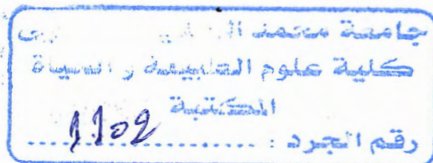


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE JIJEL



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT : DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire :

De Fin D'études En Vue L'obtention Du Diplôme D'études Universitaires
Appliquées (D.E.U.A)

Option : Contrôle De Qualité et analyses

Thème

*Les Mycotoxines Dans
Les Produits Alimentaires
De Large Consommation*

Membre Du Jury :

Encadreur : M. Bouldjedri

Examineur : M. Bouhous



présenté par :

Bousmaha Hicham

kimouche abdelma lek

Belksier Abdelaziz:

Promotion : juin 2007





Remerciement

Avant tout, nous remercions le bon Dieu qui nous donné le courage

Et la force de continuer

*Nous tenons a remercier notre encadreur monsieur
Bouldjadri Med pour tout son aide, ses précieux
conseilles et ses effort déployé durant la préparation de
notre mémoire*

*Nous remercions les membres de jury qui sont accepté
de juger notre travaille monsieur bouhous.*

*Nos remerciements s'adressent également à tout nos
enseignements et les*

*Laborantins de la faculté des sciences de l'université de
Tijel.*

*Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de
pré ou de loin à la réalisation de se modeste travail.*

Abdel Malek ***abdelazize ***fichem

Sommaire

INTRODUCTION	01
CHAPITRE I LES MOISSURES	
I Généralités	02
I-1 Définition	02
I-2 Structures végétatifs	02
I-3 Caractères physiologiques.....	03
I-4 Croissance des moisissures	03
II- Classification des moisissures	04
II-1- Classe 1 : Zygomycètes	05
II-2-classe 2 Ascomycètes	05
II-3 classe 3 : Deutermycètes	06
II-3-1 Les Hyphomycètes	06
II-3-2-Coelomycètes	06
II-3-3- Blastomycètes	06
III conditions et développement	06
III-1- Les facteurs physicochimiques	09
III-1-1- La température	09
III-1-2 le pH	09
III-1-3 – L'oxygène	09
III-1-4- L'activité de l'eau.....	10
III-1-5- Lumière :.....	10
III-2- Les éléments nutritifs	10
III-2-1 sources de carbone	10
III-2-2 sources d'azote	10
III-2-3- les oligo-éléments	10
IV-LA reproduction	11
IV-1- Reproduction asexuée	11
IV-2-Reproduction sexuée.....	11

CHAPITRE II : LES MYCOTOXINES

I Métabolisme des moisissures.....	12
I-1 métabolites primaires.....	12
I-2 métabolites secondaires.....	12
II l'intoxication alimentaire.....	13
II-1 effets des intoxications fongiques.....	13
II-2 Conditions favorisant la contamination de denrées alimentaires.....	13
III-les mycotoxines.....	13
III-1 Définition.....	13
III-2 Les différents types des Mycotoxines	14
III-2-1 Aflatoxines.....	14
III-2-2-Ochratoxine.....	15
III-2-3- Patuline.....	15
III-2-4 Fumonisines.....	16
III-2-5 Zéaralénone.....	17
III-2-6 Trichothécène.....	17
III-2-7 Citrine.....	18
III-5 Le métabolisme de quelques mycotoxines.....	21
III-5-1 Métabolisme d'aflatoxines.....	21
III-5-2 métabolismes de Zéaralénone.....	21
III-5-3 métabolisme d'ochratoxine.....	22
IV Les produits vulnérables au développement des moisissures.....	22
IV-1 produits alimentaires.....	22
IV-1-1 Céréales et dérivés.....	22
IV-1-2- Produits laitiers.....	22
IV-1-3- Viandes et charcuteries	23
IV-1-4- Les œufs.....	23
IV-1-5- Oléagineux et tourteaux.....	23
IV-1-6- Fruits et légumes	23
IV-1-7- Boissons.....	23
IV-2- Produits divers.....	23

V- Maladies Provoqués par les moisissures.....	24
V-1 les maladie chez l’homme.....	24
V-1-1 les maladies allergiques.....	24
-1-2 Les Mycoses superficielles et les Mycose cutanées	24
V-1-3 les intoxication alimentaires.....	25
V-2 Chez les animaux.....	25
V-2-1 Les aspergillose	25
V-2-1-1Chez les Bovins.....	25
V-2-1-2 Chez les Porcs	25
V-2-1-3 Chez les chats et les chiens.....	25
V-3 Chez les végétaux.....	26
V-3-1 Anthracnoses.....	26
V-3-2 Mildious.....	26
V-3-3 Oïdiums.....	26
V-3-4 Moniliose des fruits	26

CHAPITRE III : Techniques de Recherche de mycotoxines

I- Techniques particulières d’étude de la flore fongique.....	27
I-1 Examen microscopique direct	27
I-1-1- Montage sans coloration	27
I-1-1- Montage avec coloration	27
I-1-3-conservation des préparations	27
I-2 Dosage des constituants spécifiques après extraction :.....	27
I-3-Culture direct à partir des grains ou d’amandes	28
I-3-1 Isolements par suspension dilution	28
I-3-2 Isolement par ensemencement direct	28
I-3-3- Milieux de cultures	28
I-3-4 Incubation	29
II- Types d’analyses réalisées	29
II-1- Etude de la pollution des matières premières	29
II-2- Etude de la population des locaux	29
II-3- Evolution de la population d’une denrée	30
II-4- Etude expérimentale et perspectives de luttés	30

III- Techniques de recherche des mycotoxines	31
III-1- Techniques chimique et physico-chimiques.....	31
III-1-1- Aflatoxines	31
III-1-2- Acide pénicillique	32
III-1-3- Trichothécènes	32
III-1-4- fumonisines	32
III-1-5- Citréoviridines	32
III-1-6 -Citrinine	33
III-1-7- Ochratoxine A	33
III-1-8- Patuline	33
III-1-9- Zéaralénone	33
III-2- Techniques immunologiques	33
IV- législation des mycotoxines.....	34
IV-1- Critères d'interprétation des résultats	34
V-2- quelques précisions sur les mycotoxines recherchées	35
Discussion	36
Conclusion.....	37

Introduction

Introduction :

Au sein du règne des champignons renfermant suivant les auteurs de 65 000 à 100 000 espèces différentes, les moisissures constituent un ensemble hétérogène d'environ 20 000 espèces. Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à 3 classe : Zygomycètes, Deutéromycètes et Ascomycètes. Ce sont des champignons microscopiques filamenteux possèdent la capacité de se développer sur des substrats nutritifs variés. Et tout particulièrement sur les denrées alimentaires : l'aliment contaminé par le champignon moisit.

Le développement non souhaité de moisissures sur une denrée est associé à de multiples nuisances : modification de l'aspect de l'aliment et de ses caractéristiques organoleptiques et chimiques. Ces défauts conduisent généralement à la l'élimination des produits, ce qui entraîne aujourd'hui à l'échelle mondiale une perte de la production alimentaire estimée à 5 à 10%. [16]

Les mycotoxines sont considérées comme faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique, la sécurité alimentaire et l'économie de nombreux pays, notamment en développement. Elles affectent de nombreux produits agricoles, dont les céréales, les fruits secs, les noix, les grains de café et les graines oléagineuses, qui sont un capital important pour les pays en développement. Ces productions majeures sont très sensibles à la contamination par les moisissures et lorsqu'un ensembles de conditions environnementales au champ, ainsi que de techniques incorrectes de récolte, de stockage, et de transformation sont réunies.

Les mycotoxines retiennent l'attention dans le monde entier en raisons des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, la productivité animale et le commerce national et international. On a estimé, par exemple, que les pertes annuelles aux États-Unis et au Canada dues à l'effet des mycotoxines sur les pays en développement, ou les vivres (par exemple le maïs et les arachides) sont susceptibles d'être contaminés, il est probable qu'il faille y ajouter des pertes importantes dans la population humaine en raison des décès prématurés associés à la consommation de mycotoxines.[17]

Chapitre I

Les Moisissures

I – les moisissures :**I-1 Définition :**

Les moisissures sont des champignons filamenteux, uni ou multicellulaires, eucaryotes, non photosynthétiques et immobiles. Certaines vivent en symbiose avec des végétaux ou des animaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux. [13]

La plupart des moisissures sont aérobies, [10] se développent sur des déchets organiques et contaminent les produits alimentaires. [13] Les espèces qui colonisent un substrat mort ou inerte sont saprophytes, et celles qui se développent au dépend d'autres organismes vivants sont des parasites. [1]

I-2 Structures végétatifs :

L'appareil végétatif d'un mycète s'appelle le thalle chez une moisissure, le thalle est constitué de longues filaments reliés les uns aux autres (Les hyphes). Chez la plupart des moisissures les hyphes sont divisées par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui rassemblent des cellules distinctes avec un seul noyau (hyphes segmentés ou septés).

Il y a habituellement des ouvertures dans les cloisons qui font en sorte que le cytoplasme des cellules adjacentes est continu ; il existe aussi des structures coenocytiques (des hyphes ne contiennent pas des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples). [10] Les hyphes, qu'ils soient segmentés ou non sont de petits tubules transparents entourés d'une paroi cellulaire rigide. Cette paroi contient de la chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui confèrent une plus grande rigidité, une plus longue durée de vie et une plus grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées- plus élevées. [10]

Quand les conditions du milieu le permettent ; les hyphes grandissent pour former une masse filamenteuse appelée mycélium [10] qui est parfois visible à l'œil nu sous forme de petites taches colorées à la surface des substrats moisissés. [4]

La partie de l'hyphe qui obtient les nutriments s'appelle hyphe végétative ; la partie consacrée à la reproduction est l'hyphe reproductrice ou aérienne. Les hyphes aériens portent souvent des spores reproductrices. [10]

I-3 Caractères physiologiques :

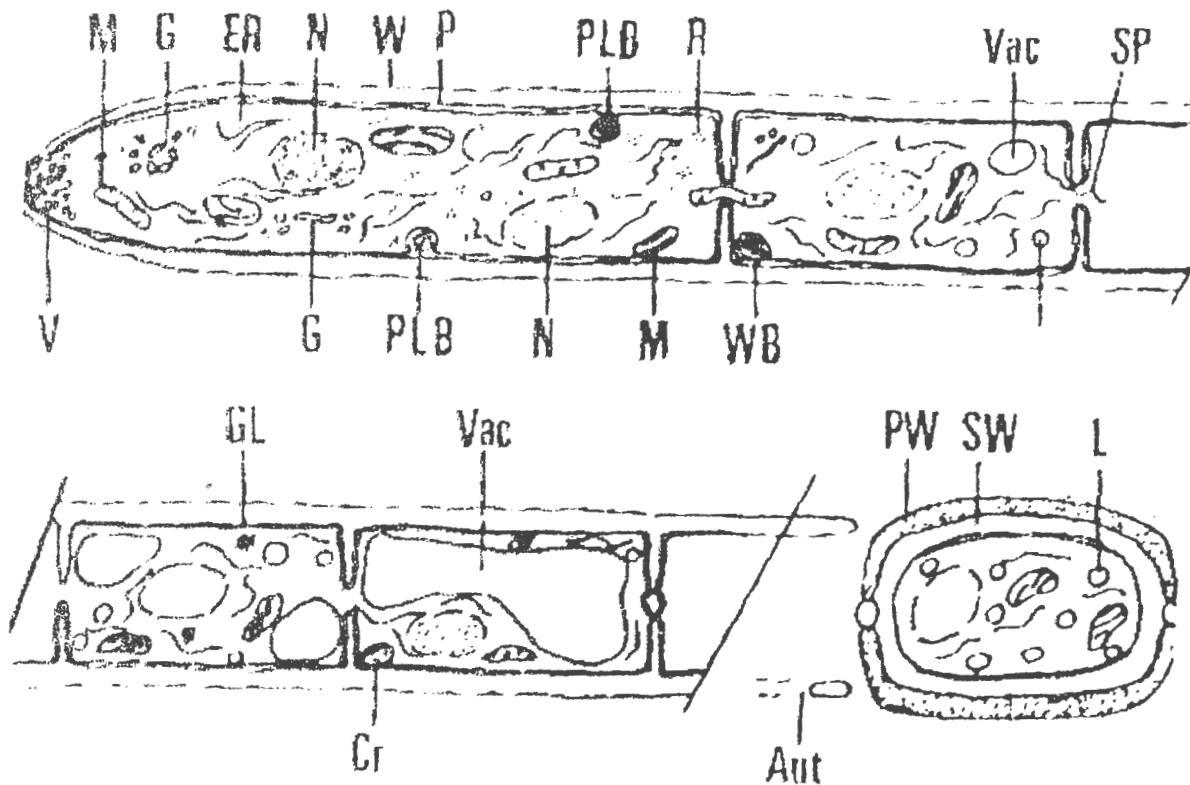
Les moisissures sont des eucaryotes, non photosynthétiques, hétérotrophes et immobiles, elles sont acidophiles et sont obtenus sur milieu à PH acide (PH compris entre 3 et 7). Elles sont mésophiles : température optimale : 20°C a 30°C. D'autre sont psychrotrophes : température <15°C. [4]

Elles sont à l'origine d'altérations superficielles, certaines souches produisent des toxines. [4]

I-4 Croissance des moisissures :

La croissance des hyphes est apicale, [7] les hyphes croissent grâce a l'allongement de leurs extrémités ; chacune des parties de l'hyphe est capable de croissance. Quand un fragment se détache, il peut s'allonger pour former un nouvel hyphe. [10] Dans des conditions favorables, se développe un mycélium dont la croissance est la même dans toutes les directions de l'espace ; en outre, les hyphes se ramifient harmonieusement [7] chacune des hyphes en croissance, installée dans le substrat prélevé les molécules indésponsables au travers de sa surface pariétale. [7]

Les moisissures dégradent le substrat par production d'enzymes et d'acides- cette dégradation des substrats peut être infinie ou considérables, selon l'adaptation spécifique des champignons, la durée et les conditions de son développement. [1](Fig 01)



- | | |
|----------------------------------|--|
| (+) V= vésicules | (+) W =Paroi |
| (+) M = Mitochondrie | (+) Pw= Paroi Primaire |
| (+) G = Golgi | (+) P= Plasma lemme |
| (+) Er = Réticulum endoplasmique | (+) Plb = Plasmalemasome Ou Lomasome |
| (+) Wb= Corps de woronin | (+) R = Ribosome |
| (+) Vac= Vacuole | (+)Gl = Glycogen |
| (+) Sp = pore septal | (+) Cr = Cristal |
| (+) L= Globules Lipidique | (+) Aut = Autolyse |
| (+) N= Noyau | (+) Sw = Paroi Secondaire De La Chlamydo-spore |

Figure 01: croissances d'une hyphes

II- Classification des moisissures :

La classification des moisissures est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques, nous nous limiterons ici aux groupes intéressants dans le cadre des industries alimentaire, les principaux genres des moisissures sont trois classes :

II-1- Classe 1 : Zygomycètes :

Ce sont des moisissures saprophytes ou parasites. [13] Ce groupe se divise en deux ordres : Mucorales et Entomophthorales.

- Mucorales : ce sont des champignons filamenteux à mycélium souvent envahissant, non septé (siphonnés) ou à cloisons formées exceptionnellement au niveau des organes reproducteurs ou lors de la différenciation de spores de résistance (chlamyospores).[3] Quatre genres – *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, et *Rhizopus* incluent la plupart des espèces de Mucorales isolées des denrées alimentaires, quelques espèces appartenant aux genres *choanephora*, *cunninghamilla*, *Mucor*, *Rhizopus*, interviennent dans la préparation d'aliments fermentés.[3] La reproduction asexuée s'effectue au moyen de spores immobiles formés généralement en grand nombre dans les sporocystes.[1]

II-2-classe 2 Ascomycètes :

Regroupent nombreux parasites des végétaux, mais aussi de nombreuses moisissures contaminant les produits alimentaires.[13] la reproduction est sexuée. [1]

Ces champignons ont des thalles filamenteux septés ou levuroïdes, présentent une structure caractéristique appelée asque qui est un sporocyste particulier formé au cours de la reproduction sexuée (ascospores). [3] La morphologie d'ascospores, extrêmement variée, et très utilisée dans la définition des genres et des espèces, elles peuvent être :

- Hyaline, vivement colorées, brun plus ou moins foncé.
- Globuleuse, elliptiques, cylindriques, vermiculaires.
- Unicellulaire, cloisonnées transversalement avec 2, 4, 8, 16, 32 et même 64 cellules chez *Sporomium mirabilis* ; cloisonnées transversalement et longitudinalement.
- Lisses ou ornementées. [3]

Les Ascomycètes ont une grande importance économique. Beaucoup d'espèces cellulolytiques sont des agents de biodégradation des substrats celluloseux.

Ce sont souvent des parasites redoutables de végétaux (chancre du châtaignier dû à l'*Endothia parasitica*), maladie de l'orme provoquée par *Ceratocystis ulmi*, ergot du seigle par *Claviceps purpurea*. (Fig 02)

Certain Ascomycètes filamenteux peuvent entraîner des altérations aux denrées alimentaires. [3]

II-3 classe 3 : Deutermycètes :

Ce classe comprend tout les champignons qui ne produisent ni ascospores ni basidiospores et qui se multiplie au moyen de conidies. Ils sont unicellulaire (levures) ou a thalle filamenteux septé [3]. Ils sont aussi appelées champignons imparfaits, le plus souvent se rencontrent sous leur forme imparfaite. Les deutermycètes se divisent en trois classes.

II-3-1 Les Hyphomycètes :

Ces champignons filamenteux produisent des spores ou des conidies. Certaines Hyphomycètes, tels *Rhizoctonia* et *Sclerotium*, ne forment jamais de spores.

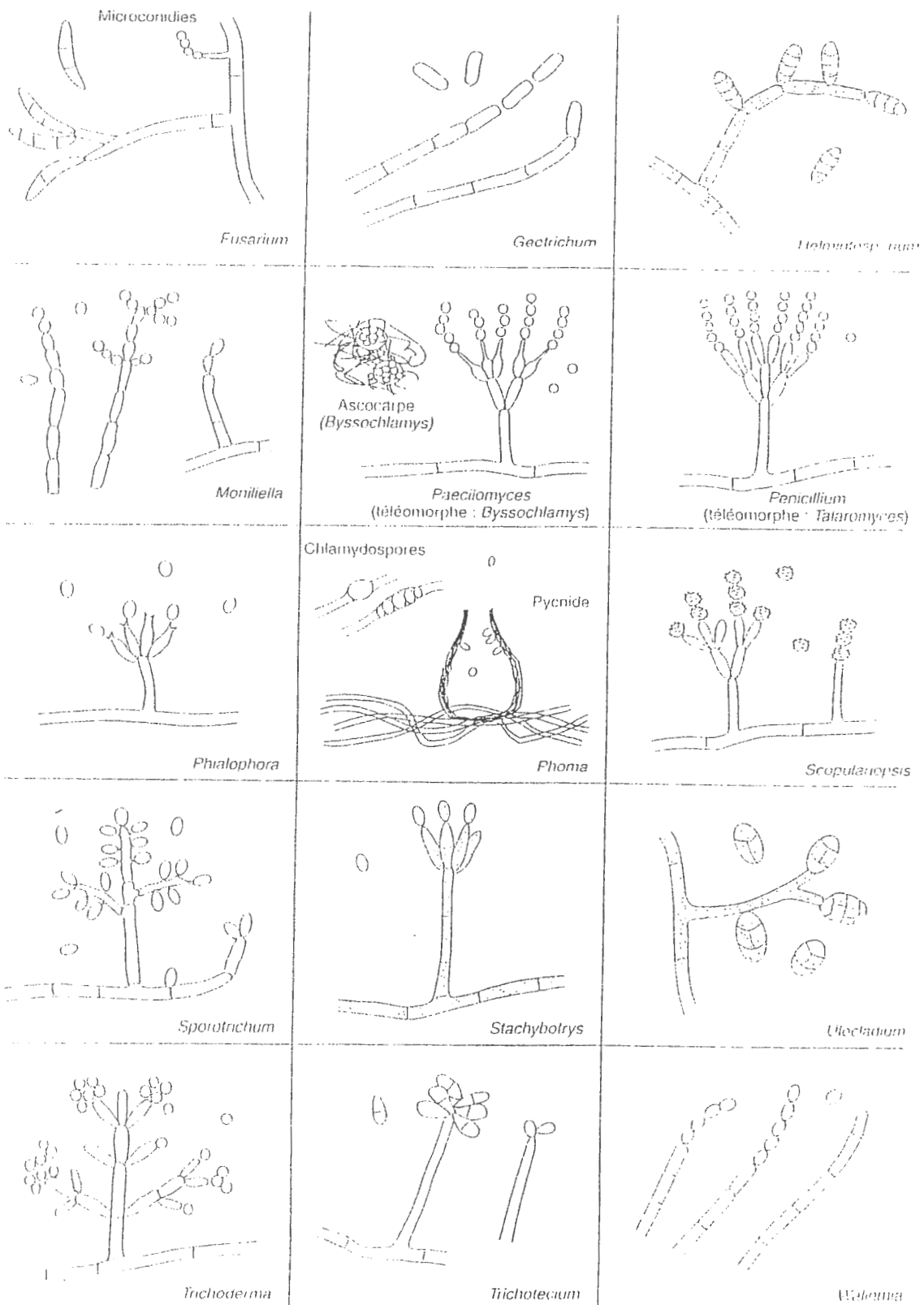
Les différents types des spores sont les suivants :

- les chlamydo-spores qui sont des spores de résistance, qui sont produites par *Trichoderma* et *Fusarium*.
- les arthrospores ou arthroconidies.
- les conidies peuvent être solitaires, bourgeonnées de façon synchrone sur des renflement (Botrytis), associées en glomérules ,disposées en chaîne basipitales s'accroissent par la base (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou en chaîne acropétales s'allongeant au sommet (*Alternaria*, *Cladosporium*).[3](Fig 02)

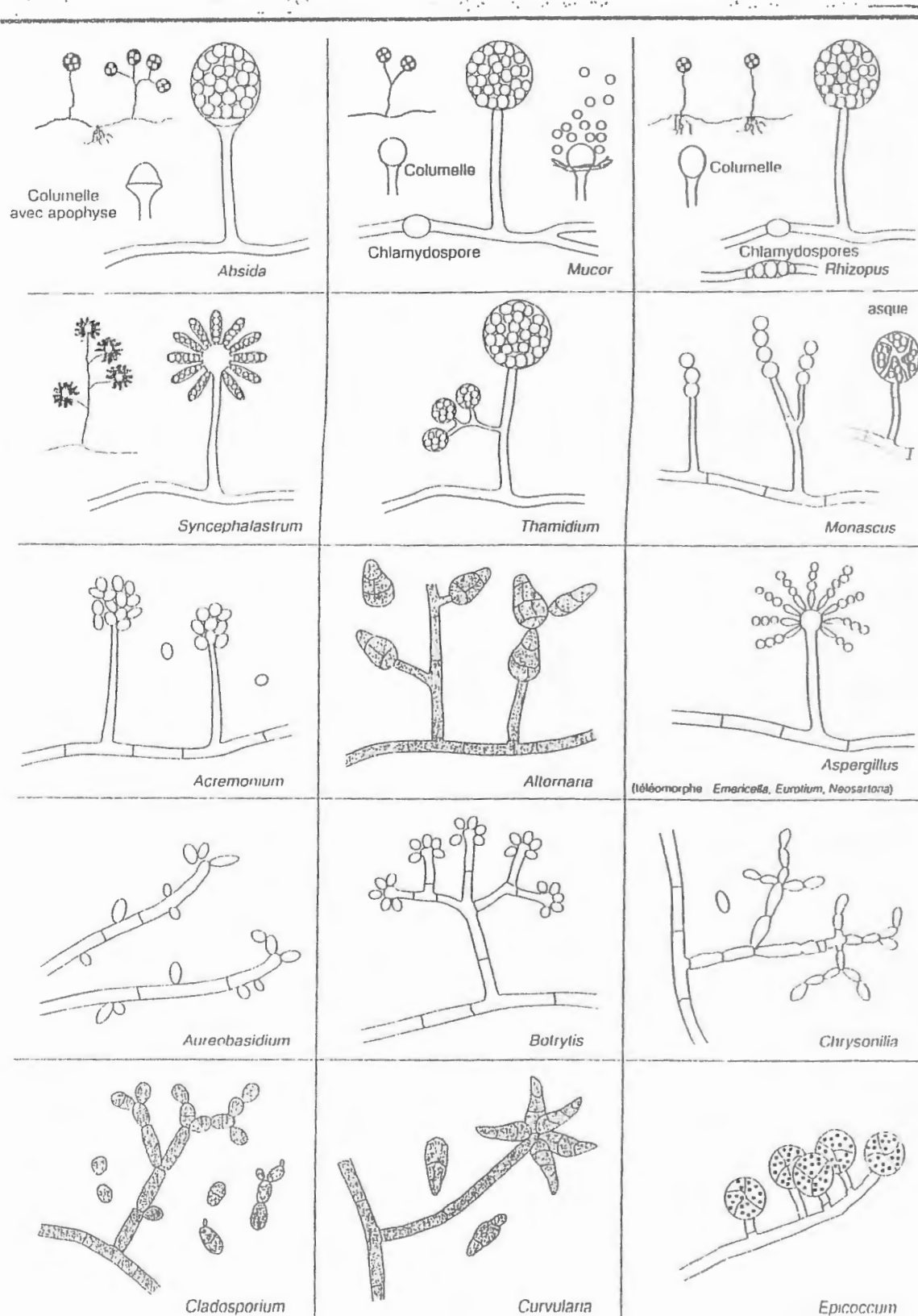
II-3-2-Coelomycètes :

Conidies produites dans des pycnides (sphaeropsidales) (Phoma) ou dans des acervules (melanconiales)

II-3-3- Blastomycètes : (levures). [3]



Caractères morphologiques des principaux genres des moisissures. [13]



Caractères morphologiques des principaux genres des moisissures. [13]

III- conditions et développement :

Les conditions de récolte des produits agricoles et surtout celles de stockage de ces denrées ou de leur dérivés ont une grande influence sur le développement des moisissures. [7]

Les principaux facteurs de développement des moisissures sont :

III-1- Les facteurs physicochimiques :

III-1-1- La température :

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne ; elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores [7]

La plus part des moisissures se développent entre 15 et 30°C avec une croissance optimale aux environs de 20 et 25°C [7]

Certaines moisissures sont mésophiles ou la température optimale 20 – 30°C cependant certaines espèces sont psychrophiles se développant à basse température (<15°C ou même < 0°C). Certaines espèces de moisissures peuvent résister jusqu'à 30 minutes à 65°C (thermorésistants) d'autres espèces sont thermophiles comme les ascomycètes. [13]

L'action de la température intervient à plusieurs niveaux :

- Ralentit et bloque le métabolisme, entraînant une forte mortalité (congélation lente)
- Dénaturation des constituants cellulaires, les transferts physiques. [13]

III-1-2 le pH :

La plupart des moisissures n'ont que peu d'exigences à l'égard du pH :

Les moisissures sont en général acidophiles ou le pH de développement compris entre 3 et 7. [13] cependant certaines tolèrent des pH beaucoup plus acides ou très alcalins. [7] Les moisissures peuvent croître dans un milieu à pH minimal compris entre 1,2 et 3, et pH maximal compris entre 8 et 11. [13]

III-1-3 – L'oxygène :

Les moisissures sont aérobies. [13] La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. Les moisissures plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats ; les moins exigeantes peuvent

se développer en profondeur- certaines peuvent même supporter une anaérobiose tré stricte. [7]

III-1-4- L'activité de l'eau :

Les moisissures ont général un besoin en eau faible par apport au autres micro-organismes et elles peuvent se développer sur des aliments a faible (A_w) jusqu'à 0,65 quelques moisissures sont des xérophiles (se développent sur les produits secs) a A_w

<0,62 [13], la majorité des moisissures préfèrent une A_w plus élevée de 0,85 a 0,95 voire même par fois la saturation. [7]

Selon l'activité de l'eau y a deux autres types des moisissures

- Osmophiles.
- Halophiles. [13]

III-1-5- Lumière :

La lumière influence la croissance des champignons soit par déstractions photochimique de constituants de milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique. [2]

III-2- Les éléments nutritifs :

Les champignons exigent des composés organiques comme source d'énergie et de carbone. Les molécules simples (monosaccharides, acides aminés ou acides organiques), traversent facilement la barrière membranaire. Les molécules complexes ou polymères doivent auparavant être dégradé par des enzymes excrétés ou liées à la paroi. Ces enzymes extracellulaires sont largement exploitées par l'industrie. [12]

III-2-1- sources de carbone :

Les champignons peuvent dégradent les hexoses, les pentoses ainsi que des dérivés des glucides (acides uroniques, sucres alcools) presque tous les champignons peuvent utiliser, le glucose, le maltose, le saccharose et l'amidon. [12]

III-2-2- sources d'azote :

Les champignons peuvent métaboliser les acides aminés et l'urée. La plupart d'entre eux utilisent l'ammoniaque mais relativement les nitrates. [12]

III-2-3-les oligo-éléments : tels que K, Fe, Cu, MN, Mg, Zn, Mo, et Ca sont essentiels pour la croissance. [12]

IV-LA reproduction

La reproduction chez les moisissures passe par la formation des spores issues de processus asexuée au sexuée.

La reproduction se fait par germination de spores, les spores mûres sont libérées de appareils sporifères et disséminées, une spore germe et émet un filament ou hyphe qui croit, s'allonge et se ramifie pour donner un nouveau mycélium.[4]

Il peut exister deux types de reproduction :

IV-1-Reproduction asexuée :

La reproduction asexuée est très répandue et se fait sans recombinaison génétique, selon différents modes :

- Simple fragmentation du mycélium, bourgeonnement, ou plus généralement par la formation de spores, appelées aussi conidies et formées en nombre plus ou moins importants dans une structure spécialisée (Le sporange)[8]

IV-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. [1]
- chez les moisissures on distingue deux types catégories de spores sexuées.
 - Les zygosporos chez les Zygomycètes.
 - Les ascospores chez les Ascomycètes.
- Les Deutéromycetes se caractérisent par la présence d'un seul cycle (asexuée). [1]

Chapitre II

Les Mycotoxines

I Métabolisme des moisissures:

I-1 métabolites primaires:

Pour assurer leur développement (croissance et reproduction), les moisissures comme tout autre micro-organisme utilisent les sources de carbone, et d'énergie qu'elles trouvent dans leur environnement et qu'elles dégradent à l'aide d'enzymes exo cellulaires appropriées; les produits résultants [5] absorbés sélectivement et soumis à leur tour à l'action d'enzymes endocellulaires, sont transformés en molécules plus petites fournissant l'énergie et les précurseurs indispensables pour la biosynthèse des acides aminés, nucléotides, vitamines, sucres, acides gras etc. c'est-à-dire des métabolites dits primaires; ceux-ci constituent les éléments à partir des quels les molécules essentielles sont synthétisées (protéines, acides nucléiques, coenzymes, Polysaccharides, lipides). [5]

I-2 métabolites secondaires:

Les intermédiaires dans la biosynthèse de ces derniers produits sont également comptés parmi les métabolites primaires. Il arrive que les métabolites primaires soient utilisés à d'autres fins que celles qui concourent au développement du micro-organismes

En dérivent des produits dits métabolites secondaires. Qui ne sont pas indisponibles à la croissance des micro-organismes. Lorsque ceux-ci sont développés in-vitro en culture pure mais peuvent toute fois avoir un rôle non négligeable dans la nature du bénéfice de ceux qui les produisent [5]

Les métabolites secondaires sont des composés de poids moléculaire généralement inférieurs a 1500 Dt ; ils comprennent notamment les antibiotiques, les mycotoxines les alcaloïdes, les hormones de croissances, etc. [5]

On trouve chez les moisissures, des espèces sur productrices de métabolites commercialement très importants. Parmi les métabolites primaire, l'acide citrique l'acide itaconique le B-carotène; parmi les métabolites secondaires. La pénicilline la Céphalosporine, et divers alcaloïdes. [5]

II- l'intoxication alimentaire:

II-1 effets des intoxications fongiques:

Les intoxication alimentaires provoquées par des exotoxines fongiques, produites dans divers aliment durant leur conservation, de telles intoxications provoquent de façon passagères ou durable des perturbations [8] d'une ou plusieurs fonctions de l'organisme: les altérations des foie, des centre neveux, de circulation sanguine ou du tractus digestif sont les plus fréquentes. [7] les intoxications alimentaire sont provoques par des micro-organismes qui secrètent ou libèrent une ou plusieurs toxines dans l'aliment. Certaines moisissures peuvent produire des mycotoxines et provoquer des intoxications Alimentaires.[19] dans ce cas, ce n'est pas la présence du germe qui est importante mais celle de toxines, car le microorganisme producteur peut disparaître mais la toxine persiste . [13]

II-2- Conditions favorisant la contamination de denrées alimentaires:

Les trois principales genres de moisissures impliquées lors d'intoxications alimentaires sont *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium*.

La contamination des denrées alimentaires peut survenir avant, pendant et après la récolte, et aussi au moment du stockage. En effet les moisissures se développent lors de l'entreposage si les céréales ne sont pas suffisamment sèches au départ aussi le grain a été endommagé ou encore si le taux d'humidité augmente durant la période de stockage [18]

III-les mycotoxines:

III-1 Définition:

Le terme mycotoxine vient du grec "mycos" qui signifie champignon du latin, "toxicum" qui signifie poison. Il désigne les substances Chimiques toxiques produits par certaines moisissures qui développent sur certaines denrées alimentaires.[19]

Ils sont des produites du métabolisme secondaire des moisissures; elles présentent l'aboutissement d'une succession de réactions, catalysés par des enzymes a partir de quelques produits du métabolisme primaire. [7] la plus commune de ces mycotoxines est l'aflatoxine, c'est aussi la mycotoxine aux effets toxiques les plus sévères. [8]

Selon Manon et Johnson (1985), environ de 25% des denrées alimentaire sont contaminées par des mycotoxines [19] même en faibles concentration, elles peuvent avoir

Selon Manon et Johnson (1985), environ de 25% des denrées alimentaire sont contaminées par des mycotoxines [19] même en faibles concentration, elles peuvent avoir un effet toxique pour l'homme et l'animal. Suivant le type de substance, les mycotoxines peuvent présenter une toxicité aiguë ou chroniques. [20]

III-2 Les différentes types des Mycotoxines:

III-2-1 Aflatoxines:

Les aflatoxines sont responsables de nombreux accidents en pathologie animale aussi bien qu'humaine.[9] Découvertes en Angleterre en 1960 à la suite d'hépatites toxiques d'étiologie alors inconnue, ayant occasionné des pertes considérables dans des élevages de dindons, les toxines furent isolées de moisissures contaminant l'alimentation. Elles sont produites par *Aspergillus flavus* et dans une moindre mesure par *Aspergillus parasiticus*. [9]

Certaines espèces sont aptes à produire l'une ou l'autre ou encore quelques unes des quatre aflatoxines-: B1, B2, G1 et G2. C'est l'aflatoxine B1 qui est plus toxique. [18]

Aliments à risque: les céréales, surtout le maïs, les arachides, les noix et les légumineuses notamment les grains de Soya entreposés quelques jours à une température de 25°C .[18](Fig 03)

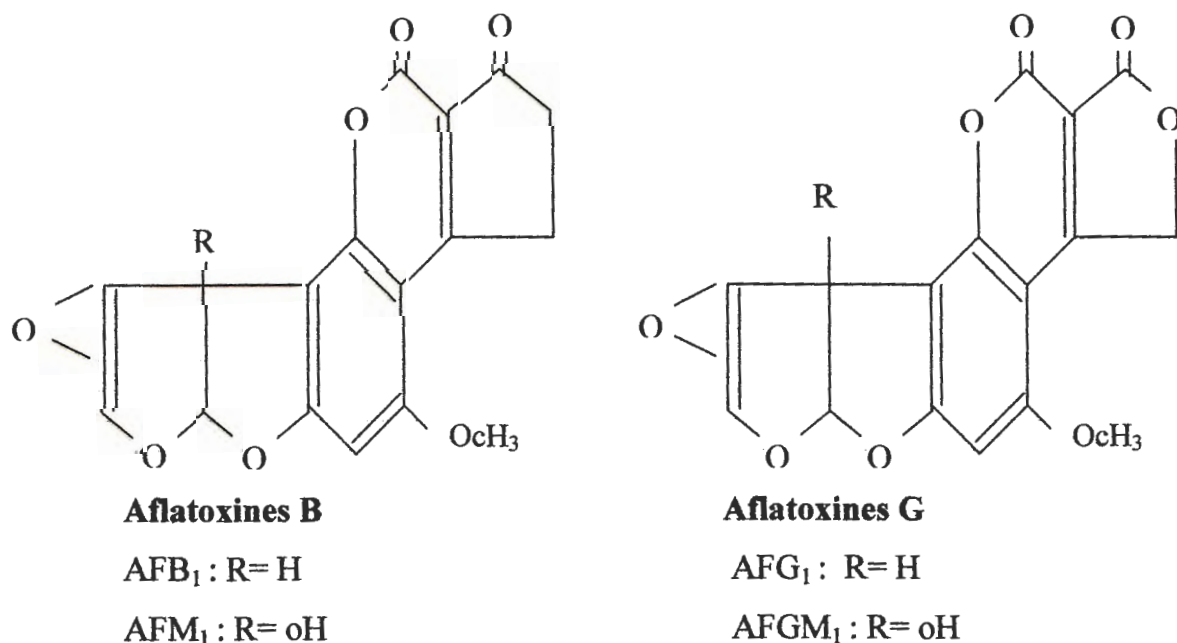


Figure 03: Structure chimique d'aflatoxine [9]

III-2-2-Ochratoxine:

Elle est également synthétisée par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, en particulier *P. viridicatum*, contaminant banal des céréales.[9]

Les produits dérivés constituent le principal vecteur (50%), les abats; principalement du porc, constituant une autre source de contamination; il s'agit d'une substance mutagène et cancérogène pour l'homme.[1] (Fig 04)

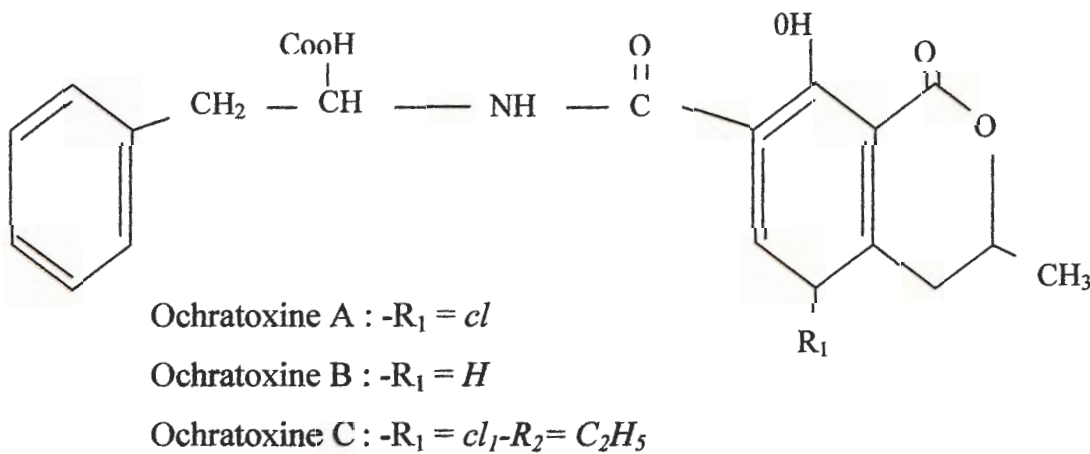


Figure 04: Structure chimique d'ochratoxine. [9]

III-2-3- Patuline:

Cette mycotoxine est produite par *Penicillium expansum* et certaines *Aspergillus* contaminant les fruits pourris, plus spécifiquement la pomme et le jus de pomme si les fruits contaminés entrent dans la fabrication du jus.

La patuline est toxique pour le système nerveux et le système immunitaire. Elle est aussi cancérogène pour certains animaux. [19] On peut aussi considérer la patuline comme antibactérien Gram positif et négatif. [1] (Fig 05)

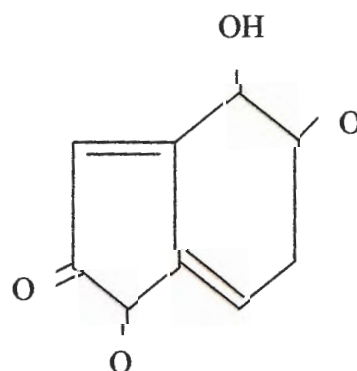


Figure 05: Structure chimique de patuline [1]

III-2-4 Fumonisines:

Ce groupe de mycotoxines récemment caractérisé chez quelques espèces de *Fusarium* infectants les cultures de céréales dans les conditions climatiques particulières; la fumonisine B₁ est la plus abondante dans les aliments dérivés destinés au bétail et à l'homme. [1] elle produit une large gamme d'effets toxiques chez l'animal, néphrotoxicité et cancer du foie chez le rat. Les fumonisines sont classées cancérogènes potentiels pour l'homme. [1] (Fig 06)

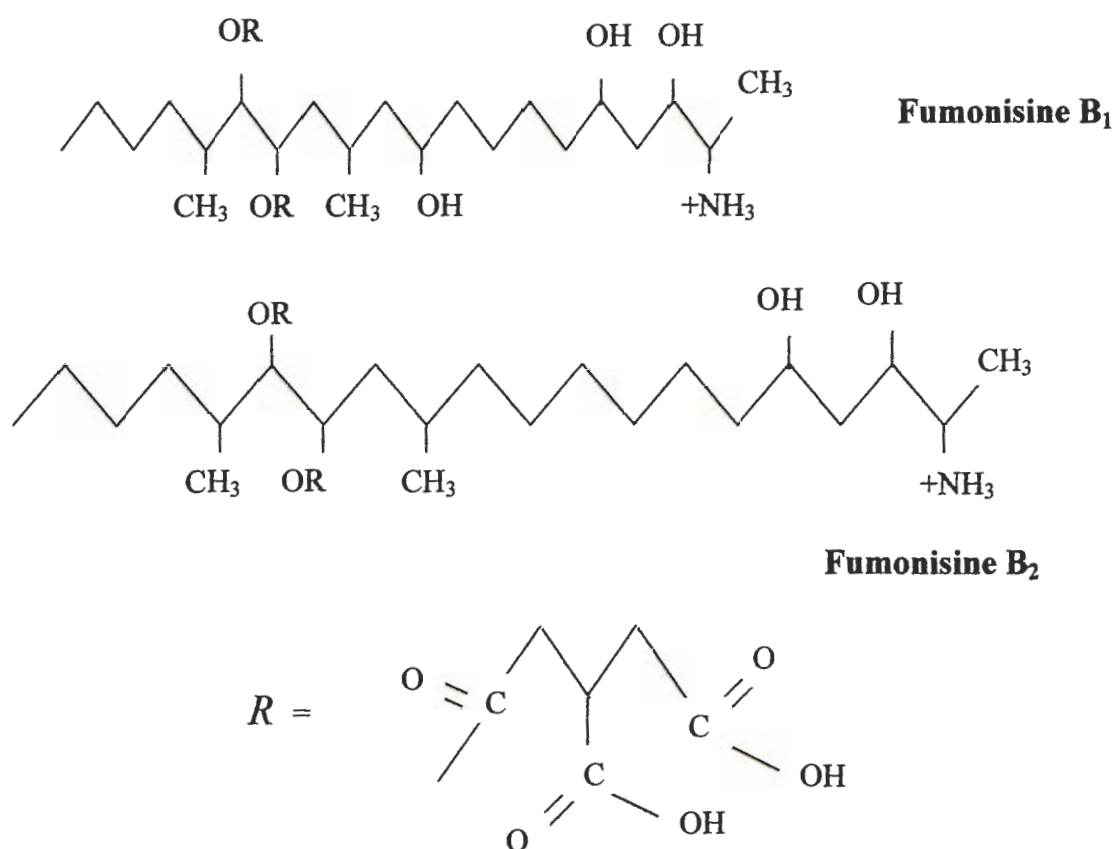


Figure 06: Structure chimique des fumonisines B₁, B₂. [9]

III-2-5 Zéaralénone:

La zéaralénone ou toxine t-2 a une action oestrogène (gonflement et rougissement de la vulve, prolapsus vaginal, accroissement de la taille de l'utérus, chaleurs anormales etc.). C'est une lactone d'un acide résorcylique produite par *Fusarium graminearum* et les différentes espèces voisines fréquentes sur mas. Son développement est favorisé par un séchage et une conservation en cribs. De plus, cette mycotoxine et ses dérivés ont un effet anabolisant. [7] (Fig 07)

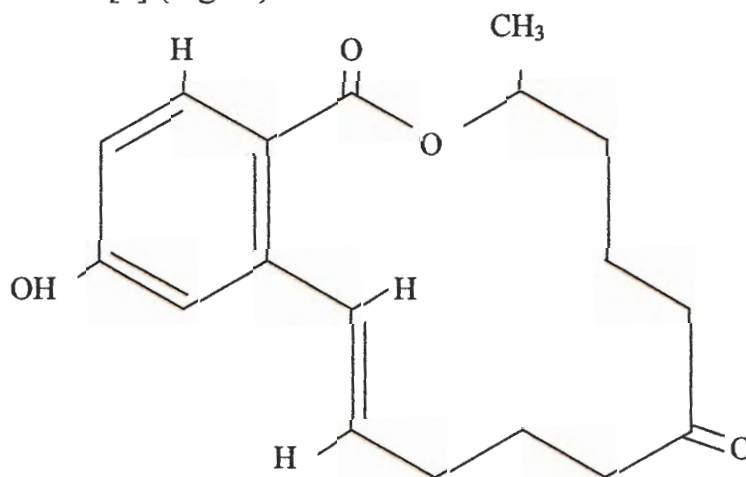


Figure07: Structure chimique de zéaralénone.[9]

III-2-6 Trichothécène:

Cette mycotoxine produite par la moisissure *Fusarium*. [19] Ces mycotoxines ont été à l'origine d'importantes intoxications animales et même humaines (consommation de millet moisi et mas).[7] Il provoque une maladie historique, l'aleucie toxique alimentaire (ATA). Les toxines attaquent la moelle osseuse. Les premiers symptômes sont une sensation de brûlure dans la bouche et une gastro-entérite. Ces symptômes s'estompent en quelques jours, mais l'empoisonnement se poursuit par la destruction de la moelle osseuse. [18] (Fig 08)

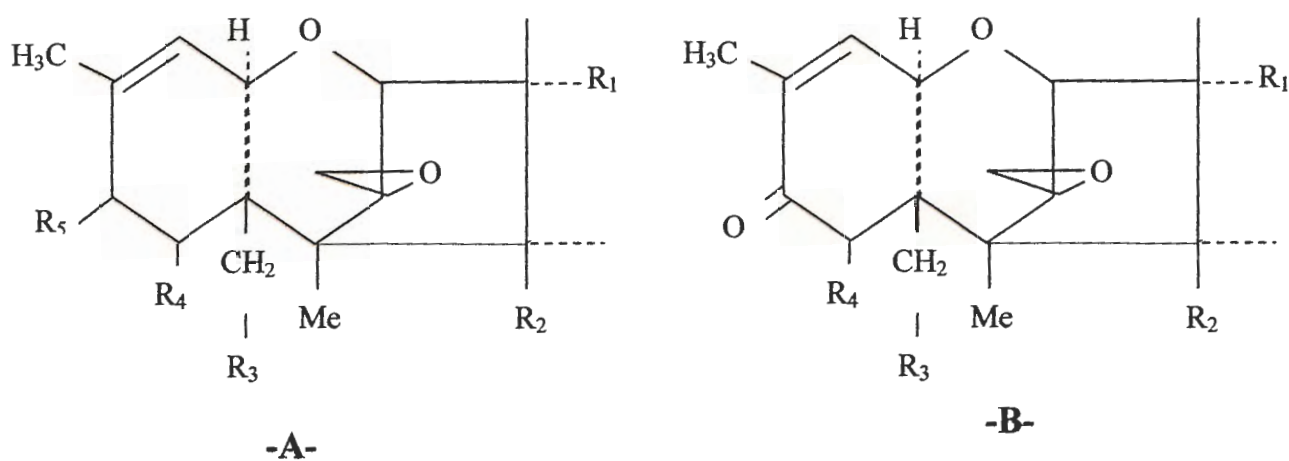


Figure08: Structure chimique de Trichothécènes.[9]

	type	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Scirpène	A	H	H	H	H	H
Trichodermine	A	H	OAc	H	H	H
Dtacétoxyscipénol	A	OH	OAc	OAc	H	H
T-2 toxine T2	A	OH	OAc	OAc	H	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COO
Néosolaniol	A	OH	OAc	OAc	H	OH
Fusarénone	B	OH	OAc	OH	OH	O
Nivalénol (NIV)	B	OH	OH	OH	OH	O
Désoxynivalénol	B	OH	H	OH	OH	O

III-2-7 Citrine:

Cette mycotoxine produite par la moisissure *Penicillium citrinum* et d'autres espèces voisines. La moisissure produit aussi un pigment jaune et colore riz en surface.[18](Fig 09)

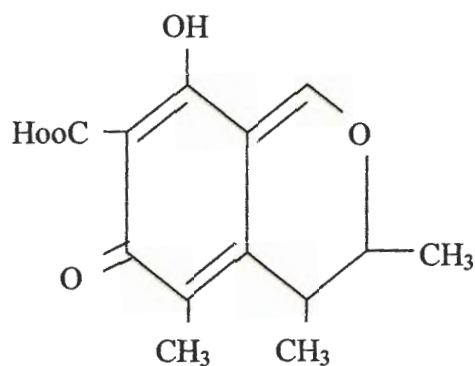


Figure09: Structure Chimique De Citrinine.[1]

Tableau 01: présentation des quelques mycotoxines:[20]

Groupe de mycotoxines	Mycotoxines	Conditions d'apparition	Moisissures	Substrats
Aflatoxines	Aflatoxines B1, B2, G1, et G2	Climats tropicaux et subtropicaux	<i>A. parasiticus.</i> <i>A. flavus.</i>	Arachide, Maïs, Sorgho
Ochrotoxines	Ochratoxine A, B, C et D	Climat frais et tempéré en cours de stockage	<i>A. ochraceus</i>	Maïs, Orge
Zéaralénone	Zéaralénone	Moisissures ubiquistes	<i>Fusarium</i>	Maïs, Blé, Sorgho
Déoxynivalenol	Vomitoxine (DON) nivalenol. Tricothécènes B. T2 toxine, Ht2 toxine	Moisissures ubiquistes.	<i>Fusarium</i>	Maïs, Orge, Blé, Avoine
Fumonisines	Fumonisines	Climats tempérés et climats chauds.	<i>Fusarium moniliforme.</i> <i>Fusarium proliferatum.</i>	Maïs, Orge, Blé, Avoine

Tableau02: Influence des conditions du milieu sur la croissance des moisissures toxigènes et la production de certaines toxines.[13]

Espèces ou toxines	PH mini	PH maxi	T° (c)° mini	T° (c)° maxi	A w mini
-Aspergillus flavus	02	11	10	43	0.80
-Aflatoxine	2.5	10	13	37	0.82
-A. parasiticus	02	11	12	42	0.80
-Aflatoxine	02	08	12	40	0.86
-A. ochraceus	2.2	13	08	37	0.77
-ochratoxine	2.2	12	12	37	0.83
-acide pnictique	2.2	12	10	31	0.81
-A. versicolor	3.1	10	09	40	0.76
-Penicillium	/	/	/	/	/
-citronnigrum	2.2	10	05	37	0.80
-citronnigrine	2.5	10	10	37	0.80
-P.citrinum	2.2	9.7	05	40	0.80
-Citrinine	/	/	15	37	/
-P.crustisum	2.2	10	02	30	0.90
-Penitrem A	/	/	17	30	0.92
-P.griseofulvum	2.4	9.5	00	35	0.82
-Patuline	2.4	9.5	04	33	0.93
-P.islandicum	2.1	9.2	10	38	0.83
-P.verrucosum	2.1	10	00	31	0.81
-Fusarium	/	/	/	/	/
-Sporotrichodes	2.5	10.6	-02	35	0.88
-F.equiseti	3.3	10.4	02	37	0.92
-F.graminuerum	2.4	10.2	02	45	0.90
-F.moniliforme	2.5	10.6	22	28	0.87

III-5- Le métabolisme de quelques mycotoxines:

III-5-1 Métabolisme d'aflatoxines:

Comme beaucoup de molécules, les aflatoxines sont métabolisées dans l'organisme, essentiellement au niveau hépatique par l'action des mono oxygénases microsomiales (famille de cytochrome P450), ce métabolisme conduit deux situations opposées:

- La formation de dérivés hydroxyles, on a caractérisés une dizaine de molécules peuvent être en théorie recyclées en donnant des diols. C'est la première étape d'une détoxification: les hydroxyles sont conjugués puis éliminés.

-La formation d'un époxyde aux niveaux de la double liaisons 2-3 du groupes bisfurannique, c'est une fonction instable et très réactive,sa position a l'extrémité plan de la molécule facilite une fixation covalente aux acides nucléiques et conditionne son pouvoir génotoxiques. Ils s'agit donc d'une activation des propriétés toxiques: le 2-3 époxyde est le "dérivé ultime", le cancérigène réel. Cette propriété différencie des aflatoxines de type1 (B1,G1, M1) qui possèdent une double liaison en 2-3 des aflatoxines de type2 qui ne la possèdent pas et sont donc que des cancérigènes médiocres.[9]

III-5-2- métabolismes de Zéaralénone:

Le métabolisme de la zéaralénone a été étudié après administration par voie orale en utilisant un produit marqué au C14 chez le rat, ou un produit non marqué chez le rat, le porc, la vache, le mouton, le primate . Les fèces constituent la voie majeure d'excrétion, indépendamment de la voie d'administration, les produits retrouvés sont, en plus de la zéaralénone elle-même, des métabolites hydrogénés (Zéaralanone-, Zéaralénol, et B Zéaralanols) conjugué ou non sous forme de glucuronate ou de sulfates. Chez l'homme, le métabolisme a été étudié après administration unique par voie orale de Zéaralénone a un volontaire sain (masculin) et collecte de l'urine pendant 24heures. L'α zéaralénone conjugué au glucuronate a constitué le métabolite principale avec une proportion équivalente de Zéaralénone. Des incubations ont été menée avec des homogénats de prostate prélevées au cours d'exérèse d'adénomes bénins, Zéaralénone et Zéaralénol interfèrent avec le métabolisme de la testostérone, ils sont sans effet sur la 5-α réductase, mais inhibent de manière compétitive les 3α et 3β-hydroxytroïdes des hydrogénases. [9]

III-5-3-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 atteints de néphropathie au Danemark. [1]

La concentration maximale ayant été observée (jusqu'à 97mg/kg) dans des tissus rénaux, au cours d'étude expérimentale 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 et adipeux. Des études faites in vitro ont montré que l'ochratoxine A se lie à l'albumine sérique. Cette liaison a été également conservée au cours d'étude menées in vivo sur des rats. [1]

IV- Les produits vulnérables au développement des moisissures

IV-1- produits alimentaires

IV-1-1- Céréales et dérivés:

les grains de céréales peuvent être contaminés:

-Avant la récolte par la flore fongique microscopique du champ (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*.....etc.) aux fortes capacités cellulolytiques.

-Au cours du stockage de la récolte, une autre flore fongique, aux propriétés moins cellulolytiques et plus osmophile peut prendre le relais (*Aspergillus*, *Penicillium*).

-finalement les substrats organiques les plus altérés permettent la croissance de champignons peu cellulolytiques et non osmophiles (Mucorales).

-Après la mouture des grains les champignons se retrouvent mêlés aux farines et aux produits dérivés, et peuvent provoquer de graves intoxications parfois mortelles. [2]

IV-1-2- Produits laitiers:

un grand nombre d'espèces sont capables d'envahir les fromages, le beurre et la margarine.

- Les Mucorales peuvent se développer à la surface de fromage.
- *Penicillium* peuvent en modifier l'aspect et le goût.
- Le beurre et la margarine sont à l'origine du développement d'une cinquantaine d'espèces telles que des *Aspergillus*, et *Penicillium*. [2]

IV-1-3- Viandes et charcuteries :

Aspergillus clavatus, *A niger*...etc. peuvent rencontrer sur les viandes, les salaisons peuvent également contaminées (*Penicillium*).[2]

IV-1-4- Les oeufs:

certaines moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*,...etc.) se développent aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des oeufs. [2]

IV-1-5- Oléagineux et tourteaux:

Les gousses et les graines d'arachides en particulier lors de leurs stockage, peuvent être attaquées par de très nombreuses espèces fongiques (*Aspergillus*, *Penicillium*) sont prépondérants, à côté de *trichothécium roseum*, *Fusarium moniliforme*.

La contamination du riz par *Penicillium islandicum* est également due pour responsable d'une telle pathologie.[2]

IV-1-6- Fruits et légumes :

de très nombreuses espèces fongiques peuvent altérer des produits aussi divers que les agrumes, les pommes, les poires, les bananes, les fraises, les tomates, l'ail....etc.[2]

IV-1-7- Boissons:

les espèces thermorésistants peuvent coloniser les jus de fruits pasteurisée, le développement de *Penicillium expansum* sur les pommes peut être à l'origine d'une production de cidre toxiques. [2]

IV-2- Produits divers:

Les moisissures mettent à profit la présence d'impuretés les matières brutes (protéines, pectines, graisses, Selles minéraux) ou de substances organiques utilisées pour des traitements divers.

Seules quelques espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Trichoderma* peuvent développer sur le liège.

Les espèces cellulotytiques (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium...*etc.) endommagent les papier.

Les développement fongiques sur le cuire conduit a la formation de taches de nombreuses levures et moisissures sont capables de se développer à partir de produits pétrolier tel que le Kérosène.

Les crèmes et les émulsions cosmétologiques peuvent être colonisées par *A.niger*. l'aluminium et l'acier peuvent être corrodés par diverses espèces d'*Aspergillus* et de *Trichoderma*.

Le verre peut faire l'objet d'une dégradation par certaines espèces fongiques (*Penicillium citrinum...*etc.) [2]

V- Maladies Provoqués par les moisissures:

Les moisissures essentiellement saprophytes . les espèces pathogènes ont pour cible principale Les végétaux, est seul une cinquantaine d'espèces sont pathogènes pour les animaux et l'homme,mais leur incidence reste relativement faible[8]

V-1- les maladie chez l'homme:

V-1-1- les maladies allergiques:

Du type asthme et autre réaction d'hypersensibilité, elles sont causées par la réponse immunitaire de l'hôte en réaction à l'inhalation de composé allergènes fongique. *Aspergillus SP*. Moisissures très communes d'environnement sont principalement responsable des ces réactions.[8]

V-1-2- Les Mycoses superficielles et les Mycose cutanées:

Dues par croissance fongique en surface ou en faible profondeur dans diverses zone du corps humain. Plusieurs pathologies sont associées à ce type de colonisation fongique: pied d'athlète (*Trichophyton*), diverses teignes (*Trychophyton microsporum*). dermatophytes (*Epydermophyton*)... Mais certain champignons sont responsable d'affections systémique (*Histoplasma*, *Coccidiodes*).[8]

V-1-3- les intoxication alimentaires:

Provoque par des exotoxines fongique, produit dans divers aliments durant leur conservation. La plus commune de ces mycotoxines est l'aflatoxine d'*Aspergillus flavus*. C'est aussi la mycotoxine aux effets toxiques les plus sévères[8]

V-2- Chez les animaux:**V-2-1- Les aspergillose:**

Les aspergilloses sont des maladie cosmopolites sévissant chez les mammifères, les oiseaux et les insectes. Mais est souvent rencontrée chez les poulets. Elle est due au développement d'*Aspergillus fumigatus* dans l'appareil respiratoire. Les symptômes majeurs de cette maladie sont les dyspnées associées a une diarrhée blanche et à troubles nerveux. L'évolution est rapidement mortelle chez les sujets âgés de quelques jours. [1]

V-2-1-1 Chez les Bovins:

Chez les Bovins, les dermatopytoses sont sans les infections fongique les plus fréquentes, dues principalement à *Trichophyton verrucosum* (par fois a T - mentagrophytes et exceptionnellement a *Microsporium canis*) elles se développent dans la couche cornée de la peau, dans les sabots et les poils des veaux vivant dans les étables humides. Elles constituent une mycose transmissible, pouvant tout le cheptel.[1]

V-2-1-2 Chez les Porcs:

Le porc est rarement atteint d'infection fongique. Les rares cas sont dus a un Dermatophyte géophile, *Microsporium manum*, les infections des porcelets a *Microsporium canis* ont généralement été transmises par des chats et celles à *Trichophyton mentagrophytes*, par des rongeurs.[1]

V-2-1-3- Chez les Chats et les Chiens:

Les chats et les chiens sont essentiellement atteints de dermatophytoses, les champignons responsables, essentiellement *Microsporium canis*, se développent dans les poils, la peaux ou les griffes. Généralement sans affecté l'état générale les animaux touché deviennent alors très contagieux pour l'homme et les autres animaux.

V-3- Chez les végétaux:**V-3-1- Anthracnoses:**

Les anthracnoses correspondent à l'infection des parties aériennes de plantes par diverses espèces fongiques, telle que *Colletotrichum*, les exemples les plus communs sont l'anthracnose du haricot (*Colletotrichum lindemuthianum*), touchant les plantules; les tiges, les feuilles et les grains, l'anthracnose des cucurbitacées (*Colletotrichum lagenarium*) ou l'anthracnose de la banane. (*Colletotrichum musae*) couvrant ses fruits de petits amas alaires. [1]

V-3-2- Mildious:

Le Mildious ou "meunier" est l'une des maladies les plus anciennes, les plus fréquentes et les plus redoutables, qui affectent les laitues cultivées aussi bien en plein champ que sous abri. *Bremia lactucae*, qui affecte surtout les laitues. [1]

Les mildious de la tomate sont provoqués par *Phytophthora* infestant, qui est aussi la cause de mildious de la pomme de terre, les taches foliaires sont semblables chez les deux espèces: nécrotiques, irrégulières, d'extension rapide, entourées d'une marge livide ou l'on peut voir à la face inférieure les fructifications du *Phytophthora* (duvet blanc fugace), sur les tiges on voit de grandes taches brunes irrégulières. Pouvant les ceinturer complètement. [1]

V-3-3- Oïdiums:

Les Oïdiums sont des champignons strictement parasites, en laboratoire provoquent parfois la mort de la plante infectée, les Oïdiums des plantes cultivées concernant les graminées (*Erysiphe graminis*). Les groseilliers (*Sphaerotheca morcuva*), le rosier (*Sphaerotheca pannosa*), le chêne (*Microsphaera alphitoides*), le premier (*Podosphaera leucotricha*) et Nigelle (*Uncinula necator*) [1]

V-3-4 -Moniliose des fruits:

Monilia fructigena est responsable de l'atteinte des arbres fruitiers à pépins, en envahissant les fruits lésés mécaniquement ou par des piqûres d'insectes. Une espèce voisine, *M. laxa* attaque de préférence les fruits à noyau. [1]

Chapitre III
Techniques de
Recherche de mycotoxines

I- Techniques particulières d'étude de la flore fongique

La mise en évidence de la flore fongique dans les végétaux et en particulier les céréales peut faire appel à techniques particulières. [11]

I-1 Examen microscopique direct :

L'examen microscopique des prélèvements effectués sur une denrée moisie n'a d'intérêt que s'il s'agit de thalles jeunes et bien développés sur le substrat altéré. Dans la pratique courante, les moisissures sont rarement dans leur stade de développement le plus favorable et toute identification précise est illusoire. Les techniques microscopiques que nous indiquons ci-dessous s'appliquent tant l'observation des prélèvements directs effectués sur la denrée moisie qu'à celle des moisissures développées après leur isolement. [6]

I-1-1- Montage sans coloration :

Sur une lame porte-objet, on dépose une gouttelette d'eau ; on y place délicatement un fragment de thalle à observer. On recouvre d'une lamelle et on examine au microscope. Pour éclaircir la préparation, un meilleur milieu de montage et le lactophénol d'AMANN. [6]

I-1-1- Montage avec coloration :

Le meilleur colorant, pour les champignons, est le bleu de méthyle : Pour mieux observer des éléments fongiques inclus dans des oranges sombres, on a intérêt à décolorer ceux-ci à l'aide d'une solution de potasse à 10% à chaud. Après rinçage, on colore au bleu de méthyle. [6]

I-1-3-conservation des préparations :

Les préparations au lactophénol peuvent se conserver quelques temps, surtout si on prend la précaution de les luter avec vernis cellulosique. Toutefois, la gélatine glycinée convient mieux pour des montages de plus longue durée.

I-2 Dosage des constituants spécifiques après extraction :

L'ergostérol est bon traceur spécifique des moisissures (et des levures) : sa détermination se fait par HPLC avec détection UV. Par exemple, pour le blé une

concentration de l'ergostérol supérieur de 12µg/g et le signe d'une qualité douteuse ; le seuil est 10µg/g pour la farine et de 8µg pour le maïs. Une concentration > 30µg/g est signe d'une contamination massive. [14]

I-3-Culture direct à partir des grains ou d'amandes :

Afin d'éliminer la flore de surface, 50 grains ou plus sont immergés pendant deux minutes dans de l'eau chlorée (0,4% d'hypochlorite) sous agitation. Il sont ensuite rincés à l'eau stérile puis déposés avec une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé classique (5 à 10 grains par boîte). Après 5 jours d'incubation à 25°C, on détermine le pourcentage de grains infectés. On peut éventuellement réaliser cette recherche sans désinfection de surface ; il est conseillé d'utiliser alors un milieu additionné d'antibiotique antibactérien, (PDA Chloramphénicol, OGA, etc.). [15]

I-3-1- Isolements par suspension dilution :

L'intérêt de ces méthodes réside dans le fait que bactérie, levures et moisissures sont dénombrées à partir de la suspension mère, qu'elles intègrent les flores internes et externe et qu'elles permettent d'analyse des échantillons importants, ce qui est favorable au plan de la représentativité statistique. [11]

I-3-2- Isolement par ensemencement direct :

Le prélèvement à partir de thalles visibles sur un substrat donné et ensemencement sur un milieu gélosé donne souvent de bons résultats. Lorsque plusieurs moisissures coexistent sur substrat, un tel ensemencement direct même s'il est réalisé avec de faibles quantités, ne permet généralement de détecter que les espèces les plus compétitives dans les conditions utilisées. [6].

I-3-3- Milieux de cultures :

Les milieux de cultures les plus couramment utilisés pour révéler la flore fongique sont de géloses, l'une de 20g d'extrait de malt par litre, et l'autre à 50g de chlorures de sodium par litre qui permet de mettre en évidence la flore xérotolérants (*penicillium*, *Aspergillus*), flore d'altération par excellence. Du chloramphénicol (bactéricide) est

ajouté à les milieux de culture à raison de 0,1g/l afin d'éliminer le développement des colonies bactériennes. Les résultats sont exprimés en nombre de propagules programme de la substance sèche du produit. [11]

I-3-4- Incubation :

Il importe de tout mettre en oeuvre pour recenser l'éventail des espèces de moisissures présentes dans une denrée alimentaire. Il convient donc de réaliser l'incubation des cultures aux températures qui conviennent le mieux à chacune d'elles. On sait par exemple que l'importance d'une attaque par l'*Aspergillus flavus* ou l'*Aspergillus fumigatus*. Peut être estimée dans des produits céréaliers, des tourteaux oléagineux, des ensilage ou dans un lait sec par une erreur du choix de la température d'incubation : à une température trop basse (22°C), elles sont peu compétitives et se laissent dominer par des *Penicillium* et *Mucor* banaux. [6]

II- Types d'analyses réalisées :

II-1- Etude de la pollution des matières premières :

Une grande partie des denrées alimentaires résultant d'un mélange ou d'une transformation de matières premières. Lorsqu'on voudra rechercher la source de contamination d'un aliment il sera nécessaire de réaliser l'analyse mycologique de tous les matières premières. En principe, chacune d'entre elles doit être considérée comme suspecte car elle risque d'héberger l'un des éléments de la mycoflore finale. [6]

II-2- Etude de la population des locaux :

En présence d'un accident de fabrication survenu au cours de la préparation ou du stockage d'une denrée alimentaire. Il convient de rechercher la source de contamination non seulement dans les matières premières entrant dans la composition de l'aliment, mais encore dans les locaux de fabrication ou d'entreposage. La source de population sera recherchée à la fois dans la mycoflore véhiculé par l'atmosphère et dans celle présente sur les surfaces (murs, sols, plafonds, élément variés de la chaîne de fabrication. [6]

II-3- Evolution de la population d'une denrée :

Lors de l'examen d'une chaîne de fabrication, des prélèvements être pratiqués à tous les niveaux. On constate ainsi que certaines fabrications qui impliquent un passage de longue durée au four, une pelletisation à haute température aboutissent à un produit momentanément stérile à partir des matières premières contaminées. C'est le cas en panification, biscuiterie, charcuteries cuites, tourteaux en pellets, aliment du bétail en granules, etc. Il suffira alors d'imposer des normes d'hygiène très rigoureuses après ce stade de fabrication pour hériter une recontamination de la denrée. Si une telle stérilisation n'intervient pas en cours de fabrication (fromage, pâtes molles, saucissons secs, etc.), le problème est évidemment plus complexe.

D'autre part des examens échelonnés en cours de stockage (cas des aliments des bétails par exemple) révèlent des successions floristiques et permettent d'envisager l'évolution ultérieure de la population fongique, établissant ainsi des « prévisions de conservation », compte tenu des conditions ambiantes. [6]

II-4- Etude expérimentale et perspectives de lutttes :

Toute recherche des causes d'un accident de fabrication devra comporter une étude expérimentale lorsque la ou les moisissures supposées responsables de l'accident auront été détectées et identifiées. Cette étude pourra concerner la connaissances des particularités biologiques des souches indésirables, surtout si celles-ci sont insuffisamment connues dans la littérature : température optimales et létales, milieux nutritifs les plus favorables, durée résistance aux agents physiques ou chimiques, etc. Parallèlement, elle concernera la contamination expérimentale de la denrée à partir de moisissures obtenues en culture pures.

On suivra dès lors leur évolution dans des conditions ambiantes différentes. Disposant alors avec les denrées infectées d'une manière homogène de « témoins expérimentaux » surs, on pourra rechercher les mesures propres à inhiber les développements des espèces indésirables.

D'une manière générale, pour lutter efficacement contre les moisissures dans les industries alimentaires, on peut utiliser divers moyens de traitement appliqués directement sur les aliments au indirectement pour limiter les sources de contamination

Les traitements directs comportent essentiellement : stérilisation par la chaleur, utilisation du froid, des hydratation- dessiccation- lyophilisation de l'acidité, stérilisation par agents actiniques, agents conservateurs chimiques. Pour prévenir la contamination, on utilisera :

- des traitements de surfaces de (détergents, désinfectants, peintures fongicides, etc.)
- des traitements d'ambiances (nébulation, fumées, gaz, etc.).[6]

III- Techniques de recherche des mycotoxines :

Certaines moisissures produisent des mycotoxines qu'il est possible de mettre en évidence ou de doser par des méthodes chimiques, physico-chimique ou immunologiques.

III-1 Techniques chimique et physico-chimiques :

III-1-1 Aflatoxines :

Elles sont généralement caractérisées après extraction par chromatographie en couche mince en utilisent un échantillon témoin. L'extraction est réalisée sur 50g de produits, à l'aides de 5 volume d'acétone- eau (8,5/1,5) par agitation (30à45 minutes) ou léger broyage (3minutes). Après filtration l'extraction est débarrassé des substances risquant de provoquer des interférences par adjonction de 170ml de soude 0,2N, puis de 3ml de perchlorure de Fer en solution saturée et après agitation de 3g de carbonate de cuivre. Après nouvelle agitation on ajoute 150ml de poudre de diatomée et l'on filtre. Il faut ensuite placer 150ml de filtrat dans une fiole à décanter avec 150ml de H₂SO₄ à 0,03% et 10ml de chloroforme .Après 2 minutes d'agitation et décantation on recueille le chloroforme et on le met en contact avec 100 ml de KOH dans une ampoule. Après mélange et décantation le chloroforme est recueilli : il contient les aflatoxines. Il existe d'autres méthodes d'extraction utilisant des mélanges méthanol l'eau ou du chloroforme et des purifications sur colonne. La caractérisations s'effectue par chromatographie en couche mince sur plaque de gel de silice en utilisent comme éluant le mélange

chloroforme- méthanol (98/2) et par comparaison éventuelle avec un échantillon de référence. Les toxines sont visualisées par examen sous lumière UV. Une détermination quantitative peut être réalisée à l'aide d'un fluorodensitomètre. [15]

III-1-2 Acide pénicillique :

Une extraction est réalisée ou chloroforme de préférence sur le produit acidifié. La mise en évidence se fait, après chromatographie en couche mince (Gel de silice ; Toluène / Acétate d'éthyle / Acide formique 6/3/1). Sont sous UV après exposition à l'ammoniac (Spot bleu). Soit par révélation au panisaldéhyde avec chauffage à 105° (spot vert sombre). [15]

III-1-3- Trichothécènes :

La mise en évidence (toxine T₂, désoxynivalénol, etc.) se fait, après CCM (chloroforme méthanol 98/2), par révélation à l'acide sulfurique avec chauffage durant 5 minutes à 110°C. Dans le cas de « *Fusarium graminearum* » la mise en évidence conjointe du désoxynivalénol et du nivalénol se fait, après CCM (Gel de silice G prétraité au chlorure d'aluminium 20% et chauffage ; chloroforme / acétone / isopropanole (8/1/1), ou chloroforme/ méthanol 9/1), par chauffage durant 7 minutes à 100°C.

Lorsqu'on dispose de témoins, on peut utiliser l'HPLC. Le couplage GLC /SM peut aussi être employé. [15]

III-1-4 fumonisines :

La mise en évidence se fait, après extraction (méthanol l'eau) (1/1), purification sur colonne et CCM (chloroforme / méthanol / acide 6/3/1) par révélation au P – anisaldéhyde. L'HPLC est utilisable. [15]

III-1-5 Citréoviridines :

La mise en évidence se fait, après CCM (hexane/acétone 1/1), par révélation sous UV (spot jaune fluorescent). [15]

III-1-6 Citrinine :

La mise en évidence se fait après extraction (acétonitrile / KCL / acide sulfurique puis chloroforme), Concentration et CCM (acétate d'éthyle / acétone /eau 5/5/2 par révélation sous UV (spot jaune fluorescent) [15].

III-1-7 -Ochratoxine A :

Après extraction (acide phosphorique 0,5M /chloroforme). Purification sur colonne de ce lite et CCM (toluène / Acétate d'éthyle /Acide formique 5/5/1) elle est révélés sous uv (spot bleu-vert). [15].

III-1-8 -Patuline :

Cette mycotoxine a été une des premières à être détectée et dosée par CLHP l'extraction est réalisée à l'acétate d'éthyle. Après purification et réalisée sur divers couples support solvant (par exemple sphérosil XOA500 et heptane / dichlorométhane / méthanol 80/15/3) et la détection se fait sous UV. La CCM peut également être utilisée. [15]

III-1-9- Zéaralénone :

Il existe plusieurs techniques utilisant L'HPLC par exemple avec support Bonda pak C18, une phase éthanol /eau /50/50 et une détection fluorométrique.[15]

III-2- Techniques immunologiques :

Il existe déverses techniques rapides : les mycotoxines sont antigéniques mais non immunogènes, mais en les utilisant sous forme d'haptènes, on peut produire des anticorps. Il existe dans le commerce de nombreux Kits disponibles ou la détection se fait par voie chimique ou enzymatique, parfois par marquage radioactif. [15]

Par ailleurs, il existe des systèmes de détection immunologique de moisissures phytopathogènes. [15]

IV -législation des mycotoxines

IV-1 Critères d'interprétation des résultats :

Les résultats d'analyses obtenus ont été compris aux teneurs maximales :

Définie par la réglementation pour les aliments courants.

Proposées par les instances scientifiques (conseil supérieurs d'hygiène publique de France).

Proposées par le syndicats européen représentant les fabricants d'aliments destinés à une alimentation particulière (IDACE) à la commission européen.

Ces teneurs sont récapitulées dans le tableau suivant : [21]

Tableau 03 : Critères d'interprétation des résultats :

	Règlement 466/2001 modifié	Propositions instances scientifiques	Propositions IDACE
Aflatoxine B ₁ (préparation à base de céréales).	2 µg/kg	-----	0,25µg/kg dans les préparations telles que vendue.
Aflatoxine M ₁ (préparation à base de fait).	0,05 µg/kg	-----	0,03 µg/kg dans les produits prêts à être consommés
Aflatoxine A (préparation à base de céréales)	3 µg/kg	-----	1 µg/kg dans les préparations tels que vendue
Palutine C (préparations à base de pomme).	-----	25 µg/kg	25 µg/kg

IV-2 quelques précisions sur les mycotoxines recherchées :

Tableau 04: Teneurs maximales pour certaines mycotoxines (Règlement 466/2001). [21]

Mycotoxines	produits	Teneurs maximales
Aflatoxines	Céréales et produits dérivés de leur transformation destinés à la consommation humaine directe ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	Aflatoxines B ₁ =2µg/kg Aflatoxines totales = 2µg/kg
Ocharatoxine A	Tous les produits dérivés des céréales y compris les grains de céréales destinés à la consommation humaine directe.	0,3 µg/kg
Zéuralénone	Farines d céréales a l'exception de la farine de maïs.	100 µg/kg 75 µg/kg
Zéuralénone	Farines, semoules de maïs.	200 µg/kg
Fumonisines B₄, B₂	Farines, semoules de maïs.	1000 µg/kg

Tableau 05 : Réglementation particulière du produits laitiers (CHSPF). [14]

Produit	Mycotoxines	Teneurs maximales
- Lait	AflatoxineM ₁	0,05 µg/L
- Laites destinés a l'enfance	AflatoxineM ₁	0,03 µg/L
- Fromage	AflatoxineM ₁	0 ,20 à 0,25µg/Kg

- Il existe une réglementation définissant les teneurs maximales admissibles en aflatoxines B et G₁.
- Pour toutes les autres mycotoxines, IL n'ya pas de législation afférente a leur limitation dans les produits laitiers. [14].

Expression des résultats

La simple analyse d'une denrée moisie par la méthode des suspensions-dilutions constitue un test conventionnel dont les résultats sont sujets à critique. En effet, si pour des organismes « unicellulaire » comme des bactéries ou des levures, le dénombrement total des colonies développées dans les boîtes de PETRI peut apporter des éléments d'appréciation de la qualité du produit contaminé, dans le cas des moisissures, organismes filamenteux, le dénombrement des thalles ne peut qu'exprimer la présence d'espèces à forte sporulation ou dont le mycélium viables a été plus ou moins fragmenté lors du broyage.

Si des *Penicillium* ou *Aspergillus* à thalles généralement petits mais très prolifiques sont par cette méthode aisément détectés, des *Fusarium*, certaines Mucorales par exemple qui sporulent mal ou modérément, sont toujours sous-estimés alors que leur présence pourra être prédominante dans l'accident considéré. [6]

Un dénombrement « total » des moisissures sans identification n'a aucune signification valable. Aussi est-il recommandé d'indiquer pour chaque espèce identifiée son « degré d'abondance » : quantité d'éléments (nombre de germes par gramme) d'une espèce polluant un produit donné. On peut distinguer :

- Des espèces très abondantes (> 10 000 germes / g).
- Des espèces abondantes (1 000 à 10 000 germes / g).
- Des espèces assez abondantes (100 à 10 000 germes / g).
- Des espèces peu abondantes (< 100 germes / g). [6]

Lorsque plusieurs analyses concernent un même produit, on peut reconnaître la « Fréquence » des espèces : nombre de fois où une espèce a été décelée par rapport au nombre total d'échantillons examinés. On reconnaîtra :

- Des espèces fidèles (>80 %).
- Des espèces fréquentes (50 à 80 %).
- Des espèces occasionnelles (10 à 50 %).
- Des espèces accidentelles (< 10 %). [6]

Conclusion

Conclusion :

Aujourd'hui, les mycotoxines posent un réel problème sanitaire à l'échelle mondiale.

Les aflatoxines sont, sans aucun doute, responsables de cancers du foie chez l'homme. Par ailleurs, beaucoup de mycotoxines dont les trichothécènes et la zéaralénone, en raison de leur affinité pour les lipides, pourraient être la cause des effets délétères des graisses animales et de certaines huiles végétales.

En outre, la toxicité des mycotoxines pourrait être aggravée par une exposition concomitante de l'homme et de l'animal à d'autres poisons comme les pesticides modernes (organophosphorés par exemple) qui inhibent de nombreuses enzymes et notamment les enzymes capables de détoxifier certaines mycotoxines .

Durant les trente-cinq dernières années qui se sont écoulées depuis la mise en évidence des mycotoxines, des centaines de méthodes de détection ont été publiées. Une nette évolution a été constatée dans le but idéal de rechercher l'alliance de la simplicité, sensibilité, rapidité et faible coût. De manière chronologique, les techniques ont fait appel à la CCM, la CLHP, la spectrométrie de masse (SM) et l'EIA. Toutes les techniques recèlent des qualités, certes différentes. Aussi les nouvelles techniques n'ont-elles pas systématiquement supplanté les anciennes.

Les techniques immunologiques sont encore de « jeunes » techniques. Si elles ont séduit un large public, l'analyste consciencieux restera prudent devant l'apparente facilité et l'aspect « boîte noire » de certains Kits. Les méthodes de dépistage qui n'ont pas d'autre ambition que d'être un crible adapté à une utilisation sur le terrain, resteront des méthodes de tri grossier puisqu'elles n'autorisent pas la détection quantitative.

Il est temps aujourd'hui de donner une nouvelle impulsion à la lutte contre la prolifération des mycotoxines dans les aliments.

La sensibilisation au problème et la motivation pour l'application des méthodes prophylactiques passent obligatoirement :

- 1) par l'information du consommateur qui doit connaître les quantités de mycotoxines dans les aliments à risques.
- 2) par la mise en place et l'application d'une réglementation internationale cohérente.

Références

1. Belhaine. M, Kismoune.N, Lakhal.H 2004, mémoire d'obtention du DEUA université de Jijel. p (1)
2. Boiron-P, 1996, organisation et biologie des champignons, nathan, p (35).
3. Botton.B, Breton.A, Ferre.M, Gauthier.S, Guy-BH, Larpent-JP,Reymond-P, Sanglier-J.J, Vayssier.Y, Veau.P, 1990, biotechnologie, moisissures utiles et nuisibles, Importance Industrielle, 2^{ème} édition, Kiasson, p (35).
4. Boucenna.S,Herri.M Meliani.L,2006, mémoire en vu de l'obtention du DES, université de Jijel, pp (14).
5. Bouix.M, Leveau.J.Y, 1993, microbiologie industriel- les micro-organismes d'intérêt industriel, Technique et documentation- Lavoisier, p (124).
6. Bouvgeois.C.M, le veau –J.Y, techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires parti 3 : le contrôle microbiologique, 2^{ème} édition Lavoisier, TEC et DOC, APRIA, p (234).
7. Bouvgeois.C.M, Mexle.J.F. et Zucca.J, 1996, microbiologie alimentaire aspect-microbiologique de sécurité et de la qualité des aliments TOM 1, technique et documentation, p 180(14)
8. Boussaboua. H, 2002, élément de microbiologie générale. Université Mentouri Constantine, p (223).
9. Cahagnier .B, 1998, moisissures des aliments peu hydratés, technique et documentation – Lavoisier, p (160).
10. Case.C.L, Funke. B.R, Tortora. G.J, 2003, introduction a la microbiologie ERPI, p (362).
11. Godon.B, loiselle. W, 1997, guide pratique d'analyse dans les industries des céréales, technique et documentation- Lavoisier, p (536)

12. Larpent .J.P, Larpent .M, 1997, memento technique de micro biologie, technique et documentation, P (192).
13. Guiraud. J.P, 2003, Microbiologie alimentaire- nouvelle présentatio, Dunod paris, p (14)
14. Larpent .J.P, 1997, microbiologie alimentaire- technique de laboratoire, Technique et documentation, p (482)
15. Larpent, 1998, Microbiologie almentaire, Dunod- paris, pp (486).
16. <http://handy.univ-lyon.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.
17. <http://www.fao.org/docrep/005/Y1390F/y1390f01.htm#TopOfpage>.
18. [http://www.innocuite.org/loader.php?src=http://www.innocuite.org/pages/cconnaissances/intoxication/agents microorg moisis.html](http://www.innocuite.org/loader.php?src=http://www.innocuite.org/pages/cconnaissances/intoxication/agents_microorg_mois.html).
19. [http://biosol.free.fr/liens/myco2004/quest ce quune mycotoxine.htm](http://biosol.free.fr/liens/myco2004/quest_ce_quune_mycotoxine.htm)
20. <http://www.art.admin.ch/themen/00930/index.html?lang=fr>
21. [http://www.minefi.gouv.fr/dgccrf/04dossiers/consommation/controles alimentaires/actions/mycotoxine0606.htm?ru=04](http://www.minefi.gouv.fr/dgccrf/04dossiers/consommation/controles_alimentaires/actions/mycotoxine0606.htm?ru=04)

Les tableaux

Tableau01 : présentation des quelques mycotoxines.....	19
Tableau02 : Influence e conditions du milieu sur la croissance des moisissures toxigènes et la production de certaines toxines.....	20
Tableau 03 : Critères d interprétation des résultats.....	34
Tableau 04 : teneurs maximales pour certaines mycotoxines.....	35
Tableau05 :réglementation particulière du produits laitiers.....	35

Les figures :

Figure01 : Croissance d une hyphe.....	04
Figure02: Principales moisissures intervenants en industrie alimentaire.....	07
Figure03: Structure chimique d'aflatoxine.....	14
Figure04: Structure chimique d'ochratoxine.....	15
Figure05: Structure chimique de patuline.....	15
Figure06: Structure chimique de fumonisines.....	16
Figure07: Structure chimique de zéaralénone.....	17
Figure08: Structure chimique de trichothécène.....	18
Figure09 : Structure chimique de citrinine.....	18

Réalisé par :

**Bousmaha Hichem
kimouche abdelmalek
Belksier Abdelaziz**

Date de soutenance : / 06/ 2007

Dirigé par : M.Bouldjedri

**Thème Les Mycotoxines Dans Les Produits Alimentaire De Large
Consommation**

Nature de diplôme : Diplôme D'études Universitaires Appliquées (D.E.U.A)

Option : Contrôle De Qualité

ملخص

تعرف السموم الفطرية كمركبات ذات أصل فطري يمكنها أن تؤدي إلى اثر سام و أو بتركيز ضعيفة،تدخل إلى العضوية بواسطة الطرق الطبيعية(الفم، الجهاز التنفسي و الجلد). السموم الفطرية تسبب أربع أنواع من السمية :حادة، مزمنة،طفرة وراثية وناسخية. آخر الدراسات كشفت أن عدد كبير من السموم الفطرية عبارة عن مثبطات مناعية ولها تأثير على ميثابوليزم البروتينات، نسبة الهيموغلوبين و فعالية اللقاحات. دور السموم الفطرية كسبب لموت الإنسان ممكن تقديره.

يمكن الكشف عن وجود السموم الفطرية عمليا بعدة طرق أهمها تقنيات كيميائية و فيزيوكيميائية و مناعية كيميائية و أهمها الكروماتوغرافيا (سهلة التطبيق و اقتصادية) بالإضافة إلى طرق آية أخرى لكنها مكلفة جدا لحد الآن.

كلمات مفتاحية: الفطريات، التسمم، السموم الفطرية، السمية.

Résumé

Les mycotoxines sont définies comme des substances d'origine fongique capables à faibles concentrations d'induire un effet toxique en pénétrant par les orifices naturels (bouche, système respiratoire, peau). Les mycotoxines présentent quatre modes de toxicité : aiguë, chronique, mutagénique et tératogénique. Des études récentes ont montré que de nombreuses mycotoxines sont immunosuppressives et ont un rôle sur le métabolisme des protéines, le taux d'hémoglobine et l'efficacité des vaccins. Le rôle des mycotoxines comme cause de mortalité humaine est probablement sous-estimé. On peut mettre en évidence des mycotoxines par plusieurs méthodes (chimiques physico-chimiques et immunochimique). Les méthodes chromatographiques sont les plus utilisables a cause de leurs rapidité et économique. Il y a d'autres méthodes automatiques mais sont très chers.

Mots clés : moisissures, intoxication, mycotoxines, toxicité.

Abstract

Mycotoxins are defined as substances produced by moulds that can provoke a toxic effect when introduced in small concentrations via natural routes (i.e. mouth, respiratory system or skin). Mycotoxins have four basic types of toxicity: acute, chronic, mutagenic and teratogenic. Recent studies have demonstrated that many mycotoxins are immunosuppressive and have an influence on protein metabolism, haemoglobin levels and efficacy of vaccines.

The role of mycotoxins as a cause of human mortality is probably underestimated. One can put in evidence mycotoxins by several methods (chemical physicochemical and immunochemical). Les chromatographic methods are most usable because of their speed and economic. It has other automatic methods but there are more expensive.

Key words: moulds, Intoxication, mycotoxins, toxicity.