassium et 350 μ l d'acide nitrique 4M sont ajoutés (selon le manuel KORA Cell®). Le débit est réglé à 0,5 ml/min. Un volume de 20 μ l d'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microseringue. L'analyse est réalisée en condition isocratique. La pression est alors de 28-30 mPa et le temps de rétention d'aflatoxines B1, B2, G1 et G2 sont respectivement 30, 24, 22,5 et 21 min. Des solutions standards de l'aflatoxine B1 pure de concentrations connues sont injectées intercalées parmi la série d'échantillons. Le seuil limite minimum de détection est de 0,005 μ g/kg. La détection est réalisée en réglant l'onde d'excitation à 362 nm et des filtres d'émission à 425 nm pour B1 et B2 et à 455 nm pour G1 et G2. Des lavages au méthanol de qualité HPLC sont effectués après chaque injection afin d'éliminer les traces d'aflatoxines. L'AFB et l'AFG sont confirmées par leur transformation dans la cellule KOBRA Cell®, placée en post-colonne, en leur dérivé 9,10-dibromé, qui est détecté par spectrofluorimétrie. La cellule de KOBRA Cell® est connectée au système HPLC entre la colonne HPLC et le détecteur de fluorescence. Les 4 aflatoxines séparées et l'agent précurseur de dérivation (bromure de potassium) entrent dans le KOBRA Cell®, où va se dérouler la réaction électrochimique générant le brome. Les aflatoxines et le brome ressortent de la cellule avant que la réaction de dérivation n'ait lieu. Celle-ci aura lieu dans le tube de connexion avant l'entrée dans le détecteur de fluorescence (Figure 14). Cette longueur de tube entre la sortie de la cellule et le détecteur est donc très importante et doit être suffisante pour permettre la réaction de dérivation au brome qui dure 4 secondes (KOBRA Cell, 2005).

L'enregistrement et l'analyse des chromatogrammes sont effectués par un logiciel adapté (Normasoft).

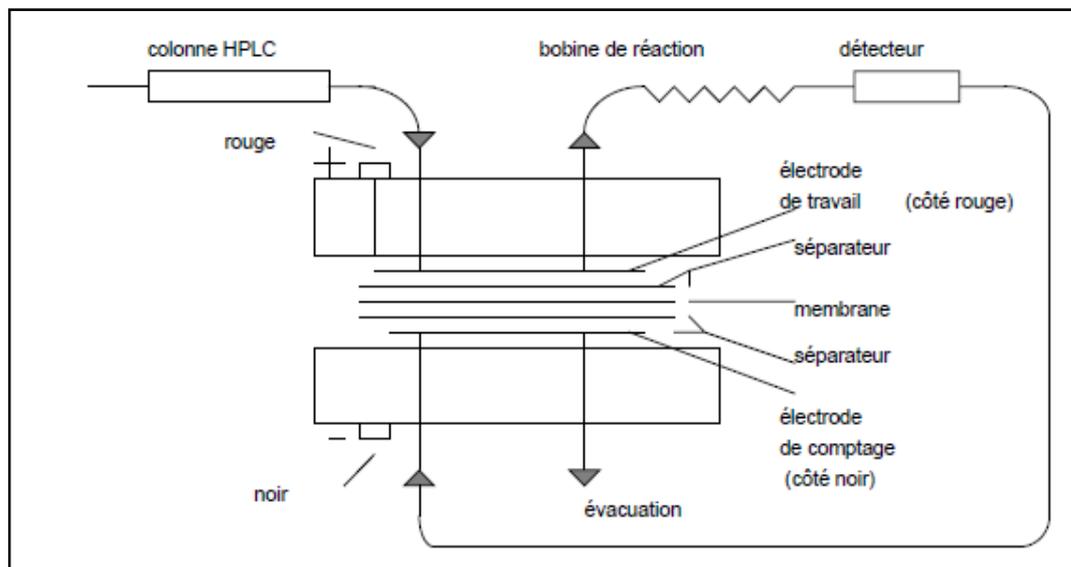


Figure 14. Schéma des connexions de la KOBRA Cell à l'HPLC (Riba, 2008).

4. Production et détection de l'acide cyclopiazonique et des sclérotés

4.1. Production d'acide cyclopiazonique (CPA)

4.1.1. Culture et extraction sur milieu CYA

La production de l'acide cyclopiazonique (CPA) est réalisée sur milieu CYA selon la méthode décrite par Pildain *et al* (2004). Après 10 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C, environ 0,70 g de milieu colonisé par le mycélium sont découpés à l'aide d'un emporte pièce stérile. L'extraction du CPA est réalisée en ajoutant 1 ml de méthanol.

Après incubation pendant 1 heure à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une microseringue puis injecter dans un autre tube Eppendorf, ensuite le conservé à une température de 4 °C.

4.1.2. Détection de l'acide cyclopiazonique par CCM

Des plaques de gel de silice déjà préparées (paragraphe 3.3.1.1) ont été utilisées. Un volume de 15 µl d'une solution standard de CPA et 15 µl de chaque extrait à analyser, sont spotés sur les plaques préalablement imprégnées dans une solution d'acide oxalique à 2% dans du méthanol puis séchés. Le système de solvant de développement utilisé est l'acétate d'éthyle/2-propanol/hydroxyde d'ammonium (40:30:20) (Fernandez Pinto *et al.*, 2001). Après migration, le CPA est visualisé sous la lumière du jour après pulvérisation des plaques par le

réactif d'Ehrlich (1 g de 4-diméthyle aminobenzaldéhyde dans 75 ml d'éthanol et 25 ml d'HCl concentré). Le CPA est détecté sous forme de tache violette avec un même Rf de 0,6.

4.2. Production des sclérotés sur milieu CYA

La production de sclérotés par les *Aspergillus* section *Flavi* (caractère taxonomique important) est réalisée selon la méthode utilisée par de nombreux auteurs (Novas et Cabral, 2002 ; Abbas *et al.*, 2006; Pildain *et al.*, 2008). Elle consiste à cultiver les isolats à tester sur milieu gélosé Czapek Yeast agar (CYA) à 28°C à l'abri de la lumière. La production des sclérotés est suivie périodiquement pendant 3 semaines. Le diamètre des sclérotés (moyenne de 50 à 60 sclérotés par souche) est obtenu en les déposants sur une plaque quadrillée à mailles de 500 µm et après observation à l'aide d'une loupe. Le morphotype « L » produit des sclérotés de taille comprise généralement entre 500 µm et 800 µm. Par contre le morphotype « S » produit des sclérotés de taille inférieure, allant de 200 à 300 µm.

5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A

5.1. Culture et extraction sur milieu CYA

Le pouvoir producteur de l'OTA par les isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* a été déterminé par CCM selon la méthode décrite par Bragulat *et al.* (2001). La méthode consiste à cultiver les isolats sur milieu CYA, favorable à la production d'OTA, pendant 7 jours à 28°C. Trois rondelles (5 mm de diamètre) de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de Pétri (60 mm de diamètre). Les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml. L'extraction de l'OTA est réalisée par addition de 1 ml de méthanol tout en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction. Après incubation pendant une heure à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 15 min à 13000 tours puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une microseringue puis injecter dans un autre tube Eppendorf, le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et a une température de 4 °C.

5.2. Détection de la production d'ochratoxine par CCM

L'utilisation de la CCM, permet une détection qualitative de l'OTA. Plusieurs protocoles ont ainsi été développés par l'AOAC (1995) (Official Methods 973.37 et 975.38). Des plaques de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur ont été déjà préparé selon le protocole précédent. D'après Lin *et al.* (1998), le solvant de migration est le toluène/ethylacétate/90 % d'acide formique (5:4:1, v/v/v). Un volume de 15 µl d'une solution standard d'ochratoxine est appliqué en même temps que les extraits à analyser. La visualisation des ochratoxines a été effectuée par l'observation sous UV à 365 nm.

L'identification à été réalisée par comparaison de leurs Rf (rapport entre la distance de migration de la tache fluorescente et la distance du front du solvant) et de leurs couleurs de fluorescence à l'ochratoxine A de référence.

6. Extraction d'aflatoxine B1 (AFB1) à partir des échantillons

6.1. Principe général

Dans les conditions acides, les mycotoxines sont extraites à partir de matrices de nature différentes. L'acidification et la force ionique de la solution d'extraction permettent de rompre en partie les liaisons des toxines aux constituants de la matrice et favorisent ainsi leur extraction. La purification de l'extrait est réalisée par partage de phase: en fonction de leur état d'ionisation, les mycotoxines seront solubles, soit dans la phase aqueuse, soit dans la phase organique.

6.2. Extraction à partir des épices et de légumes secs

La méthode d'extraction des aflatoxines utilisée au cours de notre étude est celle décrite par Molinié et al. (2005), El Adlouni et al. (2006) et Riba et al. (2008). Le protocole d'extraction est illustré dans la figure 20. Vingt grammes d'échantillon finement broyés sont additionnés à 20 ml d'une solution de 4% de chlorure de potassium (KCl) acidifié à pH 1,5 avec de l'acide sulfurique concentré. Un volume de 180 ml du solvant d'extraction acétonitrile/eau (9:1) est ajouté au mélange préalablement homogénéisé. Le solvant d'extraction et l'échantillon, disposés dans un Erlenmeyer de 500 ml, sont mis à agiter sur un agitateur rotatif pendant 20 min. L'extrait est filtré sur papier filtre Whatman n° 4.

6.3. Purification de l'extrait

Le filtrat est récupéré dans un erlenmeyer de 250 ml. Ce dernier est extrait par addition de 50 ml d'eau distillée et 100 ml de chloroforme. Le mélange acétonitrile/eau et chloroforme est placé 10 min sur l'agitateur rotatif. Après agitation, puis une décantation de 10 min, la phase chloroformique inférieure est récupérée dans un Erlenmeyer. La phase acétonitrile/eau supérieure est à nouveau extraite 2 fois par addition de 20 ml de chloroforme. Après 10 min d'agitation et 10 min de décantation, les phases chloroformiques qui contiennent les mycotoxines sont récupérées. L'ensemble des extraits chloroformiques réunis est évaporé (sous vide d'air) dans des ballons à fond conique de 50 ml plongés dans un bain marie à 40°C. L'extrait sec est remis en suspension dans 1ml de méthanol est placé dans un flacon en verre bien fermé et conservé à + 4°C avant d'être analysé par HPLC (figure 15).

6.4. Dosage par HPLC: Le dosage des aflatoxines dans les échantillons d'épices et des légumes secs a été réalisé selon la méthode décrite précédemment (paragraphe 3.3.2).

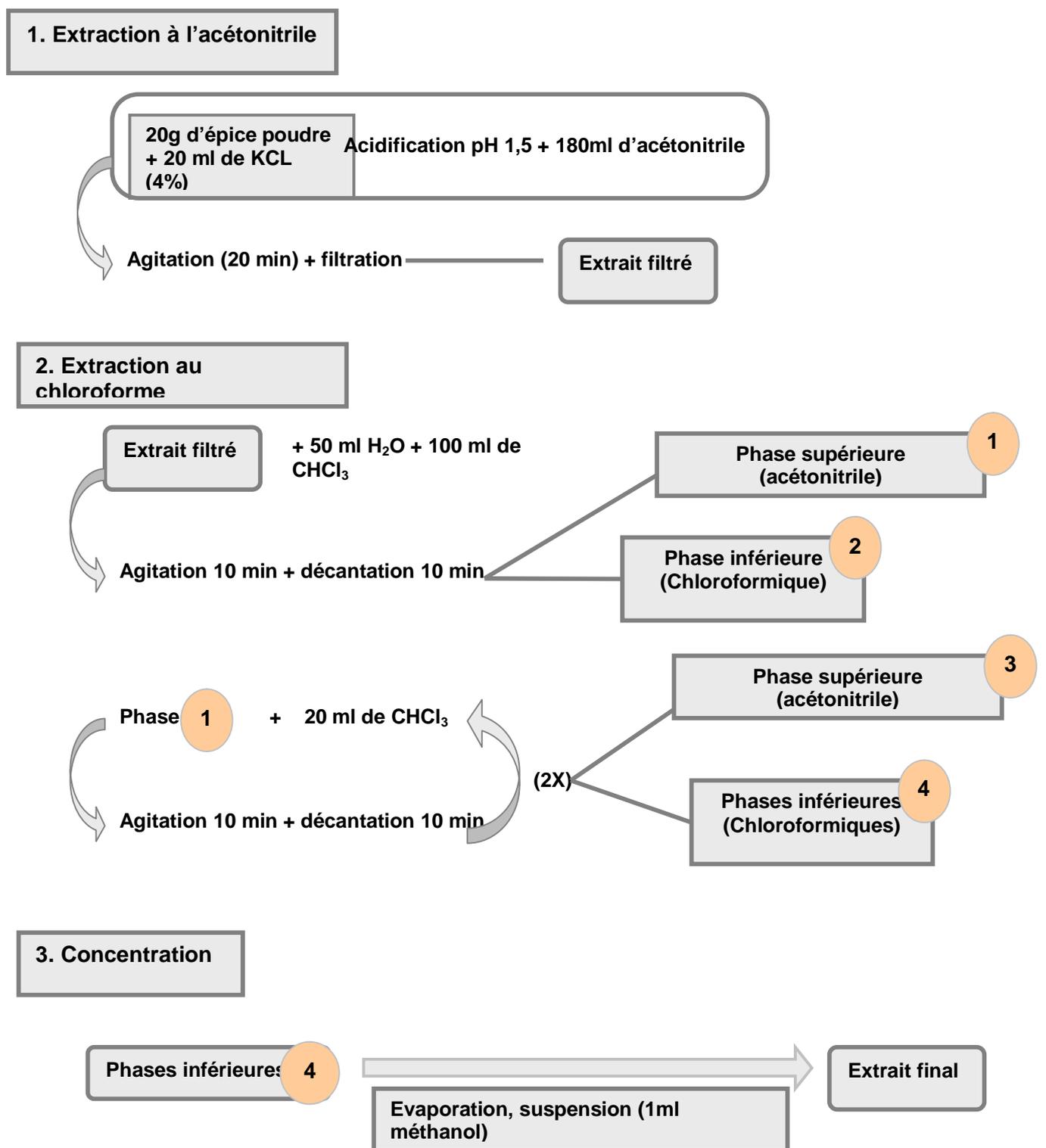


Figure 15. Protocole d'extraction des aflatoxines des échantillons analysés. (Riba, 2008)

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Analyse de la flore fongique totale des échantillons d'épices et de légumes secs

Dans cette étude, un total de 70 échantillons d'épices et de légumes secs a été analysé. Nous avons prélevé 44 échantillons d'épices différentes (le gingembre, le poivre rouge doux, le poivre rouge, le poivre noir, la cannelle, les graines de fenouil, le safran le cumin, le carvi, les graines d'anis et la coriandre) et 26 échantillons de légumes secs composés de pois chiches, lentilles, petits pois, haricots, fèves et fêveroles).

1. Analyse de la flore fongique totale des échantillons d'épices

Les résultats montrent que tous les échantillons d'épices analysés ($n = 44$) sont contaminés par les moisissures. La densité de la flore fongique totale varie de 450 ± 113 à 2010 ± 1494 ufc/g et la densité moyenne est de 974 ± 482 ufc/g. Les épices les plus contaminées sont le gingembre, le poivre rouge doux, le poivre rouge, la graine de fenouil et le safran dont les densités varient entre 1015 et 2010 ufc/g (Tableau 14 ; figure 16; figure 17). La graine d'anis, le poivre noir, la coriandre, le carvi, le cumin et la cannelle présentent des densités allant de 800 à 450 ufc/g.

Une faible densité de moisissures dans certains épices a été rapportée par plusieurs chercheurs. Bhat *et al.* (1987) ont rapporté une absence totale des moisissures dans le cumin. Garrido *et al.* (1992) a étudié la contamination de 31 échantillons d'épices par les moisissures, les résultats ont montré une faible contamination par les moisissures pour le girofle, noix de muscade, cannelle, graine d'anis et le cumin. Bartine et Elaraki (1997) ont trouvé que la croissance des souches de moisissures toxigènes était très faible sur le curcuma, le poivre blanc et le poivre noir. Par contre les travaux de Mandeel. (2005) ont montré une forte contamination de poivre noir et poivre rouge par les moisissures.



Figure 16. Colonies des moisissures poussant sur milieu DRBC après 5 jours d'incubation à 28°C

Tableau 14. Distribution de la flore fongique et les fréquences des principaux genres isolés des 44 échantillons d'épices.

Épice	Flore fongique totale (ufc/g)	<i>Aspergillus</i> %*	<i>Penicillium</i> %*
Gingembre	2010 ± 1494	82,6	11,9
Poivre rouge doux	1646 ± 100	69,6	24,3
Poivre rouge	1175 ± 678	61,4	26
Graine de fenouil	1031 ± 457	59,7	32
Safran	1015 ± 658	86,4	13,6
Graine d'anis	800 ± 370	16,3	25,6
Coriandre	752 ± 712	58,6	29,4
Poivre noir	719 ± 71	71,4	25,4
Carvi	565 ± 322	47,4	44,2
Cumin	550 ± 330	34,9	21,7
Cannelle	450 ± 113	31,6	22,3
Total	974 ± 482	56,4	25,2

* : le pourcentage est calculé par rapport au nombre total d'isolats (450 isolats)

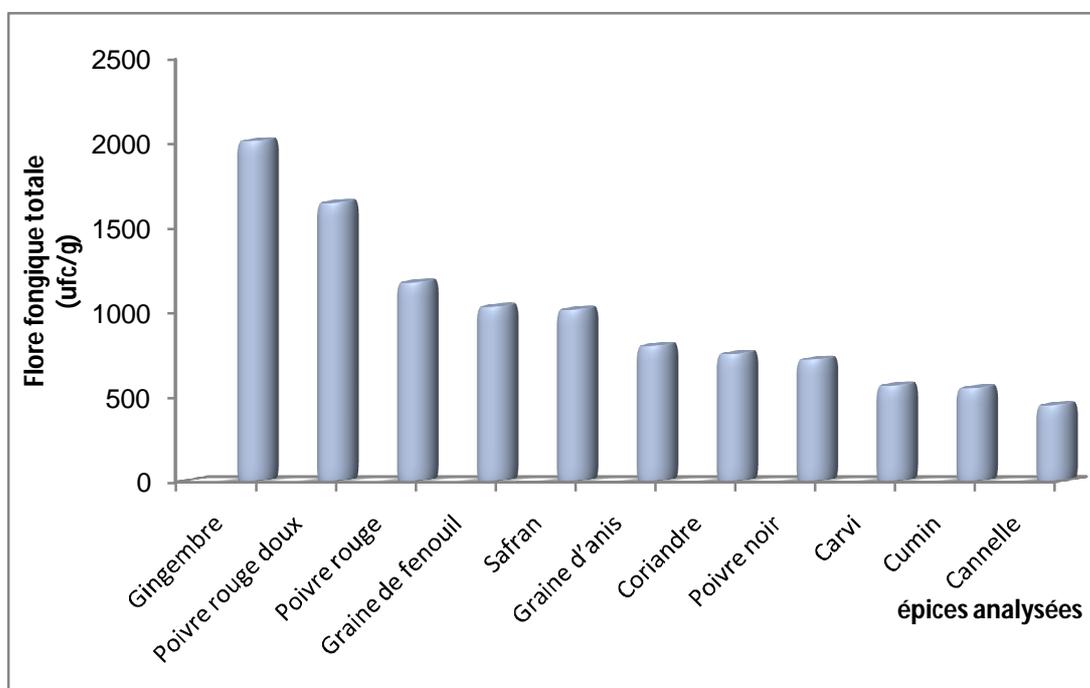


Figure 17. Densité de la flore fongique totale (ufc/g) des différents échantillons d'épices analysés

1.1. Principaux genres dans les échantillons d'épices

Les principaux genres fongiques identifiés dans les échantillons analysés sont : *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et la texture de la colonie, sur le milieu (DRBC), ainsi que les structures micromorphologiques permettent généralement de faire la distinction entre ces deux genres.

Globalement, les résultats obtenus montrent une nette dominance du genre *Aspergillus* et de *Penicillium* avec des fréquences moyennes de 56,4% et 25% respectivement. Toutes les épices analysées sont contaminées par ces deux genres fongiques. Le taux de contamination par *Aspergillus* varié entre 86,4 et 16,3%. Le safran et le gingembre sont les plus contaminés (86,4 et 82,6% respectivement) suivi du poivre noir, du poivre rouge doux et du poivre rouge avec des taux de 71,4; 69,6 et 61,4% respectivement (figure 18). Le taux d'*Aspergillus* dans les graines de fenouil, la coriandre, le carvi, le cumin et la cannelle est de 59,7 ; 58,6 ; 47,4 ; 34,9 et 31,6 % respectivement. Les graines d'anis sont les moins contaminés par *Aspergillus*. Par contre, le genre *Penicillium* est dominant dans les échantillons de carvi et de graines de fenouil (44,2 et 32%). Dans les autres épices (coriandre, poivre rouge, les graines d'anis, le poivre noir, le poivre rouge doux, la cannelle et le cumin) le pourcentage de ce genre fongique est compris entre 29,8 et 21,7 %. Le safran et le gingembre présentent 13,6 et 11,9 % respectivement (figure 19).

Peu de travaux ont été consacrés sur la qualité microbiologique des épices. La plupart des références rencontrées traitent beaucoup plus l'aspect concernant leurs effets antimicrobiens et antioxydants et de la présence de mycotoxines.

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 peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les graines puis proliférer pendant le stockage si les conditions sont favorables. Par ailleurs, nous remarquons que les échantillons prélevés dans l'Algérois et dans l'Oranie, dont le taux d'humidité est plus élevé, sont plus chargés en moisissures que ceux collectés dans les régions de Batna et de Biskra (figure 20). Cette différence est vraisemblablement liée aux différences des taux d'humidités de ces régions.

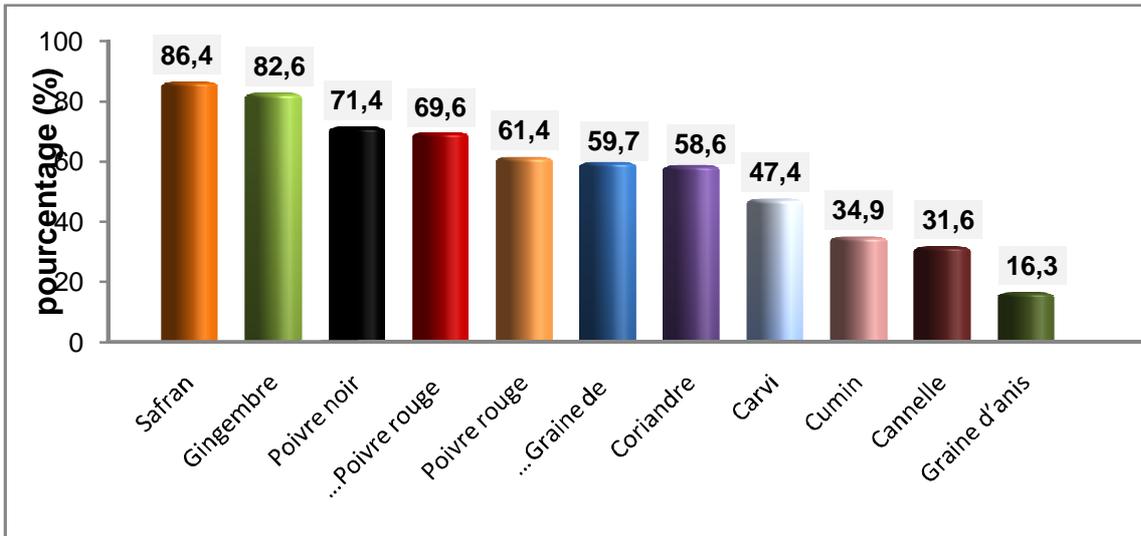


Figure 18. Fréquence du genre *Aspergillus* dans les 44 échantillons d'épices analysés.

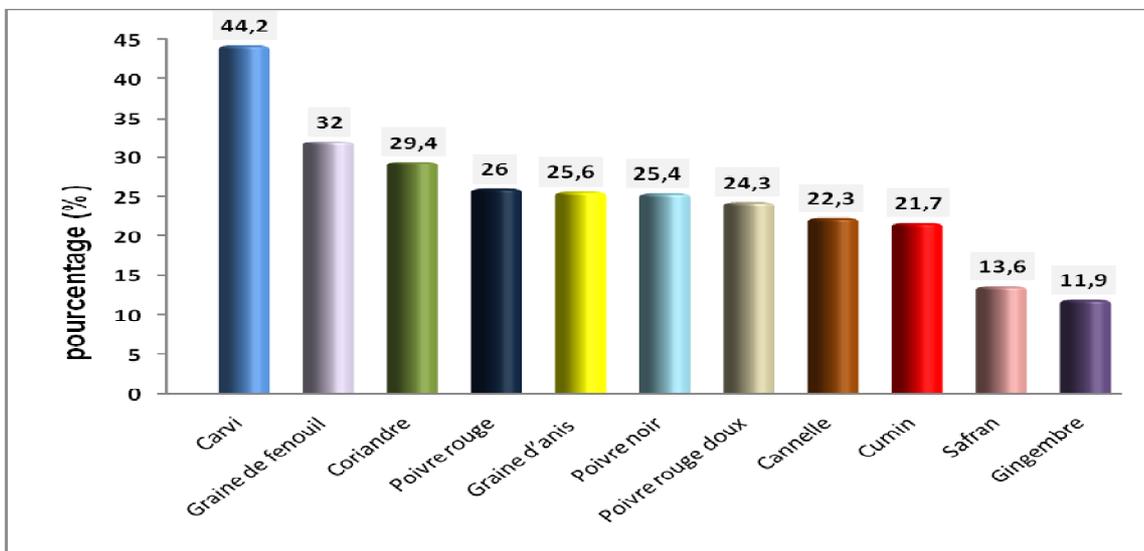


Figure 19. Fréquence du genre *Penicillium* dans les 44 échantillons d'épices.

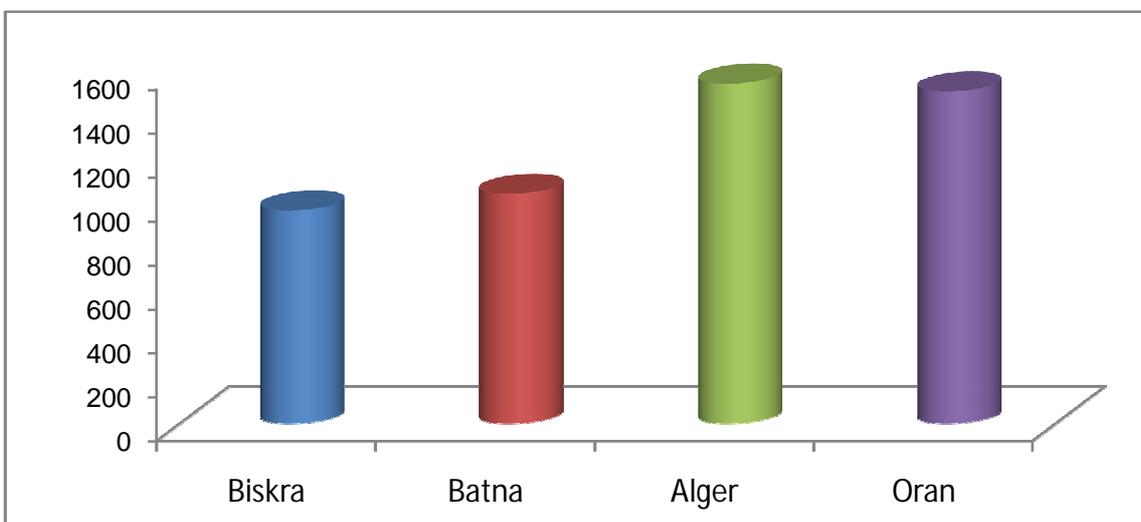


Figure 20. Flore fongique totale dans les 4 régions (Biskra, Batna, Alger et Oran).

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), il est très répandu dans la nature (Pařenicová *et al.*, 2000) et tout particulièrement dans les régions à climat chaud comme l'Algérie (Mantle, 2002; Hocking et Pitt, 2003). Ainsi, la plupart des enquêtes menées dans les régions à climat chaud ont mis en évidence la prédominance des espèces fongiques du genre *Aspergillus* dans les épices. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés sur les épices et les plantes médicinales (EL-Kady *et al.*, 1992 ; Hashem et Alamri, 2008 ; Abou Donia ; 2008).

Cependant, 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 des denrées d'origine végétale après récolte est influencée par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc) (Magan et Aldred, 2005).

En général, certaines épices à l'état naturel constituent un milieu non favorable pour la croissance des moisissures et la production de mycotoxines. Selon Juglal *et al.* (2002), Sara Maria Chalfoun *et al.* (2004), les huiles essentielles du girofle et de la cannelle exerceraient un effet inhibiteur sur la croissance fongique comme *Aspergillus parasiticus* et *Fusarium moniliforme*. Ces mêmes résultats ont été observés par d'autres auteurs comme Ferhout *et al.* (1999), Morris *et al.* (1979), Bullerman *et al.* (1977), Hitokoto *et al.* (1980), Mabrouk et El-Shayeb, (1980), Tantaoui el-Araki et Beraoud (1994).

Les travaux de Senhaji *et al.* (2006), sur l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle, ont montré une inhibition totale de la croissance des moisissures testées à une concentration de 0,5% des huiles essentielles de cannelle. D'autre part, le cumin est capable d'inhiber partiellement les spores des espèces d'*Aspergillus*, la présence de cumaldéhyde en grande quantité avec les terpènes jouent un rôle déterminant dans l'inhibition d'*Aspergillus* sp (Adegoke, 1996).

1.2. Distribution des espèces de différentes sections d'*Aspergillus* dans les échantillons d'épices

Dans ce travail nous nous sommes particulièrement intéressés au genre *Aspergillus* dont certaines espèces produisent les aflatoxines (AFs) et l'ochratoxine A (OTA). Il faut rappeler que la plupart des espèces appartenant à la même section, selon la classification actuelle (voir chap.III.4), ne se distinguent pas morphologiquement. La notion d'espèce employée ici désigne plutôt le groupe voire la section.

Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *Aspergillus* section *Flavi* et *Aspergillus* section *Nigri*, sont les plus dominantes dans les 44 échantillons d'épices (Tableau 15). Ces deux espèces

représentent 28,9 et 25% du nombre total d'*Aspergillus*. Elles ont été isolées dans 37 et 33 échantillons analysés, ce qui correspond à un taux de contamination de 88% et 78,6% respectivement. Cependant, la plus forte incidence d'*Aspergillus* section *Flavi* est enregistrée dans le Safran et le Gingembre avec des taux de 61,1 et 58% respectivement du total d'*Aspergillus* (figure 21). Dans le poivre rouge doux, les graines de fenouil, la coriandre cette espèce représente plus de la moitié du total d'*Aspergillus* (33,8 ; 31,1 et 30,3%) respectivement. le poivre rouge, le carvi et le cumin présentent des taux de 24,2 ; 20,7 et 18,9% respectivement. Des taux relativement faibles sont enregistrés dans le poivre noir (16,3%), la cannelle (11,2%) et les graines d'anis (6,4%).

Aspergillus section *Nigri* a été isolée à une teneur très élevée dans le poivre noir (54,7%). Dans le poivre rouge, et le poivre doux sa fréquence est de 36,8 et 27,5% respectivement (figure. 23). La fréquence des isolats de cette section dans le carvi, la coriandre, le gingembre, le safran, la graine de fenouil et la cannelle varié de 24,7 à 20,4%. Cependant un niveau très faible a été observé dans le cumin et la graine d'anis (11,8 et 7,2 %). Selon Domsh *et al.* (1981), la contamination des épices par les différentes espèces d'*Aspergillus* résulte de la contamination de ces derniers par la poussière provenant de l'extérieur après stockage dans des conditions humides. Les épices peuvent être contaminés par ces champignons, lors du traitement, le stockage et le transport (Dimié *et al.*, 2008).

Les espèces d'*Aspergillus* section *terrei*, *Aspergillus* section *Circumdati* et *Aspergillus* section *Fumigati* sont faiblement représentées. En effet, leur pourcentage est compris entre 0 et 5%. En plus de ces espèces. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés sur les épices (Aziz *et al.*, 1998 ; Mandeel, 2005). Plusieurs études enregistrent que *A. flavus* est un prédominant par rapport aux autres espèces dans des différentes épices commercialisées (Sharma *et al.*, 1984 ; Christensen *et al.*, 1967 ; Moreno.,1973 ; Garrido *et al.*, 1992), cependant d'autres études montrent que *A. niger* est rencontré à une fréquence élevée et il est largement distribué dans les épices et les plantes médicinales (Moharram *et al.*, 1989 ; 1985 ; Udagawa *et al.*, 1976 ; Hitokoto *et al.*, 1978). Selon El-Kady *et al* (1992), *A. terreus*, *A. ochraceus* et *A. fumigatus* se trouvent à des faibles teneurs dans les épices. La contamination des épices est tributaire d'un bon nombre de facteurs dont, l'origine des plantes, l'écologie du milieu, les conditions de transport (hygrométrie et température), ainsi que le mode de récolte, de collecte, de préparation, du séchage, du stockage, et du conditionnement (Richard, 1992).

Tableau 15 Pourcentage des isolats de différentes sections d'*Aspergillus* isolées des 44 échantillons d'épices

Épices	Pourcentage (%)*				
	<i>Asp</i> ' section <i>Flavi</i>	<i>Asp</i> section <i>Nigri</i>	<i>Asp</i> section <i>Terrei</i>	<i>Asp</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Asp</i> section <i>Fumigati</i>
Safran	64,1	22,7	0	0,0	0
Gingembre	58,0	23,4	1,2	0,1	0
Poivre rouge D	36,8	27,5	3,0	0,9	1,5
Graine de fenouil	31,1	21,0	5,4	2,7	0
Coriandre	30,3	24,5	2,7	0	1,1
Poivre rouge	24,2	36,8	0,3	0,1	0,0
Carvi	20,7	24,7	2	0,0	0
Cumin	18,9	11,8	3,6	0,2	0,4
Poivre noir	16,3	54,7	0	0,4	0
Cannelle	11,2	20,4	0	0	0
Graine d'anis	6,4	7,2	1,2	1,3	0
Total	28,9	25	1,7	0,5	0,3

*: les pourcentages sont calculés par rapport au total du genre *Aspergillus*. *Asp*' : *Aspergillus*

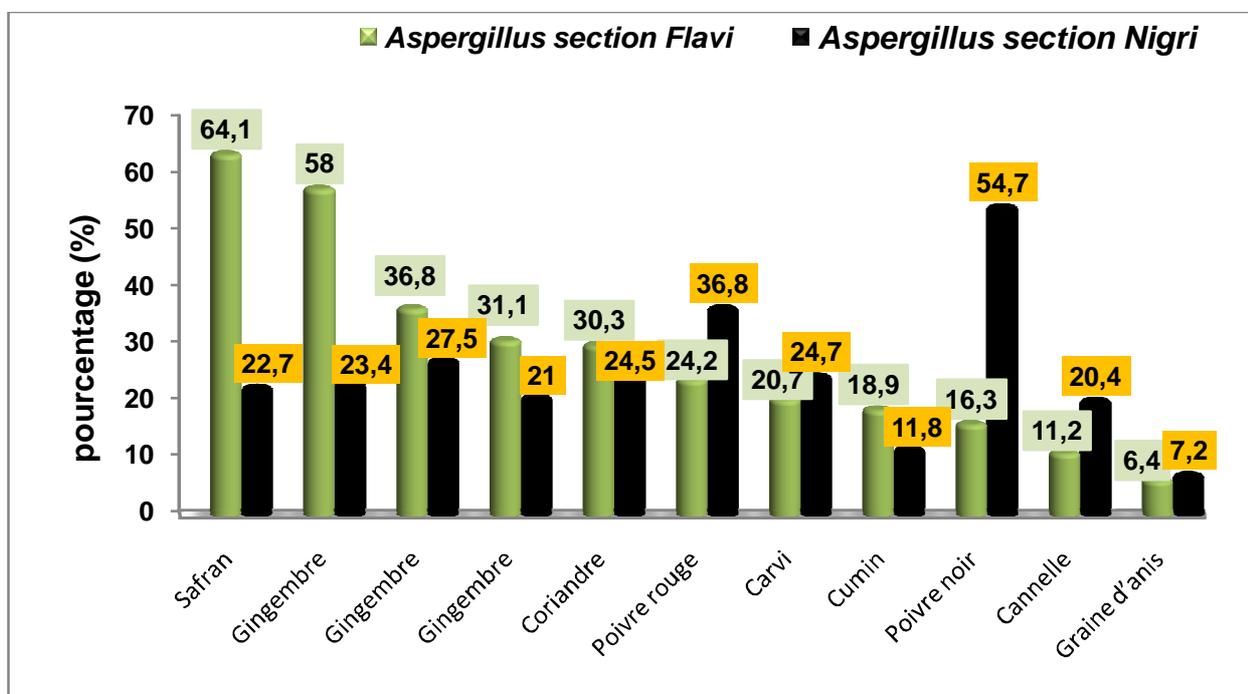


Figure 21. Fréquence d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* dans les échantillons d'épices analysés

2. Analyse de la flore fongique totale des échantillons de légumes secs

2.1. Principaux genres

L'analyse des 26 échantillons de légumes secs (Lentilles, Haricots, Petits pois, Fèves et Pois chiches) collectées dans les étals du marché a révélé des teneurs en moisissures inférieures à 10 ufc/g. Cette mycoflore est nettement dominée par le genre *Penicillium*. Le genre *Aspergillus* est relativement faible (Tableau 16). Cependant, aucune propagule fongique n'a été révélée à la dilution 10^{-1} dans les légumes secs (Pois chiches, Lentilles, Petits pois et Fèves) collectées au niveau de l'ITGC. Seule la Féverole a montré une teneur en moisissures de 350 ufc/g.

Parmi les espèces du genre *Aspergillus*, nous avons isolé trois espèces d'*Aspergillus* section *Flavi*, et deux espèces d'*Aspergillus* section *Fumigati*. La première a été isolée dans deux échantillons : Pois chiches et la Féverole et la seconde dans les Pois chiches.

Tableau 16. Distribution des principaux genres fongiques isolés des 26 échantillons de légumes secs collectés au niveau des commerces et de l'ITGC*.

Origine	Type d'échantillon	FFT (ufc/g)	<i>Aspergillus</i> %	<i>Penicillium</i> %
Légumes secs commercialisés (n=21)	Pois chiche (5)	< 10	10	90
	Lentille (4)	< 10	0	100
	Haricot (4)	< 10	0	100
	Petit pois (4)	< 10	0	100
	Fève (4)	< 10	0	100
ITGC (n=5)	Pois chiche (1)	0	0	0
	Lentille (1)	0	0	0
	Petit pois (1)	0	0	0
	Fève (1)	0	0	0
	Féverole(1)	360	19,4	55,5

* : ITGC : Institut Technologique des Grandes Cultures

0 : aucune colonie n'a été détectée ; FFT : flore fongique totale

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

1. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines

1.1. Production d'AFs par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

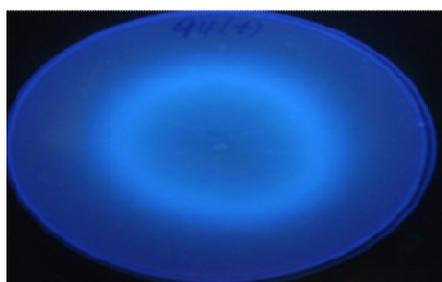
Au cours de cette étude, 252 souches d'*Aspergillus* section *Flavi* isolées des échantillons d'épices et des légumes secs ont fait l'objet d'une identification morphologique et de l'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines. Le criblage des isolats aflatoxinogènes basé sur la mise en évidence de la fluorescence bleue sous U.V à 365 nm sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM). Le pouvoir producteur des isolats ayant donné une fluorescence bleue et un revers du milieu CAM jaune orangé a été confirmé par CCM en utilisant un standard d'AFB1 et l'extrait de la souche de référence *A.parasiticus* qui produit les deux types d'aflatoxines B et G. les résultats ont révélé un taux de production de 37,3% (94 isolats) et 38,9% (98 isolats), respectivement sur milieu CAM et par CCM. Seuls quatre isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur CAM. Ce qui démontre que cette méthode simple de screening est aussi performante que la détection par CCM (tableau.17).

Le résultat concernant le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes doit prendre en compte le seuil limite de détection. Car ce pourcentage a été déterminé sur la base de la mise en évidence de la fluorescence sur CAM et CCM. Ce pourcentage peut être revu à la hausse avec si les isolats sont analysés par HPLC avec un seuil de détection plus sensible. Riba et *al.* (2010) ont montré que le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par HPLC est de 30 et 72%, respectivement. Parmi les 154 isolats non producteurs d'AFs (par CCM), 25 isolats 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). L'estimation de la quantité d'aflatoxine (par CCM) dans les extraits des 98 isolats a montré des quantités d'AFB1 très variables. Ainsi, les isolats aflatoxinogènes peuvent être divisés en fonction de l'intensité de la fluorescence en trois catégories:

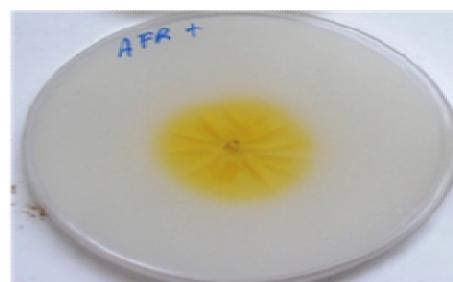
La moitié (50%) des isolats est moyennement producteurs, les isolats fortement producteurs représentent 26,53% et les isolats faiblement producteurs 23,47%. La fluorescence des aflatoxines sur milieu de culture est illustrée sur la figure 22 et la révélation sur CCM est illustrée sur la figure 23. Nous remarquons que le gingembre est le plus contaminé par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs (41,8%) suivie du safran (14,3%). La graine de fenouil, poivre rouge doux, graine d'anis, carvi, poivre rouge, cumin, poivre noir sont moins contaminés par les isolats aflatoxinogènes. Les pourcentages respectifs de ces isolats dans ces échantillons sont de 8,1%, 7,1%, 5,1%, 5,1% et 4,1. D'autre par la contamination de pois chiche feverole, cumin et poivre noire par les isolats aflatoxinogènes est négligéable (Figure 24).

Tableau 17. Répartition des isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction de l'intensité de fluorescence

Epices et légumes secs	Nombre d'isolats testés	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Intensité de la fluorescence			Moyenne des Isolats aflatoxinogènes (%)
			+++	++	+	
Gingembre	74	41	7	22	12	41,8
Safran	46	14	4	7	3	14,3
Grain de fenouil	20	8	3	5	0	8,1
Poivre rouge doux	46	8	2	5	1	8,1
Coriandre	12	7	5	1	1	7,1
Grain d'anis	5	5	2	2	1	5,1
Carvi	7	5	1	2	2	5,1
Poivre rouge	20	4	0	2	2	4,1
Cumin	7	1	0	1	0	1,01
Poivre noir	6	1	0	0	1	1,01
Pois chiches	2	2	0	2	0	2,02
fêverole	5	2	2	0	0	2,02
Nombre total	252	98	26	49	23	
Pourcentage (%)	61,12	38,9%	26,5	50	23,5	100

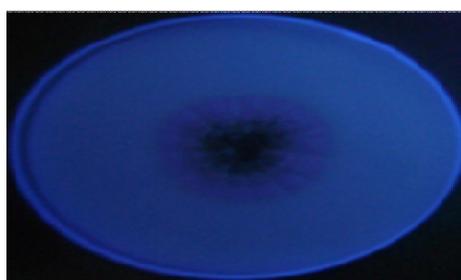


A : Fluorescence bleue (365 nm)

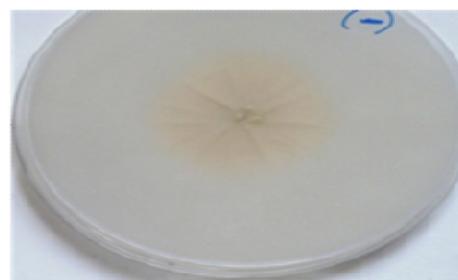


B : revers jaune orangé

Isolat producteur d'aflatoxines



C : (absence de la fluorescence sous U.V.)



D : revers beige

Isolat non producteur d'aflatoxines

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

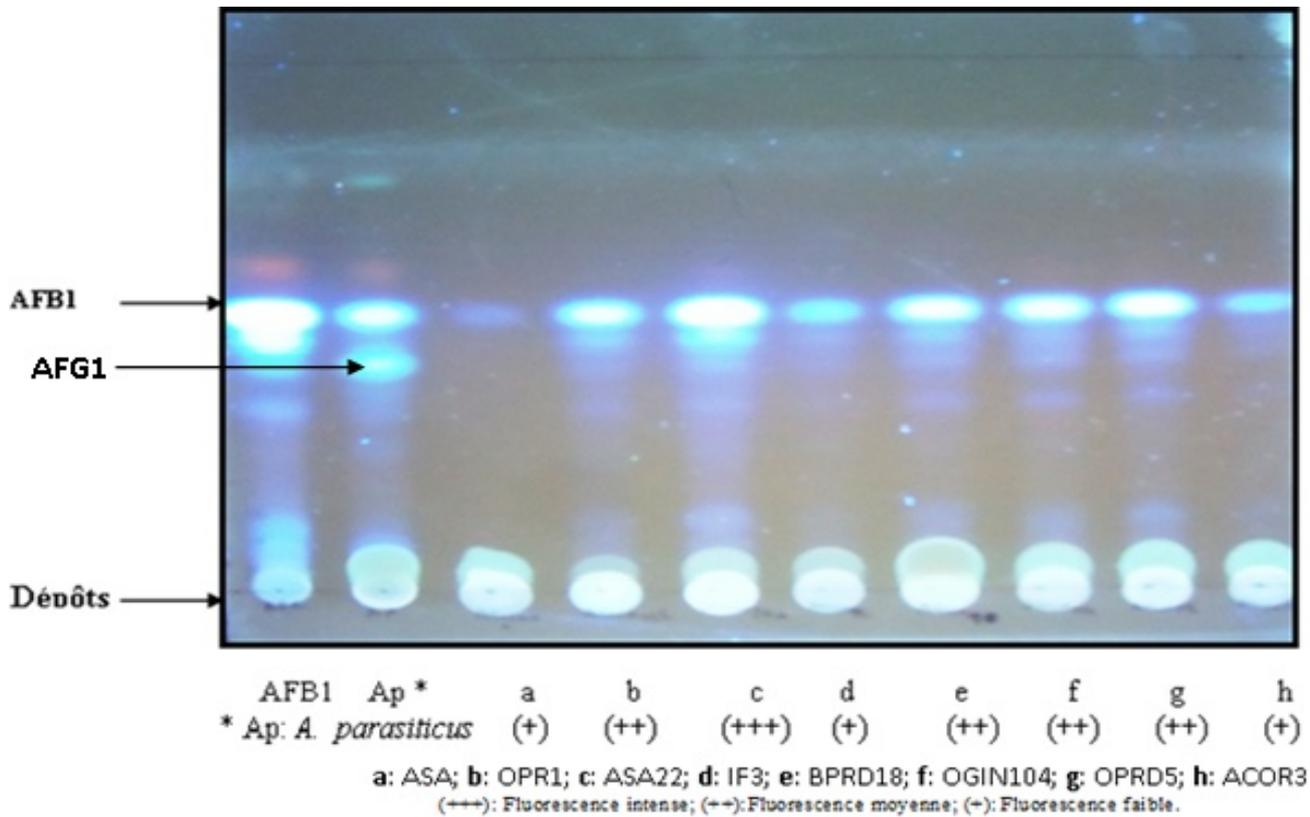


Figure 23. Images sous UV 365 nm montrant les taches bleues plus d'aflatoxines produites par les isolats aflatoxinogènes

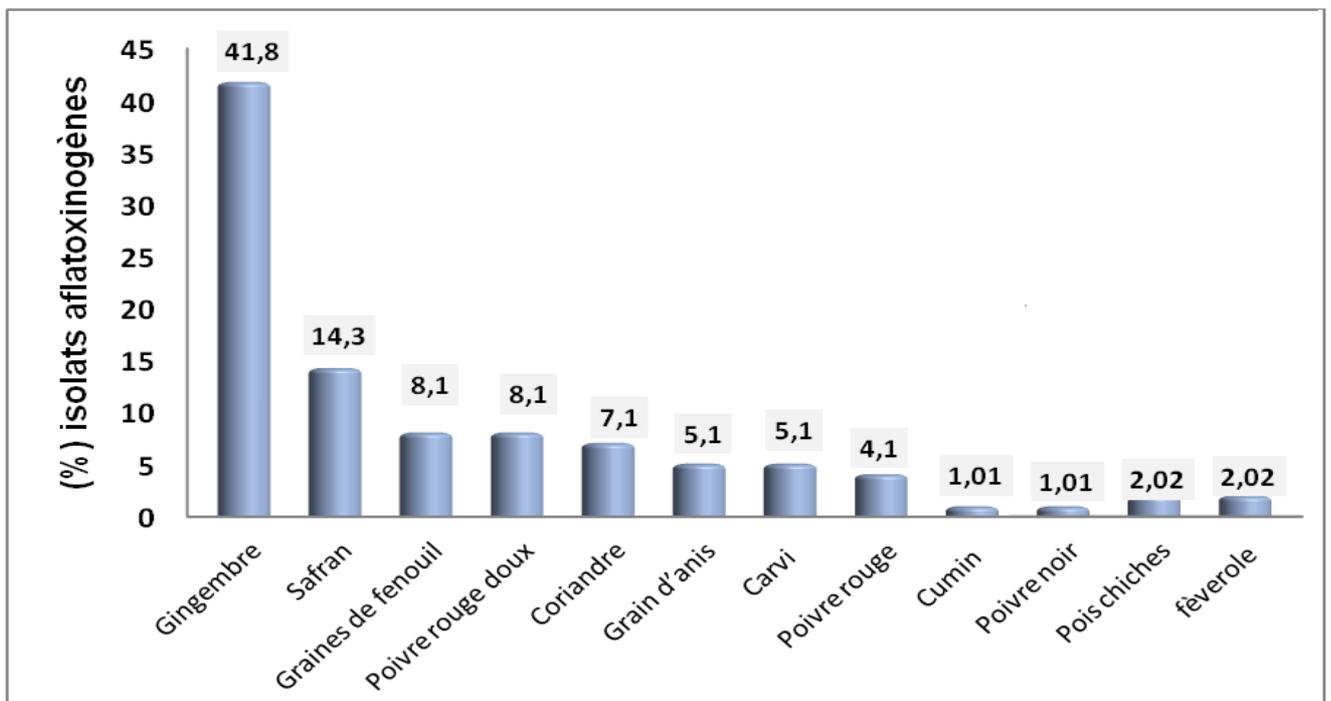


Figure 24. Fréquence (%) des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs en fonction de type de produit.

1.2. Quantification par HPLC des AFs produites par les isolats aflatoxinogènes

Le but de cette analyse était surtout savoir la quantité d'AFB1 produites par les isolats aflatoxinogènes. Il aurait été souhaitable d'analyser systématiquement tous les isolats. Toutefois, en raison du coût élevé des analyses par HPLC, la quantification de la production d'AFB1, a été réalisée pour 28 isolats seulement sur les 98 isolats aflatoxinogènes. Ces isolats ont été choisis selon l'intensité de la fluorescence obtenue par CCM. 12 isolats sont fortement producteurs d'AFB1, 11 isolats sont moyennement producteurs, 5 isolats sont faiblement producteurs. L'analyse a été réalisée au laboratoire de toxicologie à l'E.N.S.A. Toulouse (France).

Les résultats de l'analyse ont révélé des quantités allant de 8,66 à 15313,22 µg/kg. Douze sur 28 isolats, soit 42,8% d'isolats produisent des quantités d'AFB1 comprises entre 3090,12 et 15313,22 µg/ml, ces derniers représentent les isolats fortement productrices selon les résultats obtenus par CCM. 39,4% d'isolats produisent des quantités d'AFB1 comprises entre 629,21 et 2788,72 µg/ml, ils correspondent aux isolats moyennement producteurs, 17,8% d'isolats faiblement producteurs représentent des quantités variées entre 8,66 et 485,76 (Tableau 18). La plus grande quantité (15313,22 µg/ml) est produite par l'isolat « AGIN 101 » isolé du gingembre provenant de la région d'Alger.

Nous remarquons, d'après les résultats consignés dans le tableau 18 qu'il ya une concordance entre l'intensité de la fluorescence et la quantité produite par les isolats, cela prouve que la CCM est aussi performante que la HPLC.

2. Production de l'acide cyclopiazonique (CPA) par les isolats aflatoxinogène

En vue d'une caractérisation chimio-taxonomique, les 98 isolats aflatoxinogènes ont été analysés pour leur pouvoir producteur de CPA, cette dernière est produite par quatre espèces d'*Aspergillus* aflatoxinogènes qui sont: *A. flavus*, *A. pseudotamarii*, *A. minisclerotium* et *A. parvisclerotigenus*. Les résultats ont révélé que 86 isolats (87,7%) sur 98 isolats aflatoxinogènes produisent le CPA, avec un seuil de détection de 1 µg/g du milieu. 12 (12,3%) isolats aflatoxinogènes ne produisent pas le CPA.

Le tableau 19 montre la répartition des 98 isolats aflatoxinogènes producteurs de CPA en fonction de type du produit analysés et en fonction de la production d'AFs. Les résultats nous montrent que 37 isolats (43%) ont été isolés du gingembre, 13 isolats (15,2%) de safran, 7 isolats (8,2%) de poivre rouge doux, 7 isolats (8,2%) de coriandre, 3 isolats (3,4%) des graines d'anis, des faibles pourcentages d'isolats producteurs de CPA ont été enregistré dans le carvi, poivre rouge, cumin, poivre noir, pois chiche et la fevèrole.

Tableau 18. Caractéristiques des 28 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* issus des échantillons d'épices et légumes secs.

isolats	Source	Origine	Quantité d'AFB1 (µg/kg)	CCM	
				AFB1	AFG1
AGIN101	Gingembre	Alger	15313,22	+++	-
ASA22	Safran	Alger	7529,38	+++	-
BPRD29	Poivre rouge doux	Biskra	5114,69	+++	-
ASA88	safran	Alger	4809,95	+++	-
AGIN22a	Gingembre	Alger	4365,9	+++	-
BCOR18	Coriandre	Biskra	4334,55	+++	-
BCOR35	Coriandre	Biskra	4269,73	+++	-
AGIN96	Gingembre	Alger	4094,71	+++	-
AGIN102	Gingembre	Alger	4021,08	+++	+
SPRD2	Poivre rouge doux	Batna	4013,34	+++	+
AGIN14	Gingembre	Alger	3112,46	+++	-
OGA90	Graine d'anis	Oran	3090,12	+++	-
BPRD18	Poivre rouge doux	Biskra	2788,72	++	-
OGIN104	Gingembre	Oran	2685,85	++	-
OPRD5	Poivre rouge doux	Oran	2496,32	++	-
SPRD5	Poivre rouge doux	Batna	2428,8	++	+
SGF40	Graine de fenouil	Batna	2002,72	++	-
OP2	Pois chiche	Oran	1991,19	++	-
OCOR2	Coriandre	Oran	1785,41	++	-
OPR1	Poivre rouge	Oran	1300	++	-
AGIN11	Gingembre	Alger	947,74	++	-
AGIN21	Gingembre	Alger	698,02	++	-
BCU16	Cumin	Biskra	629,21	++	-
BCAR10	Carvi	Biskra	485,76	+	-
IF3	Féverole	ITGC	184,19	+	-
ACOR3	Coriandre	Alger	109,68	+	-
OGIN4	Gingembre	Oran	29,48	+	-
AGA98	Graine d'anis	Alger	8,66	+	-
Moyenne			3022,9		

Tableau 19. Répartition des 98 isolats aflatoxinogènes selon la production de CPA

Epices et légumes secs	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Nombre d'isolats producteurs de CPA	Moyenne %
Gingembre	41	37	43
Safran	14	13	15,2
Grain de fenouil	8	6	7
Poivre rouge doux	8	7	8,2
Coriandre	7	7	8,2
Grain d'anis	5	3	3,4
Carvi	5	3	3,4
Poivre rouge	4	4	4,6
Cumin	1	1	1,2
Poivre noir	1	1	1,2
Pois chiches	2	2	2,3
fève	2	2	2,3
Nombre total d'isolats	98	86	100
Pourcentage %	38,9%	87,7%	

3. Production de sclérotés par les isolats aflatoxinogènes

Sur les 252 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* isolés des épices et de légumes secs, 98 se sont révélés des producteurs d'AFs. Parmi ces isolats producteurs : 54 isolats (55,5%) non producteurs de sclérotés, ces derniers appartiendraient vraisemblablement à *A. flavus* typique. 44 isolats (44,9%) produisant des sclérotés dont 14 (14,3%) produisent les sclérotés de type « S » (<400 µm), [ces isolats regroupent des *A. flavus* atypique et *A. minisclerotigenes*] et 30 (30,6%) produisent les sclérotés de type « L » (>400 µm)[ces isolats regroupent les *A. flavus* typique] (Figure 25 et 26). Nous parlerons dans le paragraphe suivant sur la taxonomie de ces isolats d'une manière plus détaillée

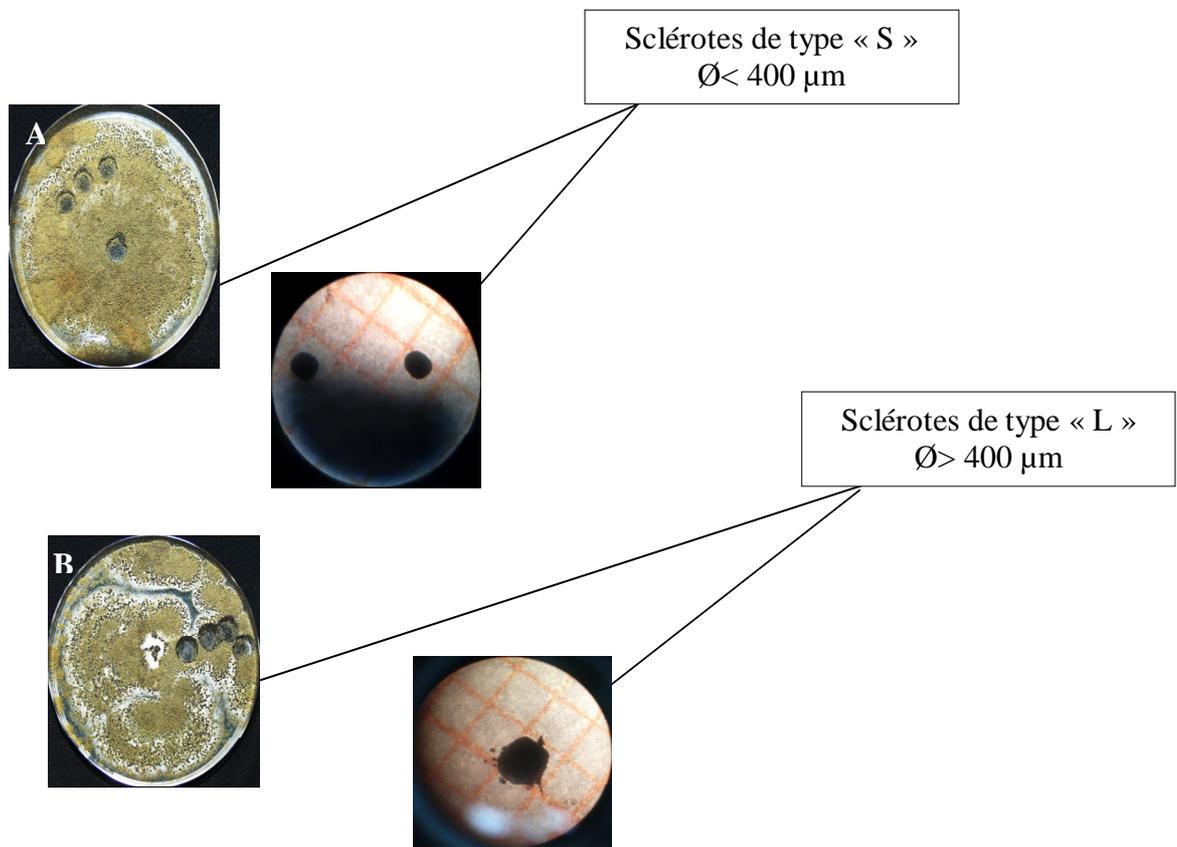


Figure 25. Présentation de deux types d'isolats producteurs des sclérotés de type « S » et « L »
 A : isolat de type « S » (sclérote $< 400 \mu\text{m}$). , B : isolat de type « L » (sclérote $> 400 \mu\text{m}$).

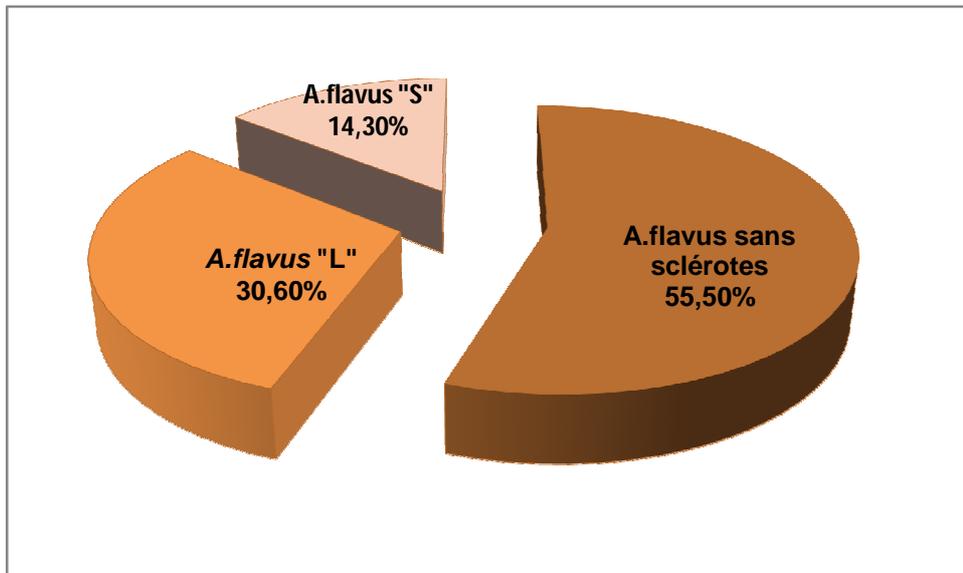


Figure 26. Répartition des 98 isolats aflatoxinogènes selon la production des sclérotés

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

Sur la base du profil de mycotoxines produites, en plus des caractères morphologiques, les 98 isolats aflatoxinogènes appartenant à la section *Flavi* ont été subdivisés en 7 groupes (Tableau 20).

Le groupe I, (44 isolats, 45% du total d'*Aspergillus* aflatoxinogènes analysé) produit l'aflatoxine de type B, le CPA mais pas des sclérotés

Le groupe II est constitué de 28 isolats produisant l'aflatoxine de type B, le CPA et de sclérotés de type "L" ($\emptyset > 400 \mu\text{m}$). Ce groupe représente 28,5% du total des souches d'*Aspergillus* aflatoxinogènes analysé.

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

Le groupe III, moins fréquent (2 isolats, 2%), produit l'aflatoxines de types B, et de sclérotés de type "L" mais pas de CPA

Le groupe IV, (9 isolats, 9,2 du total d'*Aspergillus* aflatoxinogènes) produit uniquement l'aflatoxine de type B mais ne produit pas de CPA et des sclérotés.

Le groupe V, (10, 10,2%) inclue des isolats produisant l'AFB, le CPA et de sclérotés de type « S » ($\emptyset < 400 \mu\text{m}$). Ces isolats pourraient appartenir au groupe atypique d'*A. flavus* qui produit uniquement l'aflatoxine de type B.

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

Le groupe VI, inclue les 4 isolats produisant les aflatoxines de type B et G, le CPA et les sclérotés de type « S ». Ce groupe représente 4% des isolats aflatoxinogènes testés. Ces isolats sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus*.

Le groupe VII, représenté par un seul isolat produit les deux types d'AFs B et G, mais pas de CPA et de sclérotés. Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*. Cette dernière, morphologiquement très proche d'*A. flavus*, produit les AFs B et G et est fréquente dans le sol et parasite les insectes (Kurtzman *et al.*, 1987). La caractérisation des 28 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction de la production d'AFB, AFG, de CPA et de sclérotés sont récapitulés dans le tableau 21.

Tableau 20. Répartition des 98 isolats aflatoxinogènes selon la production de CPA et de sclérotés.

Groupe	AFB	AFG	CPA	Sclérotés « L »	Sclérotés « S »	Nombre d'isolats	Pourcentage (%) ^a
I	+	-	+	-	-	44	45
II	+	-	+	+	-	28	28,5
III	+	-	-	+	-	2	2
IV	+	-	-	-	-	9	9,2
V	+	-	+	-	+	10	10,2
VI	+	+	+	-	+	4	4
VII	+	+	-	-	-	1	1
Total (%)	100	5,1%	87,7%	30,6%	14,3%	98	100

a : Pourcentage par rapport à 98 isolats aflatoxinogènes. AFG : aflatoxine G ; CPA: acide cyclopiazonique

Presque la majorité des isolats aflatoxinogènes (74%) produisent le CPA avec présence ou non de sclérotés de type « L ». Selon Samson *et al.*, (2004), cette catégorie d'isolats appartiendrait vraisemblablement à *A. flavus* typique (groupe I et II). 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 aflatoxines de type B et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais cette production est extrêmement variable (Richard *et al.*, 1992; Horn et Dorner, 1999). En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (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, Mehdi *et al.* (2006) soulignent, comme nous, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les AFs, le CPA et les sclérotés. 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).. D'après Hua (2002), tous les isolats de types « S » sont aflatoxinogènes, alors que le morphotype « L », le plus fréquent, comprend des producteurs et des non producteurs.

Parmi les 98 isolats aflatoxinogènes, 14% d'entre eux produisent des sclérotés de type « S ». Ces isolats sont fortement producteurs d'AFB1 révélée sur CCM et par HPLC. Parmi

ces 14% d'isolats, 4% (4 isolats) se sont révélés producteur d'AFG. Nos isolats produisant l'AFB, l'AFG et le CPA sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus* sont rares. Le type « S », signalé pour la première fois par Hesseltine *et al.* (1970) est rarement rencontré (Vaamonde *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2005; Giorni, 2007). Selon 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.

IV. Etude du pouvoir producteur d'OTA par les isolats d'*Aspergillus* et *Penicillium*

L'étude du pouvoir producteur de l'OTA a été réalisée sur milieu de culture CYA pour un total de 146 isolats appartenant au genre *Aspergillus* et *Penicillium* issus des échantillons des épices et de légumes secs (Tableau 22). Ainsi l'analyse par CCM a révélée un taux de 9,6% d'isolats ochratoxinogènes, dont 3 isolats d'*Aspergillus* section *Circumdati* issus du cumin et de graine de fenouil, 3 isolats d'*Aspergillus* section *Terrei* issus de poivre rouge doux et du coriandre, 7 isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* issus du poivre noir, poivre rouge doux et la cannelle, un isolat de *Penicillium verrucosum* issus de cumin (Figure 27). La production d'OTA est liée à la physiologie propre de chacune des espèces et aux paramètres de l'environnement (température, sol, pratiques culturales ect) (Bayman et Baker., 2006). La production d'OTA dans les régions à climat chaud est généralement attribuée aux espèces du genre *Aspergillus*. Par contre, dans les régions à climat tempéré, c'est les espèces de *Penicillium* qui sont responsables de la production de cette toxine. Toutefois, ces deux genres peuvent être retrouvés dans les différentes denrées stockées ou dans les produits en cours de transformation (Magan et Aldred, 2005). Chez le genre *Penicillium*, deux espèces sont capables de produire l'OTA: *P. verrucosum* et *P. nordicum* (Larsen *et al.*, 2001). Cette dernière contamine souvent les produits riches en protéines et les produits fermentés à base de viande ou de fromage (Lund et Frisvard, 2003). Nos isolats du genre *Penicillium* producteurs d'OTA appartiendraient à *P. verrucosum*. Ainsi, les espèces responsables de la production d'OTA dans les épices commercialisées en Algérie sont surtout *Aspergillus* section *Nigri*, et à un degré moindre *Aspergillus* section *circumdati*, *Aspergillus* section *terrei*, et *Penicillium verrucosum*. *Aspergillus ochraceus* est très connue pour sa grande capacité à produire l'OTA (Bayman *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003). D'après Samson *et al.* (2006), la production d'OTA chez les isolats d'*A.ochraceus* n'est pas très stable. Comme nous l'avons souligné dans la partie revue bibliographique, il est très difficile morphologiquement de faire la distinction entre les espèces de la section *Circumdati* et puisque nos isolats ont montré une faible production d'OTA, de ce

fait, il est fort probable que ces isolats d'*Aspergillus* section *Circumdatii* appartiennent à d'autres espèces ochratoxinogènes très proches d'*A. ochraceus*.

Tableau 21. Caractéristiques des 28 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* selon la production d'AFs, de CPA et de sclérotés.

isolat	Source	Origine	Quantité d'AFB1 (µg/kg)	CCM		CPA	Sclérotés	Espèces probables
				AFB1	AFG1			
AGIN101	Gingembre	Alger	15313,22	+++	-	+	+ (S)	<i>A. flavus</i> (V)
ASA22	Safran	Alger	7529,38	+++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
BPRD29	Poivre rouge doux	Biskra	5114,69	+++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
ASA88	safran	Alger	4809,95	+++	-	+	+ (S)	<i>A. flavus</i> (V)
AGIN22a	Gingembre	Alger	4365,9	+++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
BCOR18	Coriandre	Biskra	4334,55	+++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
BCOR35	Coriandre	Biskra	4269,73	+++	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
AGIN96	Gingembre	Alger	4094,71	+++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
AGIN102	Gingembre	Alger	4021,08	+++	+	+	+ (S)	<i>A. flavus</i> * (VI)
SPRD2	Poivre rouge doux	Batna	4013,34	+++	+	-	-	<i>A. parasiticus, nomius</i>
AGIN14	Gingembre	Alger	3112,46	+++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
OGA90	Graine d'anis	Oran	3090,12	+++	-	+	+ (S)	<i>A. flavus</i> (V)
BPRD18	Poivre rouge doux	Biskra	2788,72	++	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
OGIN104	Gingembre	Oran	2685,85	++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
OPRD5	Poivre rouge doux	Oran	2496,32	++	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
SPRD5	Poivre rouge doux	Batna	2428,8	++	+	+	+ (S)	<i>A. flavus</i> * (VI)
SGF40	Graine de fenouil	Batna	2002,72	++	-	-	-	<i>A. flavus</i>
OP2	Pois chiche	Oran	1991,19	++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
OCOR2	Coriandre	Oran	1785,41	++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
OPR1	Poivre rouge	Oran	1300	++	-	-	-	<i>A. flavus</i>
AGIN11	Gingembre	Alger	947,74	++	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
AGIN21	Gingembre	Alger	698,02	++	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
BCU16	Cumin	Biskra	629,21	++	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
BCAR10	Carvi	Biskra	485,76	+	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
IF3	Féverole	ITGC	184,19	+	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
ACOR3	Coriandre	Alger	109,68	+	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
OGIN4	Gingembre	Oran	29,48	+	-	+	+ (L)	<i>A. flavus</i> (II)
AGA98	Graine d'anis	Alger	8,66	+	-	+	-	<i>A. flavus</i> (I)
Moyenne			3022,9					

S : sclérotés de taille < 400µm ; L : sclérotés de taille >400µm ; +++ : fluorescence très intense; ++ : fluorescence intense; + : fluorescence faible; CPA : acide cyclopiazonique; * : le type (VI) d'*A. flavus* correspond soit à *A. minisclerotigenes* soit à *A. parvisclerotigenus*, selon la dernière classification proposée par Pildain *et al.* (2008).

Nous n'avons pas rencontré d'*A.carbonarius* au cours de cette étude. Il est fort probable que les épices ne soient pas un substrat propice pour cette espèce. Le pourcentage d'isolats producteurs d'*Aspergillus* section *Nigri* peut varier en fonction du nombre d'espèces testées ainsi que leur origine géographique (Abarca *et al.*, 1994 ; Nakajima *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 2004). Da Rocha Rosa *et al.* (2002) et Magnoli *et al.* (2003) ont rapporté des taux de production de l'OTA de 30% et 43,1% respectivement. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie (Abarca *et al.*, 1994; Téren *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2005). La production d'OTA par *A. terreus* a été rapportée par Ueno *et al.* (1991) et Abarca *et al.* (1997).

V. Contamination des échantillons d'épices et de légumes secs par l'aflatoxine B1

1. Contamination des échantillons des épices par l'aflatoxine B1

L'analyse par HPLC de l'AFB1 a été réalisée pour 21 échantillons d'épices. La distribution de ces échantillons ainsi que les taux de contamination par l'AFB1 sont illustrés dans le tableau 23. Dans cette étude nous avons trouvé 13 (61,9%) échantillons d'épices sur 21 ont été contaminés par l'AFB1, dont 2 (9,5%) échantillons dépassant la valeur maximale limite fixée par la réglementation Algérienne (10 µg/kg), 11(52,3%) échantillons sont inférieurs à la limite maximale et 8 (38,2%) échantillons sont révélés négatifs (figure 28). En effet, les quantités d'AFB1 enregistrées dans le safran et la graine de fenouil 24,34 et 19,07 µg/kg respectivement. Cependant les quantités retrouvées dans le gingembre la coriandre, graine d'anis, poivre rouge doux, poivre rouge et carvi sont comprises entre 1,60 et 0,08 µg/kg. La teneur élevée d'AFB1 dans le safran s'expliquerait par la forte contamination de cette dernière par des isolats aflatoxinogènes 14,3 %. Le gingembre présente une faible teneur en AFB1, malgré que le gingembre présente une forte contamination par les isolats aflatoxinogènes (41,8% d'isolats aflatoxinogènes). Il faut souligner que la capacité de production *in vitro* par certaines souches ne traduit pas obligatoirement les mêmes capacités *in vivo*. En effet, il peut y avoir des souches capables de produire la mycotoxine dans les conditions naturelles mais pas dans les conditions de laboratoire et inversement (Mantle, 2002; Medina *et al.*, 2005). Cette hypothèse peut d'ailleurs expliquer, en partie, l'absence de corrélation entre le taux d'isolats mycotoxinogènes et la présence de la mycotoxine mycotoxinogènes et la présence de la mycotoxine dans une denrée alimentaire, ce que a été observé dans notre cas. Cependant Madhyastha et Bhat. (1984) ont signalé que le poivre rouge et le gingembre sont des bons substrats pour la croissance et la production des aflatoxines. La recherche des AFB1 dans le poivre noir, cumin et la cannelle, s'est révélée négative. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par de nombreux auteurs. Selon Elshafie *et al.*, (2002), l'analyse de 105 échantillons d'épices (cumin, cannelle, girofle, poivre noir, curcuma) a montré la contamination par *A. flavus*

Tableau 22. Nombre des isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ochratoxinogènes isolés des échantillons d'épices.

Type des isolats	Nombre des souches analysées	Nombre d'isolats ochratoxinogènes révélés par CCM	Pourcentage (%) des isolats ochratoxinogènes	Source des isolats ochratoxinogènes
<i>Asp¹</i> section <i>Nigri</i>	124	7	50	Poivre rouge doux, poivre noir, cannelle
<i>Asp</i> section <i>Terrei</i>	8	3	21,4	Poivre rouge doux, coriandre
<i>Asp</i> section <i>Circumdati</i>	6	3	21,4	Cumin, graines de fenouil
<i>Penicillium</i>	8	1	7,2	Cumin
Total	146	14(9,6%)	100%	

Asp¹ : *Aspergillus*

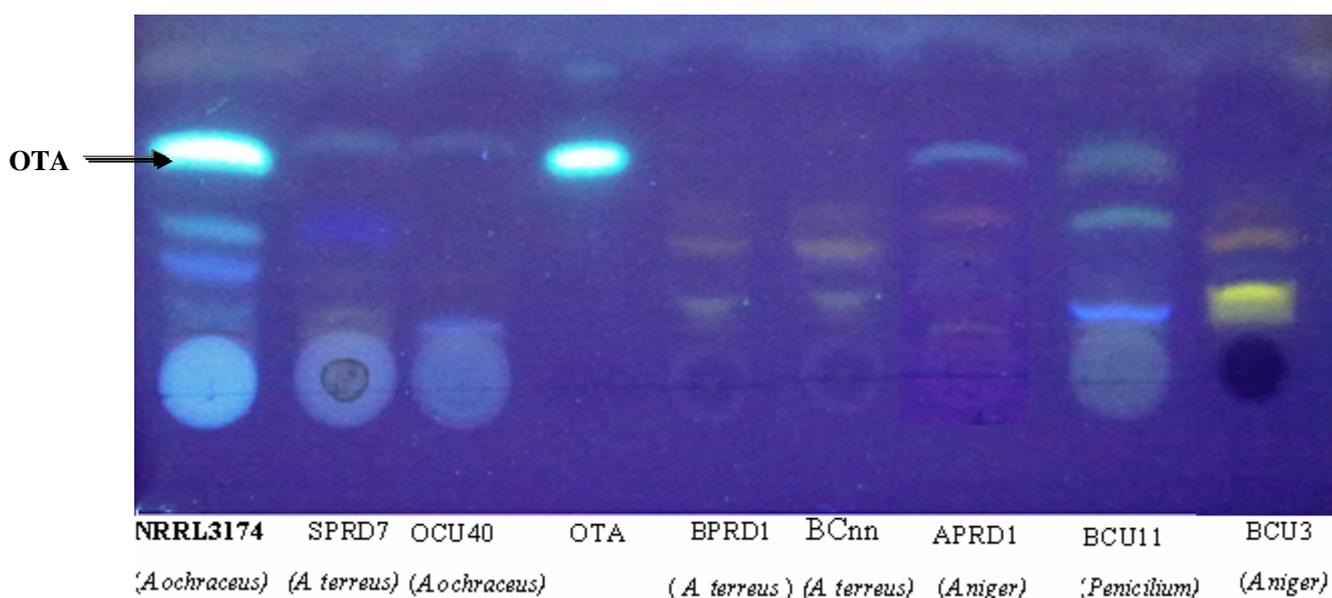


Figure 27. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse des extraits méthanoliques de sept isolats d'*Aspergillus* et un isolat de *penicillium* par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV).

A.niger, *Penicillium* et *Rhizopus*. Cependant, les aflatoxines n'ont pas été détectées dans les épices analysées. Ainsi Bartine et Tantaoui-Elaraki (1997) ont trouvé que la croissance des souches de moisissures toxigènes d'*A. flavus* étant très faible sur le poivre noir et blanc, ces mêmes auteurs ont signalé aussi que l'AFB1 n'est pas détectée dans le poivre noir et blanc. D'autre part, Bircan (2005) souligne que le cumin n'est pas favorable à la production d'aflatoxines. Cela est expliqué par Juglal *et al*, (2002), qui disent que l'absence d'aflatoxines dans le cumin et la cannelle peut être le résultat d'une inhibition des champignons aflatoxinogènes par les huiles essentielles et d'autres substances aromatiques produites par ces plantes. Selon Mabrouk et El-Shayeb. (1980), les huiles essentielles présentes dans les épices comme le clou de girofle, la cannelle, le cumin et le poivre noir, peuvent inhiber la production d'aflatoxines par *A. flavus*.

La présence d'AFB1 à des quantités très variables dans les épices à été signalée par de nombreux auteurs. Cependant les travaux de Zinedine *et al*, (2006) ont montré que les taux des aflatoxines totales dans le poivre rouge et le gingembre varient respectivement de 1,30 à 9,68 µg/kg et de 0,03 à 9,10 µg/kg. Cependant les niveaux de l'AFB1 varient entre 0,03 à 0,3 µg/kg dans les échantillons de poivre noir, alors que dans les échantillons du cumin, les taux d'AFB1 varient entre 0,01 et 0,08 µg/kg. Fufa et Urga. (1996) ont noté une forte contamination des épices provenant d'Addis Ababa (Ethiopie) par l'AFB1. Les niveaux d'AFB1 dans le « Shiro » et le poivre rouge variaient respectivement de 100 à 500 µg/kg et de 250 à 525 µg/kg. En Egypte la contamination de 17 échantillons des herbes et épices incluant : les graines de fenouil, gingembre, le safran, la cannelle et le curcuma par les AFB1 a été étudié par Aziz *et al* (1998), les résultats en monté que 22,4% des échantillons analysés contenait plus de 10 µg/kg d'AFB1. La valeur maximale en AFB1 a été retrouvée dans les échantillons de graine de fenouil 160 µg/kg. Par contre ils ont montré une absence totale des mycotoxines dans les échantillons de cannelle, safran et le curcuma.

En effet les études de roy *et al* (1988) trouve que 89% des échantillons de fenouil, coriandre et cumin sont contaminés par les AFB1 a des niveaux 300 µg/kg, 164 µg/kg et 158 µg/kg respectivement. D'autre part Roy et chourasia (1990) ont montré que le taux d'AFB1 dans le poivre noir, coriandre et cardamome est au dessous de 20 µg/kg En Angleterre, la contamination de 157 échantillons des herbes et des épices incluant le carvi, le poivre, le piment, la "chilli" en poudre, le gingembre, la cannelle et le coriandre par les aflatoxines a été étudiée par MacDonald et Castle (1996), les résultats ont montré que 95% des échantillons analysés contenaient moins de 10 µg/kg d'aflatoxines totales. La valeur maximale en aflatoxines totales a été retrouvée dans un échantillon de la "chilli" en poudre avec 48 µg/kg. Les mêmes auteurs ont montré que le taux des aflatoxines dans les épices; n'a pas été réduit au cours de la cuisson par différentes méthodes.

Tableau 23. Résultats de la contamination par l' AFB1 des 21 échantillons d'épices.

Les épices	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Quantité (µg/kg)
Safran	2	1	24,34
Graine de fenouil	2	1	19,07
Gingembre	3	2	1,60 ; 0,1
Coriandre	2	2	0,79; 0,10
Graine d'anis	3	3	0,66 ; 0,47 ; 0,14
Poivre rouge doux	2	2	0,17 ; 0,10
Poivre rouge	3	1	0,19
Carvi	1	1	0,08
Poivre noir	1	0	ND
Cumin	1	0	ND
Cannelle	1	0	ND
Total	21	13 (61,9 %)	0,08-23,34

ND: le seuil limite de detection est de 0,005 µg/kg

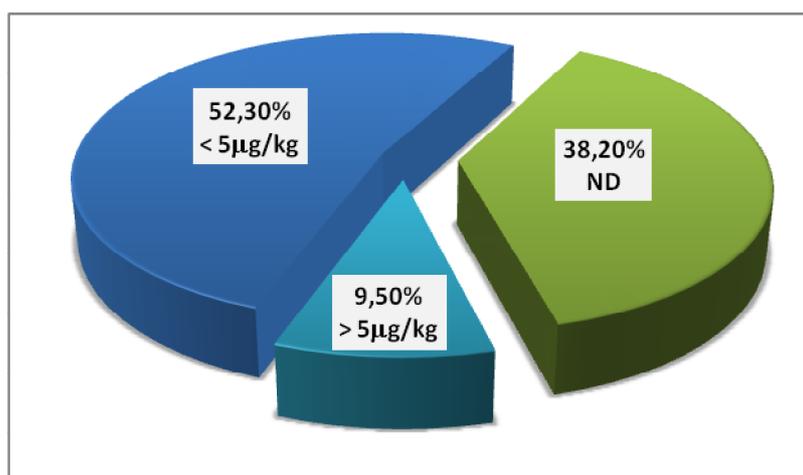


Figure 28. Taux de contamination des échantillons d'épices par l' AFB1

Les épices sont dotées de propriétés de préservation et elles sont utilisées également comme antioxydants. Elles sont aussi utilisées en médecine traditionnelle, ce qui fait que leur valeur marchande est assez élevée dans le marché international.

Les épices sont produites par les pays ayant un climat tropical ou subtropical et dont la température, l'humidité et les précipitations sont importantes. Après leur récolte, les épices sont souvent laissées sur le sol dans une aire ambiante pour sécher. Ce qui constitue dans la majorité des cas des conditions idéales pour la croissance des moisissures et la production de mycotoxines (Martins *et al.*, 2001).

2. Contamination des échantillons des légumes secs par l'aflatoxine B1

Les résultats de l'analyse de 4 échantillons de légumes secs ont montré qu'aucun échantillon n'est contaminé par l'AFB1. En effet, l'AFB1 s'est révélée négative dans ces échantillons pour les lentilles, pois chiches, les haricots et la fève. Nous remarquons qu'il y a une corrélation entre l'absence des contaminations par les espèces aflatoxinogènes dans les légumes secs et l'absence des toxines. Les traitements que subissent les légumes secs après la récolte et la faible teneur en eau dans ces légumes sont vraisemblablement la cause essentielle de l'absence de moisissures et de mycotoxines dans ce type de produit. Toute fois il faut signaler que peu d'informations sont disponibles sur la contamination des légumes secs par les moisissures et les aflatoxines.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Elles sont produites sur une large variété de denrées alimentaires et leurs productions dépendent d'un certain nombre de conditions environnementales. Les aflatoxines et l'ochratoxine A produites par différentes espèces fongiques du genre *Aspergillus* et *Penicillium*; sont les plus toxigènes pour l'homme et les animaux. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier les espèces aflatoxinogènes et ochratoxinogènes ainsi que les aflatoxines dans les épices et légumes secs commercialisés en Algérie. Les résultats obtenus montrent que les épices tels que le gingembre, le safran, poivre rouge doux, graines de fenouil et la coriandre sont fortement contaminées par les moisissures dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus dominants 56,4% et 25,2% respectivement. 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* (28,9%) et *Nigri* (25%), dans la majorité des épices analysés, et à un degré moindre en *Aspergillus* section *Terrei*, *Circumdati* et *Fumigati*. Par contre, on a remarqué que la densité des moisissures dans les légumes secs est insignifiante et le genre dominant est le *Penicillium*, suivie d'une faible densité du genre *Aspergillus*.

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 sept groupes différents dont la majorité (73,5%) présentait les caractères d'*A. flavus* typique produisant le CPA. Certains (10,2%) sont rattachés aux espèces d'*A. flavus* atypique ayant la capacité de produire de petits sclérotés (<400 µm). Un seul isolat rattaché à *A. parasiticus* ou *nomius* et quatre 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 (Horn *et al.*, 1996; Cotty et cardwell, 1999; Pildain *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006).

La mise en évidence du pouvoir producteur d'aflatoxine 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 et l'HPLC peuvent être utilisées pour la quantification et la confirmation des résultats obtenus sur milieu à base d'extrait de noix de coco.

Les résultats ont montré que près de 38,9 % des isolats appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* produisent les aflatoxines. Les taux de production des 28 isolats d'*A.flavus* testés par HPLC varient entre 8,66 et 15313,22 µg/ml. Les résultats relatifs à la production d'OTA ont montré que près de 9,6% des isolats appartenant au genre *Aspergillus* et *Penicillium* ; produisent cette mycotoxine.

La quantification par HPLC des AFB1 nous a permis de constater que la moitié des échantillons analysés (61,9%) sont contaminés par les AFB1. Deux échantillons de safran et de graine de fenouil dépassent les normes fixées par la législation algérienne (10 µg/kg). Malgré que la plupart des quantités détectées soient inférieures aux normes, ces quantités peuvent être considérées comme un véritable risque pour la santé humaine. Car les effets chroniques (exposition répétée à des faibles voir très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires ainsi que du pouvoir de rémanence de ces toxines.

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

- étendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons;
- étudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxigènes et l'influence des conditions de stockage (température, humidité) sur la toxinogénèse;
- Faire une identification moléculaire des isolats producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A afin de compléter la caractérisation chimiomorphologique.

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

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

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

- vente des aliments comme les épices dans des bacs opaques et qui se ferment hermétiquement cette technique réduit le contact direct entre les épices et l'humidité de l'air, ce qui évite la contamination par les mycotoxines, malgré la présence des spores de

moisissure et aussi d'éviter la destruction des huiles essentielles par la lumière. ces derniers en un rôle fongicide et bactéricide très important.

- 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.
- Il conviendrait de faire un effort législatif accompagné de contrôle de la qualité des denrées alimentaires locale et importé, ainsi que la sensibilisation de la population algérienne sur le danger de ces mycotoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abarca M.L., Accensi F., Cano, J. et Cabanes F.J.** (2004).- Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, **86**, 33–49
- Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G. et Cabanes F.J.** (1994).- Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (7), 2650-2652.
- Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Accensi F. et Cabañes F.J.** (1997). - New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *Journal of Food Protection*, **60**, 1580-1582.
- Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Castella G. et Cabanes F. J.** (2003).- *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, **66**, 504–506.
- Abbas H.K, Zablotowicz R.M., Bruns H.A et Abel C.A.** (2006). - Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*, **16**(5), 437–449.
- Abou Donia. M.A.**(2008)-Microbiological Quality and Aflatoxinogenesis of Egyptian Spices and Medicinal Plants (Global Veterinaria),**2** (4): 175-181
- Adegoke G.O., Odesola B.A.**, 1996. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *International Biodeterioration and Biodegradation*, **37**, 81-84.
- A.O.A.C** (1995).- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods 973.37 et 975.38 (16th ed., pp. 31–32). Arlington, Virginia, USA.
- Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N.** (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of American Chemical Society*. **85**, 1706.
- Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N.** 1965. Structures of aflatoxins B and G1. *Journal of American Chemical Society*. **87**, 822-826.
- Ayerst, G.** 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi, *Journal of Stored Products Res.* **5**,127-141
- Aykroyd W.R., Doughty J.**, 1982. les graines de légumineuses dans l'alimentation humaine. 2^{ème} éd. N 20.FAO.Rome.
- Aziz, N.H., T.A. Youssef, M.Z. El-Fouly and L.A. Moussa,** 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **39**: 279-285

B

Badillet G., de Briève

C., Guého E., (1987), Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris.

- 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.
- Bartine H et Tantataoui-Elaraki A (1997)** Growth and toxinogenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices. *J Environm Pathol Toxicol Oncol*, **16**: 61-65.
- Battilani P., Giorni P. et Pietri A. (2003).**- Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, **109**, 715–722
- Baydar T., Engin A.B., Girgin G., Aydin S. et Sahim G. (2005).**- Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medical*, **12**, 193–197.
- Bayman P., Baker, J.L., Doster M.A., Michailides T.J. et Mahoney, N.E. (2002).**- Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2326–2329.
- Bayman P. et Baker J.L. (2006).**- Ochratoxins, a global perspective. *Mycopathologia*, **162**, 215–223.
- Belli N., Pardo E., Marin S., Farre G., Ramos A.J., et Sanchis V. (2004).**- Occurrence of Ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, **84**, 541–546.
- Bennett J.W. et Klich M. (2003).**- Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, **16**, 497–516.
- Besançon P., 1978.** la valeur nutritionnelle des légumes secs et des protéines de légumineuses. *Revue Française de diététique* (Marseille-France). Vol **22**. n 84. pp 05-17
- Berthier, J. et**
- G. Valla (2001)**- Moisissures-Mycotoxines et aliments : du risque a la prévention. Université Claude Bernard Lyon I. <http://handy.univ-lyon1.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.
- Bhat R, Geeta H, Kulkarni P.R (1987).**-Microbila profile of cumin seeds and chilli powder sold in retail shops in the city of Bombay. *J Food Prot*; **50**: 418-419
- Bhatnagar D., Yu J. et Ehrlich K. C. (2002).**- Toxins of filamentous fungi. *Chemistry and Immunology*, **81**, 167–206
- Botton et al., 1985
- Bircan, C. (2005).** The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *International Journal of Food Science and Technology*, **40** : 929–934.
- Bouchet P., Guignard J.L., Madulo–Leblond G. et Régli P. (1989).**- Mycologie générale et médicale. Ed.Masson (Paris), Chap.4 ,36.
- Botton B. (1990).**- Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2ème ed. Masson ed, Paris. 1990.
- Boysen M.E., Jacobsson K.G., Schnürer J., (2000),** Molecular Identification of Species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (4), 1523-1526.

Bouraima, Y., Ayi-Fanou, L., Kora, I., Sanni, A., Creppy, EE, 1993. Mise evidence la contamination des cereals par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Benin. In Creppy, EE., Castegnaro, M., Dirheimer (Eds). Human ochratoxicosis and its pathologies. **231**, 101-110.

Bragulat M.R., Abarca M.L. et Cabanes F.J. (2001).- An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 139–144.

Bullerman L.B., Lieu F.Y., Seier S.A., 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*, **42**, 1107-1109

C

C.I.R.C (2002).- Centre International de Recherche contre le Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, World Health Organization. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation, vol. 82. Lyon, pp. 171–175.

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, *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 1215-1221

Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Fremy J.M., Hennebert G.L., Lesage–Meessen L., Multon J. F., Richard–Molard D. et Roquebert M.F. (1998).- Moisissures des aliments peu hydratés. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, France. 218p

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.

Campbell-Platt G. et Cook P.E. (1989). Fungi in the production of foods and food ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*, **67**,117S–131S.

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-Leskowicz A., (2002), Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc

Chabane S. (2000).-mise au point de méthodes physiques d'analyse pour la détection des épices ionisées. Thèse de doctorat en chimie analytique. P19-22

Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile.L., Brun.S., Cimon.B., Penn.P. (2002)- les moisissures d'intérêt medical, chapitre de formation biologie medical, n 25, 160p

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.

Chermette R., Bussieras J., (1993), Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort

Chiavaro E., Dall'Asta, C., Galaverna G., Biancardi A., Gambarelli E., Dossena A. et Marchelli R. J. (2001).- New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography*, **A7**, 31–40.

Christensen C.M, Fanse H.A, Nelson G.H, Bates F, Microcha C.J.(1967) Microflora of black and red pepper. *Appl Microbiol*; **15**: 622-628

Ciegler, A., Fennell, D. I., Sansing, G. A., detroy, R. W., Bennett, A. 1973. Mycotoxinproducing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Applied Microbiology*, **216**, 271-278.

Cotty P. J. (1989).- Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. **79**, 808–814.

Cotty P. J. et Cardwell K. F. (1999). - Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2264–2266.

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

Da Rocha Rosa C.A., Palacios V., Combina M., Fraga M.E., De Oliveira Rekson A., Magnoli, C.E., et Dalcero A.M. (2002).- Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil *Food Additive and Contaminants*,**19**, 408–414.

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.

De Aguirre L., Hurst S.F., Choi J.S., Shin J.H., Hinrikson H.P., Morrison C.J., (2004), Rapid Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay, *J. Clin. Microbiol.*, **42** (8), 3495-3504

Delaveau P., 1987. Les Epices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur, v .**75**, n .27. 372 p.

Dial S.M., (2007), Fungal diagnostics: current techniques and future trends, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **37**(2):373-92

Dimié G.R., Kocić-Tanackov, A.N.,vujčić, B.L., Sumić,Z.M., 2008. Mycopopulation of spices. *BIBLID* **39**,1-9

Domsh K.H., Gams W., et Anderson T.H., (1981). Compendium of soil fungi, vol.1 and 2, Academic Press, London, pp. 857 and II, pp.405

Domsch, K.H.; Gams, W. et Anderson, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. London, Academic press.

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.

Dorner J.W., Cole R.J., Lomax, L.G., Gosser H.S. et Diener U.L. (1983).- Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 698–703.

Dutton, M. F., Ehrlich, K., et Bennett, J. W. 1985. Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1392–1398.

E

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.

El achkar M., Lebrun E., Ghorbal S., Gurerin L., Pernelle J .J., Ogier J C., Bouix M . (2007)_différenciation rapide des espèces de moisissures en mélange à l'aide d'un référentiel basé sur une empreinte moléculaire. 8ème Symposium International d'OEnologie. Bordeaux 25, 26 et 27 Juin 2007

El Adlouni C., Tozlovanu M., Natman F., Faid M. et Pfohl-Leszkowicz A. (2006).- Preliminary data on the presence of mycotoxins (OTA, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “greek style” of Moroccan origin . *Molecular Nutrition and Food Research*, **50**, 507–512.

El-Kady¹, S. S. Mohamed El-Maraghy¹ and M. Eman Mostafa (1992)-contribution of the mesophilic fungi of different spices in Egypt. *Assiut University, Botany Departement, Faculty of science, Assiut, Egypt: mycopathologia* **120**: 93-101,

Elshafie AE, Al-Rashdi TA, Al-Bahry SN et Bakheit CS (2002) Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. *Mycopathologia* **155**(3):155-160.

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.

F

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004). - Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. FAO, Rome.

Fazli H., 1992-spices: trends of the world market international trade Forum.

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.

Fernandez Pinto V., Patriarca A., Locani O., Vaamonde G. (2001).- Natural co-occurrence of aXatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additive and Contaminants*, **18**, 1017–1020.

Franco C. M., Fente C. A., Vazquez B. I., Cepeda A., Mahuzier G. et Prognon P. (1998).- Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1, fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography*, **A 815**, 21–29.

Ferhout H., Bohatier J., Guillot J., 1999. Antifungal activity of selected essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol against *Malasseria furfur* and *Candida albicans*. *J. Essent. Oil Res.*, 11, 119-129

Frisvad, J. C., Filtenborg, O., Lund, F., Samson, A. 1999. The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion, p 259-277. In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (ed.), Integration of modern taxonomic methods for *Aspergillus* and *Penicillium* classification. Harwood Academic Publishers, Reading. UK

Frisvad J.C., Skouboe P, Samson R.A. (2004).- A new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3–O–methylsterigmatocystin: *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 442–453.

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.

Frisvad, J.C. et Samson, R.A. 1991. Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: Chelkowski, J.(Ed.) Cereal Gggrain Mycotoxins, Fungi and quality in Drying and storage.; pp 441-476. Elsevier, Amsterdam.

Fufa H et Urga K (1996) Screening of aflatoxins in Shiro and ground red pepper in Addis Ababa. *Ethio Med J*, **34**: 243-249.

G

Garrido, D, Jordal, M, Poza, R. (1992). Mold flora and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in spices and herbs. *Journal of Food Protection [J. FOOD PROT.]*. Vol. **55**, no. 6, pp. 451-452.

Guarro J., Gené J. et Stchigel A.M. (1999).- Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review*, **12** (3), 454–500.

Geiser D.M., Dorner J.W., Horn B.W. et Taylor J.W. (2000).- The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 169–179.

Geiser D.M., Frisvad J.C. et Taylor J.W. (1998).- Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta–tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia*, **90**, 831– 845.

Giorni P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T., Battilani P. (2007).- Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 330–338.

Glass, N.L., and Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4):1323-1330.

Gower L., (2002). Les légumineuses au moyen orient et en Afrique du nord. Le bulletin bimensuel, **.15**, n.05

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

Grusak M.A., (2000). Strategies for improving the iron nutritional quality of seed crops: lessons learned from the study of unique iron-hyperaccumulating pea mutants. *Pisium genet*, **132**, pp 1-5

H

Hashem. M et Alamri.S, (2008) Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi: ^a King Khaled University, Faculty of Science, Biological Science Department, P.O. Box 10255, Abha 61321, Saudi Arabia, ^b Assiut University, Faculty of Science, Botany Department, Assiut 71516, Egypt

Hageskal G., Knutsen A.K., Gaustad P., de Hoog G.S., Skaar I, (2006), Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (12), 7586-7593.

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.

Henry S.H. et Bosch F.X. (2001).- Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in *Foodborne Disease Handbook*, 2nd ed., Hui, Y.H., Smith, R.A., et Spoerke, Jr., D.G., Eds., Marcel Dekker, New York.

Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J., (2005), Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, **43** (1), 129-137

Hitokoto. H., S. Morozumi., T.Wauke., S. Sakai et H. Kurata, (1978). fungal contamination and mycotoxins detection of powdered herbal drugs. *Applied environmental microbiology*, **36**:252-256 (journal).

Hitokoto.H., Morozumi S., Wauke T., Sakai S., et UenoI, (1980)- inhibitory effect of spices on growth and toxin production by toxigenic fungi. *App. Environ. Microbiol*, **39**: 818-822

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.

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 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. et Dorner J.W. (2002).- Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycologia*, **94**, 741–751

Hua Sui Sheng T. (2002).- Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin and 16th Aflatoxin Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA.

J

Juglal S; Govinden R; Odhav B. (2002) -Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of food protection* 2002; **65**(4):683-7

K

KOBRA Cell (2005).- Cellule électrochimique pour la dérivation des aflatoxines par HPLC. R–Biopharm, France.

Kozakiewicz, Z.(1989)- *Aspergillus* species on stored products. *Mycological papers*, , **161**, 1-188.

King A.D., Hocking A.D. et Pitt, J.I. (1979).- Dichloran–rose bengal medium for enumeration and isolation 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 tamarisii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 147–158.

L

Lacey J. (1989).- Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. *In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. Mycotoxins and phycotoxins* 88. Elsevier, Amsterdam, pp 161–168.

Larsen K., Jahrl S. et Widenfalk A. (2001).- Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 1145–1151.

Le Bars, J., Le Bars P., (1998), -Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing, *Rev. Med. Vet.*, **149**, 493-500.

Lin, L.; Zhang, J.; Wang, P. et Chen, J. (1998). Thin – layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *J Chromatogr A* **815**, 3 20.

Lund F. et Frisvad J.C. (2003).- *Penicillium verrucosum* in cereals indicates production of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 1117–1123.

M

Mabrouk S. S et El-Shayeb N. M A, (1980)- inhibition of aflatoxin formation by some spices. *Z Lebensu Unters Forsch*, **171**, 344-347

MacDonald S et Castle L. (1996) A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Addit Contam*, **13**(1):121-8.

Madhyastha M. S, Bhat. R. V. (1984)-Evaluation of Substrate Potentiality and Inhibitory Effects to Identify High Risk Spices for Aflatoxin Contamination

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 Dalcero A. (2003).- Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, **37**, 179–184.

Mandeel, Q.A., (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159: 291-298.

Mantle P.G. (2002).- Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **50**, 143–146.

Martins M.L, Martins H.M et Bernardo F (2001). Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Add Contam*, **18** (4): 315-319.

Mckee L.H., (1995). Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, **28**, 1-11

Medina A., Mateo R., Lopez-Ocana L., Valle-Algarra F.M., Jimenez M. (2005).- Study of Spanish Grape Mycobiota and ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4696–4702.

Miller J.D. et Trenholm H.L. (1994).- *Mycotoxins in grain : compounds other than Aflatoxin*. Eagan press, st Paul, Minnesota, USA.

Mills, J. T., Abramson, D., Frohlich, A. A., Marquardt, R. R. 1989. Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. From stored durum wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **11**, 357-360.

Mitchell D., Parra R., Aldred D. et Magan N. (2004).- Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 439–445.

Moharram A.M Abdel-Mallek A.Y, Abdel-Hafez (1989)- AII. Mycoflora of anise and fennel seeds in Egypt. *J Basic Microbiol*; **29**: 427-435

Molinié A., Faucet V., Castegnaro M., 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. *Food Chemistry*, **92**, 391–400

Morin O. (1994), *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10

Morno-Martinez E, Christensen CM (1973); Fungus flora of black and white pepper (*piper nigrum* L.) *Rev Lat Am, Microbiol* 15: 19-33

Morris J.A., Khettry A., Seitz E.W. (1979). Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 595-603

N

Nakajima, M., Tsubouch, H., Miyabe, M., Ueno, Y. (1997). Survey of aflatoxin b1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and agricultural immunology*, 9, 77-83.

Niessen L., (2007), PCR based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi, *Int. J. Food Microbiol.*

Novas M. V. et Cabral D. (2002).- Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Diseases*, **86**, 215–219.

Northolt M. D. et Bullerman L .B. (1982).- Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*, **45**, 519–26.

O'Callaghan J. H. X. caddick et A. D. W. Dobson. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 2003, **149**, 3485-3491.

Olutiola, P.O. (1976). Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Trans Br Mycol Soc.* **67**, 265–268.

P

Parenicova, L., Skouboe, P., Samson, R. A., Rossen, L., Visser, J. (2000). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (pp 413-424). Harwood Academic Publishers, Amsterdam the Netherlands.

Park D.L., Liang B. (1993).- Perspectives of aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends Food Science Technology*, **4**(10), 334–42.

Park, J.W., Kim, E.K., Shon, D.H. et Kim, Y.B. (2002).- Natural co-occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 1073–1080.

Perry, J. J., Staley J. T., and S. Lory. (2004). *Microbiologie*. Dunod. France.

Peterson S.W. (2006), Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8.

-
- Pfohl-Leszkowicz A.** (1999).- Ecotoxicogénèse. in : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risqué, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17–35.
- Pfohl-Leszkowicz A.** (2001), Définition et origines des mycotoxies in *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14
- Pildain M.B., Frisvad J. C., Vaamonde G., Cabral, J. Varga D. and Robert A. Samson.** (2008)-Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 725-735
- Pildain M.B., Vaamonde, G. et Cabral D.** (2004). - Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin : mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, **93**, 31–40.
- Pitt, J. I. (1987).** *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied And Environmental Microbiology* **53**, 266-269.
- Pitt J.I., Hocking, A.D.** (1997).- *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professionnal, London
- Pitt J.I., Basilio J.C., Abarca M.L et Lopez C.** (2000).- Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, **38**, 41–46.
- Purchase I.F.H.** (1971).- The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **18**,114–123.
- Raper K. et Fennell D.J.** (1965).- The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore
- Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K. et Yamaguchi H.** (1998).- *Molecular Diagnosis and Epidemiology of Fungal Infections*, **36**, 249–257.
- Riba A.** (2008). Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie, thèse de doctorat
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A. et Sabaou, N.** (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology* , **48** , 2772–2777.
- Richard H.** (1992). *Epices et Aromates*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 339 p
- 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.
- Rojas T.R., Sampayo C.A.F., Vazquez B.I., Franco C.M. et Cepeda A.** (2005).- Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrine. *Food Control*, **16**, 445–450.

Romero S.M., Comerio R.M., Larumbe G., Ritieni A., Vaamonde G. et Fernandez Pinto V. (2005).- Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **104**, 43–49.

Roy, A.K., Chourasia, H.K. (1990). Mycoflora, mycotoxin producibility and mycotoxins in traditional herbal drugs from India. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**. 295–302.

Roy, A.K., Sinha, K.K., Chourasia, H.K. (1988)- Aflatoxin contamination of some common drug plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**. 842–843.

S

Samson R.A. et Pitt JI (eds) (2000).- Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*, 510 pp. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands.

Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006).- Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, **44**, 133–148.

Samson R.A., Houbraken J.A., Kuijpers A.F.A., Frank M.J. et Frisvad J.C. (2004).- New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, **50**, 45–61.

Sára Maria Chalfoun, Marcelo Cláudio Pereira, Mario Lúcio V. Resende, Caroline Lima Angélico, Rozane Aparecida da Silva. (2004)- Effect of powdered spice treatments on mycelial growth. Sporulation and production of aflatoxins by toxigenic fungi. Lavras, **28**, (4),p.856-862

Sargeant K, Sheridan A, O’Kelly J & Carnaghan R.B (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192: 1096-1097

Scheidegger K.A. et Payne G.A. (2003).- Unlocking the secrets behind secondary metabolism, A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, **22**, 427–463.

Senhaji, M Faid et I. Kalalou. (2006)- Effect of essential oil from cinnamon on some pathogenic fungal growth: phytothérapie Numéro 1 : 24-30.

Sharma A.K ,Sharma K.D. (1984); Studies on seed mycoflora of some umbelliferous spices. *Agric Sci Dig* **4**: 71-73.

Smith J.E. et Moss M.O. (1985).- Mycotoxins. Formation, analysis and significance, John Wiley et Son, Chichester.

Strohl, W. R. (1997). Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed). *Bio/technology of antibiotics*, 2nd edn. Marcel Dekkr. New York. 1-47.

Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* species. *Internatioanl Journal of Food Microbiology*. **43**, 141–158.

T

Taniwaki M.H., Hocking A.D., Pitt J.I. et Fleet G.H. (2001).- Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, **68**, 125–133.

Taniwaki M.H., Pitt, J.I., Teixeira A.A. et Iamanaka B.T. (2003).- The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, **82**, 173–179.

Tantatoui-Elaraki, A and Beraoud, L. (1994)- Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *J Environ Path Toxicol Oncol*, **13**: 67-72.

Téren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E. et Kevei F. (1996).- Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, **134**, 171– 176.

Teuscher. E Anton. R. Lobstein. A. (2005)-Plantes aromatiques Épices, aromates, condiments et huiles essentielles, 3^{me} Ed p.521, lavoisier

Tran-Dinh N., Pitt J. I. et Carter D.A. (1999).- Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*, **103**, 1485–1490.

Troller J.A. (1980) Influence of aw on micro-organisms in foods. *Food Techno*, 34-76.

U

Ueno Y., Kawamura O., Sugiura Y., Horiguchi K., Nakajima M., Yamamoto K. et Sato S. (1991).-Use of monoclonal antibodies, enzyme–linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin–producing fungi. *In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N. and Bartsch, H., (eds), Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours, (pp 71–75). IARC–Science–Publ., Lyon, France.*

Uchiyama M, Isohata E, Takeda Y. (1976).- A case report on the detection of ochratoxin A from rice. *Journal of Food and Hygienics Society of Japan*, **17**, 103.

Udagawa S, Kurata H, Norizuk K, Tokatori K, Nakao M, Takahashi K. (1976)- Distribution of aflatoxin-producing fungi in crude drugs of plant origin. *Proc- Assoc Mycotoxicol* **3**: 35-37.

V

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.

Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., de Scott B. et Theron J.J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature*, **205**, 1112– 1113.

Van Egmond H. (1991) Mycotoxins. In “Residues and contaminants in milk and milk products”; *IDF Special issues*, 9101: 131-145.

Varga J., Rigo K., Toth B., Teren J. et Kozakiewicz Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, **41**, 29–36

Vargas E.A., Preis R.A., Castro L. et Silva C.M. (2001).- Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Additive and Contaminants*, **18**,981–986.

Vierling E. (2008)- Aliments et boissons - Filières et produits (3e édition), Edi : *Doin Editions* Coll : *Biosciences Et Techniques*. Bordeaux. france pp275

Vij.V., Ailes.E., Wolyniak.C., Angulo-FJ., Klontz-KC. (2006). Recalls of spices due to bacterial contamination monitored by the U.S. Food and Drug Administration. *J.Food.Protection*. 69(1):233-237.

W

Wallace H.A.H. et Sinha R.N. (1962).- Fungi associated with hot spots in farm stored grain . *Canadian Journal of Plant Science*, **42**, 130–141.

Weidenbörner M. (1998) - Lebensmittel-Mykologie B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3.

Wilson D.M., Mubatanhema W. et Jurjevic Z. (2002).- Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Advances Experimental and Medical Biology*, **504**, 3–17.

Wogan G. N. (2000).- Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, **10**(3), 201–210.

Y

Yiannikouris, A. et Jouany, J.P. (2002). - Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Animal Research*, **51**, 81–99.

Z

Zaghouane O. (1997). Les légumineuses alimentaires en Algérie, situation actuelles et perspectives. *Céréalicuture*. n°30.ITGC. pp27-34

Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnac, F. R., Angelini, S., et al. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, **17**, 868–874

ANNEXE I

Compositions des milieux de cultures utilisés

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose30 g
Extrait de levure5 g
Czapek concentré10 ml
K₂HPO₄1 g
Agar15 g
Eau distillée1000 ml
pH final= 6,2 ± 0,2

Czapek concentré

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

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

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

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

Glucose.....10 g
Peptone5 g
KH₂PO₄.....1 g
MgSO₄, 7H₂O.....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 1ml/litre de milieu d'une solution de 0,2% dans l'éthanol.

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 filtrée à l'aide du tissu en mousseline. Le pH final est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N. Le filtrat

est additionné de 20 g d'agar puis complété à 1000 ml par l'eau distillée. 3g de β -cyclodextrine (β -cyd) sont ajoutés à un litre de milieu.

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

ANNEXE II

1. Produits chimiques et standards analytiques

Les solvants: acétonitrile (C_2H_3N), chloroforme ($CHCl_3$), acide chlorhydrique (HCl) à 37%, le méthanol (CH_3OH), éthanol (C_2H_5OH), propanol-2 (C_3H_7OH), acétate d'éthyle, acétone, hydroxyde d'ammonium, réactif d'Ehrlich

L'aflatoxine B1 produite par *A. flavus*, L'aflatoxine G produite par *A. parasiticus* l'ochratoxine A et l'acide cyclopiazonique utilisés comme étalons standards sont fournies par Sigma-Aldrich, France.

2. Appareillage

- Spectrophotomètre UV- visible (Philips PU 8600).
- Agitateur orbital Heidolph unimax 2010.
- pH-mètre (Corning- EEL modèle 109).
- Rotavapeur (Certomat RB Braun, Unimax 2010, Heidolph, Germany)
- Bain-marie (Bioblock Scientific, Polystat I ref. 33194 220 V).
- Mixeur (Type 418, Braun, Spain).
- Centrifugeuse à évaporation sous vide "Speedvac concentrator".
- Balance de précision (OSI, M-220 D, Drnver Instrument).
- Etuves (Héraeus).
- Microscope optique (Leica, Leitz DM R
- Système sous vide Visiprep de Supelco (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Fra
- lampe UV (254 nm; 365 nm
- plaques de gel de silice-60
- Seringues (Sun International Trading Wilmington Etats- Unis).

ANNEXE III

Chaines chromatographiques

- Chromatographie liquide à haute performance (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec un détecteur de fluorescence (Spectra Physic 2000).

Les aflatoxines sont analysées sur un chromatographe de marque Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japon) équipé d'une vanne d'injection (rhéodyne), d'une boucle d'injecteur de 20 μ l, et d'un détecteur de fluorescence (Spectra Physic 2000) avec un filtre d'excitation à 362 nm et des filtres d'émission à 425 nm pour B1 et B2 et à 455 nm pour G1 et G2. La colonne analytique utilisée est une colonne C18 (ProntoSil 3 μ m 250 x 4 mm) reliée à une précolonne (ULTRASEP 10x4 mm). La colonne et la précolonne sont fabriquées par

Bischoff, et fournies par ICS, France. La cellule électrochimique, KOBRA Cell®, avec curseur d'intensité du courant placé sur 100 µA, est connecté au système HPLC entre la colonne HPLC et le détecteur de fluorescence. Les chromatogrammes sont traités par le logiciel Class-LC software 1.6 Shimadzu. Le système d'acquisition des données est le logiciel NORMASOFT commercialisé par ICS, France.

Le KOBRA Cell® offre une méthode de dérivation alternative qui présente l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre et d'offrir les mêmes performances que la dérivation à l'iode. Le KOBRA Cell® est une cellule électrochimique qui génère en ligne l'agent de dérivation à partir de bromure de potassium présent dans la phase mobile. La réaction dure 4 secondes à température ambiante et ne nécessite pas de préparation journalière de réactif. Aucun équipement supplémentaire n'est requis et la cellule demande très peu d'entretien.

Le principe de cette technique est de délivrer au KOBRA Cell® la phase mobile provenant de la colonne HPLC, contenant les aflatoxines et l'agent précurseur de dérivation: le bromure de potassium. Le branchement du KOBRA Cell® sur le courant va permettre d'appliquer un potentiel constant au niveau de l'électrode de travail, et ainsi de générer électro chimiquement du brome qui va se fixer sur les aflatoxines B1 et G1.

Les dérivés bromés des aflatoxines B1 et G1 vont présenter une fluorescence supérieure à celle existant naturellement.

