République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de biochimie et microbiologie

Bc.934.04
09/02

Mémoire de fin d'étude
en vue de l'obtention du diplôme d'étudesuniversitairesappliquées
Option : Analysesbiologiqueset biochimiques

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 424

Thème

جامعة جيجل
المكتبة
كلية العلوم

Recherche des mycotoxines Dans Les grains de certains légume secs

les membres des jurys :
Président : BOUHOUS Mustapha
Examinateur LEGHOUCHI Essaid
Encadreur : BOULDJEDRI Mouhamed

Réalisé par :
LAKHAL Houda
BELHAINE Merbouha
KISMOUNE Nawel

Promotion 2004

دعـــــــــاء

«اللهـــم انفعنـــي بما علمتنـــي ، و علمنـــي بما

ينفعنـــي وزدني علما ،و الحمـــد لله علـــى كل حال»

«اللهـــم لا تجعلنـــا نصاب بالغـــرور إذا نجحنـــا و لا باليأس إذا

أخفقنـــا،وذكرنا أن الإخفـــاق هو التجربـــة التي تسبـــق

النجـــاح».

remerciement

Nous tenon. à remercier dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force a fin d'accomplir ce modeste travail, et il nous est agréable d'exprimer nos vive et sincère gratitude à notre promoteur, Mr Bouldjedri Mohamed pour avoir suivi et dirigé notre travail avec patience, et pour sa précieuse aide, sa compétence et sa présence.

Notre remerciement s'adresse également au :
Mr : Boudjerda pour sa précieuse aide.
Le personnel du laboratoire de biologie de l'université de jijel.
Mr : Oudina Abdelaziz et Mr Oudina Abdelfateh pour ses précieuse aide.
Nous voudrions aussi remercier tous les enseignants de l'institut de science de la nature, qui nous ont transmis leur savoir durant les trois ans.

Nous tenons à remercier également monsieur le président d'avoir bien voulu présider notre jury et monsieur l'examinateur.

En fin, nous remercions toute personne ayant participé de prés ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Houda, Nawel, Merbouha.

SOMMAIRE

Introduction.....01

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES MOISISSURES

1- Généralités.....02
2- L'activité enzymatique.....03
3- Croissance et développement.....03
3-1- Mycélium.....03
3-2- Mode de développement.....03
3-3- Croissances végétatives des hyphes.....04
3-4- Différentiation des hyphes.....05
4- La reproduction.....06
4-1- Reproduction asexuée.....06
4-2- Reproduction sexuée.....06
5- Classification des moisissures.....09
5-1- Classe des zyggomycétés.....09
Ordre 1- les mucorales.....09
Ordre 2- entomophtorales.....09
5-2- Classe des ascomycètes.....09
5-3- Classe des deutéromycètes (champignons imparfait).....12
6- Les différentes espèces rencontrés dans les produits alimentaires.....14
6-1- Les *Aspergillus*.....14
6-2- *Penicillium*.....14
6-3- *Fusariums*.....14
6-4- *Rhizopus*.....15
6-5- *Altenaria*.....15
6-6-*Cephalosporium*.....15
6-7-*Cladosporium*.....15
7- Les conditions de développement.....17
7-1- Les éléments nutritifs.....17
7-2- La température.....17
7-3- Le PH.....17
7-4- Oxygène.....18
7-5- L'humidité.....18

II - METABOLITES SECONDAIRES

1- Antibiotiques.....19
1-1- Pénicillines.....19
1-2- Céphalosporines.....19
1-3- Griséofulvine.....19
1-4- Acide fusidique.....19
1-5- Fumagilline.....19
1-6- Siccanine.....20
1-7- Variotine.....20

1-8- Acide aspergillique.....20
1-9- Cérulenine.....20
2- Les arômes.....20
2-1- Méthyle – cétones.....20
2-2- Lactones.....20
2-3- Terpènes.....20
3- Mycotoxines.....21
3-1- Classification.....21
3-1-1- Aflatoxines.....21
3-1-2- Ochratoxine.....21
3-1-3- Patuline.....21
3-1-4- Fumonisines.....22
3-1-5- Zéaralénone.....22
3-1-6- Trichotecénes.....23
3-1-7- Citrinine.....23
3-2- La nature et propriété chimique de quelques mycotoxines.....23
3-2-1- L'aflatoxine.....23
3-2-2- L'ochratoxine.....24
3-3- Aspects pathologiques des mycotoxines.....25
3-4- Métabolisme des mycotoxines.....27
3-4-1- Métabolisme d'aflatoxine.....27
3-4-2- Métabolisme d'ochratoxine.....28
4- Méthodes de recherche et dosage des mycotoxines.....29
4-1- Techniques chimiques et physiques.....29
4-1-1- La chromatographie sur couche mince (CCM).....29
4-1-2- La chromatographie liquide haute performance (CLHP)...29
4-1-3- La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....29
4-2- Techniques immunologiques.....30

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale.....31
1- Matériel et méthodes.....32
1-1- Matériel.....32
1-2- Les solvants et sels.....32
2 - Méthodes.....33
2-1- Echantillonnage.....33
2-2- L'extraction.....33
2-3- La purification.....33
2-4- La séparation.....35
Résultat et Discussion 37
Conclusion.....38
Bibliographie
Résumé

Introduction

Analyse Bibliographique

I- LES MOISISSURES

I - LES MOISISSURES

1-GENERALITES :

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques unis ou multicellulaires, ce sont des hétérotrophes: certains vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux, Des animaux, ou des saprophytes, se développant sur des déchets organiques et contaminant les produits alimentaires. Les moisissures sont des aérobies, en générale acidophiles (pH compris entre 3 et 5) et mésophiles (température optimale 20-30° C), cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres micro-organisme et elles peuvent se développer sur des aliments à faible activité d'eau (a_w) jusqu'à 0,65 [15].

Les moisissures se présentent typiquement sous la forme d'un amas de filaments enchevetrés et ramifiés, appelés hyphes l'organisme dans son ensemble est qualifié de mycelium ou thalle [5].

A l'intérieur de la structure filamenteuse ramifiée entourée d'une paroi rigide, se trouve une masse cytoplasmique multinuclée. Chez de nombreux champignons, il existe des cloisons transversales à intervalle régulier dans les hyphes dans ce cas, on dit qu'ils ont un mycelium cloisonné ou septé, dans le cas contraire, ils ont un mycelium non cloisonné ou sans septa.

La reproduction se fait par germination des spores en effets, les spores mures sont libérées des appareils sporifères et disséminées, une spore germe émet un filament ou hyphe qui croit, s'allonge et se ramifié pour donner un nouveau mycelium [2].

Les moisissures colonisent de manière naturelle quasiment tous les types d'écosystèmes terrestres et certains milieux aquatiques. elles jouent à cet égard un rôle absolument fondamental, dans la biosphère. Avec les bactéries, elles constituent les agents les plus actifs dans la biodégradation des débris organiques animaux et végétaux. La minéralisation de ces derniers permet le recyclage permanant des éléments constitifs de la matière vivante : carbone, azote, soufre et phosphore [5].

2- L'ACTIVITE ENZYMATIQUE :

Les moisissures sont agressives et dégradantes sous leur forme mycélienne, mais la forme des spores est inoffensive, elle peuvent se disperser très largement et contaminer, ces spores peuvent rester inertes aussi long temps que l'environnement ne permet pas leur développement [19], elles ont un équipement enzymatique très varié. L'activité des enzymes exocellulaires et mise en évidence sur le surnageant de culture, l'activité des enzymes endocellulaires l'est sur des broyats mycéliens [15].

3-CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT :

3-1- Mycelium :

Le thalle des champignons ou mycelium est formé de filaments non cloisonnés transversalement ; on les appelle siphons, ces filaments siphonés caractérisent les champignons inférieurs [22]. Ils ne comportent pas de cloisons et se présentent en organismes coénocytiques (fig1A). Les champignons supérieurs sont des thalles cloisonnés par la septation transversale de leur paroi cellulaire. Cependant, les septums ainsi formés restent perforés en leur centre, permettent la communication entre les différents compartiments hyphaux. (Fig1 B) [5].

3-2- Mode de développement :

L'appareil végétatif, qui permet la croissance et le développement, est composé de filaments appelés hyphes, dont l'ensemble constitue un réseau : le mycélium celui-ci est parfois visible sous forme de petites taches colorées à la surface des substrats moisis. Il va à la recherche des aliments, il dégrade le support par production d'enzymes et d'acide.

Cette dégradation du substrat peut être infime ou considérable, selon l'adaptation spécifique des champignons, la durée et les conditions de son développement. La colonisation de substrat est donc réalisée par extension et ramification des hyphes [27].

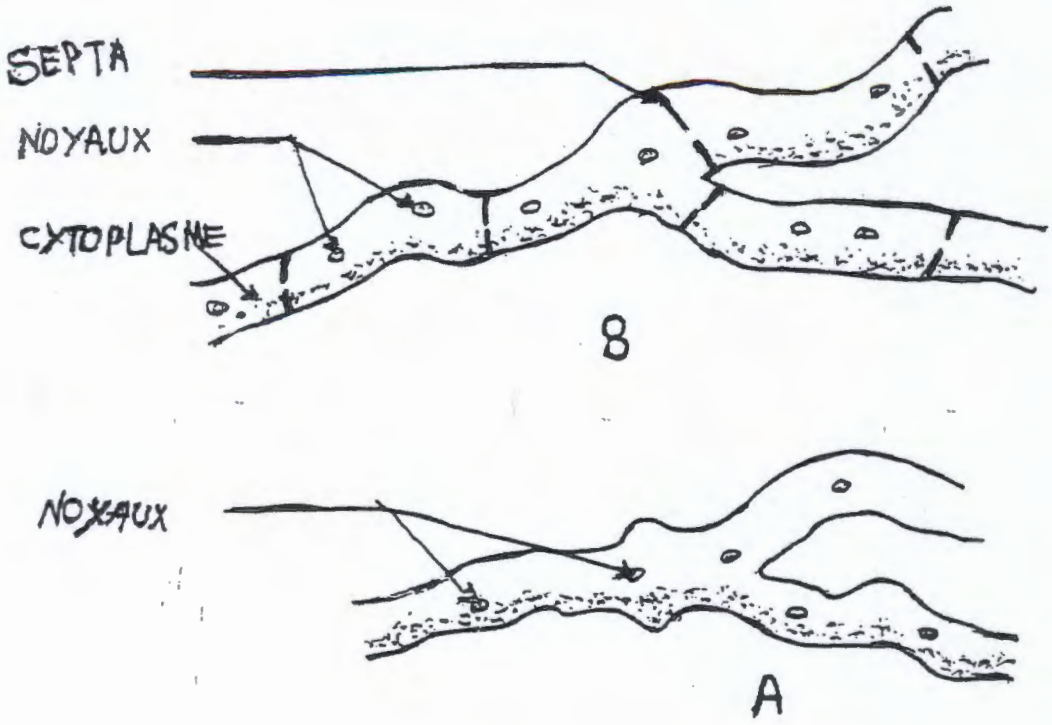


Fig1 : Représentation schématique des deux types de mycelium :
A : mycélium non septé ; B : mycélium septé

3-3- Croissances végétatives des hyphes:

La grande majorité des champignons se présentent sous forme filamenteuse, caractérisée par une structure tubulaire ramifiée et plurinuclée, le diamètre de hyphe varié considérablement en fonction des conditions de l'environnement, de leur position dans la colonie et surtout d'une espèce à l'autre de 3 à 10 µm de diamètre, le plus souvent, les hyphes sont cloisonnés par des septa qui divisent le filament en segments similaires à des cellules d'une longueur d'environ 50 µm [3].

L'hyphe ainsi formé prolifère par une croissance apicale. (il n'existe pas d'allongement de type intercalaire) [18]. La zone apicale se caractérise également par l'absence de réticulum endoplasmique, de mitochondries et de noyaux. La croissance des hyphes nécessite la biosynthèse de composants pariétaux, dont le mieux étudié est la chitine, le précurseur de la chitine, l'uridine diphosphate n-acétyl glycosamine, est transformé en chitine sous l'action de chitine synthèse active [3].

Le maintien d'une croissance optimale nécessite la conservation d'une polarité de croissance à l'extrémité de l'hyphe (Fig2). Au cours de la phase végétative, les hyphes restent généralement indifférenciés et inorganisées. Seuls

différenciées de leurs filaments végétatifs. C'est au cours de la phase de reproduction que la différenciation des hyphes se produits le plus fréquemment, conduisant à la formation des structures très variées Appelées fructification [3].

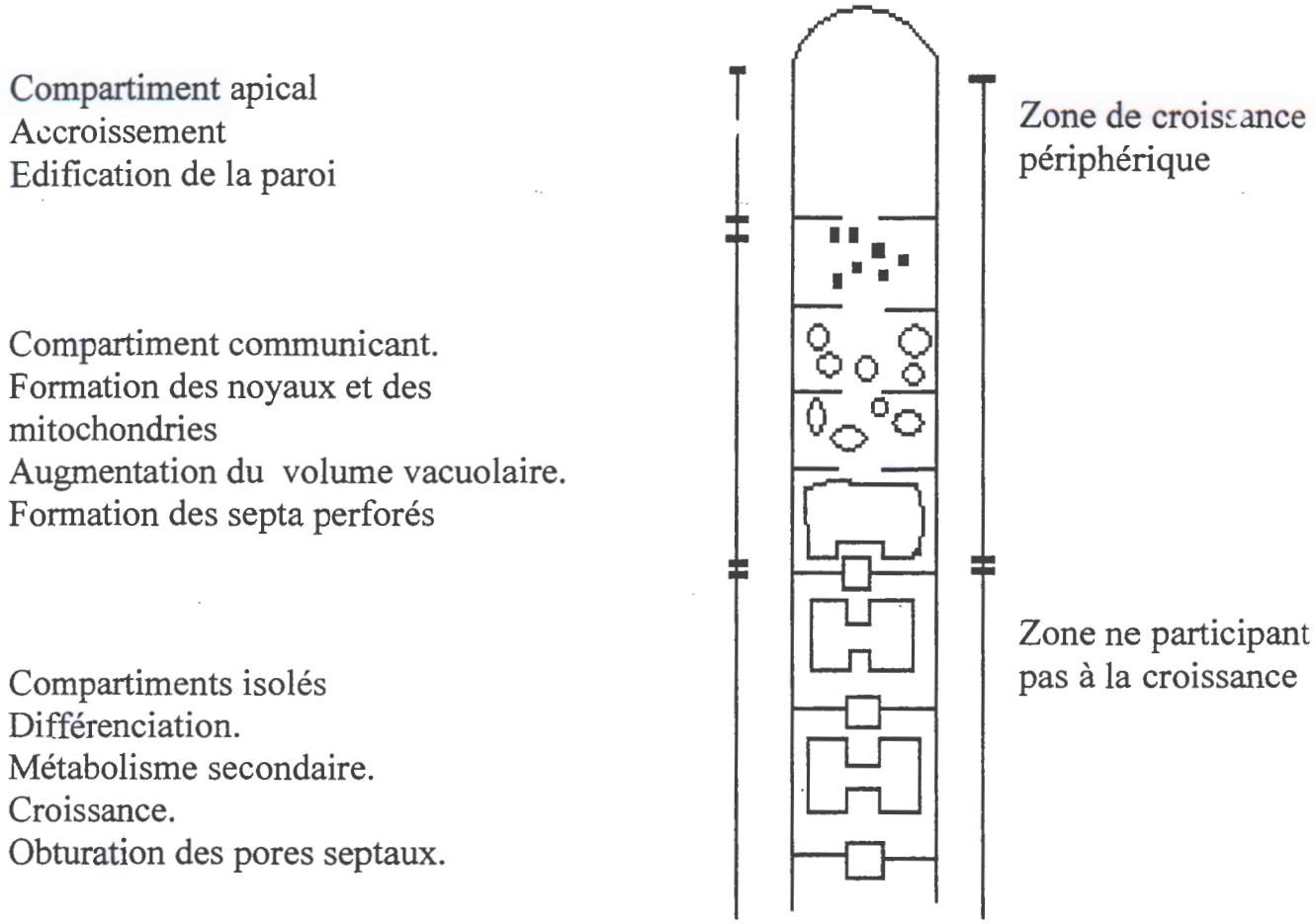


Fig 2: Les différents compartiments de l'hyphe et leur contribution à son développement fonctionnel [27]

3-4- Différenciation des hyphes :

Les hyphes peuvent présenter des modifications simples de forme et de fonction, constituant monohyphales, ou subir des transformations plus élaborées résultantes de l'agrégation des hyphes et réalisant des structures dits multihyphales [3].

4-LA REPRODUCTION :

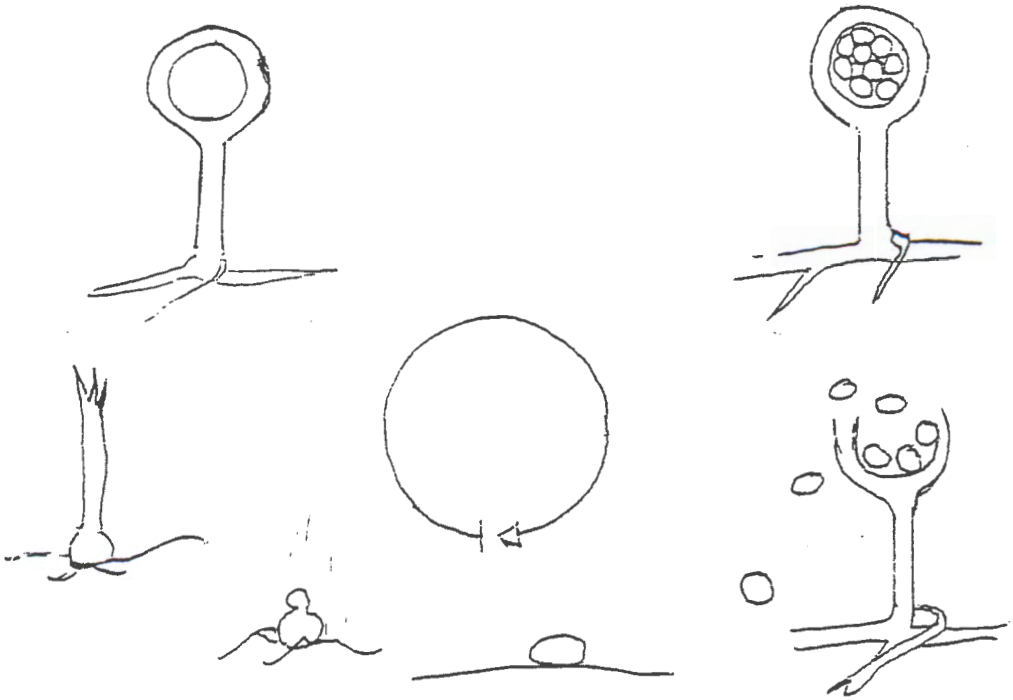
Après un certain temps de développement, les moisissures comme tous les champignons et autres être vivants, doivent se reproduire, puis se propager pour aller coloniser d'autres substrats [27,19]. Leur reproduction peut cependant être répartie en deux types :

4-1- Reproduction asexuée :

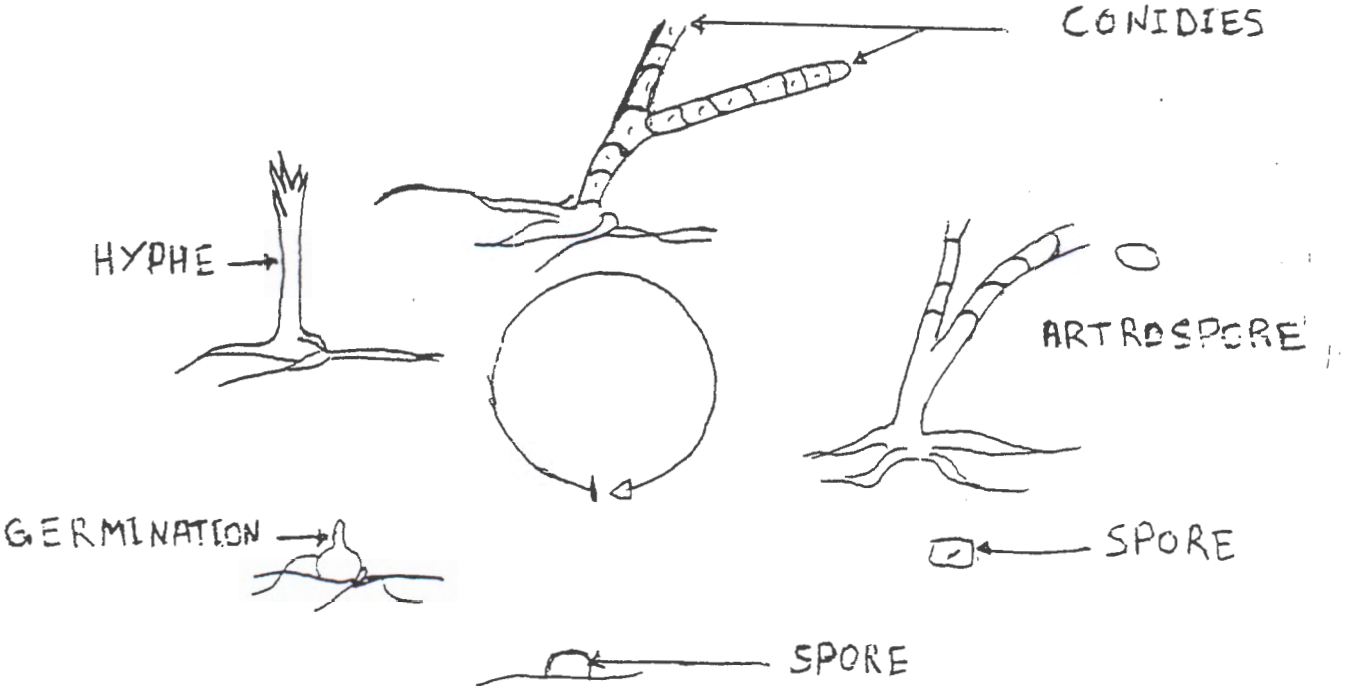
la reproduction asexuée est très répondue et se fait sans recombinaison génétique, selon différents modes : simple fragmentation du mycelium, bourgeonnement ou plus généralement par la formation des spores, appelées aussi conidies et formées en nombre plus ou moins important dans une structure spécialisée : le sporange [5,2] (fig 3).

4-2-Reproduction sexuée :

la reproduction sexuée implique, comme chez tous les autres organismes eucaryotes sexuellement différenciés, la production et la fusion de cellules sexuelles ; les gamètes, issus de partenaires différents et permettant le brassage de leurs caractères génétiques respectifs [5].
chez les moisissures, on distingues deux catégories de spores sexuées : les zygospores et les ascospores dans les asques [2].

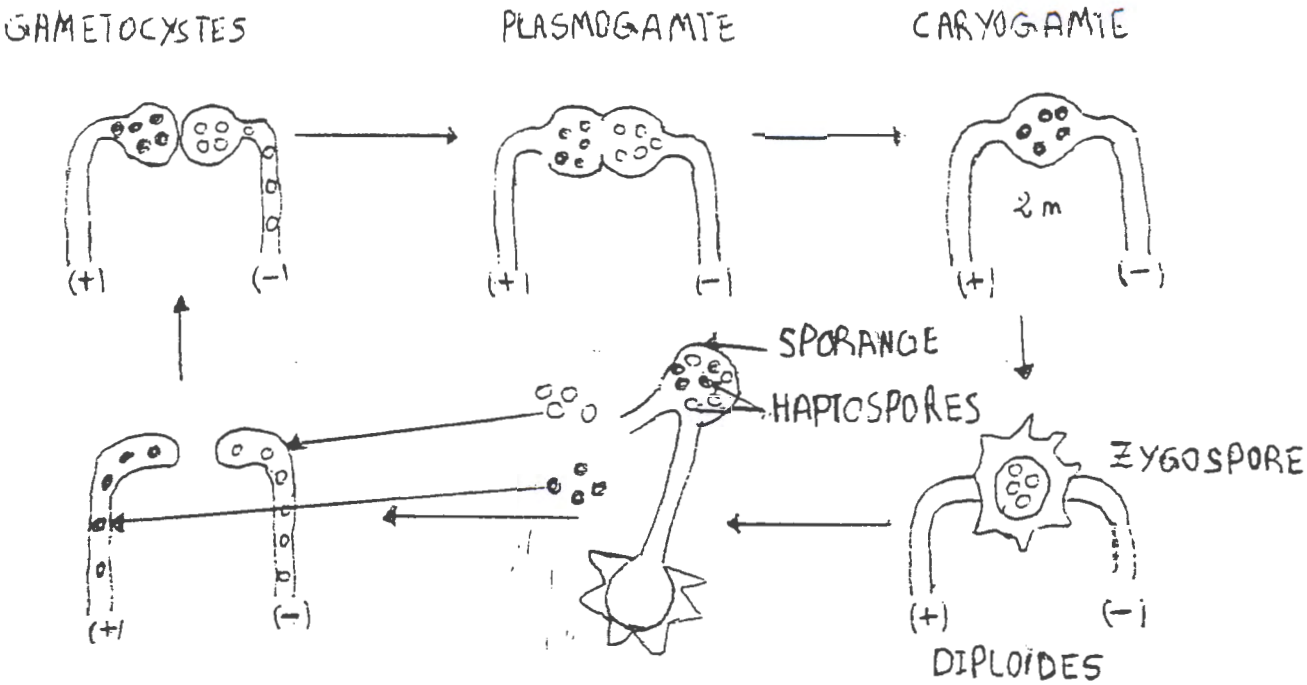


A : REPRODUCTION PAR SPORES.

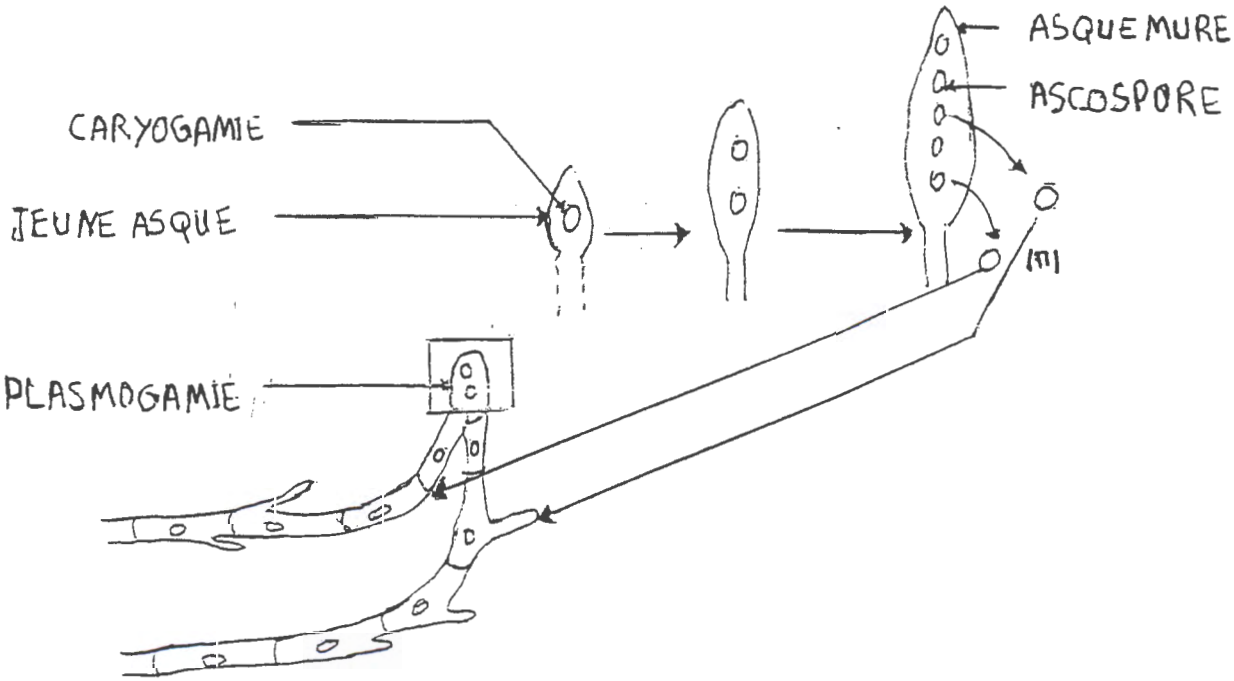


B : REPRODUCTION CLOISONEMET DU MYCELIUM.

Fig 3 : REPRODUCTION ASEXUEE.



A : ZYGOMYCETES



B : ASCOMYCETES

Fig4: REPRODUCTION SEXUEE CHEZ LES ZYGOMYCETES ET ASCOMYCETES.

5- CLASSIFICATION DES MOISISSURES :

Les moisissures sont reparties entre trois classes :

5-1- Classe des zygomycètes :

Cette classe se divise en deux ordres [4].

Ordre 1 : les mucorales :

Ce sont des champignons filamenteux à mycélium souvent envahissant, non septé (siphoné) ou à cloisons formés exceptionnellement au niveau des organes reproducteurs ou lors de la différenciation des spores de résistance (chlamydospores) [4].

L'appareil végétatif des mucorales est généralement formé par un mycelium bien développé, richement ramifiée, aux branches parfois anastomosées [19].

La reproduction asexuée s'effectue au moyen de spores immobiles formés généralement en grand nombre dans des sporocystes pourvus à l'intérieur d'une vésicule centrale ou columelle prolongeant le sporocystophore (*Absidia, Mucor, Rhisopus*), lui-même parfois renflé en apophyse sous le sporocyste (*Absidia, Rhisopus*) [4].

Selon les espèces, les sporocystophores présentent quatre modes de ramification : monopodique, sympodique, dichotomique, verticillé [4].

La reproduction sexuée, homothallique ou héterothallique fait intervenir une fusion de deux gamétocytes, elle aboutit à la formation de zygospores à paroi épaisse, souvent ornementée et de couleur foncée, portées par deux suspenseurs, quatre genres (*Absidia, Mucor, Rhizopus etRhisomucor*), incluent la plupart des espèces des mucorales isolées des denrées alimentaires [4] (fig5).

ordre 2 - entomophtorales:

Champignons saprophytes ou le plus souvent parasites d'insectes.
Entomophtora muscae se développe sur les mouches mortes.
Entomophtora virulenta, pathogène pour les hémiptères, lépidoptères et diptères [4].

5-2- Classes des ascomycètes :

Les ascomycètes regroupent de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreux moisissures contaminant les produits alimentaires [15].

Ces champignons, à thalle filamenteux septés ou lévuroïdes, présentent une structure caractéristique appelées asque qui est un sporocyste particulier formé au

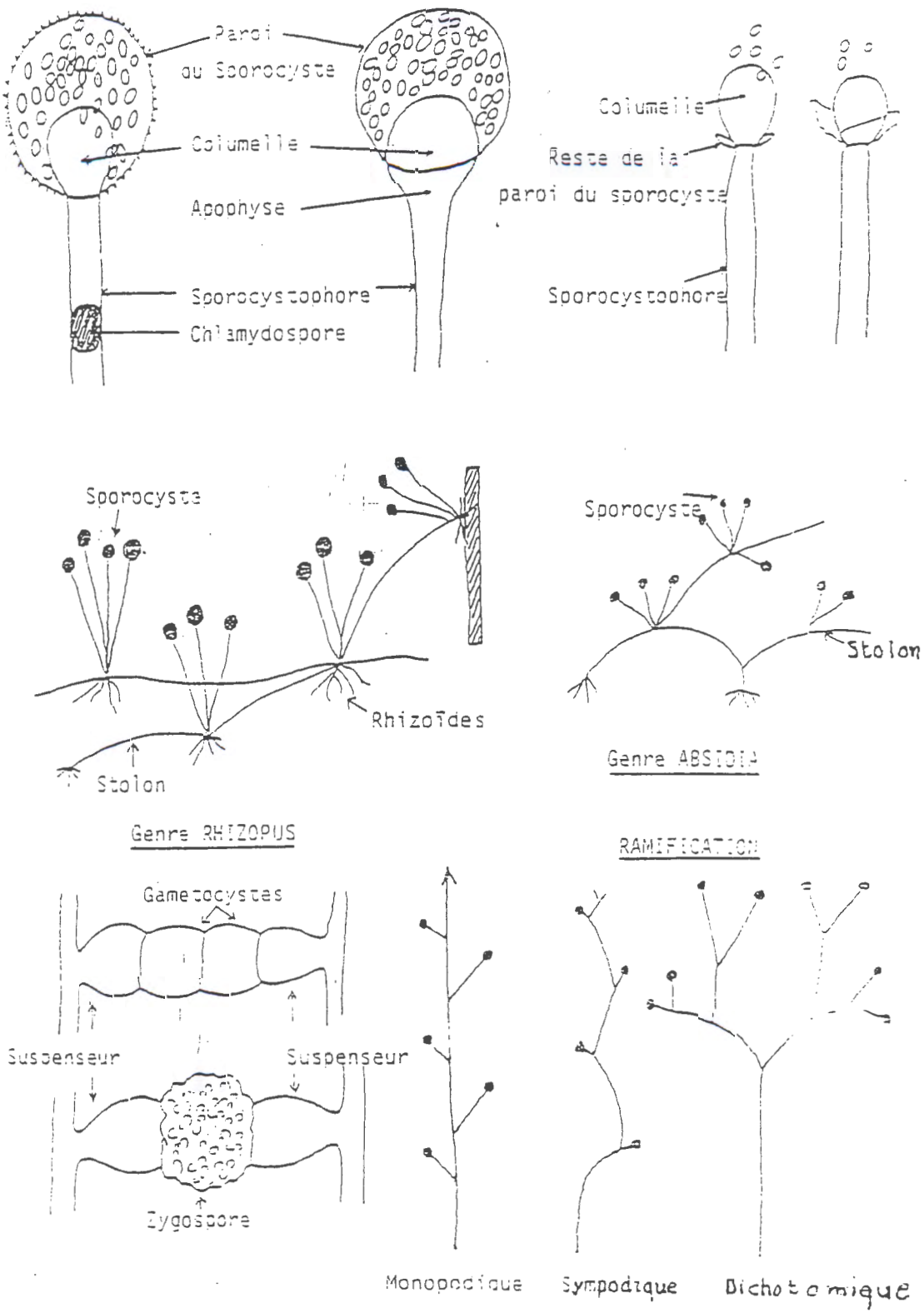


Fig 5 : Structures morphologiques des Mucorales [4]

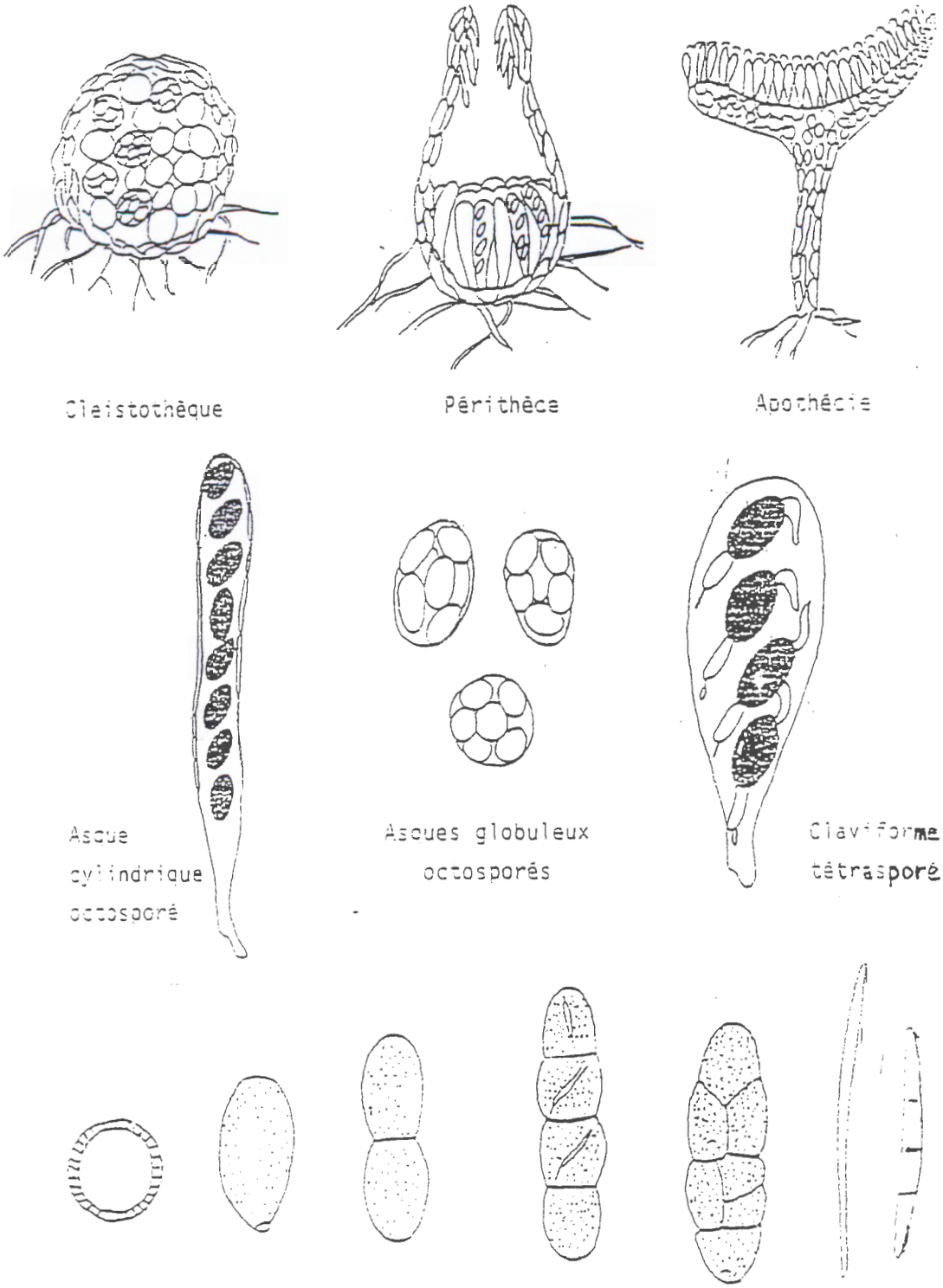


Fig 5 : Structures morphologiques des Ascomycètes . [4]

cours de la reproduction sexuée [4], la morphologie des ascospores, extrêmement variée est très utilisée dans la définition des genres et des espèces, elles peuvent être:
-hyalines, vivement colorées, brun plus ou moins foncé.
-globuleuses, elliptiques, cylindriques, vermiculaires.
-unicellulaires ; cloisonnées transversalement et longitudinalement.
-lisses ou ornementées [4] (fig 6).

5-3 Classe des deutéromycètes (champignons imparfaits) :

Constituent un groupe très vaste qui rassemble des champignons dont la sexualité est inconnue ou des variétés asexuées d'ascomycètes. Ils sont classés en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes [15].

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores et qui se multiplient au moyen de conidies.
Les deutéromycètes se divisent en trois classes :
-blastomycètes : levures avec ou sans pseudomycelium.
-hyphomycètes : champignons filamenteux, steriles.
-coelomycètes : conidies produites dans des pycnides ou dans des acervuls [4] (Figure 7) .

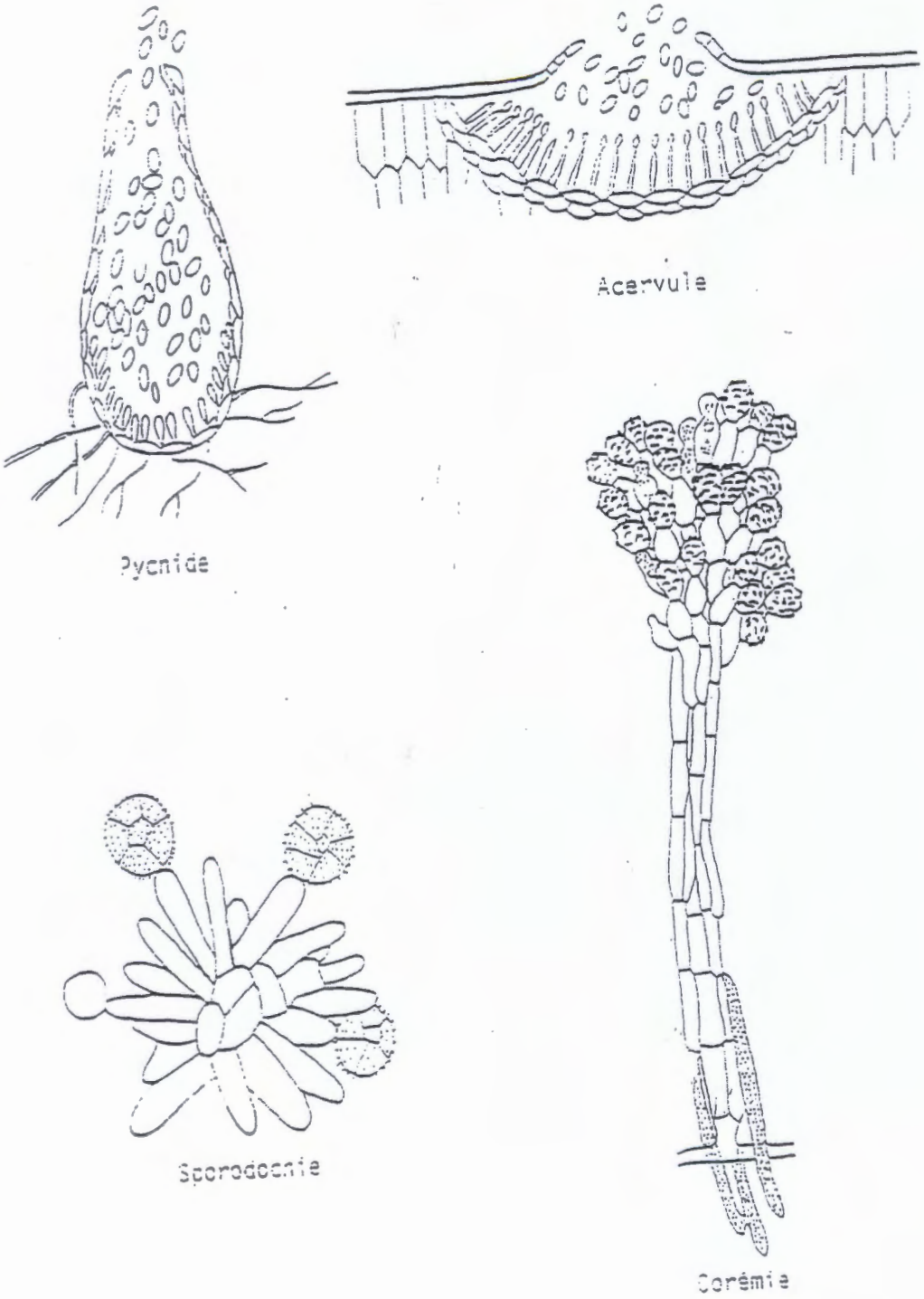


Fig 7: Structures reproductrices des Deutéromycètes [4]

6- LES DIFFERENTES ESPECES RENCONTRES DANS LES PRODUITS ALIMERNTAIRES:

6-1-Les *Aspergillus* :

Les espèces de ce groupe sont caractérisées par un thalle à mycelium cloisonné pourtant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiées, terminés en vésicule [4], c'est dernier sont arrondis et portent aussi à leur tour des conidies. Les conidies sont libérées des sterigmates lorsqu'elles sont mures. Les conidies sont en chaînes et peuvent être colorées en noires, brunes ou vertes (Fig 8B).

Les aspergillus sont très répandus dans la nature, les souches se développent bien dans plusieurs aliments qui renferment des concentrations importantes de sel et de sucre.

Certaines souches sont employées en industrie pour la production de l'acide citrique, l'acide gluconique et enzymes amylolitiques [2] comprend prés de 180 espèces repartie en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur [4].

6-2- Penicillium:

Elles sont caractérisées par la présence de mycelium à septa et des conidiophores qui portent des conidies (Fig 8E).

Les conidies sont souvent vertes, lorsqu'elles sont jeunes et brunâtres lorsqu'elles sont mûres.

Les *Pénicilliums* sont divises en plusieurs groupes suivant la forme de la tête portant les conidies.

Les *Pénicilliums* sont souvent utilisés en fromagerie, certaines espèces sont impliquées dans la détérioration des agrumes [2]. Certaines *Pénicilliums* présentent une reproduction sexuée avec formation d'ascocarpes ils peuvent en outre produire de dangereuses mycotoxines [4].

6-3- Fusariumes:

Ce genre peut posséder des microconidies et des macroconidies en forme de faucilles(fig8D) .

Ces macroconidies ne sont jamais sombres, mais peuvent être colorées. Les microconidies sont unicellulaires.

Les fusariumes se développent sur les céréales et la pomme de terre [2].

6-4-Rhizopus :

Ces moisissures sont caractérisées par l'absence de septa, la reproduction asexuée forme des sporangiospores dans les sporanges. Ces sporanges sont portés par des rhizoïdes qui sont reliés entre eux par des stolons (Fig 8F).

Quand un sporange se rompt, une multitude de spores sont libérées. Les *Rhizopus* sont souvent impliqués dans la détérioration de l'amidon [2].

6-5-Altenaria :

Le mycelium de ces moisissures en forme de coton et possèdent des septa, qui est de couleur vert sale.

Les conidiophores portent une chaîne de conidies multicellulaires attaches les unes aux autres par les extrémités dont l'une est arrondie et l'autre pointue, les hyphes observés au microscope sont presque incolores, les conidies sont vert - brut ou brun foncé (fig 8A). Ces souches sont souvent impliquées dans la détérioration des produits alimentaires, *Alténaria citri* se développe sur les agrumes [2].

6-6-Cephalosporium :

Elles sont caractérisées par un mycelium possédant des septa et des conidiophores se forment en tout point sur l'hyphe, les conidies incolores, allongées ou elipsoïdales sont capables de sécréter un liquide collant qui les tient ensemble pour donner l'aspect de petits ballons ronds [2].

6-7-Cladosporium :

le mycélium possède des septa, les jeunes connidies sont unicellulaires mais deviennent bi-cellulaires en viellissant (fig8 C).

La souche *Cladospori Herbereus* produit des colonnies noires dans les produits alimentaires [2].

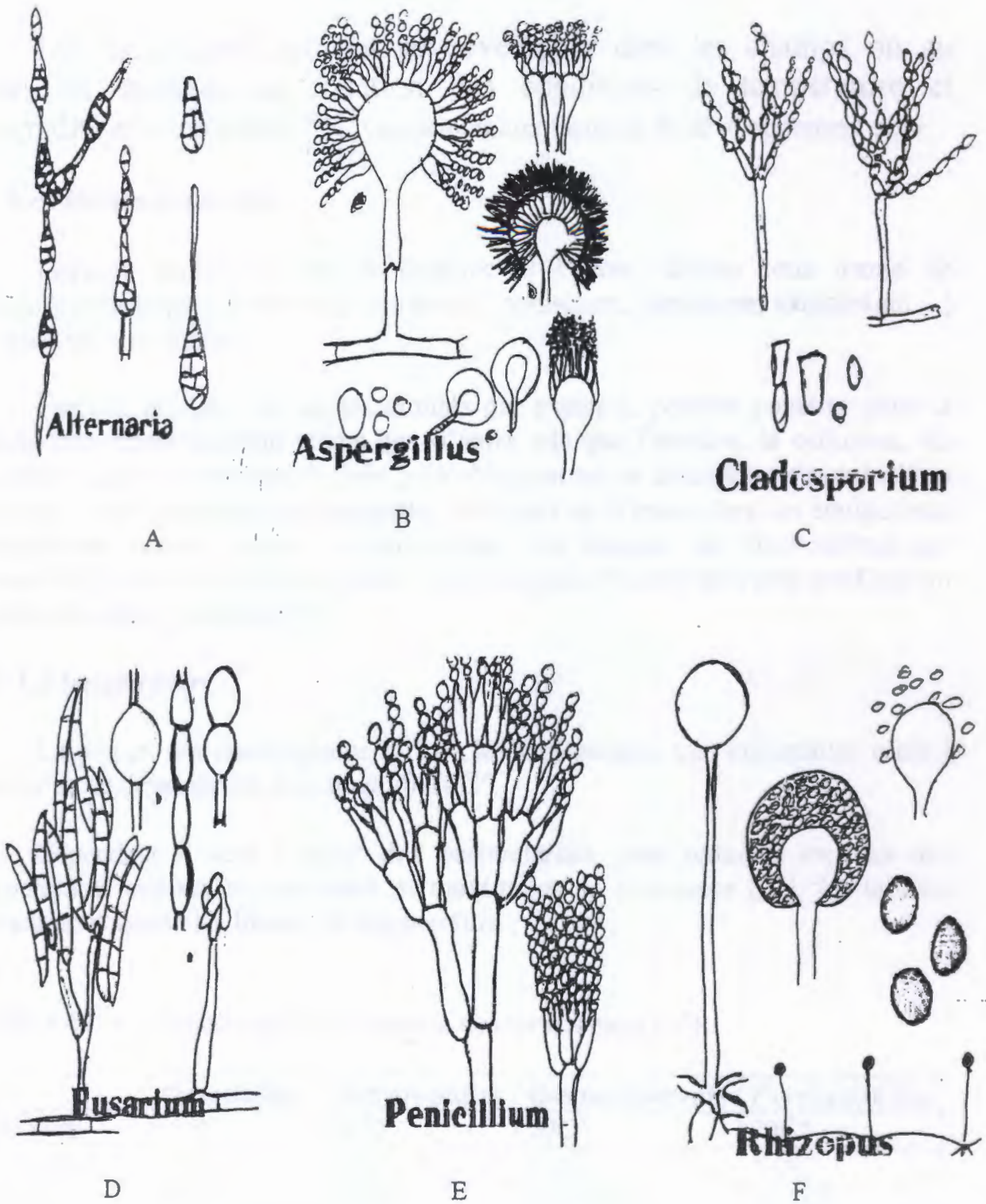


Fig 8 : structures morphologiques des différents espèces des moisissures [29]

7-4-Oxygéne:

Les champignons sont des organismes aérobies cependant, certains tolèrent des quantités relativement faibles d'oxygène et peuvent même se développer en anaérobiose avec production di-éthanole et diacides organiques. Le métabolisme des champignons peut être modifier selon la teneur en oxygène environnemental, par exemple la productions des mycotoxines (patuline et acide penicillique) décroît considérablement en condition déoxygénation faible [27, 23].

7-5--L'humidité :

Les moisissures apparaissent après un accroissent accidentel de l'humidité, en effet, la quantité d'eau disponible dans le substrat et l'ambiance environnante peuvent initier leur développement. Il y a échange permanent entre l'environnement et le support jusqu'à atteindre un point d'équilibre à la surface de ce dernier où pourras se développer la moisissure (pour les aliments, cette valeur est définie comme l'activité de l'eau ou a_w.

L'humidité relative minimum qui permet le developpement de certaines moisissures dites xérophiles, est de 65-70 % (*Eurotium*, *Aspergillus)*[27].

جامعة جيجل
المكتبة
كلية العلوم

II-Métabolites secondaires

II- METABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas synthétisées pendant tout le cycle biologique des micro-organismes mais généralement en fin de croissance active. Cette synthèse s'effectue lorsque certaines conditions internes et externes sont réunies à l'inverse les métabolites primaires, qui sont produits pendant la phase de croissances idéale. Ces molécules de structure extrêmement variées sont synthétisées par des complexes multi – enzymatiques [4, 26]. Les molécules de métabolismes secondaires peuvent être des antibiotiques, arômes, ou des mycotoxines.

1- ANTIBIOTIQUES :

Parmi un total de quelque 10 700 antibiotiques décris pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent de champignons [4].

1-1. Pénicillines :

Les pénicillines naturelles sont produites par *Penicillium chrysogenum*. En outre, des *Aspergillus* sont capables de synthétiser également cette molécule [4].

1-2 Céphalosporines:

Industriellement, la céphalosporine est produite par *Céphalosporium acremonium* [4].

1-3 Griseofulvine :

la griséofulvine est active surtout contre les dermatophytes : elle est produite par *Pénicillium griséofulvim*[4].

1-4 Acide fusidique :

L'acide fusidique est active contre diverses bactéries Gram positif , l'organisme producteur est *Fusidium coccineum* [4].

1-5 Fumagilline :

Cet amebicide est synthétisé par certaines souches de *Penicillium jensenni* et de *Penicillium nigricans* [4].

1-6 Siccanine:

L'utilisation de cet antifongique, produit par *Helminthosporium siccans* se rencontre principalement sur dermatomycoses animales [4].

1-7 Variotine :

La variotine est un dérivé d'acide gras. Cet antifongique est produit par *Paecilomyces variotii* [4].

1-8 Acide aspergillique :

Cet antibiotique : actif contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. Est synthétisée par produit par *Aspergillus flavus* [4].

1-9 Cerulenine :

Cette molécule produite par *Cephalosprium caeruleus* est active contre diverses bactéries, levures et champignons [4].

2- LES ARÔMES :

Beaucoup d'arômes naturels sont des mélanges complexes :

2-1- Methyle – cétones :

Les méthyle-cétones s'élaborent à partir d'acides gras et sont des arômes de fromage
Penicillium roquefortii synthétise divers méthyles – cétones dont le méthyle – pentyl – cétone [4].

2-2- Lactones :

Les lactones sont des estres internes, cycliques, γ et δ – hydroxy– acides [4].

2-3 - Terpènes :

Les terpènes sont les composés de base des huiles essentielles. Leur formule de base est la suivante ($C_5 H_8$) [4].

3- MYCOTOXINES :

Les mycotoxines peuvent être définies comme des produits du métabolisme secondaire des moisissures ayant un effet toxique chez les animaux et l'homme [8], les aliments concernés sont souvent des céréales moisis (mais, riz, orge....) [1]. elles constituent un groupe de substances toxiques présentant notamment des activités mutagènes, cancérigènes, tératogènes, immunotoxinogènes, et estrogènes. sept classes des mycotoxines sont considérées comme importantes du point de vue agro alimentaire [28].

3-1 Classification:

Il y a 7 classes des mycotoxines selon l'importance.

3-1-1 Aflatoxines:

Produites par différentes espèces d'*Aspergillus* Lors de conditions post récolte défectueuses, mais également durant la croissance des végétaux, les arachides, les grains de couton ; les céréales, les noix et certains figues sont particulièrement affectés ces mycotoxines possèdent une activité mutagène et cancérigène chez l'homme.

Ces toxines existent sous forme de mélanges des aflatoxines: B_1, B_2, G_1 et G_2 Parmi ces molécules : L'aflatoxines B_1 est le plus cancérigène, l'aflatoxine M_1 (métabolite de B_1) et G_1 sont aussi cancérigènes mais, avec une faible potentialité [10].

3-1-2 Ochratoxine:

Elle est produit par certaines espèces de *Pénicillium* sous les climats tempérés et froids : les céréales et les produits dérivés constituent le principal vecteur (50%) ; les abats ; principalement, du porc, constituant une autre source de contamination ; ils s'agit d'une substance mutagène et cancérigènes pour l'homme [29].

3-1-3 Patuline :

Cette substance est découverte en 1940 chez *Aspergillus*, *Pénicillium*, en particulier chez les *Aspergillus clavatus* et *Pénicillium expansum* ; un contaminant très fréquent des pommes, le jus de pomme et le cidre sont des principaux vecteurs ; sa stabilité à la température et à l'acidité étant très grande ; la génotoxicité de la patuline n'est pas entièrement avérée, non plus que sa

cancérogénicité chez l'animal, on peut aussi considérer la patuline comme antibactérien Gram positif et négatif (fig 9).

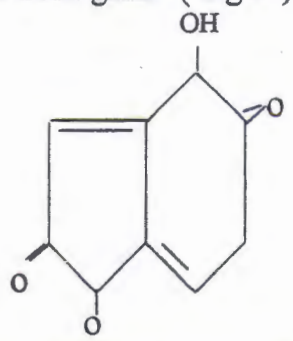


Fig 9: la structure chimique de patuline [24].

3-1-4 Fumonisines:

Ce groupe de mycotoxines récemment caractérisé chez quelque espèces de *Fusarium* infectant les cultures de céréales dans les conditions climatiques particuliers ; la fumonisine B1 est la plus abondante dans les aliments dérives destinés au bétail et à l'homme. Elle est faiblement absorbée chez l'animal et ne donne pas lieu à des résidus en quantité significative dans les denrées alimentaires ; elle produit une large gamme d'effets toxiques chez l'animal (encéphalite chez le cheval, œdème pulmonaire chez le porc, néphrotoxicité et cancer du foie chez le rat), et les études épidémiologiques ont montré une association avec certain cancers (œsophage en Afrique du sud, foie en chine) les fumonisines sont classées cancérigène potentiels pour l'homme [12].

3-1-5 Zéaralénone:

C'est une mycotoxine produit par de nombreux *fusarium* contaminant les céréales, et principalement le maïs, essentiellement en post récolte au cours de la conservation des grains ; très faiblement toxique, elle est cependant cause d'infertilité est de différents désodres metaboliques chez le porc et le mouton. Le transfert dans le lait est négligeable, de même que la présence dans la viande ou les œufs [12] (fig 10).

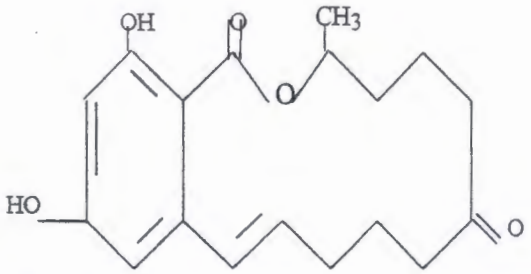


Fig 10: la structure chimique de zéaralénone [24].

3-1-6 Trichotecenes :

Constituent un groupe de métabolites secondaires issus de nombreuses espèces de *fusarium* se développent sur les épis de céréales dans certaines conditions atmosphériques (froid et humidité).ils sont retrouvés dans une proportion importante (50%) de grains ; les trichotécénes ont été a l'origine d'empoisonnements graves d'animaux et d'hommes [12].

3-1-7 Citrinine:

C'est un produit de métabolisme pour *Pénicillium* et *Aspergillus* en particulier *Penicillium citrinum* infectant le riz et l'orge moisis [12] (fig 11).

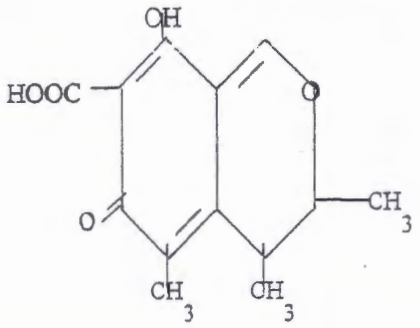


Fig 11: la structure chimique de citrinine [24].

3-2- La nature et propriété chimique de quelques mycotoxines :

3-2-1 L'aflatoxine :

Parmi les substances issues du métabolisme de divers *Aspergillus* (A. *flavus*, *A. parasiticus*) se trouvent des mycotoxines, telles que les aflatoxines [13]. les 4 principales aflatoxines (B_1,B_2,G_1, G_2) sont élaborées par certaines souches d'*A.flavus* et *A. parasiticus* les aliments les plus fréquemment contaminés par l'aflatoxine B_1 sont les arachides, les grains de coton, le mais, les noix du brésil et les pistaches, provenant des régions chaudes du globe [8], les aflatoxines sont très solubles dans les solvants modérément polaires comme chloroforme, méthanol et surtout di-methyl sulfoxy (leur hydro solubilité va de 10 à 20 mg/l) et non solubles dans l'eau.

Exposées à un rayonnement ultra – violet dans la gamme des grandes longueurs d'ondes, l'aflatoxine B sont bleus et l'aflatoxine G sont vert, le maximum des spectre d'absorption des rayonnement est de 233 nm pour l'aflatoxine G_2 [20], à l'état pur, les aflatoxines sont très stables à haute

température dans l'air, mais dans un solvant polaire elles deviennent relativement instables par exposition à la lumière dans l'obscurité et au froid ,les solutions chloformiques et benzéniques se conservent pendant des années.
Les aflatoxines M_1 et M_2 sont des métabolites hydroxyles des B_1, B_2 et les aflatoxines B_2, G_2 sont des dérivés di hydro des substances mères [16].

3-2-2 L'ochratoxine :

Elle est surtout produite par un *Aspergillus* et aussi par plusieurs variétés de *Pénicilliums* [2].

L'ochratoxine possède deux noyaux phenyl alanine et isocomarine ; et le plus toxique c'est l'ochratoxine A, il s'agit d'une substance cristal non colorée à la lumière naturel, et donne des noyaux bleus sous U.V, en plus celle de l'ochratoxine est dilué dans l'eau, et par l'hydrolyse acide, et donne phényle alamine et acide lactique, lumineusement efficace, c'est l'ochratoxine.
L'ochratoxine contenir une chaîne de sept dérivé de iso coumarinique liée à une groupe d'amine : L. Bphenyl – alanine [21] (Fig 9).

- ochratoxine A : R = H, R' = Cl
- ochratoxine B: R = H, R' = H
- ochratoxine α : R = C_2H_5, R' = Cl

- Ester méthylique de l'ochratoxine A: R = CH_3, R' = Cl
- Ester méthylique de l'ochratoxine B : R = $CH_3OHC_2H_5$, R' = H

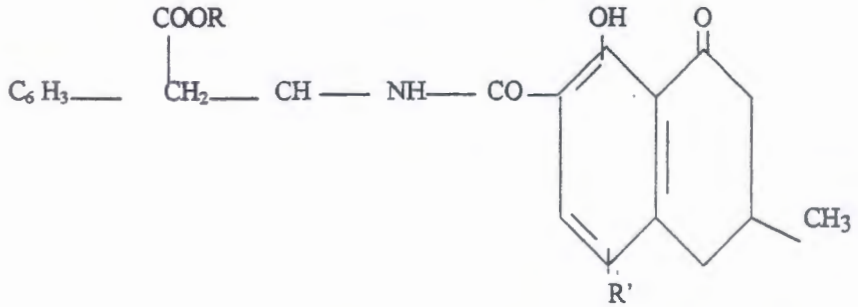


Fig 12.: la structure chimique des ochratoxines [18] ·

3-3- Aspects pathologiques des mycotoxines:

Les mycotoxines sont des polluants dans les denrées alimentaires, ce sont des composées chimiques d'origines fongiques, possédant des effets toxiques sur l'homme, l'animal et les plantes [7].

Les mycotoxines ont de très nombreuses manifestations [1], l'aflatoxine B_1 à un effet mutagène et cancérigène, elle inhibe la synthèse de l'ARN, perturbe l'induction de certaines protéines et enzymes. Le foie est l'organe le plus affecté, on y observe : nécrose, cirrhose et cancer primitif. Des teneurs en aflatoxine B1 de 0,7 mg/kg sont suffisante pour induire des lésions chez les bovins, porcins et volailles, sauf chez le canard ou une teneur de 0,3 mg/kg cause la mort de l'animal [8], l'ochratoxine A est néphrotoxique, affectant les microtubules des reins, des teneurs en ochratoxine de 1 à 4 mg/kg et de 0,3 à 1 mg/kg d'aliments provoquent l'apparition des lésions respectivement chez les porcins et chez les volailles [8]. Paralysies dûes à la patuline (pomme, jus de fruits) ou à la citréoviridine (riz...) [1]. le tableau suivant nous donne les différents types de mycotoxines et les moisissures responsables de leur production.

Tableau N° II récapitulation des mycotoxines produits par les moisissures [17, 28].

toxines	Moisissures responsables	Substrat habituel	Condition d'apparition	Syndromes caractéristiques
Aflatoxines	*Aspergillus flavus*	Arachides, maïs	climats tropicaux et subtropicaux	Syndromes hépatiques
	Aspergillus parasiticus	Céréales		Hépatomes
Ochratoxines	*Aspergillus ochraceus* *Pencillium viridicatum*	Maïs, orge	Climats frais et tempérés au cours de stockage	Syndrome hépato et néphrotoxique
	Fusarium graminearum	Maïs, foins, aliments	Moisissures Ubiquistes	Syndromes oestrogénique
Citrinine	*Penicillum citrimun*	Orge, seigle, avoine		Syndrome néphrétique
Patuline	*Penicillium clavatus*	Pomme, sol		Syndrome cutané
	Penicillium expansum	Jus de pomme		Cancérigène
	Penicilium polulum	Blé, paille		
Sporidesmine	*Peniclium thomyces chartarum*	Herbe		Exzema par photosens -ibilisation
Trichothécène	*Fusarium tricinctum*	Céréales		leucopenie

3- 4- METABOLISME DES MYCOTOXINES :

3-4-1 Métabolisme d'aflatoxine :

chez les animaux de laboratoire, soumisent à une régime alimentaire spéciale contenant des mycotoxines, l'aflatoxine B_1 subit des transformations métaboliques au niveau du foie ; qui conduit à deux situations opposées [16].

1- la formation des dérivés hydroxyles, on a caractérisé une dizaine de molécules pouvant être en théorie recyclées en donnant des diols, c'est la première étape d'une détoxication : les hydroxyles sont conjugues puis éliminés.

2- la formation d'un époxyde au niveau de la double liaison.

3- du groupe bisfurannique, c'est une fonction instable et très réactives, sa position à l'extrémité plane de la molécule facilité une fixation covalente aux acides nucléique, et conditionne son pouvoir génotoxique, il s'agit donc d'une activation des propriétés toxiques et 2-3 époxyde est le « dérivé ultime », cancérigène réel.

Cette propriété différencie les aflatoxines de type 1 (B_1,G_1,M_1) qui possèdent une double liaison en 2-3 des aflatoxines de type 2 qui ne le possèdent pas sont donc que des cancérogènes faible [6].

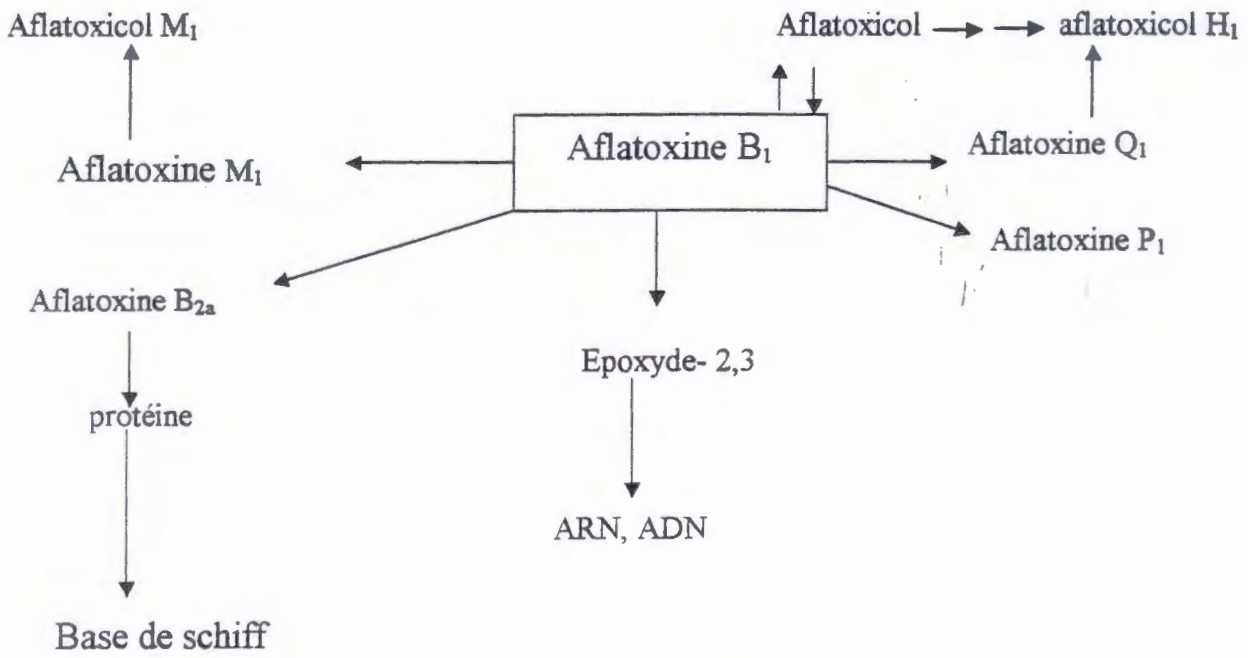


Fig 13 : métabolisme hépatique de l'aflatoxine B1 [16].

3-4-2 Métabolisme d'ochratoxine :

L'ochratoxine est véhiculée rapidement au niveau des reins et du foie des animaux de même des résidus d'ochratoxine ont été trouvés dans les reins de porcs atteint de néphropathie au Danemark [8].

La concentration maximale ayant été observée (jusqu'à 97 mg/kg dans des tissus rénaux, au cours d'études expérimentales sur des porcs dont la nourriture était additionnée d'ochratoxine A, des résidus ont été dosés dans 4 tissus analysés, en concentration décroissante ; dans l'ordre suivante :
Tissu rénal, hépatique, musculaire, adipeux.

Des études faits invitro ont montre que l'ochratoxine A se lie à l'albumine sérique. Cette liaison a été également conservée au cours d'étude menées invivo sur des rats [14].

4- METHODES DE RECHERCHE ET DOSAGE DES MYCOTOXINES :

Certaines moisissures produisent des mycotoxines qu'il est possible de mettre en évidence ou de doser par des méthodes chimiques, physiques chimiques ou immunologiques [15].

4-1- Techniques chimiques et physiques :

4-1-1- La chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince permet le dosage de nombreuses mycotoxines, parfois simultanément, mais elle tend à disparaître progressivement au profit des méthodes plus complexes comme la CLHP [6].

4-1-2- La chromatographie liquide haute performance (CLHP) :

La CLHP a comme avantage principal sur la CCM, un gain appréciable en sensibilité, en spécificité et en automaticité [6].
Le principe de l'CLHP se résume comme suite on prend un échantillon de 30kg et on le divise en trois échantillons, chacun de 10kg, et chaque échantillon est broyé en la présence de 1,5 fois du poids d'eau et chloroforme de sodium par broyage industrielle durant de 30 minute pour obtenir un mélange homogène. L'analyse se fait sur le pistache et on extrait 63,5 g de mélange et qui égal 25g de pistache et par la présence de mélange méthanol -eau (80/20) et hexane alors la purification sur colonne immuno- affinités se fait avant la neutralisation par CLHP [14].
Il existe de nombreux protocoles de CLHP applicables aux mycotoxines les plus préoccupantes et destinés aux matrices les plus surveillées [6].

4-1-3- LA Chromatographie en phase gazeuse (cpg) :

Quant à La chromatographie en phase gazeuse des mycotoxines, elle connaît un développement limite car d'une part, elle implique la possibilité de volatiliser la molécule et, d'autre part, l'équipement correspondant est moins répandu dans les laboratoires en revanche, la CPG est facilement couplée avec la spectrométrie de masse, ce qui permet d'accéder, sans ambiguïté, à l'identification de la mycotoxine ou d'un de ses dérives. La CPG est surtout utilisée vomi toxine, la sensibilité de détection est de l'ordre de 5 à 10 mg/kg [6].

4-2- Techniques immunologiques :

Les techniques immunologiques de détection utilisent la réaction antigène – anticorps comme principe de dosage. l'antigène est ici la mycotoxine à doser [6] mais non immunogène, mais en les utilisant sous forme d'haptènes, on peut produire des anticorps [15], et l'anticorps est une immunoglobuline anti–mycotoxine produite par réaction immunitaire chez un animal (lapin, souris) ayant reçus une série d'injection d'un conjugué protéine mycotoxine, en effet, cette production ne peut être obtenue que par la conjugaison de la mycotoxine à une protéine ou un polypeptide porteur car, étant de faible poids moléculaire et de nature non peptidique, les mycotoxines ne peuvent par elles – mêmes susciter la réaction immunitaire [6].

Partie Expérimentale

PARTIE EXPERIMENTALE

Les mycotoxines résultent de la présence de diverses moisissures pouvant altérer certaines denrées alimentaires dont notamment les céréales et les fruits secs.

Elles présentent, en général une très grande toxicité. Une analyse des mycotoxines peut être réalisée sur des produits particulièrement exposés (grains de céréales, farines), la recherche et le dosage des mycotoxines nécessitent une extraction et une purification et mettent en oeuvre des solvants et des techniques variées : de nombreuses méthodes sont basées sur une séparation chromatographique avec comparaison à des étalons, éventuellement sur une révélation chimique ou par fluorescence ou sur l'emploi d'anticorps monoclonaux.

Dans notre travail, nous avons recherché la présence des mycotoxines dans trois (03) échantillons : pois chiche, haricot et lentille.

Matériel et Méthodes

2- METHODES :

2-1--Echantillonnage :

Nous avons fait un prélèvement de trois échantillons de chaque lot de grains de légumes secs (pois chiche, haricot, lentille) au niveau du restaurant universitaire.

Les trois échantillons ont été conservés dans des conditions de laboratoire de biologie. Après 15 jours, on a remarqué que les trois échantillons sont pollués, ensuite on a procédé à l'extraction des mycotoxines.

2-2- L'extraction :

Les mycotoxines sont touts caractérisées par la solubilité dans les solvants organiques tel que le méthanol, le chloroforme[6].
Dans l'extraction est réalisée sur 50g de chaque échantillon (pois chiche, haricot, lentille) moisi et broyé, à l'aide de chloroforme- eau (250/25) ml par agitation pendant 30 minutes.
Les trois (03) extrait obtenus sont immédiatement filtrés sur papier filtre, et 50 ml de chaque extrait sont recueillis.

2-3-La purification:

La purification des mycotoxines est pour éliminer les diverses impuretés de l'extrait en même temps que les toxines grâce à une colonne de gel de silice[6].

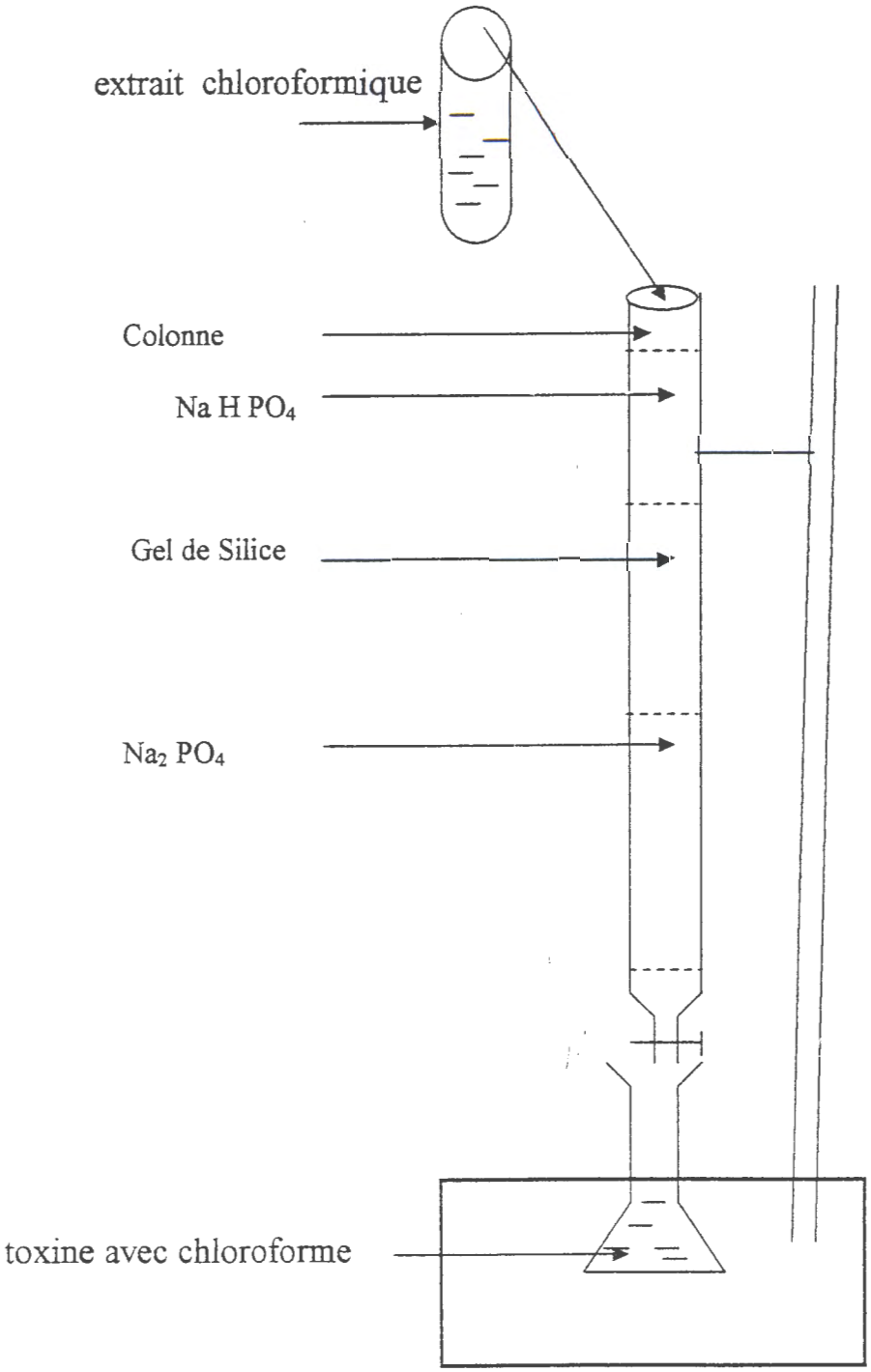


Fig 14 : Colonnes De Purification .

Il s'agit de trois (03) colonnes chacune contenant successivement de 5g de Na_2 Po_4 , 10g de silice, 10g de Na HPO_4 pour le lavage de chaque colonne, en faisant passer 100ml d'hexane et 100ml d'éther, une fois les colonnes sont prêtes.

On verse 50ml de l'extrait à partir de chaque échantillon plus 100ml de mélange chloroforme/ méthanol (97/3), Ensuite, l'extrait de chaque colonne est concentré à 500 µl. par l'évaporation.

2-4-La séparation.

Les méthodes chromatographiques permettent de détecter spécifiquement de faibles quantités de mycotoxines et ce, sans trop de limitation sur le type d'échantillon. La chromatographie sur couche mince est la plus utilisée à l'heure actuelle car elle apporte une amélioration de la séparation et augmente la sensibilité de la détection[6].

La plaque de silice qui contient les gouttes de l'extrait à partir de chaque échantillon est plongée dans la cuve qui contenant éther- méthanol – eau (94+4,5+1,5) ml.

Lorsque la migration des solvants est terminée la plaque est retirée et les toxines sont visualisées par examen sous lumière U. V à 366 nm après pulvérisation d'un mélange (H_2SO_4 +éthanol).

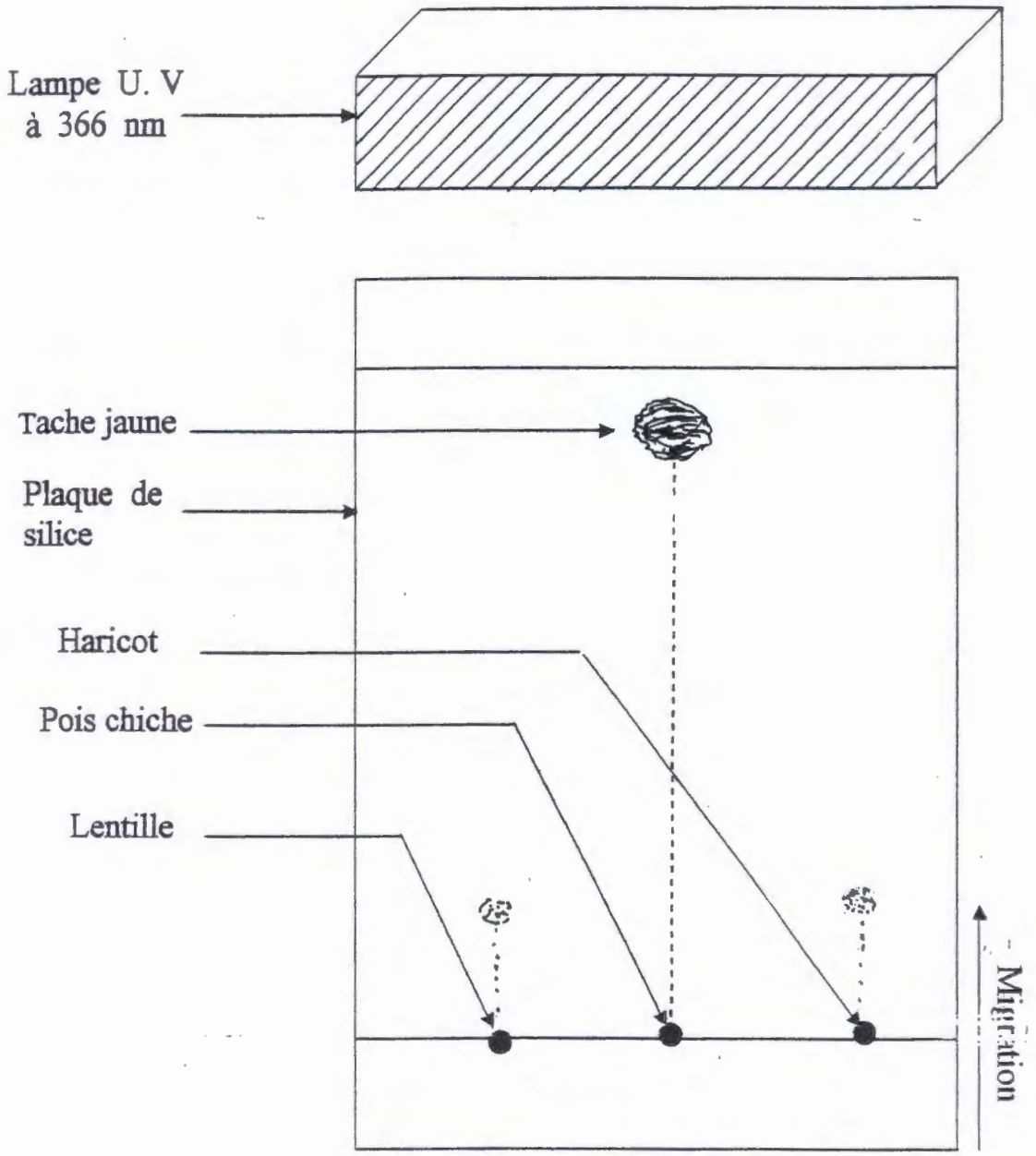


Fig 15 : Révélation sous U. V à 366 nm .

Résultat et Discussion

Conclusion

CONCLUSION :

Les mycotoxines sont des substances toxiques et cancérigènes, pour l'homme et les animaux, ils ont la propriété thermostable plus que les organismes qui les ont produit ; il s'agit de métabolites secondaires de certaines moisissures ; la production de ces métabolites est induite par des modifications du substrat, l'évolution du mycelium et la sporulation.
Ces substances existent à l'état de traces dans les denrées alimentaires ce qui rend difficile leur détection, identification et quantification, en effet ; il existent plusieurs méthodes, parmi les quelles les méthodes physico-chimiques élaborées comme la chromatographie sur couche mince (C.C.M) la chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) ou la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P) .

Depuis l'augmentation de la nécessité de contrôle des denrées alimentaires, l'emploi de ces méthodes s'est largement répandu, la C.C.M permet le dosage de nombreuses mycotoxines parfois simultanément, mais elle tend à disparaître progressivement au profit de méthodes plus complexes comme la C.L.H.P, cette dernière a comme avantage principal sur la première, un grain appréciable en sensibilité en spécificité et en automaticité (frisvad et thrane, 1993).

La présente étude est consacrée à la recherche des mycotoxines dans des légumes secs (pois chiche, lentille, haricot) polluées par des moisissures banales, nous avons utilisé la méthode C.C.M et la révélation sous lampe U.V à 366 nm selon la norme 76/372/CCE [11]. La tache fluorescente, nous apparaît, uniquement pour l'extrait de l 'échantillon de pois chiche ce qui indique la présence de mycotoxine dans cette échantillon, à défaut de solution étalon, on ne peut pas dire quelle type de mycotoxine, pour les autres échantillons (lentille, haricot), le résultat négatif est due éventuellement au stade de production qui n'est pas encore atteint, malgré les conditions de conservation qui étaient les mêmes.

Enfin selon les moyens disponibles, nous espérons avoir donner une contribution non sans intérêt.

ABRÉVIATION :

A_W : activité water

C C M : Chromatographie sur couche mince.

CLHP : Chromatographie liquide haute performance .

CPG : Chromatographie phase gazeuse .

U.V : ultra violet.

nm : nano mètre .

µL : micro letre .

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

[1]Amarenco g,badelon,barbanel,barrucan,bass,batellier,2000 Larousse médicale, larousse, bordas / Her, pour la présente édition ,1995 ,larousse pour l'édition originale,p 676.

[2] Benmohamed touati et benyoub m'hmed,1993 mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en chemie industrielle,université de mostaganem, p7.

[3] Boiran P, 1996, l'organisation et biologie des champignons ouvrage publié sous la direction de Eric perilleux, édition Nathan paris, p 37- 41.

[4] Botton B , Breton A , Fever M , Gauthier S , Gry P.H , Laepent J.P, Reymond P , Sanghier J.J , Kayssier Y , Veau P, 1990, biotechnologies, moisissuresutiles et nuisible, importance industrielle, 2e édition revue et complétée, Masson, paris milan Barcelon, mexico , P :35-39, 393-413.

[5] Bousseboua H, 2002, éléments de microbiologie générale, édition de l'université mentouri constantine (Algérie), janvier, P :8-9.

[6] Cahagnier B,1998, coordonnateur, moisissures des aliments peu hydratés, technique et documentation lavoissier londres, new york, paris, p163- 204.

[7] Derache R, 1986, toxicologie des grains et produits dérivés, in Bouklab.R,2003, mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'études universitaire appliquées, université de jijel, p16 .

[8] Eyquem A , Alouf J, Montagner L, 1995, traité de microbiologie clinique piccin Nuova Libraria S.P.A, padoue, Italie, p :1511-1512.

[9] Feillet P, 2000,le grain de blé, INRA éditions institut national de la recherche agronomique paris , P :48- 52.

[10] Fraink C, 1992,toxicologie, édition masson.

[11] Frisvad J. C, thrane u, 1993, liquide column chromatography of mycotoxins: techniques and applications: Elsevier Science Publishers ,p : 253-356.

[12] Géonge B,1999, les mycotoxines et risques alimentaires, in bouklab.R, 2003, mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'études universitaire appliquées, université de jijel, p 13-14.

[13] Genevés L,1990, Biologie végétale thallophytes et micro-organisme biosciences Dunod ,paris,p 75.

[14] Godon B. loisel.W, 1964, guide pratique d'analyse dans les industries des céréales, in Bouklab.R,2003, mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'étude universitaire appliquée, université de jijel, p 20.

[15] Guivand J.P,1998, microbiologie alimentaire, dunod, paris.

[16] Hartly R. and nesbitt B,1963, toxic métabolite of *Aspergulus flavus*, nature198 (p 1058-1058), in Bouklab R,2003, mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'étude universitaire appliquées ,université de jijel, p14,18.

[17] Larpent J. P, Larpent – Gourgaud M, 1985, éléments de microbiologie, hernann éditeurs des sciences et des arts, p122.

[18] Larpent J. P, 1991 , biotechnologie des levures, Masson paris milan Barcelone bonn, p 9.

[19] Madelin M.F , 1966, the fargus spore, butter workes edition London. in Bouklab. R. et al, 2003, mémoire en vue de l'obtention de diplôme d'études universitaires appliquées (D.E.U.A), université de jijel, p3.

[20] Nesbitt B. F, ,1962, les mycotoxines, in bouklab R, 2003, et al, mémoire en vue de l'obtention de diplôme d'études universitaires appliquées (D.E.U.A), université de jijel, p14.

[21] OMS, 1980, résultat d'études, in bouklab. R. et al, 2003, mémoire en vue de l'obtention de diplôme d'études universitaires appliquées (D.E.U.A), université de jijel, p15-16.

[22] Ozenda P ,2000, 2e cycle, les végétaux : organisation et diversité biologique, 2e édition dunod, , 1990, paris, Masson, paris, pour la 1re édition, P84.

[23] Samson R and Hoekstra E. S, 1988, Introduction to food- borne fongi.CBS édition, baarn, Holland.

[24] Sougg , 1959,botanique, zoologie, édition classiques Hachette.

REFERENCES EN ARABE :

[25] دمبري ليندة، 1993رسالة لنيل شهادة الدراسات العليا D.E.S ,أكتوبر، ص21.

[26] د.محمد علي أحمد، د/ محمد عبد الرزاق النواوي،1999 الفطريات الصناعية 206- 207 الطبعة الأولى، ، الدار العربية للنشر والتوزيع، المحور 8 ، ص

REFERENCES INTERNET :

[27] http://w.w.w.culture.gow.fr/culture/conservation/fr/cours/ roqueber.htm # comment

[28] http://w.w.w. inra.fr/internet/directions/ DEC/PRESSE/ comuniques/h h sa 95/dp10. htm

[29] http:// coproweb. Free.fr/ mycoweb/ descript. Htm

جامعة جيجل
مكتبة
كلية العلوم

Présenté par : - Lakehal Houda
- Belhaine Merbouha
- Kismoune Nawel

Date de soutenance : juillet 2004

Titre : recherche des mycotoxines dans les grains de certains légumes secs

Nature du diplôme :

Diplôme d'études universitaire appliquée (D. E. U. A)

ملخص:

من بين الملوثات المتواجدة في الأغذية نجد هناك السموم الفطرية و هي عبارة عن مركبات أيضية ثانوية تنتجها الفطريات في نهاية النمو النشط عند توفر الشروط غير الملائمة.

وصلنا في الدراسة النظرية إلى ان هذه الملوثات لها تأثيرات سمية على الإنسان، الحيوان و النبات.

تطرقنا في الدراسة التجريبية إلى البحث عن السموم الفطرية و استخلاصها من ثلاث عينات من الحبوب المتعفنة(الفاصونيا، العدس، الحمص) و ذلك باستعمال طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) ثم تمرير المستخلص المرشح عبر الأشعة فوق البنفسجية (U.V) و التي أظهرت إشعاعا في مستخلص الحمص المتعفن فقط، إذن فالفطريات أنتجت سموما. أما بالنسبة لمستخلص الفاصونياء و العدس المتعفنين فلم يظهر إشعاع و ذلك لكون هذه الفطريات لا تنتج السموم أو لأنها لم تبلغ بعد مرحلة إنتاج السموم.

summary :

A mong pollutants in food, there are mycotoxins, mycotoxins are secondry metabolic compounds produced by muschrooms at the end active growth whenever the conditions are available.

Our theoriticol study shows that these pollutants have poisonous effects on man, animal and plants.

Our experimental study deals with mycotoxins and their extraction from their samples of moulds crops (bean, lentiles, chick peas), using the medium layer chromatography (MLC) method and then the passing of the distilled extraction through ultraviolet rays. The latter have shown radiation in the chick peas extraction only. Therefore mushrooms produce toxins. In the extraction of bean and lentiles however no radiation was shown, because these fungi do not produce or have not yet reached the stap of toxins production.

Résumé:

Parmi les polluants se trouvant dans les aliments, on peut citer les mycotoxines, ces mycotoxine sont des composants métaboliques secondaires que produisent les champignons à la fin de la croissance active une fois que quelque conditions défavorables sont réunies.

Notre étude théorique démontre que ces polluants ont des effets toxiques sur l'homme, l'animal et les plantes.

Nous avons essayé de réaliser étude experimentale pour l'extraction de ces substances et leur extraction de trois échantillons des céréales moisies (haricot, lentille, pois chiche) et cela par l'utilisation de la CCM, puis la révélation sous U.V, ces derniers ont révélé une certaines radiation dans l'extrait de l'haricot et de lentilles, il n'y avait aucune radiation parce que les moisissures ne produisent pas les mycotoxines ou n'ont pas encore atteint l'étape de la production de ces mycotoxines.

Mots Clés : Moisissures, Mycotoxines, Gains des légumes secs, CCM, Les U.V.