

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique
Centre universitaire de Jijel

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية
الشعبية
وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
المركز الجامعي جيجل

Institut des sciences de la nature

معهد علوم الطبيعة

031

ABB.07/03

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme d'études
universitaires appliquées
(D.E.U.A)

02
02

Option : Analyse Biologique et Biochimique (A.B.B)



Recherche des mycotoxines dans le blé pollué par des moisissures

Jury :

✱ MAYACHE B. President
✱ HENDIS M.S. Examineur
✱ BOULDJEDRI M. Encadreur

Réalisé par :

✱ BOUKLAB RAMDANE
✱ DEKDOUK YUCEF
✱ BELAMRI ISMAIL



Année universitaire 2002-2003

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 01 |
| I- Chapitre : Les moisissures..... | 02 |
| 1- Généralités | 02 |
| 2- Activité enzymatique | 02 |
| 3- Croissance et développement | 02 |
| 4- La reproduction | 03 |
| 5- Classification des moisissures | 05 |
| 5-1 Les zygomycets | 05 |
| 5-1-a Mucorales | 05 |
| 5-1-b Entomophtorales | 05 |
| 5-2 Les ascomycetes | 05 |
| 5-3 Déutéromycetes | 06 |
| 6- Les conditions de pollution | 10 |
| 6-1 Les éléments nutritifs..... | 10 |
| 6-2 La température | 10 |
| 6-3 L'oxygène | 10 |
| 6-4 Potentiel hydrogène | 11 |
| 6-5 Les facteurs de l'environnement | 11 |
| Chapitre II : Métabolites secondaires | 12 |
| 1- Antibiotiques | 12 |

| | |
|--|----|
| 1-1 Pénicillines | 12 |
| 1-2 Céphalosporines | 12 |
| 1-3 Criseofrilvine | 12 |
| 1-4 Acide fusidique | 12 |
| 1-5 Fumagilline | 12 |
| 1-6 Siccanine | 12 |
| 1-7 Variotine | 12 |
| 1-8 Acide aspergillique | 12 |
| 2- Les arômes | 12 |
| 3- Mycotoxines | 12 |
| 3-1 Classification | 13 |
| 3-1-1 Les aflatoxines | 13 |
| 3-1-2 Ochratoxines | 13 |
| 3-1-3 Patuline | 13 |
| 3-1-4 Fumonnisines | 13 |
| 3-1-5 Zéaralenone | 14 |
| 3-1-6 Trichotécènes | 14 |
| 3-1-7 Cetrinine | 14 |
| 3-2 Les natures et propriété chimique | 14 |
| 3-2-1 L'aflatoxines | 14 |
| 3-2-2 L'ochratoxines | 15 |
| 3-3 Aspects pathologique des mycotoxines | 16 |
| 3-4 Métabolisme des mycotoxines | 18 |
| 3-4-1 Métabolisme des aflatoxines | 18 |
| 3-4-2 Métabolisme des ochratoxines | 19 |

| | |
|--|----|
| 4- Méthodes de recherche et dosage des mycotoxines..... | 19 |
| 4-1 Rida biopharm | 19 |
| 4-2 Immudot screeen cup aflatoxines | 19 |
| 4-3 Chromatographie liquide haute – performance (HLPC) | 20 |
| 4-4 Chromatographie phase gaseuse C.P.G | 20 |
| 4-5 Chromatographie sur couche mine – CCM..... | 20 |
| * Partie expérimentale | |
| Matériel et méthodes | 21 |
| I Matériels | 21 |
| II Méthodes | 23 |
| 1- Echantillonnage | 23 |
| 2- Extraction | 23 |
| 3- Purification | 23 |
| 4- Séparation | 24 |
| Résultats et discussion..... | 25 |
| Conclusion générale | 26 |
| Bibliographie | 27 |

INTRODUCTION

لنا المفضل أستاذ
الامتياز هندسة الموارد، بصفتك صانع
لهذه المذكرة
أعربك عن كل الاحترام والتقدير التي أشرت اليها مسبقاً
المناقشة قد تم تصحيحها.

هندي

Introduction :

La protection et la qualité des aliments constitue un grand pari sur le plan de la santé publique, et ce en regard aux dangers des toxines auxquelles le consommateur est exposé, dont les effets peuvent apparaître à moyen ou à long terme. En effet, les céréales constituent un aliment de base de notre société, ces produits alimentaires durant leurs phases de récolte, transport, stockage et transformation peuvent être infectés par des microorganismes divers surtout les moisissures.

Les genres et espèces composant la mycoflore des grains des céréales sont aujourd'hui rangés en trois grands groupes: une flore de champ qui rassemble les moisissures phytopathogène qui s'implante sur le grain avant la récolte.

Une flore de stockage essentiellement composée des genres *aspergillus* et *penicillium* qui tolèrent des humidités beaucoup plus faibles et sont à l'origine de la plupart des accidents de conservation d'origine microbiologique.

Une troisième catégorie de moisissures constitue la flore intermédiaire et regroupe des germes.

Cette mycoflore des grains peut produire beaucoup de toxines. Ces dernières sont des substances organiques élaborées par des moisissures et présente une toxicité pour l'homme ou l'animal ; toutes les mycotoxines sont des métabolites secondaires dont la formation peut être rapportée à des étapes de la glycolyse et au cycle des acides tricarboxyliques. Le métabolite secondaire dépend de l'espèce considérée et très souvent de la souche, à titre indicatif (60%) des souches d'*aspergillus flavus* ne sont pas toxigènes. [4]

Ces mycotoxines sont rarement élaborées par des mycéliums en croissance active (trophophase), elles apparaissent le plus souvent pendant l'idiophase qui débute lorsque la source d'azote ou de phosphore est épuisée et se termine lorsque la source de carbone a disparu. [4]

Notre travail consiste à mettre en évidence la présence de mycotoxines dans les grains de blé moisié, il se divise en deux volets.

1^{er} volet est consacré à étude bibliographique sur les moisissures et leur mycotoxines.

2^{ème} volet étude expérimentale qui consiste à faire une extraction, purification, et identification par la technique de CCM (chromatographie en couche mince) , on termine par une conclusion générale.

CHAPITRE I: LES MOISSISSURES

Chapitre I : Les moisissures

1-Généralités :

les moisissures sont des champignons, ces derniers sont des organismes eucaryotes, l'hyphe est l'élément structural dont la paroi contient souvent de la chitine la croissance du filament (hyphe) est strictement apicale, elle est suivie d'une ramification latérale qui conduit à la formation d'un mycélium ou thalle.

Tous les champignons sont chimiohétérotrophes, leur source de carbone et d'énergie provient de molécules carbonées organiques, ces organismes peuvent souvent utiliser des polymères complexes grâce à des enzymes extracellulaires (hydrolases). [9]

Les champignons peuvent adopter plusieurs modes de vie (saprohyte, symbiose, parasite, ou mycorhize) ; le monde des champignons est divisé en plusieurs groupes à savoir (myxomycets, oomycetes, zygomycetes, ascomycetes, basidiomycetes). Les moisissures ; ce terme n'a pas de signification systématique, il désigne tous les champignons microscopiques qui intéressent l'économie et l'environnement humains de façon bénéfique ou néfaste.

2- Activité enzymatique :

les moisissures sont agressives et dégradantes sous leurs forme mycélienne, mais la forme de spores est inoffensive , elles peuvent se disperser très largement et contaminer, ces spores peuvent rester inertes aussi long temps que l'environnement ne permet pas leur développement. Donc la contamination par des spores ne cause pas de dégâts immédiat mais constituent un grand danger potentiel de la dégradation.

Les moisissures puisent dans le substrat les aliments nécessaire à leur développement. Pour accomplir cette tâche, elles transforment et prédigèrent, les aliments complexes qui les entourent en éléments plus simples, assimilables et transférables à travers leur paroi. Cette digestion s'effectue par production et émission d'enzymes (cellulases, lignonases, pectinases ect...) ou d'acides. Mais ce mode de digestion d'un coté est bénéfique pour la cellule fongique et d'un autre coté est néfaste pour le support, s'il s'agit d'un aliment, ce dernier sera avarié ou chargé de toxines.

3- Croissance et développement :

L'appareil végétatif des moisissures est composé de filaments appelés hyphes dans l'ensemble constitué le mycélium ; ce dernier est parfois visibles sous forme de petites taches colorées à la surface du substrat moisi.

Les hyphes contiennent dans chaque compartiment un noyau, des mitochondries, des ribosomes, un appareil de Golgi et des vésicules qui sont souvent dérivées de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique qui apportent des hydrolases et des synthèses nécessaires à la croissance en longueur de hyphe l'accumulation apicale des vésicules implique une circulation acropète du contenu cytoplasmique

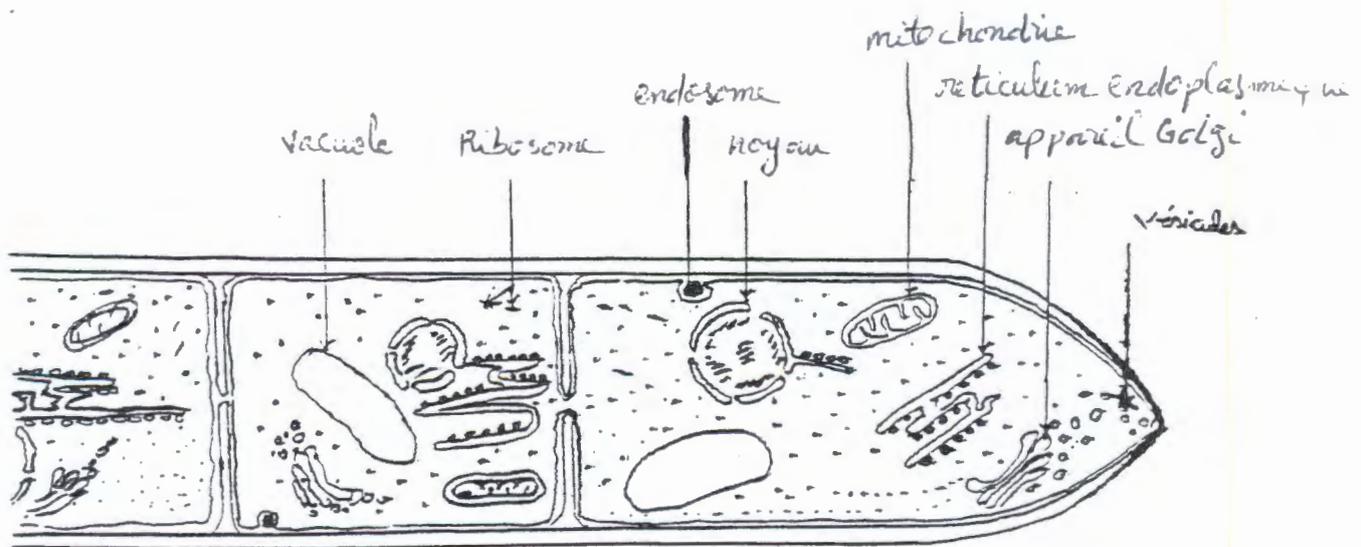


Figure N°1 : ultra structure de l'apex d'un hyphe en plein croissance . [7]

Les produits du métabolisme secondaire sont stockés en région sub apicale, les plus connus de ces métabolites pigments ; les antibiotiques, les mycotosines.....

Cependant, la croissance d'un champignon suit les mêmes étapes de la cinétique de croissance d'un microorganisme à savoir, phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire et la phase de déclin, on peut estimer la croissance d'une moisissure par la détermination de l'unité de croissance d'une hyphe qui est le rapport entre le longueur totale du mycélium et le nombre totale de branche, ce rapport augmente de façon exponentielle lors de la germination et se stabilise ensuite pour donner une courbe caractéristique pour une souche donnée.

4- La reproduction :

Après un certain temps de développement, les moisissures comme tous les champignons et autres êtres vivants, doivent se reproduire, puis se propager pour aller coloniser d'autres substrats.

*Elles se multiplient par des spores, minuscules vivantes d'origine sexuée et/ ou asexuée. Ce sont des cellules des hydratées au métabolisme réduit, entourées de parois protectrices épaisses qui les isolent du milieu ambiant. Elles sont produits en très grand nombres, elles peuvent survivre très long temps. C'est sous cette forme qu'elles sont dispersées puis se déposent sur des supports nouveaux, lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, elles germent, comme des grains et redonnent du mycélium qui produit à son tour, des spores .figure 2

*Elles se multiplient par un cloison transversale de mycélium lui même , qui produite des spores selon des processus plus ou moins différencies, elles peuvent étre solitaires ou groupées en chaînes. [10]

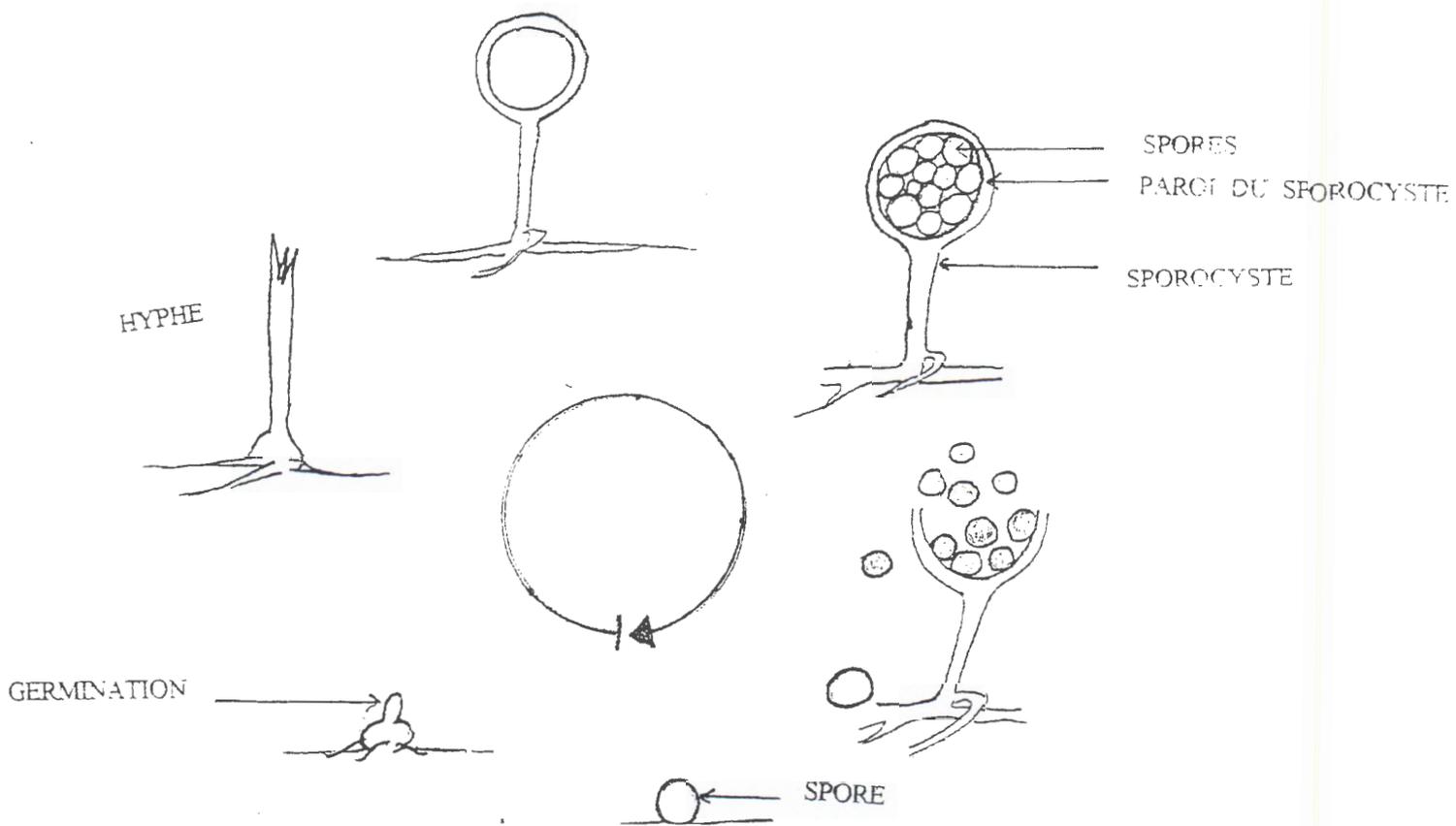


FIG 8 : LA REPRODUCTION PAR SPORES . [16] ,

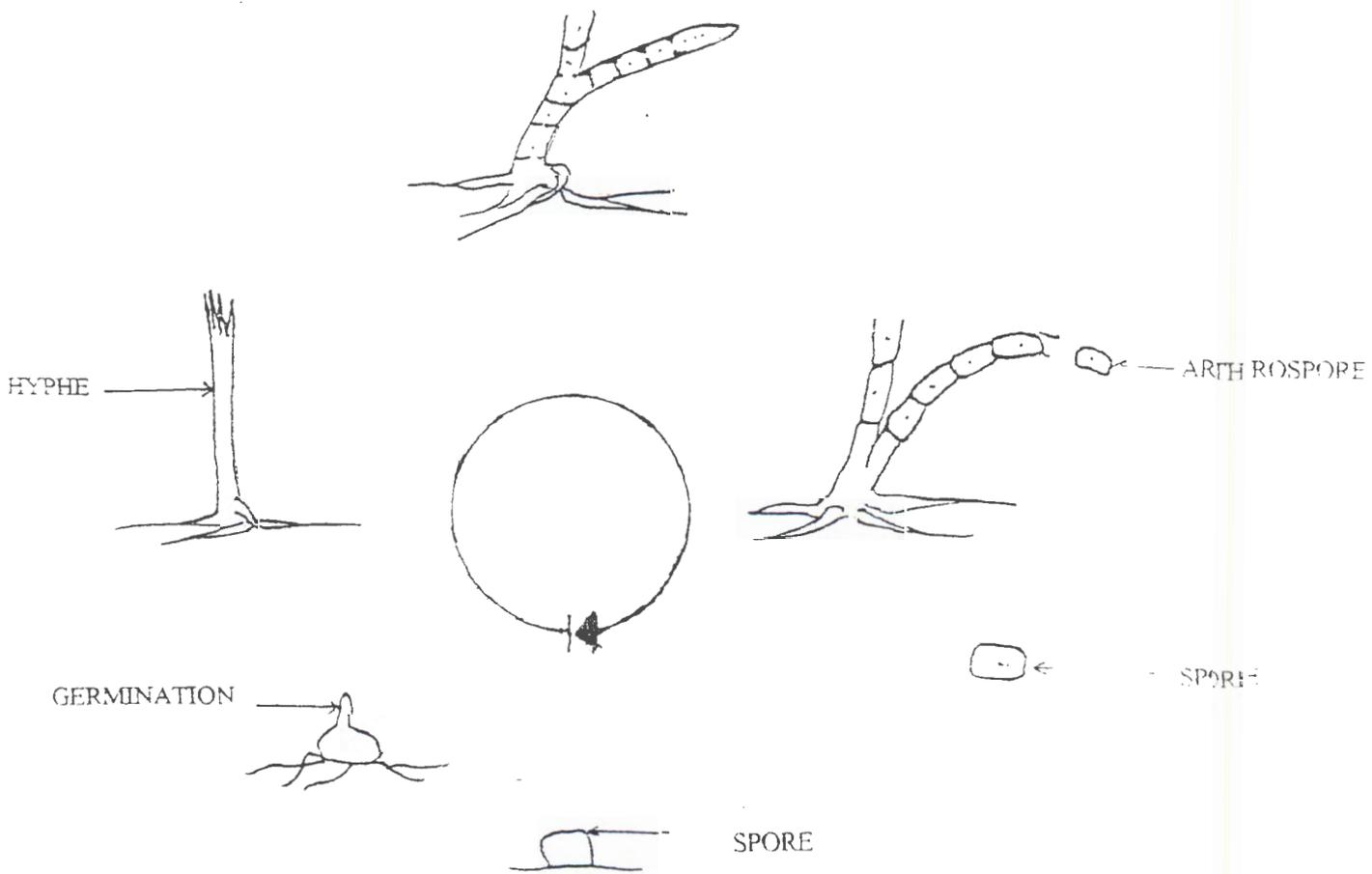


FIG 3 LA REPRODUCTION CLOISONNEMENT DE MYCELIUM

5- Classification des moisissures :

5-1 Les zygomycètes :

ce groupe se divise en deux ordres :

a- Mucorales :

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

La reproduction asexuée s'effectue au moyen de spores immobiles formées généralement en grand nombre dans des sporocystes pourvus à l'intérieur d'une vésicule centrale ou columelle prolongeant le sporocystophore (*absidia*, *mucor*, *rhizopus*), lui-même parfois renflé en apophyse sous le sporocyste (*absidia*, *rhizopus*) figure 4

Selon les espèces, les sporocystophores présentent 4 modes de ramification : monopodique, sympodique, homothallique, verticillé. figure 4

La reproduction sexuée, homothallique ou hétérothallique, fait intervenir une fusion de deux gaméthocystes. Elle aboutit à la formation de zygospores à paroi épaisse, souvent ornée et de couleur foncée, portées par deux suspensions.

Quatre genres : *absidia*, *mucor*, et *rhizopus* incluent la plupart des espèces de mucorales isolées des denrées alimentaires.

b- Entomophthorales :

Champignons saprophytes ou le plus souvent parasites d'insectes .

Entomophthora muscae se développe sur les mouches mortes.

Entomophthora virulenta, pathogène pour les hémiptères . [7]

5-2 Les ascomycètes :

Ces champignons, à thalle filamenteux septés ou levuroïdes, présentent une structure caractéristique appelée asque, qui est un sporocyste formé au cours de la reproduction sexuée. Il peut être globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme, avec une paroi simple ou doublée, la morphologie des ascospores, extrêmement variée, elles peuvent être :

- hyaline, vivement colorées, brun plus ou moins foncé.
- Globuleuses, elliptiques, cylindrique, vermiculaires.
- Unicellulaires ; cloisonnées transversalement et longitudinalement.
- Lisses ou ornées.

Les asques sont le plus souvent produits en grand nombre dans des fructifications appelées ascocarpes dont on peut distinguer trois catégories :

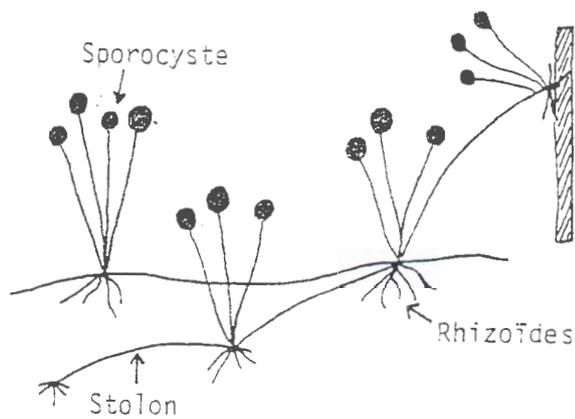
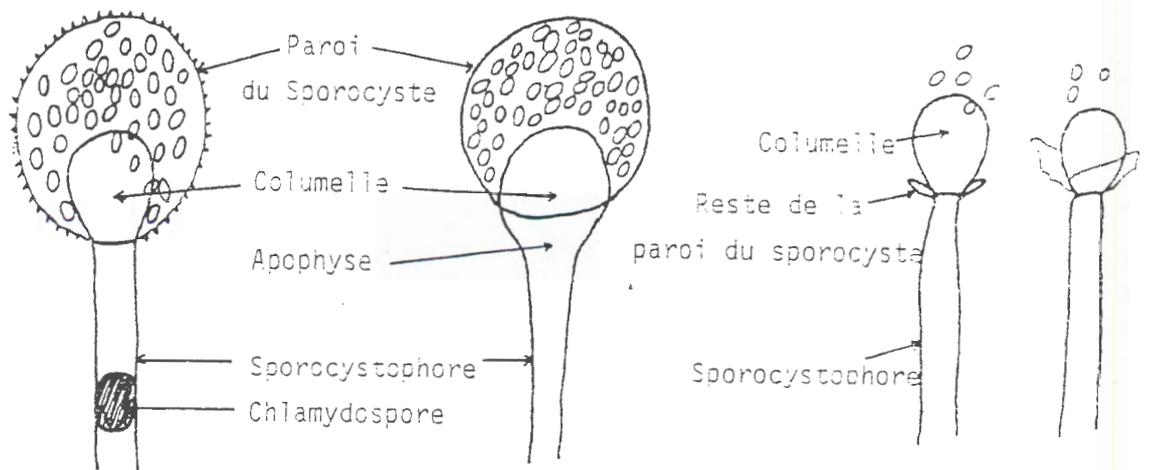
Les cléistothèques ; les périthèces ; les apothécies. Figure 5 [8]

à côté de cette forme sexuée exogène, beaucoup d'ascomycètes se reproduisent par multiplication asexuée (conidies), tel que *aspergillus* et *pénicillium*.

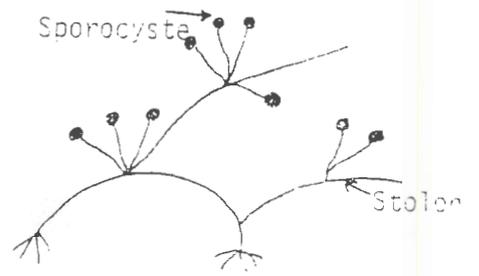
5-3 Les deuteromycetes :

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores ni basidiospores et qui se multiplient au moyen de conidies. Ils sont unicellulaires (levures) ou à thalle filamenteu septé. Les deuteromycètes se divisent en trois classes :

- Blastomycetes : levures avec ou sans pseudomycelium.
- Hyphomycetes : champignons aux filaments, stériles (agonomycetiles) ou produisent leur spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrèges (moniliales).
- Coelomycetes : conidies produites dans des pycnides (sphaeropsidales) ou dans les acervules (mélanconiales).figure 6. [7]



Genre RHIZOPUS



Genre ABSIDIA

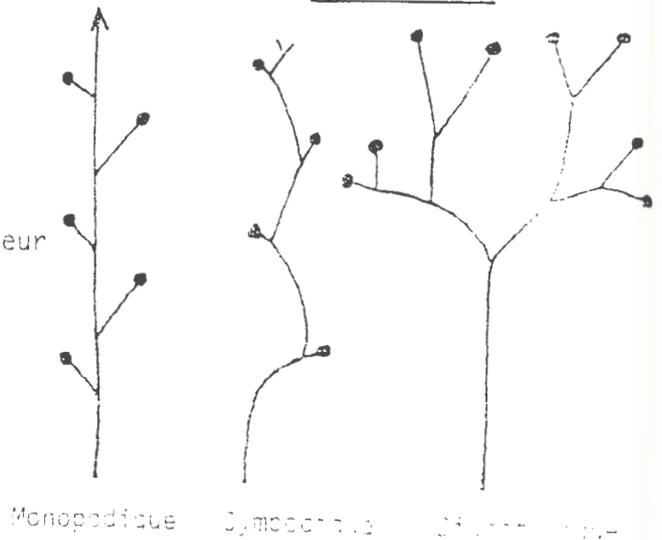
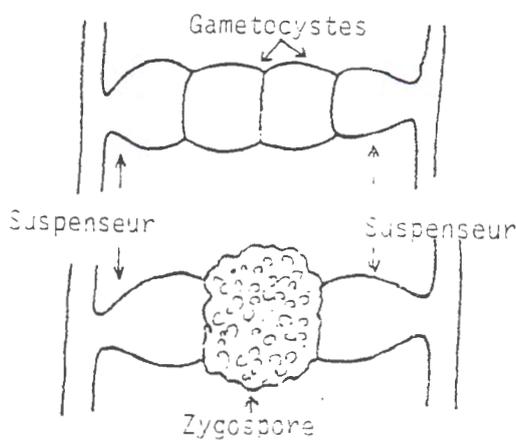


Fig 4 : Structures morphologiques des Mucorales.

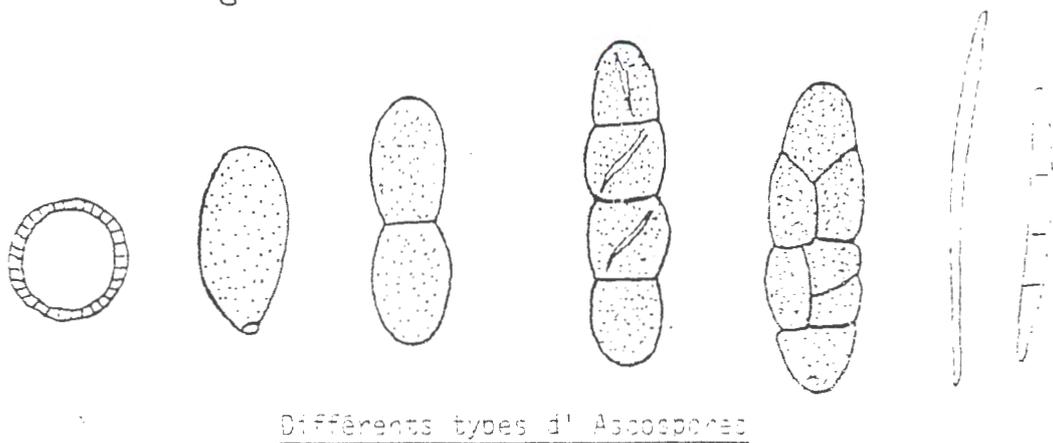
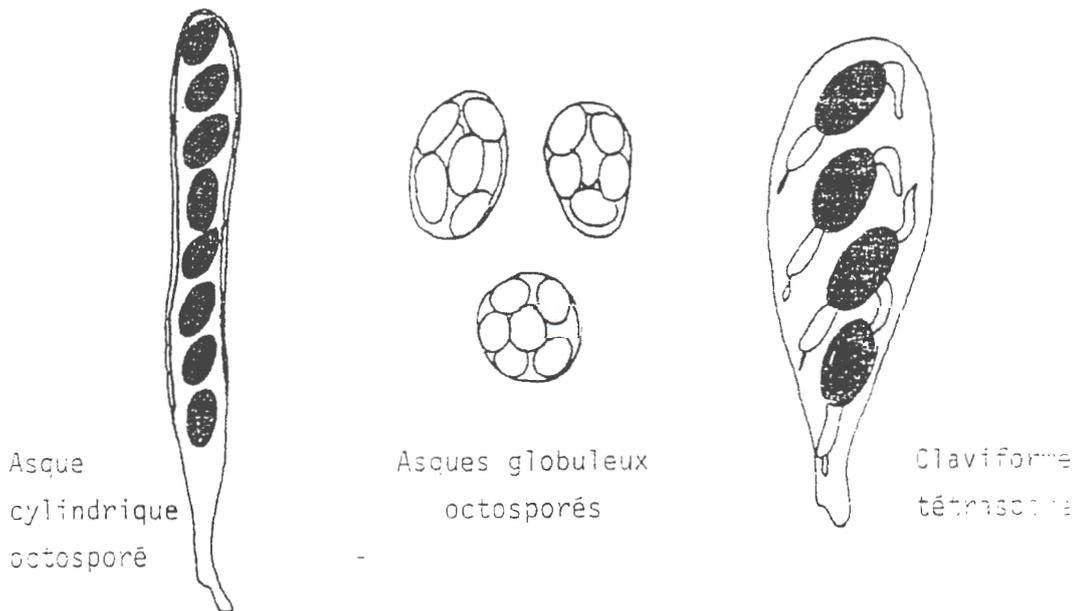
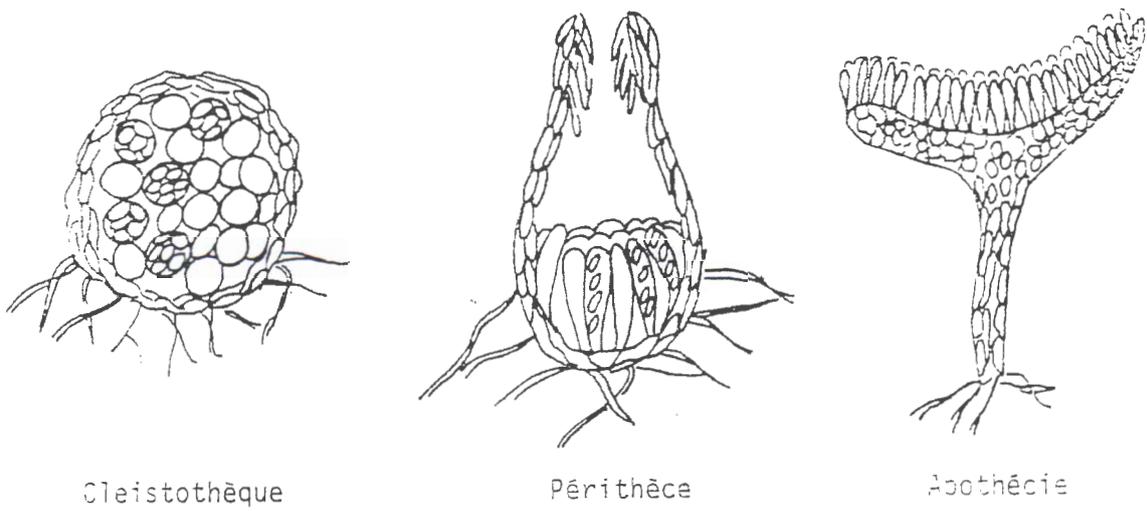
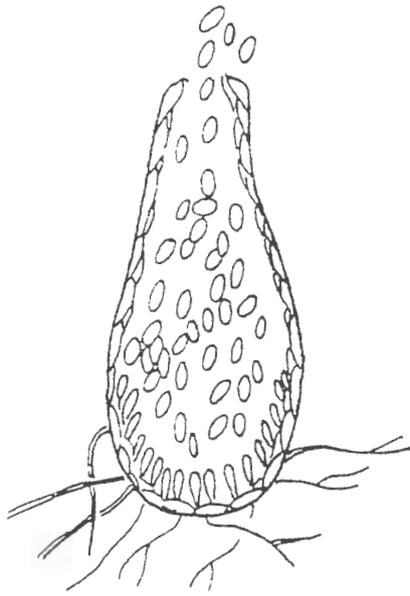
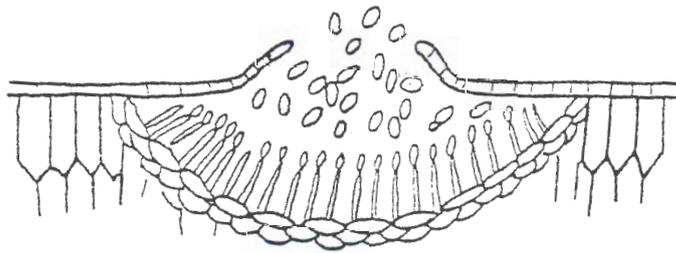


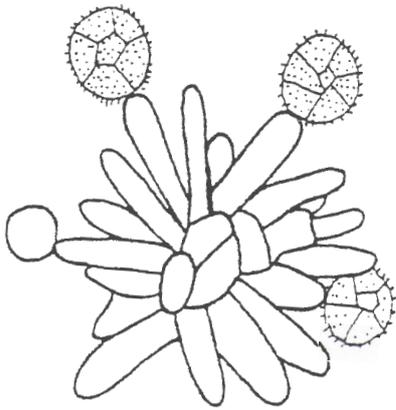
Fig 5 : Structures morphologiques des Ascomycètes .



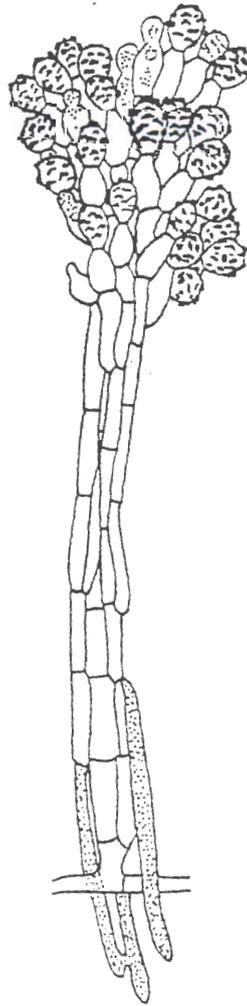
Pycnide



Acervule



Sporodochie



Corémie

Fig 6: Structures reproductrices des Deutéromycètes .

6- Conditions de pollution :

Bien que les moisissures soient relativement peu exigeantes, un certain nombre de facteurs ; nutritif et environnementaux, doivent- être réunis pour qu'il y'est un développement, les principaux facteurs de développement sont :

6-1- Eléments nutritifs :

Les plus importants sont le carbone et l'azote, utilisé sous forme de composés organiques et des ions minéraux (K,P, Mg) en quantités très faibles. Certains produits, les acides aminés par exemple, peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation tandis que d'autres tel que l'amidon, la cellulose, les protéines ..., doivent être transformés préalablement par le champignon avant d'être absorbés. Cette transformation nécessite, de la part de la moisissures un équipement enzymatique. Adapté, souvent caractéristique des espèces.[6]

Un *Trichoderma* par exemple degarde la cellulose tandis qu'un : *scopulariopsis* sera plus actif sur un support de nature protéique. De toutes façons les quantités nécessaire et suffisantes au développement des moisissures sont extrêmement faibles.

6-2 Température :

La plupart des champignons, surtout les moisissures, sont mésophiles c'est à dire qu'ils se développent autour de 20-25C° température moyenne habituelle des aires de stockage non climatisées sous les latitudes européennes, cependant il peut avoir des particularités pour certains espèces et c'est ainsi que l'on définit des températures cardinales que sont les température minimales optimales et maximales de croissance.

Tableau I: Température de croissance des moisissures . [3]

| | Mésophiles | Themophiles | Thermotolerants | Psychrophiles |
|---------|------------|-------------|-----------------|---------------|
| Maximum | <50C° | 50C° | 50C° | 20C° |
| Minimum | >0C° | 20C° | >0C° | <0C° |
| Optimal | 15.30C° | 35.40 | 15.40C° | 0.17C° |

6-3 Oxygène O2 :

Les champignons sont des organismes aérobies, cependant, certains tolèrent des quantités relativement faibles d'oxygène et peuvent même se développer en anarobiose avec production d'éthanol et d'acides organiques. Le métabolisme des champignons peut être modifié selon la teneur en oxygène environnement ; par

exemple : la production de mycotoxine (patuline et acide pencillique), décroît considérablement en conditions d'oxygénation faible. [15]

6-4 potentiel hydrogène pH :

Les champignons sont peu sensibles au pH du milieu, ils se développent entre 4,5 et 8 avec un optimum entre 5,5 et 7,5 certaines espèces *aspergillus niger* peuvent se développer jusqu'à 1,7 et 2, cette faculté de se développer en milieu acide permet de les séparer des bactéries pour l'isolement . [15]

6.5 les facteurs de l'environnement :

A la différence des substances nutritifs qui sont toujours beaucoup plus abondantes que ne le nécessite le développement des moisissures , les facteurs physiques de l'environnement (humidité, température oxygène) constituent un élément déterminant pour son initiation, parmi ceux-ci le plus important est l'humidité ; car il a été montré qu'il existe une grande corrélation entre l'humidité du milieu et le développement des moisissures. [11]

On point d'équilibre à la surface de ce dernier ou pourra se développer la moisissure (pour les aliments, cette valeur est définie comme l'activité de l'eau ou a_w , elle est approximativement inverse de l'humidité relation) l'humidité relative minimum pour que commencent à se développer certains moisissures peu nombreuses, dites xérophiles, est de 65-70% (*eurotinium - aspergillus* du groupes *glaucus*). Au fur et à mesure que l'humidité augmente ils s'installent des moisissures différentes, de plus en plus nombreuses vers 80-90%. Ainsi selon l'espèce identifiée sur un substrat on peut approximativement définir l'humidité relative de celui-ci la seul façon d'éviter le développement de contaminant fongiques est donc bien de maintenir une hygrométrie faible dans l'environnement.



CHAPITRE II

LES MYCOTOXINES

Chapitre II : Métabolites secondaires :

Le champignon durant sa croissance active, il produit des métabolites primaires qui sont indispensables à la croissance du mycélium, cependant quand le champignon se trouve dans les conditions de croissance défavorable, les molécules du métabolisme secondaire vont être converties en des molécules plus complexes qui constituent les produits du métabolisme secondaire, ces derniers peuvent être des toxines, antibiotiques, arômes, etc.....

1- Antibiotiques :

1-1 **Pénicillines** : les pénicillines naturelles sont produites par *penicillium chrysogenum*. Les rendements actuels sont supérieurs, les *penicillium* sont capables de synthétiser également cette molécule mais sans atteindre les résultats obtenus avec les pénicillines.

1-2 **Céphalosporines** : industriellement, la céphalosporine est produite par *cephalosporium acremonium*.

1-3 **Griséofulvine** : la griséofulvine est active surtout contre les dermatophytes. Elle est produite par *penicillium griséofulvum*

1-4 **Acide fusidique** : l'acide fusidique est active contre diverses bactéries gram⁺ l'organisme producteur est *fusidium coccineum*.

1-5 **Fumagilline** : cet amoebicide est synthétisé par certaines souches de *penicillium jenseni* et de *penicillium nigricans*

1-6 **Siccantine** : l'utilisation de cet antifongique, produit par *helminthosporium siccans* se rencontre principalement sur dermatomyces animales.

1-7 **Variotine** : la variotine est un dérivé d'acides gras. Cet antifongique est produit par *paecilomyces variotti*.

1-8 **Acide aspergillique** : cet antibiotique ; actif contre les bactéries gram⁺. est synthétisé par produit par *aspergillus flavus*.

2- Les arômes :

Plusieurs moisissures tel que *penicillium roquefortii*, *ceratocystis moniliformis*.

3- Mycotoxines :

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire, élaborés par une grande variété de moisissures, se développent sur différents types d'aliments bruts (céréales, fruits) ou transformés, et dans des situations écologiques très diverses, elles constituent un groupe de substances toxiques présentant notamment des activités mutagènes, cancérogènes, tératogènes, immunotoxiques, et estrogènes, elles affectent les animaux d'élevage consommant les aliments bruts contaminés, du fait de leur transfert dans la chaîne alimentaire, et de leur grande stabilité thermique ; elles constituent un danger pour la santé de l'homme. Des

études épidémiologiques attestent d'un risque élevé pour certaines populations particulièrement exposés. [4]

3-1 Classification : il y a 7 classes des mycotoxines selon leur importance :

3-1-1 Aflatoxines :

Produites par différentes espèces d'*aspergillus* lors de conditions postrecolte défectueuses, mais également durant la croissance des végétaux ; les arachides, les grains de coton ; les céréales, les noix (coprah, pistaches) et certains figues, sont particulièrement affectés ; ces mycotoxines possèdent une activité mutagène et cancérigène chez l'homme (foie).

Ces toxines existent sous forme de mélanges des aflatoxines : B₁, B₂, G₁ et G₂, parmi ces molécules : L'aflatoxine B₁ est la plus cancérigène, l'aflatoxine M₁ (M₁ métabolite de B₁) et G₁ sont aussi cancérigènes mais, avec une faible potentialité. [2]

3-1-2 Ochrotioxine :

Elle est produite par certaines espèces de *penicillium* sous les climats tempérés et froids : les céréales et les produits dérivés constituent le principal vecteur (50%) ; des abats ; principalement, du porc, constituant une autre source de contamination ; il s'agit d'une substance mutagène et cancérigène pour l'homme.

3-1-3 Patuline :

Cette substance est découverte en 1940 chez *aspergillus*, *penicillium* e, particulier *aspergillus clavatus* et *penicillium 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 cancérigénicité chez l'animal, on peut aussi considérer la patuline comme anti bactérie gram positif négatif. [3]

3-1-4 fumonisines :

Ce groupe de mycotoxine récemment caractérisé chez quelques espèces de *FUSARIUM* infectant les cultures de céréales dans des conditions climatiques particulières ; la fumonisine B₁ est la plus abondante dans les aliments dérivés 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 animales ; elle produit une large gamme d'effets toxiques chez l'animal (en céphalite 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 certains cancers (œsophage en Afrique du sud, foie en Chine) les fumonisines sont classées cancérigènes potentiels pour l'homme.

3-1-5 Zéaralenone :

est une mycotoxine produit par le 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 desordres chez le porc et le mouton, associés a ses propriétés est ergonomique. Le transfert dans le lait est négligeable, de même que la présence dans la viande ou les œufs.

3-1-6 Trichotécènes :

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). Il sont retrouvés dans une proportion importante (50%) de grains; le trichotécènes ont été a l'origine d'empoisonnements graves d'animaux et d'hommes.

3-1-7 Cetrinine

C'est un produit de métabolisme pour *pénicillium* et *aspergillus* on particulier *pénicillium citrinum* infectant le riz et l'orge moisi.[3]

3-2 : La nature et la propriété chimique des mycotoxine :

3-2-1 L'aflatoxine :

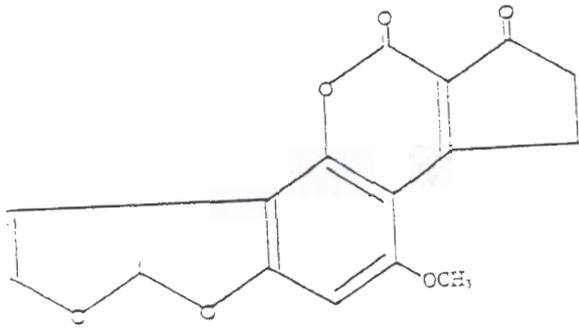
Bien que 17 composés tous dénommés aflatoxines, aient été isolés, les terme « aflatoxines » s'entend usuellement de 4 composés B₁, B₂, G₁, G₂ les aflatoxines sont des dérivés de Di-furano – coumarine, ils se distinguent les uns des autres par la couleur de leur fluorescence.

Les aflatoxines sont très solubles dans les solvants modérément polaires comme chloroforme, méthanol et surtout di-méthyl-sulfoxy (leur hydrosolubilité va de 10 à 20 mg/l) et non solubles dans l'eau.

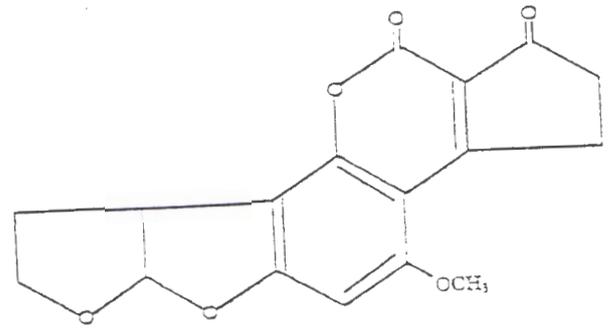
Exposées à un rayonnement ultra- violet dans la région des grandes longueurs d'ondes, l'aflatoxine B sont bleus et l'aflatoxine G sont vert , le maximum des spectre d'absorption des rayonnement est de 223 nm pour aflatoxine G₂. [12]

a 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 chloroformiques et benzéniques se conservent pendant des années.

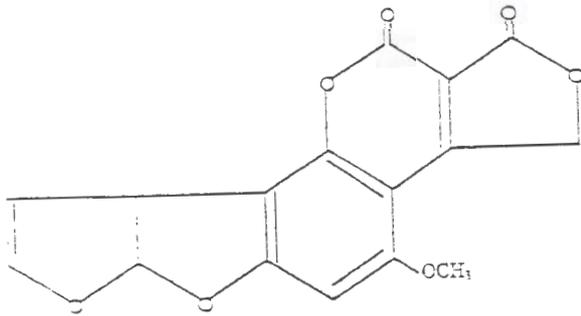
Les aflatoxines M₁ et M₂ sont métabolites hydroxylés des B₁, B₂ , et les aflatoxines B₂, G₂ sont des dérivés dihydro des substances mères.[5]



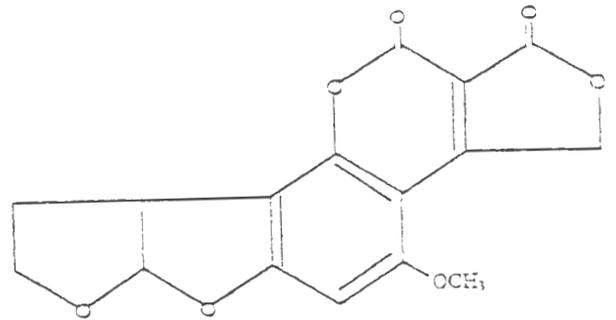
Aflatoxine B₁



Aflatoxine B₂



Aflatoxine G₁



Aflatoxine G₂

Fig 4 LA STRUCTURE CHIMIQUE DES AFLATOXINES ()

3-2-2 Ochratoxine :

On sait que l'ochratoxine produite par *pénicillium viridicatum*.

L'ochratoxine posséd deux noyau phenyle alanine et iso coumarine ; 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, sel de l'ochratoxine est dilué dans l'eau, et par l'hydrolyse acide, et donne phenyl alanine et acide l'actique. Lumineusement est efficace, c'est l'ochratoxine. L'achratoxine contenir une chaone de sept dérivé de iso coumarinique liée à un groupe d'amine : L.B phenyl- alanine. [13]

- Ochratoxine A : $R = H$
 $R' = Cl$
- Ochratoxine B : $R = H$
 $R' = H$
- Ochratoxine α : $R = C_2H_5$
 $R' = Cl$
- Ester methylique de l'Ochratoxine A : $R = CH_3$
 $R' = Cl$
- Ester Methylique de l'Ochratoxine B : $R = CH_3, OHC_2H_5$
 $R' = H$

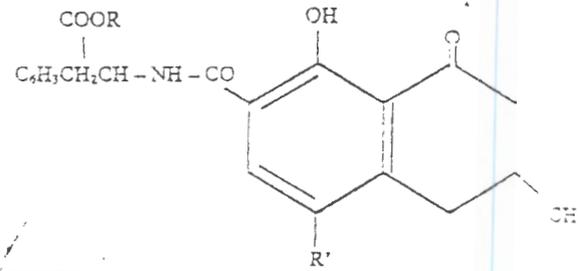
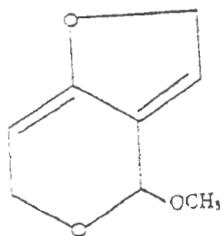
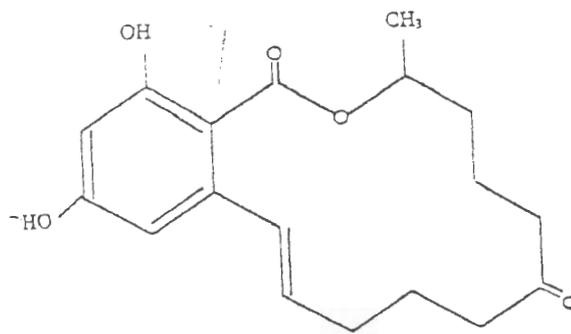


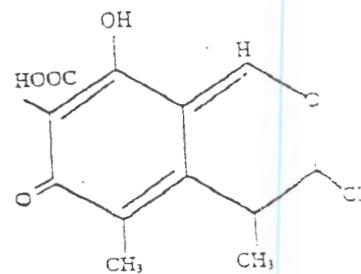
Fig8: LA STRUCTURE CHIMIQUE DES OCHRATOXINES (8)



Patuline



Zéaralinone



Citrinine

Fig9: LA STRUCTURE CHIMIQUE DES AUTRES MYCOTOXINES (8)

3- -3 Aspects pathologiques des mycotoxines :

Les mycotoxines sont des polluant dans les denrées alimentaires, ce sont des composés chimiques d'origine fongiques, possédant des effets toxiques sur l'homme, l'animal et les plantes.

On classe les effets toxiques des mycotoxines en trois classes ; effets mutagènes ; effets cancérogène ; effets tératogènes.

Le tableau suivant nous donne les différents types de mycotoxines et les moisissures responsables de leur production.[1]

Tableau N°II : Récapitulation des mycotoxines produites pas les moisissures : [8]

| Mycotoxines | Moisissures responsables | Substrat habituel | Syndromes caractéristique |
|---------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Evgotamine | Claviceps puspurea | Seigle | Gangrene des extremités |
| Aflatoxines | Aspergillus flavus | Arachides | Syndromes hépatique |
| | a. parasiticus | Céréales | Hepatomes |
| Ochratoxines | a.ochraceus | Maïs , orge | Syndrome hepato et néphoratoxique |
| | Penicillium viridicatum | | |
| Zéaralenine | Fusarium graminearum | Maïs, foins, aliments | Syndromes oestrogeniques |
| Citrinine | Penicillium citrinum | Age ; seigle, avoine | Syndrome néphrétique |
| Patuline | p. clavatus | Pomme , sol | Syndrome cutané |
| | p. expansum | Fus de pomme | Cancérigène |
| | p. polulum | Blé , paille | |
| Sporidesmine | p. thomyces chartarum | Herbe | Eczena par photosensibilisation |
| Trichothécéne | Fusarium tricinctum | Cereals | Leucopenie |

3-4 Métabolisme des mycotoxines :

3-4-1 métabolisme d'aflatoxine :

Durant le passage d'aflatoxine B₁ dans le tube digestive, elle sera dirigée principalement vers le foie ou elle subit des transformations métaboliques cette observation a été confirmée par des essais qui appliqués sur les animaux (souris, porcs) et qui ont soumise sous un régime alimentaires spéciale contenant des mycotoxines.

Ce métabolite est il susceptible d'être toxique par conjugaison avec les acides tauricholique glucuronique avant d'être excrété dans la bile ou dans l'urine, a cet égard deux métabolites récemment découverts l'aflatoxine p₁ et l'aflatoxine q₁. [5]

La conversion ou niveau du foie de l'aflatoxine B₁ contrairement aux autres bio. transformations que catalysent des enzymes microsomiales du foie, elle exige l'intervention d'une des hydrogenase cytoplasmique NADH, dépendante de plus, la formation d'aflatoxical peut être inhibée par des hormones génitales 17 céto-steroides.

Les homogénayts hépatiques de certaines espèces d'oiseaux et de mangeurs sont des agents aflatoxines G₁ en leurs dérivés hydroxy -2 et dihydro-2-3, on hémiaacetals.

A également dénommée aflatoxines B_{2a} et G_{2a} ces métabolites se lient forment aux proteines et après formation in vivo, sont protablement assez reactifs pour induire les effets aigus de l'intoxication aflatoxinique [14] jusqu'à présent, seuls ont été observés des signes indirects de la formation des epoxydes aflatoxines B₁ et aflatoxins mais il s'agit probablement de la forme la plus importante d'activation métabolique, par incubation de l'une ou l'autre des toxines mères avec les micronomes hépatique de nombreuses espèces animales, y compris l'homme, il se forme un métabolite dont l'existence paraît éphémère, qui est fortement réactif, s'associe à l'ADN par covalence et induit une mutation bactérienne dans un second système d'épreuve in vitro. [20]

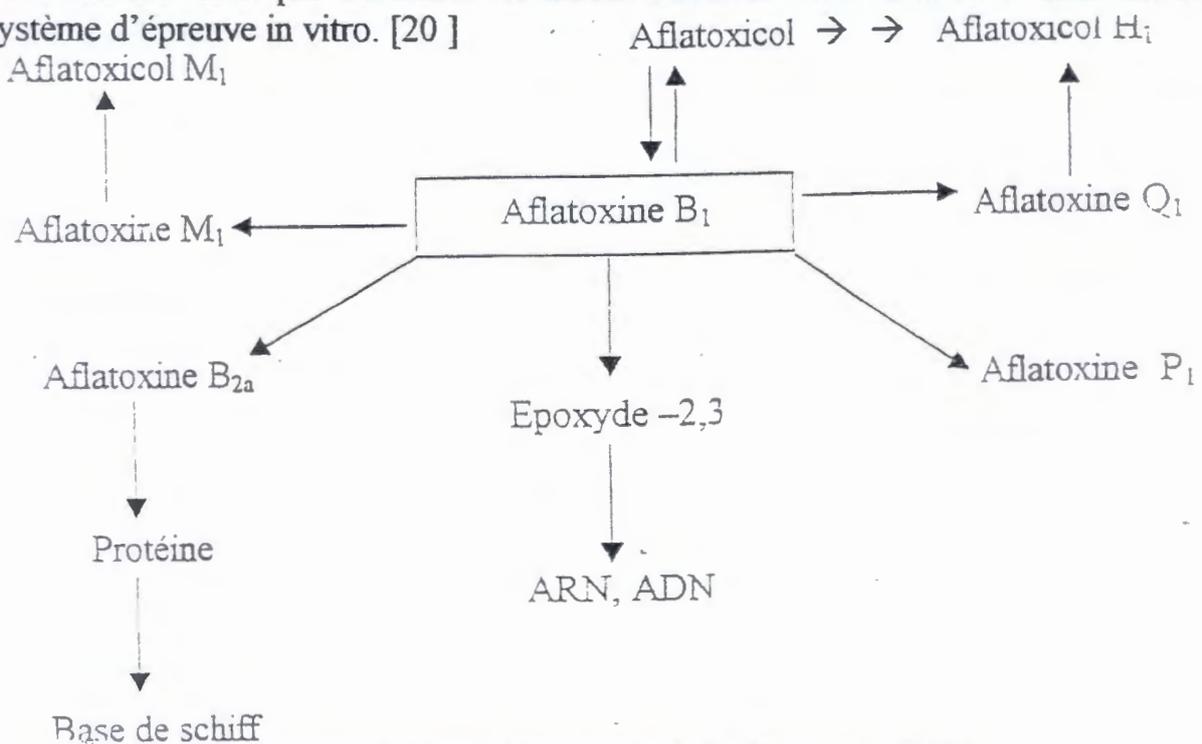


Fig 10 : métabolisme hépatique de l'aflatoxine B₁ [5]

3-4-2 Métabolisme des ochratoxines :

Dans une étude menée sur des rats exposés par gavage à une dose unique d'ochratoxine A de 10mg/kg p.c [gallier 1974] a trouvé que la concentration d'ochratoxine A inaltérée était maximale dans la paroi gastrique pendant les 4 premières heures suivant d'administration.

L'intestin grêle les gros intestin et le caecum contenaient des faibles doses principalement au niveau de l'estomac. Dans le caecum et le gros intestin n'en ont été décelées que, de petites quantités (1. 3% de la dose totale) sous forme de la fraction isocoumarinique (ochratoxine α) ; très probablement par suite de l'action hydrolysante de la microflore intestinale. [14]

Menant des études invitro, [Pitout 1969] a montré que l'ochratoxine α peut également résulter de l'hydrolyse de l'ochratoxine A par la carboxy peptidase A et l' α - chymotrypsine.

Les concentration maximales ayant été observées (jusqu'à 67 ~~ng~~g) dans des tissus rénaux, au cours d'études expérimentales sur des porcs dont la nourriture était additionnée d'ochratoxine A, des résidus ont été de dosés dans 4 tissus analysés, en concentration décroissante ; dans l'ordre suivante : tissu rénal , hépatique, musculaire , adipeux.

Des études faites in vitro ont montre que l'ochratoxine A. se lie à l'albumine, sérique [chu 1971]. Cette liaison a été également onservée au cours d'études menées in vivo sur des rats. [20]

De l'ochratoxine à été décelée dans l'urine et ces fêces des rats aux quels avait été injectée par vois intra-peritone de l'ochratoxine , ce qui montre que dans ces conditions, l'ochratoxine A se scinde en ochratoxine α et phénylalanine. Des études menées au moyen d'ochratoxine A marquée au ^{14}C ont montré que dans l'organisme se forment également d'autres métabolites, mais ceux-ci n'ont pas encore été identifiés.

4 Méthodes de recherche et dosage des mycotoxines :

4-1 RIDA Biopharm :

purification par immuno-affinité des aflatoxines, l'extraction est réalisé par méthanol/ eau (80/20) ou chloroforme ou acétonitrite/ eau. La purification est faite sur colonne avec gel + anticorps monoclonaux et l'élution par le méthanol (qui dénature les anticorps). [18]

4-2 Immudot screen cup aflatoxine (idosc) :

existe pour les aflatoxines B₁, B₂ et G₁ il est réalisé sur filtre par compétition. On utilise une toxine marquée par la perxydase (HRP). La sensibilité est de 20ng/g. le test agriscreen aflatoxine B₁ (neogen) permet le dosage de ce composé en tube par compétition. Les cartes easycreen pour les aflatoxines ; l'ochratoxine ; la toxine T₂ ; la zéaralénone (Rp diag : Rhône poulenc) permettent la détection qualitative de mycotoxines et d'antibiotiques à l'aide de microplaque et d'une technique « sand wich ». [18]

3 chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

le principe de l'HPLC se résume comme suite on prend un l'échantillon de 30 kg 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 minutes pour obtenir un mélange homogène. Et l'analyse se fait sur le pistache et on extrait 63.5g 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-affinité se fait avant la neutralisation par LHPC.

Actuellement l'HPLC est très utile dans le dosage de nombreuses mycotoxines (aflatoxine, patuline, ochratoxines, zéaralénone, streigmatocystine).[4]

4 la chromatographie phase gazeuse C.P.G :

Le dosage de certains mycotoxines telle que la zéaralénone par C.P.G à également fait l'objet de très nombreuses recherches, la sensibilité de détection est de l'ordre de 5 à 10 ug/kg. [4]

5 la chromatographie sur couche mince CCM :

A l'heure actuelle la CCM est la plus employée, car elle peut dans certains cas apporter une amélioration au niveau de la séparation et ainsi augmenter la sensibilité de la détection, c'est la méthode qu'on a utilisé pour la réalisation de notre travail.

PARTIE
EXPERIMENTAL

Matériel et méthodes :

I – Matériel :

- Mortier en céramique
- Papier filtre
- Eporouvette graduée
- Agitateur magnétique
- Colonne 2,4cm x 40cm
- Entonnoir
- Pipette
- Erlen meyer
- Balance de précision
- Rotavapor
- Plaque de gel de silice (G25)
- Cuve pour ccm
- Lampe u.v à 365 nm

★ Solvants et sels

- Chloroforme
- Hexane
- Ether de pétrole
- Méthanol
- Acétone
- Sulfate
- Gel de silice
- Eau distillée

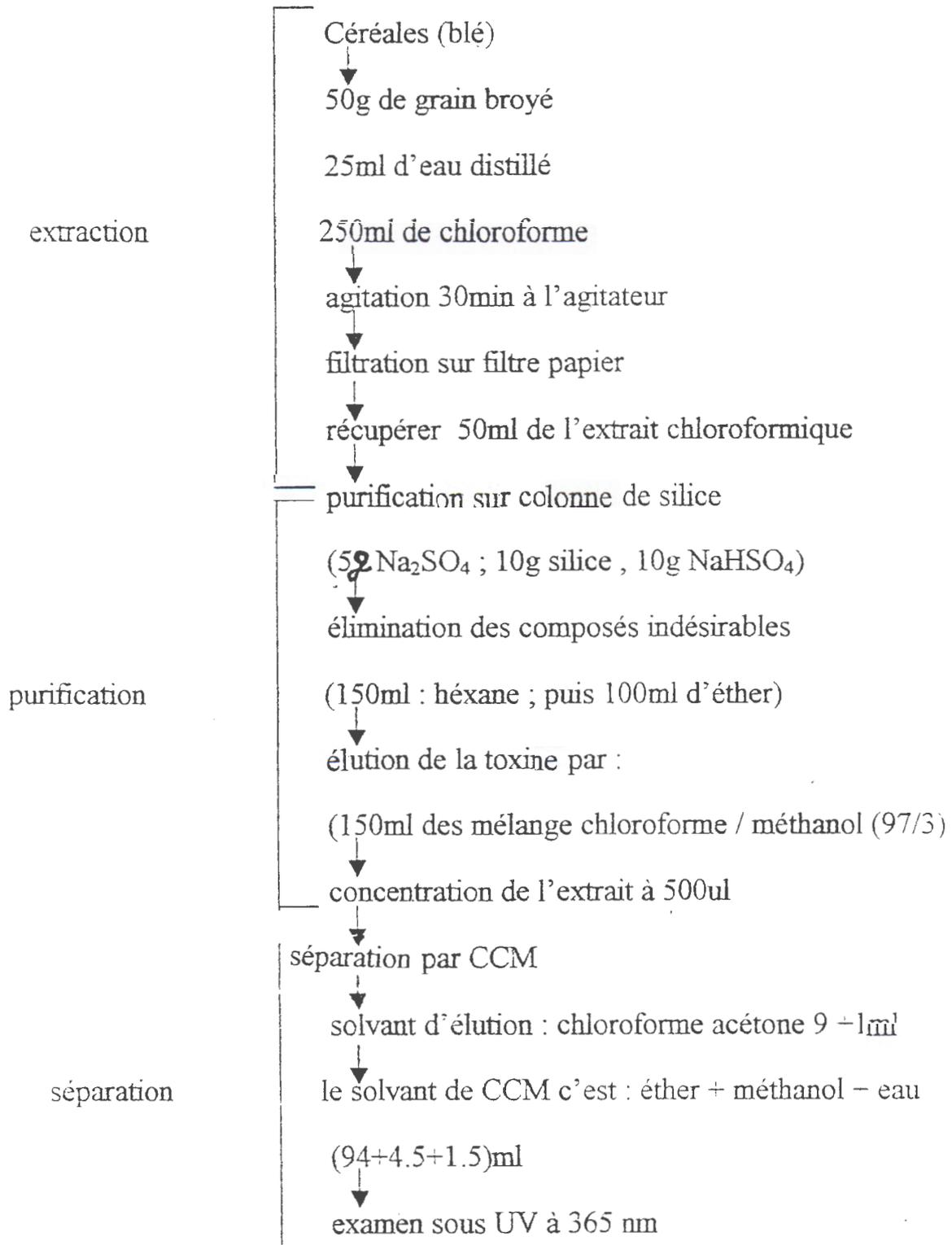


Schéma de la méthode de dosage des mycotoxines : 76/372/CEE

II- Méthodes :

- 1- **échantillonnage** : c'est une étape essentielle dans le dosage des mycotoxines compte tenu de la très forte hétérogénéité de répartition des toxines dans un lot de grains, notre échantillon est prélevé sur un lot de grains de blé importé au niveau du port DJEN DJEN .
- 2- **extraction** : les mycotoxines sont toutes solubles dans les solvants organiques tel que le méthanol, le chloroforme, dichlorométhane, l'acetonitrile , il est nécessaire de travailler en présence de l'eau sur du grain préalablement broyé, pour cela 50g de l'échantillon de blé moisi sont broyés par addition de 25ml d'eau distillée et on mélange pour obtenir une suspension homogène, on ajoute 250ml de chloroforme puis on agite pendant 30 minutes par un agitateur magnétique, puis on filtre le mélange, on met le filtrat dans une éprouvette graduée.
- 3- **Purification** : elles consiste à faire éliminer diverses impuretés , lipides, pigments et autres composés organiques extraites en même temps que les toxines ; par passage sur colonne de gel de silice correctement activés et hydratés il s'agit d'une colonne en verre 2.4cm x 40cm(fig11) rempli de chloroforme jusqu'à 20cm de hauteur on ajoute 5g de sulfate de sodium, d'un autre coté on fait la dissolution de 15g de gel de silice dans le chloroforme jusqu'à obtention d'une suspension transparente qu'on verse dans la colonne, on la laisse au repos pendant une heure, puis on ajoute 15g de Na_2SO_4 .

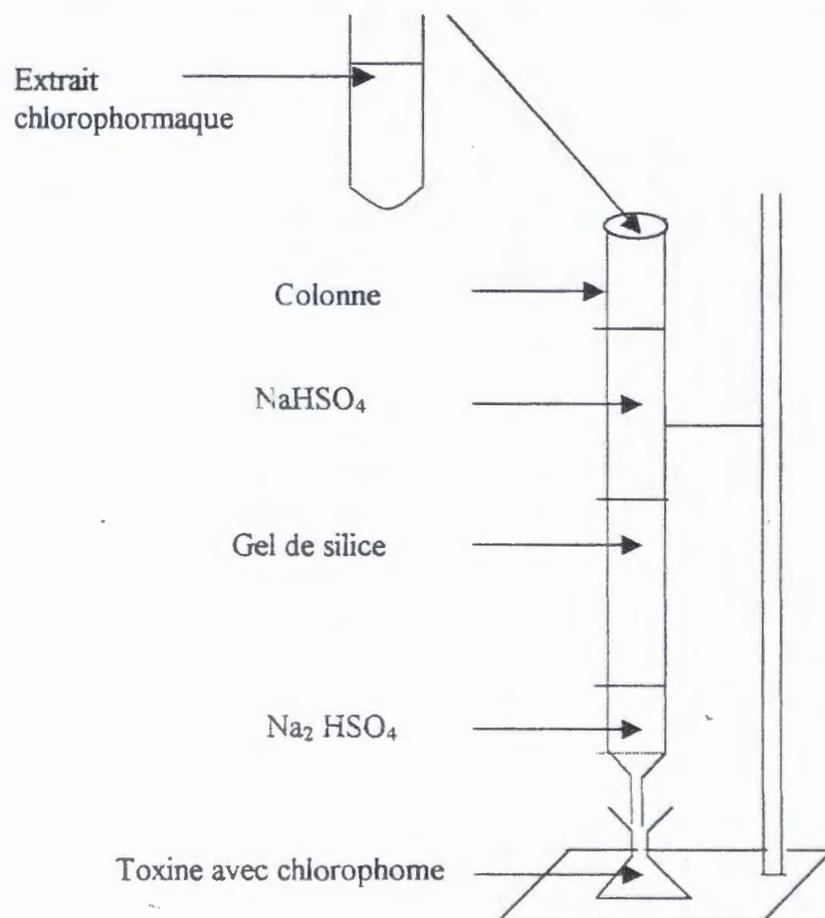


Fig11 : colonne de purification

Après on passe au lavage en faisant passer 100ml d'hexane et 100ml d'éther une fois la colonne est prête, on verse notre extrait 50ml d'extrait chloroformique + 150ml de mélange chloroforme / méthanol 97/3v/v après, l'extrait est concentré par évaporation, puis on ajoute un solvant d'éluion 10ml de chloroforme /acetone (9 +1).

4- **séparation** : la chromatographie sur couche mince (ccm) est la plus utilisée à l'heure actuelle.

La plaque qui contient des gouttes de l'extrait est plongée dans la cuve contenant ether- méthanol – eau (94+ 4.5+1.5)

La migration du solvant est terminée, la plaque est retirée et séchée, puis on passe à la révélation sous la lampe u.v à 365 nm.

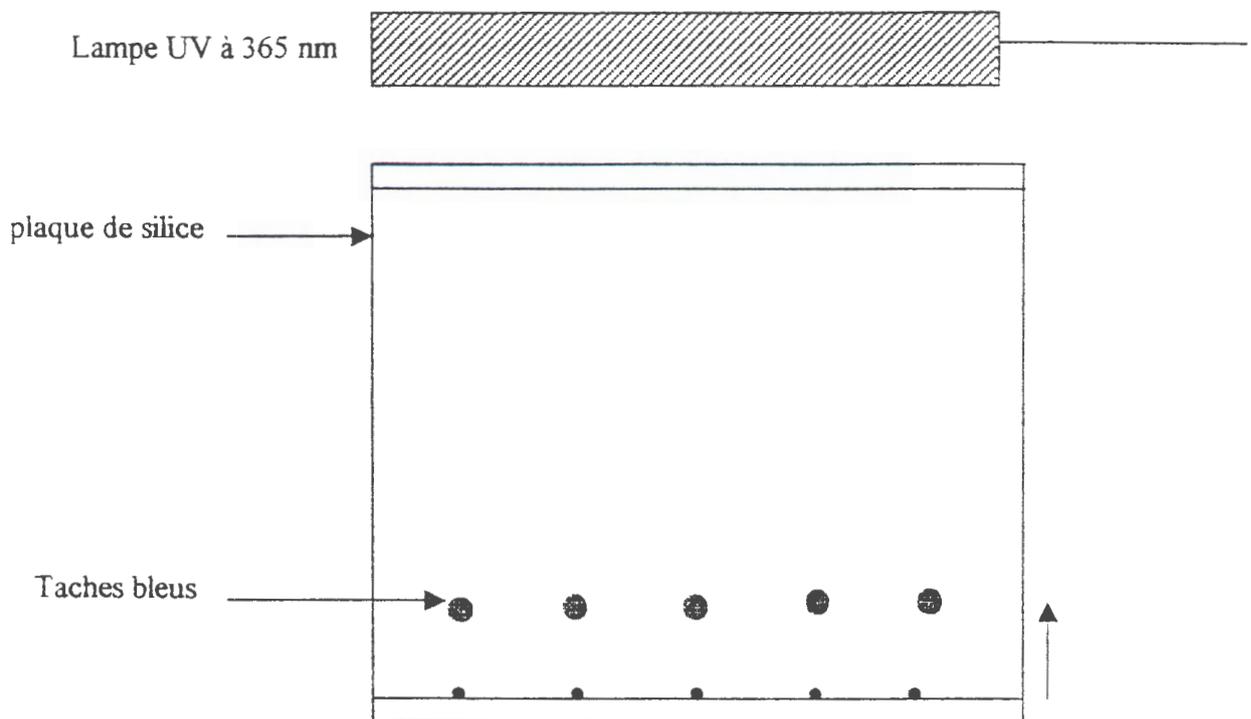


Fig12 :révélation sous UV à 365 nm

Résultats et discussion :

Parmi les familles et genres des moisissures cités en bibliographie certains ont une importance toute particulière en ce qui concerne les grains de blé et produits dérivés en raison des altérations qu'ils peuvent occasionner durant le stockage et les différents opérations de transformation.

Un genre regroupe toujours des espèces ayant des comportements écologiques différents et des exigences hydrothermiques particulières. a titre indicatif on définit par exemple des espèces thermophiles comme *aspergillus funigotus* ou *aspergillus candidus* dont la mise en évidence est très souvent caractéristique de grains ayant subi un échauffement important au stockage, avec tout ce que cela suppose au niveau des qualités technologiques des produits.

Nous tenons de souligner, que l'interprétation qualitative des résultats obtenus est très délicate, car un lot pouvant être entièrement mais faiblement contaminé par une espèce, ce qui sera sans conséquence technologique, alors qu'un autre ne contenant que quelques grains contaminés mais cette fois de manière très intense pourra être d'une qualité très médiocre. Dans notre cas nous avons analysé un échantillon prélevé sur un lot de grain moisie après l'extraction, purification et révélation sous la lampe UV à 365 nm. On a des taches bleues qui indique selon des auteurs la présence d'aflatoxine ; ensuite la pulvérisation d'un mélange méthanol / acide sulfurique 50/25 sur la plaque, la coloration bleu vire au jaune ce qui confirme la présence d'aflatoxine B₁. Par ailleurs, il est nécessaire d'utiliser une solution étalon chose qu'on *pas fait car* n'a vous pu avoir cette solution.

Il s'agit bien la d'un essai de recherche des mycotoxines dans les grains de blé, les résultats obtenus sont intéressants pour élargir cette méthode de dosage sur un lot important, il convient de donner une grande importance à l'étape d'échantillonnage. Compte-tenu de la très forte hétérogénéité de répartition des toxines dans un lot de grains.



Conclusion générale :

Actuellement et conformément aux règles de l'économie du marché ou la concurrence et la qualité du produit sont les facteurs essentiels de réussite, la sauvegarde et la préservation de la qualité d'un produit alimentaire nécessite beaucoup de vigilance à tout les niveaux de production à cause des multiples risques aux quels est exposé la santé du consommateur.

Cependant, la recherche des mycotoxines dans un produit de première nécessité tels que les céréales, présente beaucoup d'intérêts car : d'une part, il s'agit d'un produit difficile à désinfecter ou a ennobli et il est soumis à diverses manutentions et stockages ; d'autre part c'est un produit de large consommation en cas d'intoxication, la maîtrise de la situation est difficile.

D'après notre recherche bibliographique, les microorganismes susceptibles de provoquer des problèmes de toxicité dans les grains de blé et produits dérivés sont des moisissures des genres *aspergillus* et *penicillium* qui constituent essentiellement la mycoflore de stockage, par leur tolérance des humidités faibles les mycotoxines produites par ces moisissures sont essentiellement les aflatoxines ; pour cela parait nécessaire d'identifier les espèces présents dans l'échantillon pour orienter la recherche au dosage des mycotoxines ayant pu être formées.

A la lumière des résultats et discussion on peut conclure que l'échantillon de blé objet de notre analyse contient des mycotoxines et particulièrement l'aflatoxine B₁.

Nous tenons de préciser que la fiabilité des résultats de dosage des mycotoxines dépend étroitement de la méthode d'échantillonnage ; pour cela on propose :

- d'effectuer au hasard le prélèvement d'un grand nombre d'échantillon élémentaires que l'on mélange ensuite.
- D'augmenter la taille de l'échantillon analysé.
- De réaliser plusieurs analyses élémentaires sur un échantillon de plusieurs kilogramme.

Si nos résultats ne prêtent à aucune équivoque, nous ne pouvons qu'espérer que cet essai puisse servir dans la pratique de la manière la plus harmonieuse possible, nous espérons avoir apporté une contribution non sans intérêt.

BIBLIOGRAPHIE :

- [1] Derache-R , 1986 : toxicologie des grains et graines et produits dérivés. P(209)
- [2] Fraink.C : 1992 : toxicologie, ed masson
- [3]Geonges.B.1999 : les mycotoxines et visques alimentaires laboratoires des xenobiologique
- [4] Godon B.Loysel W. 1964 : guide protique d'analyse dans les industries des céréales.
- [5] Hartly R And Nesbitt B. 1963: toxic metabolites of. *Aspergillus-flarus*, nature 198p (1056-1058)
- [6] Joseph.P.G .1998 : microbiologie almentaire ed : masson
- [7] Larpant J-P . 1990 : les moisissures utiles et nuisibles ed. masson.
- [8] Larpant J-P. 1992 et.larpent M . 1985 : éléments de microbiologie ed. hermann
- [9]. Larpant J-P. 1992 : microbiologie alimentaire –ed masson
- [10] Madelin M.F. 1966: the fargus spore, butter workes ed. Loudon .
- [11] Marc. S. et al (2000) : a temperature- type model for describing the relation-ship between fumgal growth and water activity ed: el sevier
- [12] Nesbitt B.F et al : 1962: les mycotoxines
- [13] OMS. 1980: résultat d'étude
- [14] Patherson Et Roberts , 1972 : pro and meet mytoxones in animal ; disease ed maffpm
- [15] Sanson R.A , and Hoekstra , Es. 1988: introduction to food- born fongi ed barn, hollande.
- [16]. Sougy et al 1959 : botanique , zoologie ed classiques HACHETTE

REFERENCES : INTERNET

- [17] associattion pour la recherche. En toxicologie
[http:// www.aret.asso.fr/arbuletin_jun_91/hm](http://www.aret.asso.fr/arbuletin_jun_91/hm)
- [18] Diffechamb. France sarl 1999
fil:// a \ Rida Sereen fert aflatoxine B₁ hm
- [19] Entreprise services collaboration recherché de contract
fil : // a\ Mycotoxines. Htm
- [20] SGS, Laboratoire crepin
<http://www.laboratoire-crepin.fr>

Nom et prénom :
Bouklab Ramdane
Dekdouk Youcef
Belamri Ismail

Date de soutenance
29 Juin 2003

Objet : recherche des mycotoxines dans le blé

Nature de diplôme
Diplôme d'études universitaires appliquées

المخلص :

تعتبر السموم الفطرية من الفوئات المتواجدة في الأغذية، وهي مركبات كيميائية تنتجها الفطريات. أثناء العمليات الأيضية الثانوية. وقد اثبتت الابحاث العلمية التي تعرضنا اليها في الدراسة النظرية تأثيراتها السمية على الإنسان والحيوان وحتى على النبات. قمنا بدراسة تجريبية حولنا من خلالها البحث عن السموم الفطرية وإستخلاصها من القمح المتعفن، وذلك باستعمال طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ثم تمرير المستخلص المرشح عبر الأشعة فوق البنفسجية (U.V) والتي أظهرت اشعاع في هذه السموم أي ان كمية القمح المتعفن كانت ملوثة، إذن فالفطريات العفنية أفرزت سموم.

Summary :

Mycotoxines are substances pollutants of produces them food that are the chemical compounds produced by mushrooms during reactions of the secondary metabolism. the scientific research presented in the bibliographic part, show the poisonous effects of mycotoxines on the man, animals and plants.

we tried to achieve tentative survey for the extraction of these substances of a moldy wheat. And it by the use of the CCM then The revelation under UV; we got a blue coloration that indicates the presence of B aflatoxine, therefore mildews produced toxins in wheat.

Résumé :

Les mycotoxines sont des substances polluants des produit alimentaire ce sont des composés chimiques produits par les champignons durant les réactions du métabolisme secondaire; les recherches scientifiques présenté dans la partie bibliographique, montrent les effets toxiques des mycotoxines sur l'homme, les animaux et les végétaux.

nous avons essayé de réaliser étude expérimentale pour l'extraction de ces substances d'un blé moisie. Et cela par l'utilisation de la CCM puis La révélation sous UV; nous avons obtenu une coloration bleue qui indique la présence d'aflatoxine B. donc les moisissures ont produit de toxines dans le blé.