

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الجزائرية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
لعين تموشنت المركز الجامعي
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en : Microbiologie Appliquée
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Thème

Recherche et identification des moisissures isolées à partir de lait en poudre dans la région d'Ain T'émouchent

Présenté Par :

- 1) Melle. Mohammed Krachai Nor El iméne
- 2) Melle. Saklal rania
- 3) Melle. Dendane khadidja

Devant le jury composé de :

Pr. BELLAHCENEM	Pr	UAT.B.B(AinT'émouchent)	Président
Dr. CHIBANI H.R	MCB	UAT.B.B(AinT'émouchent	Examinatrice
Pr. ZIANE M.	MCA	UAT.B.B(AinT'émouchent	Encadrant

Anne Universitaire 2022/2023

Sommaire

REMERCIEMENTS	i
Dédicaces	ii
La liste d'abréviation	v
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vi
INTRODUCTION	01

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Généralité de lait en poudre	02
Définition	02
Différents types de poudre de lait	02
I. 1.3. Technologie de la poudre de lait	03
I. 1.3.1. Séchage sur cylindre	04
I. 1.3.2. Séchage par atomisation	04
I. 1.3.3. Processus de lyophilisation	05
I. 1.4. Critères de qualité de la poudre du lait	06
I. 1.4.1. Propriété physique et chimiques	06
I. 1.4.1.1. Solubilité	06
I. 1.4.1.2. Taux d'impureté	06
I. 1.4.1.3. pH	06
I. 1.4.2. Qualité nutritionnelle	06
I. 1.4.2.1. Matière grasse	06
I. 1.4.2.2. Matière protéique	07
I. 1.4.2.3. Eau	07
I. 1.4.2.4. Extrait sec dégraissé (ESD)	07
I. 1.4.2.5. Enzymes	07
I. 1.4.2.6. Les sels minéraux et les vitamines	07
I. 1.4.3. Qualité microbiologique de lait en poudre	08
I. 1.4.3.1. Propriétés microbiologiques	08
I. 1.4.3.2. Défauts et altérations du la poudre du lait	08
I. 1.4.3.3. Les bactéries pathogènes	09
I. 1.4.3.4. Altération des moisissures	09
Généralités sur les moisissures	10
Définition	10
Structure des moisissures	10
Ecologie des moisissures	11
Classification des moisissures	12
Conditions de développement des moisissures	13
Facteurs environnementaux	13
a. Oxygène	13
b. Dioxyde de carbone	13
c. Température	13
d. pH	13
e. Humidité	14
f. Lumière	14

Facteurs nutritionnels	14
a. Besoin en carbone	14
b. Besoin en azote	14
c. Besoin en éléments minéraux	14
d. Besoin en vitamines et facteurs de croissance	15
e. Teneur en eau du substrat	15
Insectes	15
Reproduction des moisissures	15
Reproduction sexuée	15
Reproduction asexuée	16
Types de moisissures	16
Les moisissures de champ	16
Les moisissures de stockage	16
Moisissures mycotoxinogènes	17
Généralités sur les mycotoxines	18
Définition	18
Localisation	18
Origine des mycotoxines	18
Structure des mycotoxines	18
Risques pour la santé humaine et animale	19
Autres	19
<i>Claviceps purpurea</i>	19
L'Afssa recommande	21
Les toxines d' <i>Alternaria</i>	21
L'acide cyclopiazonique	21
Les toxines trémorgènes	21
Autres mycotoxines principalement retrouvées en l'alimentation animale	22
Les sporidesmines	22
Les stachybotryotoxines	22
Les toxines d'endophytes	22
Les phomopsines	22

MATERIEL ET METHODES

II. 1. Matériel et Méthode	23
Échantillons et prélèvements	23
Recherche et dénombrement des moisissures	24
1. Préparation des échantillons	24
II.1.2.2. Dénombrement et isolement des moisissures	24
Identification des moisissures	25
II.1.3. 1. Observation macroscopique	25
2. Observation microscopique	25
Etude de la production des mycotoxine	25
II.1.4. 1. Détection visuelle des souches productrices de mycotoxine	25
II.1.4.2. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)	26

RESULTATS ET DISCUSSION

II.2. 1. Isolement et dénombrement des moisissures	29
II.2. 2. Distribution des genres fongiques	29

II.2. 3 Détection visuelle du pouvoir producteur des mycotoxines	34
II.2. 4. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)	35
Conclusion	36
Références Bibliographiques	
Annexes	

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, de nous a donné le courage, la force, la santé et la persistance.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Pr. ZIANE Mohammed, Professeur à l'Université d'Ain T'émouchent, pour ses précieux conseils et son soutien à tous les instants. Sa gentillesse, sa patience, ses grandes qualités scientifiques et humaines ont contribué au bon déroulement de ce travail. Ses critiques et sa compétence, ... tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous voudrions également remercier les membres du jury pour avoir accepté, D'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques.

Notre remerciement vont également à Pr. Bellahcene Miloude qui nous a fait l'honneur de présider le jury, ainsi qu'à. Dr. Chibani hibRahmane, qui ont accepté é d'examiner notre texte, et pour le temps qu'elles nous ont accordés.

Il serait vain de citer tous les enseignants ayant participé à nos formation. Nous disons merci.

Nous remercions les membres de laboratoire pour leur aide qui il été très précieuse.

Ainsi a tous les personnes que ont contribué pour une transmettre le savoir scientifique durant toute la durée de nous études universitaire.

Atous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Merci à tous.

Dédicaces

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je dédie ce travail :

À mes très chers parents (Amel et Mohammed), pour tous leurs sacrifices, leurs encouragements, leurs Soutiens, leurs précieux conseils et leurs prières durant toute ma vie. Que dieu vous procure bonne santé et longue vie.

À mes très chers sœurs : Zineb ,Abla, Rima, Kamare pour tous leurs prie pour le succès.

À mon très cher mari : Abderrahmane qui se tenait avec moi tout le temps à l'université, et sa famille.

À mes chers oncles et tantes.

A toutes familles DENDANE, MOKHFI, GUENAOUI.

À tous ceux qui m'ont soutenu, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Khedidja

Dédicace

C'est grâce a dieu, le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

A mon très cher papa «Amar» et ma très chère maman «soria» pour leurs sacrifices, soutien moral, tendresse, et encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi.

A mon cher frère «Ali» , et ma très chère sœur «manale» , Je les souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de succès.

A toutes ma famille en entière {Mohammed krachai & Taifor}.

A mes amis. ainsi que les collègues de section microbiologie appliquée promo 2022/2023.

A toutes les personnes qui m'ont vraiment soutenues et aidées même si de loin; vous êtes une source de force pour moi et je vous estime.

Et a toutes les personnes que j'aime !

Nor El Imane

Dédicace :

Avec l'aide de Dieu, j'ai réaliser ce modeste travail que je dédié exceptionnellement parents :

Mon père « AHMED » et Ma mère « KHEIRA »

Sources d'amour et bonheur qui m'ont beaucoup donné pour être ce qui je suis, Qui ont toujours été là pour moi , et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance . J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance.

A ma fille Emeni la prunelle de mes yeux qui a vécu avec moi les beaux moments de préparation de la mémoire et m'a fait sentir sa proximité avec moi-même si elle n'avait pas encore accouché

A mon mari « ILIES » qui m'a soutenu et m'a accompagné à la fin de ma carrière universitaire et ses parents « BELMAKHFI » et « BAYA »

A mon bras droit mon frère Nadir qui m'a donné la volonté et la force de faire ces efforts durant 5 ans de mes études universitaires

A mes frères ;Houcine et Achraf

A mes adorables sœurs : Djihane Sabrine Nesrine et son petit fils Imed dine que j'aime pour leur encouragement et leurs conseils précieux

Et a tout les personnes que j'aime

Rania

La liste d'abréviation

FAO : Food and Agricultural Organization

UFC : Unité Formant Colonie

Ig:Immunoglobuline

a_w: Activité d'eau (water activity)

UV :Ultra-Violet

PDA : Potato Dextrose Agar

AFB1 : Aflatoxine B1.

AFB2 : Aflatoxine B2.

AFG1 : Aflatoxine G1.

AFG2: Aflatoxine G2.

AFM1 : Aflatoxine M1.

AFM2 : Aflatoxine M2.

AFP1 : Aflatoxine P1.

AFQ1 : Aflatoxine Q1.

AFs : aflatoxines.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

CCM: la chromatographie sur couche mince.

OTA: Ochratoxine A

YES :YeastExtract

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Cyclone des différentes étapes de la production de la poudre de lait	4
2	Représentation de l'Hyphecénocytique (a) et hyphe septé (b)	11
3	Morphologie d'un hyphe, représentation schématique de l'extrémité d'un hyphe montrant les organites typiques et d'autres structures	11
4	Classification des Mycètes dans le monde vivant	12
5	Emplacement géographique de la région d'étude et localisation des zones de prélèvement des échantillons.	23
6	Méthode de préparation de frottis pour l'observation microscopique des moisissures par la technique de scotch.	26
7	Méthode de filtration de milieu YES par papier Wattman.	27
8	Séparation des mycotoxines sur plaque de CCM réalisé dans cette étude	28
9	Secteurs de réparation de différents isolats fongiques isolés à partir de l'échantillon de lait en poudre.	31
10	Mise en évidence par la fluorescence sous lumière UV (365nm) de la production de la mycotoxine sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CEA)	34
11	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (365nm) de la production de mycotoxines sur CCM	35

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Propriétés physico-chimiques du lait en poudre en fonction du type de séchage	5
2	Pourcentage de la matière grasse de lait en poudre	7
3	Pourcentage de la matière protéique de lait en poudre	7
4	Quantité des quelques vitamines et les sels minéraux dans le lait en poudre écrémé	8
5	Critères microbiologique des laits en poudre	9
6	Mycotoxines et champignons responsables de leur production	17
7	Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanisme d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement sur l'homme et l'animal	20
8	Caractères cultures macroscopiques et microscopiques (×100) des isolats fongiques	32
8suite	Caractères cultures macroscopiques et microscopiques des isolats Fongiques	33

ملخص

العفن عبارة عن كائنات دقيقة غالبًا ما تلوث المنتجات المجففة مثل مسحوق الحليب. كما يمكنها أن تنمو على هذه الاغذية منتجة مستقلبات ثانوية ضارة بالانسان. الهدف من هذه الدراسة هو البحث والتعرف على العفن المعزول من مسحوق الحليب في عين تموشنت. لتحقيق أهدافنا ، تم تحليل 27 عينة في منطقة عين تموشنت. أظهرت نتائج البحث وتعداد العفن على وسط مستخلص الخميرة ، دكستروز ، أن 74.07% من العينات المأخوذة ملوثة بالعفن بتركيز يتراوح بين 20 و 80 وحدة تشكيل المستوطنة / غرام. بعد ذلك ، تم تحديد 70 عزلة تم تحديدها مجهريًا على أنهافطر الرشاشيات (33.33%) ، (الترايكوديرما 14.81%) ، بنسيليوم (11.11%) ، أولوكلاديموم (7.41%) ، كلودوسبوريوم (7.41%) ، ريزوسيون (3.70%). فقط عزلات بنسيليوم و الرشاشيات أنتجت السموم الفطرية المركبة على وسط CEA. تم تأكيد هذه النتائج من خلال إنتاج السموم الفطرية على حساء YES متبوعًا بالكشف على TLC. تقدم هذه النتائج تأثيرًا اجتماعيًا واقتصاديًا في الوقاية وتحليل المخاطر لحماية المستهلك ومنع تلف الغذاء.

الكلمات المفتاحية: مسحوق الحليب ، القوالب ، السموم الفطرية ، تحليل المخاطر.

Résumé

Les moisissures sont des microorganismes contaminant souvent les produits déshydratés comme la poudre du lait. Elles peuvent se développer sur ces substrats en produisant des métabolites secondaires appelés mycotoxines nocifs pour l'être humain. L'objectif de cette étude était de rechercher et l'identifier les moisissures isolées à partir de la poudre de lait dans la région de Ain Temouchent. Pour atteindre nos objectifs, 27 échantillons ont été collectés et analysés dans la région de Ain Témouchent. Les résultats de recherche et dénombrement de moisissures sur milieu d'extrait de levure, dextrose, montrent que 74,07% des échantillons prélevés sont contaminés par les moisissures avec une concentration comprise entre 20 et 80 ufc/g. Ensuite, 70 isolats obtenus ont été identifiés microscopiquement comme *Aspergillus* spp. (33,33 %), *Trichoderma* spp.(14,81%), *Penicillium* ssp (11,11%), *Ulocladium*(7,41%), *Clodosporium* spp (7,41%), *Rhizocyone* ssp (3,70%). Seulement, les isolats de *Pencillium* spp. et *Aspergillus* spp. ont synthétisé les mycotoxines sur milieu CEA. Ces résultats ont été confirmé par la production de mycotoxines sur bouillons YES suivi de détection sur CCM. Ces résultats présentent un impact socio-économique dans les préventions et l'analyse de risque pour protéger le consommateur et prévenir des altérations des aliments.

Mots clés : lait en poudre ; moisissures ; mycotoxines ; analyse de risque.

Abstract

Molds are microorganisms that often contaminate dehydrated products such as milk powder. They can grow on these substrates by producing secondary metabolites called mycotoxins that are harmful to the human. The objective of this study was to research and identify molds isolated from milk powder in Ain Témouchent province. To achieve our objectives, 27 samples were collected and analyzed in the region of Ain Témouchent. The results of research and enumeration of molds on a medium of yeast extract, dextrose, show that 74.07% of the samples taken are contaminated by molds with a concentration ranged between 20 and 80 cfu/g. Then, 70 isolates obtained were microscopically identified as *Aspergillus* spp. (33.33%), *Trichoderma* spp. (14.81%), *Penicillium* ssp (11.11%), *Ulocladium* (7.41%), *Clodosporium* spp (7.41%), *Rhizocyone* ssp (3.70%). Only isolates of *Pencillium* spp. and *Aspergillus* spp. were produced mycotoxins on CEA medium. These results were confirmed by the production of mycotoxins on YES broths followed by detection on TLC. These results present a socio-economic impact in prevention and risk analysis to protect the consumer and prevent food spoilage.

Keys words: Milk Powder, Molds, Mycotoxins, risk analysis.

INTRODUCTION

Introduction

Le lait est un aliment complet présent des bienfaits pour la santé engrainant un apport important en protéines, lipides, sels minéraux, notamment calcium, phosphore et vitamines (**Watier, 1992**).

L'Algérie est le plus important consommateur de lait dans la région du Maghreb, avec une consommation annuelle moyenne de 110 litres de lait par habitant, estimée à 115 litres en 2010 (**FAO, 2007**). Cette consommation dépasse la production nationale estimée à 2,2 milliards de litres, dont 1,6 milliard de lait cru. Pour compenser ce manque, le pays importe près d'un milliard de litres de lait chaque année, principalement sous forme de poudre de lait. Malgré le taux de croissance annuel moyen du marché laitier algérien de 20%, chaque année, l'Algérie assure 60% de sa consommation de lait en poudre par l'importation. Par ailleurs, l'Algérie est l'un des pays plus consommateurs de la poudre du lait au monde (**Bekhouche 2011**). Le coût de ces quantités importées s'est élevé à 600 millions de dollars, selon les chiffres communiqués par le directeur général de l'Office national interprofessionnel du lait (ONIL)

La poudre du lait est un produit à faible activité d'eau 5% (**Brisson, 2003**) qui sélectionne la croissance de moisissures. En effet, les moisissures tolèrent des activités d'eau faible inférieure à 0,60 a_w (**Guezlane et al 2016**)

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques, susceptibles de coloniser des substrats très différents tels que les produits alimentaires. Elles peuvent être utiles dans certaines industries telles que l'industrie fromagère ou pharmaceutique. Cependant, certaines moisissures peuvent produire des métabolites secondaires appelés les mycotoxines qui sont susceptibles de représenter un danger pour la santé humaine et animale (**Mateo et al., 2002**).

La croissance de ces moisissures mycotoxinogènes peut être accompagnée de la production des mycotoxines et par la suite provoquer des dégâts sur la santé humaine. A cet effet, ce travail vise essentiellement à la recherche des moisissures mycotoxinogènes dans la poudre du lait consommé dans la région de Ain Témouchent, ainsi que utilisé pour reconstituer le lait pasteurisé.

Pour atteindre ces objectifs, ce travail a été proposé en trois parties, la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique sur des généralités sur le lait, la poudre du lait, les moisissures ainsi que les mycotoxines. La deuxième partie décrit la méthodologie suivie par la troisième partie elle expose les principaux résultats avec leur discussion.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Généralité de lait en poudre

Au fil des siècles, l'homme a commencé à développer des techniques de transformation pour produire différents produits (fromage, yaourt, lait en poudre, etc.) avec de nouvelles propriétés physico-chimiques qui leur permettent de mieux conserver les produits et d'éviter leur altération. Aujourd'hui, avec les avancées scientifiques dans le domaine de l'agroalimentaire, ces différentes méthodes de transformation manuelle ont été améliorées et intégrées dans les processus industriels, permettant de fabriquer des produits plus nombreux et meilleurs, répondant ainsi à un marché de plus en plus exigeant (**Abdenouri, 2008**).

Pfiffner (2009) mentionne que l'expérience de séchage de lait entier, demi-écrémé ou écrémé réalisées dans la seconde moitié du **XIXe siècle**, en donnant un produit insatisfaisant en termes de réhydratation. Des années après, c'est-à-dire au début du **20e siècle**, des procédés adaptés (l'atomisation et le séchage sur cylindres chauffés) ont été développés pour réduire le taux d'humidité du lait de 88% à 2-4%.

Définition

Le lait en poudre, ou lait déshydraté ou lait en sec, est défini comme un produit solide obtenu directement par élimination de l'eau du lait (Arrêté interministériel, 1998) dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini (**Brisson, 2003**). Il se présente sous la forme d'une poudre crème jaune clair avec une odeur et un goût agréables. Il se dissout immédiatement dans l'eau chaude sans prise en masse (**Guinon et al., 1925**). De plus, il représente la forme la plus courante de conservation du lait et est couramment utilisé pour préparer une variété de dérivés laitiers (**Abdenouri et al., 2008**).

Le lait en poudre peut remplir de nombreux rôles fonctionnels lorsqu'il est incorporé dans des produits alimentaires, les développements de la technologie du lait en poudre et une meilleure compréhension des changements chimiques dans le lait ainsi que l'élimination de l'eau ont conduit à une meilleure cohérence et différenciation des propriétés du lait en poudre (**Arie et al., 2012**).

Différents types de poudre de lait

Le lait en poudre est une forme déshydratée de lait, de crème ou une combinaison des deux, créée en éliminant l'eau jusqu'à ce que le produit final ne contienne pas plus de 5 % de son poids d'origine (**GEMRCN., 2009**). Plusieurs types de lait en poudre peuvent être identifiés :

- **Le lait en poudre riche en matières grasses:** Lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses ;
- **Lait entier en poudre :** Le lait en poudre avec une teneur en matières grasses entre 26% et 42%. En particulier dans les pays à production laitière limitée, est un choix populaire pour le lait reconstitué. Il sert également un ingrédient essentiel dans plusieurs produits alimentaires, à savoir, chocolat les produits de confiserie, les produits de boulangerie, les glaçages et divers produits laitiers comme la crème glacée et le fromage fondu ;
- **Poudre de lait partiellement écrémé :**Lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 % en poids ;
- **Poudre de lait écrémé :**Lait écrémé en poudre, ne contient pas plus de 1,5 % de matières grasses en poids.. Il parvient directement aux consommateurs sous forme de lait écrémé reconstitué. Les industriels de l'agroalimentaire l'utilisent dans les desserts lactés, les glaces, les yaourts, les charcuteries, les charcuteries végétales, les sirops, les sauces, les mayonnaises, les boissons instantanées du petit-déjeuner, etc.

I. 1.3. Technologie de la poudre de lait

Après purification, standardisation, pasteurisation ou préchauffage à haute température, deux étapes principales sont réalisées : la concentration et le séchage. La concentration est réalisée par évaporation et ébullition sur une surface chaude. Pour des raisons de qualité, on cherche à limiter la température du lait et à réduire son temps de séjour, il est donc traité sous vide et en film mince. Pour des raisons énergétiques, des effets multiples, compression mécanique de la vapeur et préchauffage du liquide sont utilisés. Ainsi, plusieurs kilogrammes d'eau peuvent être évaporés avec l'énergie de vaporisation de 1 kilogramme d'eau, alors que : le séchage nécessite plus que l'énergie de 1 kilogramme de vapeur pour sécher 1 kilogramme d'eau. Par conséquent, il est avantageux de concentrer autant que possible avant le séchage (**FAO, 2008**).

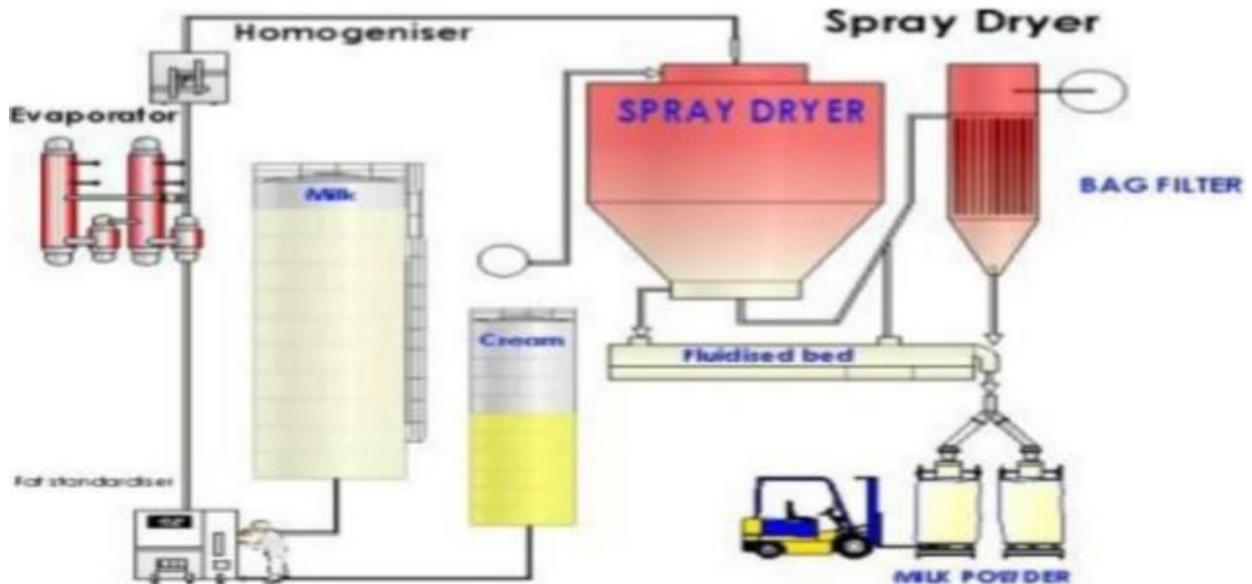


Figure 1 : Cyclone des différentes étapes de la production de la poudre de lait (Soy,2011).

Il existe différent type de séchage afin de produire différents type de qualité de poudre de lait. Selon (Jeantet *et al.* 2008), ces techniques de séchage comprennent :

I. 1.3.1. Séchage sur cylindre

C'est la plus ancienne procédure commerciale satisfaisante, elle n'a été développée que depuis le début du siècle. Essentiellement simple, il consiste à chauffer un mince film de vapeur à 143-149°C sur une surface métallique pendant 2 à 3 secondes à pression atmosphérique (Gaiani, 2006). Le séchage sur cylindre ne peut répondre aux nouvelles exigences qualitatives des poudres de lait (solubilité, dispersibilité élevée, faible teneur en matières grasses libres, etc.). D'autre part, les poudres séchées sur cylindres sont toujours le choix préféré dans le domaine du chocolat en raison de leur pourcentage élevé de graisse libre, de leur taille de particules élevée et de l'absence de vacuoles (Thomas, 2004). Dans le domaine de la confiserie, le taux en matière grasse libre élevé et la présence de composés de Maillard libérés lors du séchage en plus grande quantité ne font que le séchage sur cylindre est préférentiellement utilisé (Azza *et al.* 2010).

I. 1.3.2. Séchage par atomisation

Le procédé de fabrication de lait en poudre atomisé comprend deux étapes principales, l'étape de concentration, puis l'étape d'atomisation proprement dite, parfois appelée séchage. Selon la taille de l'installation, des thermoplongeurs bridés ou des serpentins de procédés chauffés sont utilisés pour cette opération. Le séchage par atomisation est la méthode

de séchage la plus couramment utilisée pour le lait en poudre, qu'il s'agisse de lait entier ou de lait écrémé. Appelé parfois spray, il est de plus en plus préféré par les industriels au séchage sur cylindres, car il en résulte une poudre plus soluble, mais aussi des qualités organoleptiques plus intéressantes (goût, aspect, etc.).(schuck. , 2012) .

I. 1.3.3. Processus de lyophilisation

Le processus de lyophilisation a été utilisé pour produire du lait en poudre de haute qualité. Cette méthode présente des avantages en termes de qualité, puisque la fraction protéique n'est pas affectée. Cependant, la lyophilisation n'a pas été largement utilisée, en partie en raison des besoins énergétiques élevés (**Journal of Animal & Plant Sciences, 2011**).

Tableau N°1 : Propriétés physico-chimiques du lait en poudre en fonction du type de séchage (Journal of Animal & Plant Sciences, 2011).

	Séchage par atomisation	Séchage sur cylindres
Structure des particules	Particules sphériques inclusions d'air	Compacte forme irrégulière pas d'air
Surface des particules	Lisse en particule pliée	-
Dimension des particules	10-250um	-
Densité apparente (g/cm ³)	0,50-0,70	0,3-0,5
Solubilité, dénaturation	Dénaturation des protéines peu élevée –bonne solubilité	taux de dénaturation élève des protéines –mauvaise solubilité
Exigences relatives a la	Cuivre < 1,5 mg/kg	Idem
Teneur en métaux lourds	Fer < 10,0mg/kg	-
Teneur en oxygène résiduel dans les poudres contenant des matières grasses	0,01 ml O ₂ /g	-
Brunissement du a la réaction de Maillard	Peu marque	Plus marque

I. 1.4. Critères de qualité de la poudre du lait

Le processus de fabrication des produits laitiers en poudre a un impact significatif sur leur valeur nutritionnelle. Des études ont montré que les traitements thermiques utilisés lors de la production peuvent altérer les propriétés physico-chimiques et organoleptiques du lait, diminuant à terme la disponibilité de certains nutriments (**Damicz et al., 1965 ; Hachana et al., 2018**).

Selon **Azza et al. en 2010** montré que les importants paramètres de qualité pour le lait en poudre sont constitués par la qualité microbiologique, les propriétés organoleptiques, ainsi que les propriétés physico-chimiques suivantes:

I. 1.4.1. Propriété physique et chimiques

I. 1.4.1.1. Solubilité

La solubilité est un critère essentiel dans le contrôle de la qualité des poudres laitières destinées à être réincorporées en phase aqueuse (**Jeantet et al., 2008**). Elle permet de déterminer l'aptitude d'une poudre à se dissoudre dans l'eau (**Schuck et al., 1994**). La solubilité de la poudre du lait est supérieure à 99,6% (**Schuck et al., 1994**),

I. 1.4.1.2. Taux d'impureté

De manière générale, le lait en poudre ne doit pas contenir d'impuretés. Le test de turbidité identifie les corps étrangers en suspension dans 100 grammes de poudre dissoute dans de l'eau distillée. Les suspensions étaient considérées comme non conformes si elles contenaient plus de huit corps étrangers clairement visibles (**Hachana et al., 2018**).

I. 1.4.1.3. pH

Selon **Alais et Stenne (1965)**, le pH de la poudre de lait varie selon diverses conditions et est d'environ 6,7.

I. 1.4.2. Qualité nutritionnelle

I. 1.4.2.1. Matière grasse

La teneur en matières grasses du lait en poudre est de 25,5 g par (**Jephcott et Bacharach, 1926**) et leurs pourcentages dans le lait varient selon leur type, comme le montre le tableau N°2.

Synthèse bibliographique

Tableau N°2: Pourcentage de la matière grasse de lait en poudre (**Michel et al., 2002**).

	Écrémé	partiellement écrémé	Entier
Matière grasse	≤ 1,2 %	$1,3 \leq x \leq 25,9\%$	≥ 26%

I. 1.4.2.2. Matière protéique

Comme montre le Tableau 3, la diminution du niveau de matière protéique contenue dans la poudre de lait peut être expliquée par une température de séchage plus élevée qui peut entraîner une dénaturation des protéines solubles (**Hachana et al., 2018**).

Tableau N°3: Pourcentage de la matière protéique de lait en poudre (**Penda et Sow, 2002**).

	Écrémé	partiellement écrémé	Entier
Matière protéique	36 %	29%	23%

I. 1.4.2.3. Eau

La conversion d'un produit liquide en poudre sèche nécessite l'élimination de la quasi-totalité de l'eau (**GEA Niro et Copenhagen, 2010**) et la teneur en eau du lait ne dépasse pas 5 % en poids du produit fini (**Gemrcn, 2009**).

I. 1.4.2.4. Extrait sec dégraissé (ESD)

ESD extrait sec dégraissée de la poudre de lait écrémé était comprise entre 81,40 et 94,80g/100g (**Hachana et al., 2018**)

I. 1.4.2.5. Enzymes

Les enzymes (protéase et lipase) produites par la flore initiale sont thermostable au traitement thermique (**Hachana et al., 2018**).

I. 1.4.2.6. Les sels minéraux et les vitamines

Les quantités des sels minéraux et des vitamines sont illustrées dans le tableau 4.

Tableau N°4: Quantité des quelques vitamines et les sels minéraux dans le lait en poudre écrémé (Jeantet *et al.*, 2008).

Constitution	Valeur
Vitamine	
Biotine	150µg/Kg
Vit B6	2,5 µg/Kg
Vit C	50 µg/Kg
Vit E	Trace
Minéraux	
Calcium	13,01 g/Kg
Fe	5,2 mg/Kg
Phosphore	11,06 g/Kg
Zinc	47,5 mg/Kg

I. 1.4.3. Qualité microbiologique de lait en poudre

I. 1.4.3.1. Propriétés microbiologiques

Les propriétés microbiologiques de la poudre dépendent principalement de la qualité initiale de la matière première et de la nature de l'opération utilisée (Traitement thermique, stérilisation, microfiltration). Lors du processus de séchage, une partie de la flore présente à l'origine dans le produit est détruite, mais dans une moindre mesure que les traitements de la technologie amont mentionnés ci-dessus. De plus, une autre partie n'est inactivée que par le stress thermique (processus réversible à prendre en compte lors du dénombrements) (Jeant *et al.*, 2008).

I. 1.4.3.2. Défauts et altérations du la poudre du lait

Le lait en poudre est sujet à des défauts et des altérations qui peuvent affecter son utilisation future. Ils sont continus avec un traitement thermique et peuvent avoir des propriétés biochimiques telles que : (brunissement et goût cuit) ; mauvais traitement du lait : (mouillabilité et solubilité insuffisantes, humidification).

La qualité du lait en poudre dépend en grande partie des micro-organismes présents dans le lait cru, et il convient de noter que le prétraitement est un facteur important affectant la contamination du lait en poudre, car la matière première est souvent soumise à des températures mortelles, éliminant ainsi les pathogènes état cellulaire dans la plante (Salahudin *et al.*, 2006).

I. 1.4.3.3. Les bactéries pathogènes

Le lait en poudre en spray a été le vecteur d'une série d'épidémies d'empoisonnement au *staphylocoque* (I.C.M.S.F, 1980). Le nombre d'espèces de *Salmonella* susceptibles de provoquer une intoxication alimentaire collective dans le lait en poudre est très faible, généralement de 1 à 10 bactéries pour 100 g de lait en poudre (ICMSF, 1980).

I. 1.4.3.4. Altération des moisissures

La microflore résidant dans le lait en poudre est influencée par plusieurs facteurs, tels que le nombre et le type de bactéries initialement présentes dans le lait cru, la température de préchauffage et les réglages de l'évaporateur. Une quantité abondante de micro-organismes trouvés dans le lait cru peut se transférer dans le lait en poudre pendant la transformation (Azza et al. 2010).

Sur les poudres de lait se développent de nombreuses moisissures dont beaucoup sont réputées toxigènes (Tableau 5) (Claude, 1976), malgré leur faible teneur en eau (3 à 4 par 100 normalement) recèlent des moisissures lorsqu'elles sont préparés ou stockées de mauvaises conditions (Cooke et Brazis, 1968). En Algérie, ces microorganismes ne sont pas recommandés selon la norme de 2 Juillet 2017 (Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires).

Tableau N°5 : critères microbiologique des laits en poudre (journal officiel 2017).

Micro-organisme	Nombre de micro-organisme (ufc /g ou ufc /ml)
Enterobacteriaceae	10 -10 ²
Staphylocoques à coagulase +	10-10 ²
Salmonella	Absence dans 25 ml

Généralités sur les moisissures

Définition

Les moisissures sont des champignons filamenteux, unicellulaires ou multicellulaires (**Guiraud, 1998**). Ces micro-organismes sont largement répandus dans la nature et peuvent être observés à différents endroits (atmosphère, sol, eau, plantes et déchets organiques, etc.), notamment sur les aliments stockés, conservés pendant un certain temps (mauvais pain, fromage ou fruit) (**Tabuc, 2007 ; Berthier et Valla, 2002 ; Marieetal., 2002**).

Le mot "moisissure" n'a pas réellement de signification systématique et ne représente pas un groupe botanique bien défini. Il désigne tous les champignons microscopiques importants pour l'industrie humaine et l'environnement de manière bénéfique ou néfaste (**Leyral et Vierling, 2001**).

Structure des moisissures

Les micromycètes, communément appelés moisissures, sont un groupe varié de champignons microscopiques qui n'appartiennent pas à un groupe systématique homogène. Ils sont répartis entre différentes familles de champignons. La structure de base des moisissures est un thalle filamenteux qui leur sert d'appareil végétatif. Ce thalle prend la forme de mycélium, qui est une masse entrelacée de filaments appelés hyphes. Au fur et à mesure que les moisissures se développent, les hyphes se ramifient dans toutes les directions. (**Bourgeois et al., 1996 ; Heritage et al., 1996**).

Dans le monde des champignons, les hyphes peuvent prendre deux formes : cénocytaires (non clobrées) dans le cas des Phycomycètes, ou cloisonnées (clombrées) dans le cas des Septomycètes (**Leyral et Vierling, 2001**). Les champignons subissent une croissance apicale et un allongement des filaments à partir de leurs extrémités, qui se produit uniformément et dans toutes les directions (**Boquet, 1993**). Le mycélium peut différencier des organes spécialisés dans la multiplication et la dissémination, appelés spores (**Bourgeois et al., 1996**) (**Figure 3**).

En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donne naissance à des structures plus spécialisées, qui produisent des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées (**Kendrick, 1999**).

Les cellules de moisissures sont tubulaires, formant des filaments. La composition chimique globale est voisine de celle des bactéries (**Guiraud, 1998**). La paroi cellulaire responsable de la forme est riche en cellulose ou en chitine selon les groupes. Le cytoplasme

Synthèse bibliographique

est limité par une membrane cytoplasmique, contient des ribosomes, des mitochondries, un

réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des lysosomes, des peroxysomes, des vacuoles, etc.), et un ou plusieurs noyaux (Guiraud, 1998) (Figure 02).

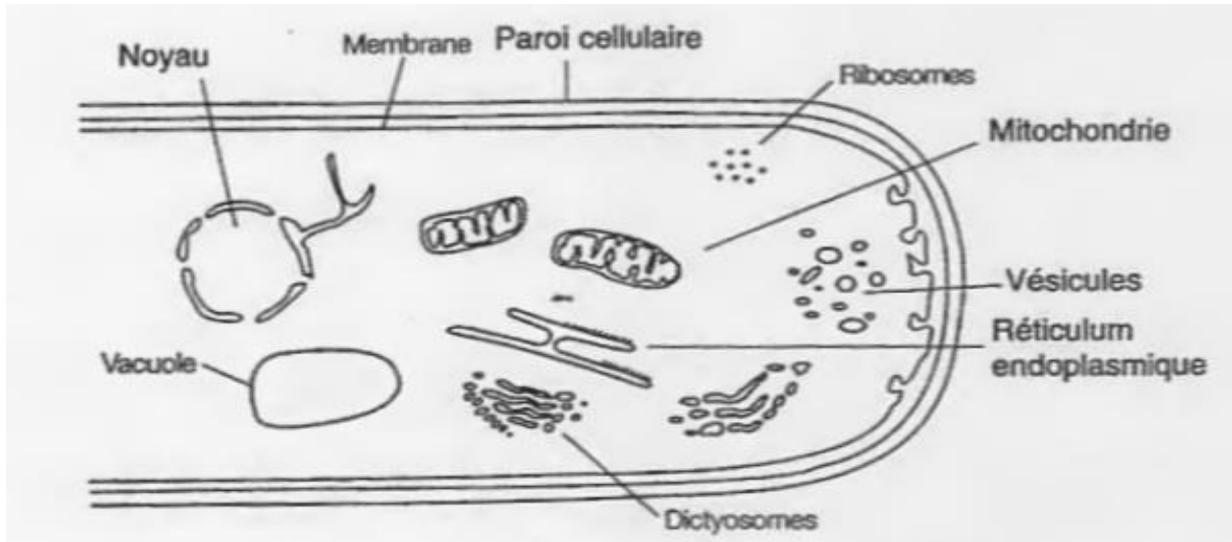


Figure 2 : Structure d'une hyphe (Nick et al., 2000)

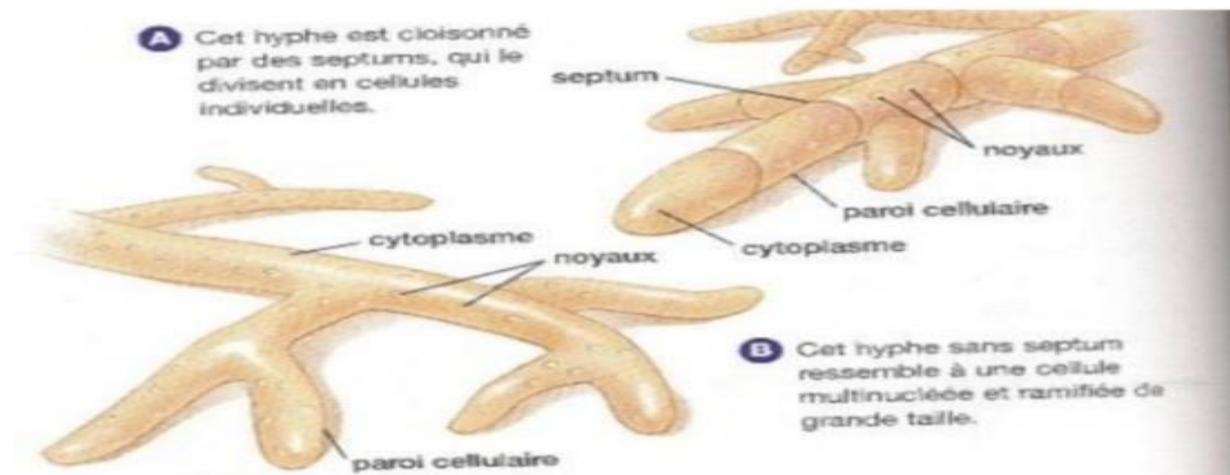


Figure 3 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe cenocytique ;(B), hyphe cloisonnée (Chabasse et al.,2002)

Ecologie des moisissures

Les moisissures colonisent, presque tous les types d'écosystèmes. Certaines vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, et

d'autres sont des saprophytes (Carip, 2008). Elles sont aérobies, en générale, acidophiles (pH de développement optimal de 3 à 7), mésophiles (20-30°C) avec un besoin faible en eau. Certaines espèces sont osmophiles, halophiles ou xérophiles (Bousseboua, 2004 ; Guiraud, 1998).

Classification des moisissures

La classification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères morphologiques (structure du mycélium), et aux mode de reproduction (sexuée ou asexuée), pour définir les grandes classes de moisissures (Heritage et al., 1996 ; Leveau et Bouix, 1993). On différencie ainsi quatre subdivisions selon les modalités de reproduction sexuée : les Mastigomycotina (Chytridiomycotina), les Zygomycotina, les Basidiomycotina et les Ascomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée Deuteromycotina ou Fungiimperfecti (Heritage et al., 1996 ; Leveau et Bouix, 1993).

Les Deuteromycotina ne sont pas une division véritable, mais un groupe dans le quel sont réunies les espèces qui n'ont pas de reproduction sexués ou, que l'on ne connaît pas encore. Le tri est en cours, et les organismes qui y sont classés trouvent peu à peu leur place chez les Basidiomycotina et les Ascomycotina (Branger et al., 2007).

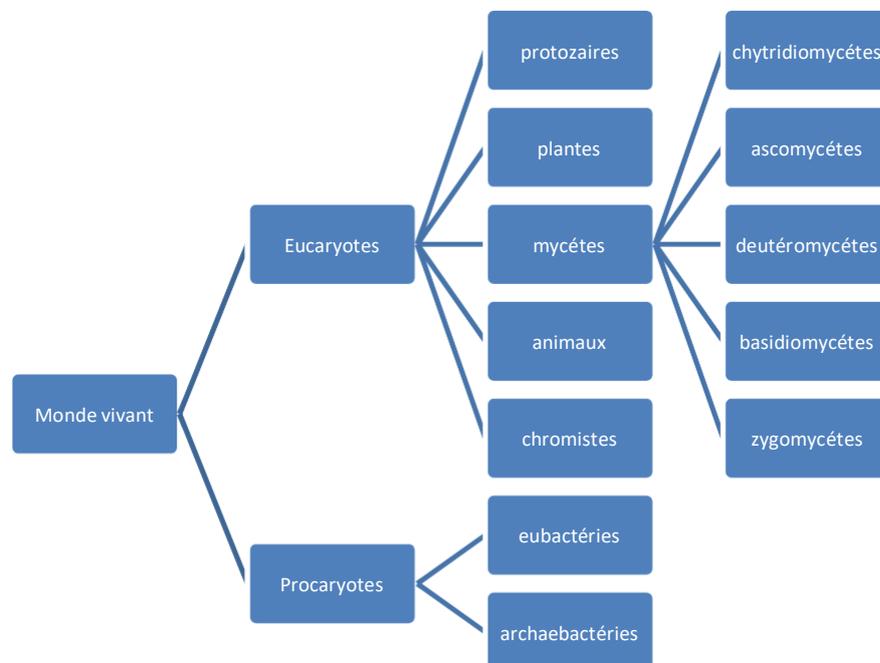


Figure 4 : Classification des Mycètes dans le monde vivant (Blackwell et al., 2012).

Conditions de développement des moisissures

Facteurs environnementaux

a. Oxygène

Les moisissures sont des organismes aérobies, mais les exigences en oxygène des différentes formes d'une même espèce sont différentes. Cela n'empêche pas l'existence de certaines espèces qui peuvent se développer en anaérobiose (**Boiron, 1996 ; Roquebert, 1984**).

b. Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un élément essentiel intervenant dans d'importantes réactions métaboliques des moisissures. Cependant, certaines espèces sont intoxiquées par des concentrations élevées de dioxyde de carbone, alors que d'autres ne peuvent se développer qu'en présence d'une forte concentration de cet élément (**Boiron, 1996**).

c. Température

La végétation maximale des moisissures est produite entre 20 et 30°C, mais la plupart des mycètes tolèrent, généralement, une température de 5 à 40°C ; elles sont dites donc **mésophiles**.

Les espèces **psychrotolérantes** sont capables de se développer à des températures basses et mêmes négatives. Les espèces de moisissures incapables de pousser au dessus de 20°C, sont dites **psychrophiles**. À l'opposé, les espèces **thermotolérantes** poussent à des températures allant jusqu'à 50°C. Celles qui ne poussent pas à moins de 20°C, sont dites **thermophiles** (**Leyral et Vierling, 2001 ; Nicklin et al., 2000 ; Boiron, 1996**).

d. pH

Les moisissures se développent mieux en milieu légèrement acide (croissance optimale à des pH entre 4 et 6), mais elles peuvent tolérer des pH très acides (pH = 1). Par ailleurs, le métabolisme des moisissures modifie le pH, soit par l'utilisation des anions ou des cations du milieu, soit en produisant des acides organiques ou de l'ammoniac (**Leyral et Vierling, 2001 ; Boiron, 1996**).

e. Humidité

Les mycètes ont besoin de l'eau pour extraire les nutriments et sont donc restreints à des environnements assez humides, comme les tissus d'un hôte, les sols et les substances humides (Nicklin *et al.*, 2000).

f. Lumière

La lumière influence la croissance des moisissures, soit par destruction photochimique des constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique par la stimulation de la biosynthèse de divers pigments (Boiron, 1996).

Facteurs nutritionnels

a. Besoin en carbone

Les mycètes utilisent des substances organiques comme sources de carbone et d'énergie. La grande partie du carbone de l'environnement est sous forme de polymères complexes tels que la cellulose, la chitine et la lignine. Ces polymères doivent être hydrolysés par des enzymes hydrolytiques, libérées par les mycètes, pour avoir une forme soluble et diffusable (la paroi cellulaire rigide empêche l'endocytose) (Nicklin *et al.*, 2000).

b. Besoin en azote

Les moisissures ne peuvent pas fixer l'azote gazeux (Heritage *et al.*, 1996). Cependant, la plupart des espèces peuvent assimiler facilement, aussi bien l'azote ammoniacal que l'azote nitrique. Certaines sources d'azote organique peuvent aussi être utilisées sous formes d'acides aminés, par absorption directe à travers la membrane (Davet et Rouxel, 1997). Les peptides et les protéines ne sont utilisables qu'après leur dégradation par des protéases fongiques en acides aminés absorbables (Nicklin *et al.*, 2000 ; Heritage *et al.*, 1996).

c. Besoin en éléments minéraux

Les moisissures ont un requis spécifique en éléments traces tels que le Soufre, le Phosphore, le Magnésium, le Fer, le Cuivre, le Manganèse, le Zinc, le Molybdène, le Potassium, le Sodium et le Calcium, qui sont convertis en divers composés après réduction. Ces traces d'éléments sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production des cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc. (Boiron, 1996 ; Heritage *et al.*, 1996).

d. Besoin en vitamines et facteurs de croissance

Beaucoup de moisissures exigent diverses vitamines pour leur croissance, à de très faibles concentrations (10⁻⁵ à 10⁻¹² Molaire). Les besoins les plus communs concernent la thiamine (B1) et la biotine (B8), intervenants comme Co-enzymes lors des réactions de carboxylations. Les facteurs de croissance sont des composés indispensables à la nutrition et à la croissance de certains micro-organismes tels que les stérols, les acides gras, les purines et les pyrimidines, nécessaires en quantité relativement importante. À titre d'exemple, les stérols jouent un rôle majeur dans la composition des membranes fongiques et leur perméabilité (Boiron, 1996).

e. Teneur en eau du substrat

La teneur en eau du substrat est un facteur déterminant le développement des moisissures. L'activité de l'eau (a_w) exprime la teneur en eau libre du substrat, et qui est disponible pour la croissance des moisissures. Si elle est maintenue en dessous de 0,65, aucun développement fongique ne sera observé (Roquebert, 1984).

Insectes

L'effet des insectes est particulièrement préoccupant, aussi bien pour une contamination aux champs que pendant le stockage. Une infestation par les insectes prédispose les grains à une contamination par les moisissures et à la production des mycotoxines. La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *Aspergillus flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Les acariens sont aussi des vecteurs importants des spores ; ils vivent sur les graines et les plantes moisies, récupèrent et transportent ensuite les spores sur la surface de leur corps et dans leur tube digestif (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

Reproduction des moisissures

Reproduction sexuée

Ce type de reproduction permet la recombinaison des caractères héréditaires. Les cellules jouant le rôle de gamètes se forment à partir des hyphes déjà différenciés. La cellule résultant de la fécondation des gamètes subit des transformations plus ou moins importantes pour donner une spore (Leyral et Vierling, 2001 ; Guiraud, 1998). Les champignons issus de ce type de reproduction sont dits **téléomorphes** ou parfaits (Cahagnier et al., 1998).

On connaît quatre sortes de spores issues de la reproduction sexuée :

- Les zygospores;
- Les oospores;
- Les ascospores;
- Les basidiospores (**Leyral et Vierling, 2001 ; Guiraud, 1998**).

Reproduction asexuée

Certaines moisissures sont, le plus souvent ou exclusivement, rencontrées à des stades de multiplication asexuée, par l'intermédiaire de spores ou de conidies. Ces champignons sont dits anamorphes ou imparfaits, et sont alors classés dans la cinquième subdivision, les Deuteromycotina (**Blackwell et al., 2012**).

Les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose ; elles assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les Deuteromycotina (appelés également champignons mitosporiques ou conidiens) (**Prescott et al., 2007 ; Leyral et Vierling, 2001 ; Guiraud, 1998**). Lorsque les deux formes de reproduction (sexuées et asexuée) co-existent, les champignons sont dits holomorphes.

Types de moisissures

Les moisissures de champ

Les principaux genres sont : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* et *Fusarium*. Ces moisissures peuvent survivre pendant des années dans la graine sèche.

Parmi les quatre genres, la toxicité du *Fusarium*spp présente un grand risque pour la santé humaine et animale. Les espèces de ce genre contaminent diverses cultures, principalement le maïs, le blé, le mil et le sorgho, ainsi que des plantes ligneuses. Le genre *Fusarium* est considéré comme "champignon des champs", qui secrète sa toxine lorsque les conditions lui deviennent favorables (**Atoui, 2006 ; FAO, 1984**).

Les moisissures de stockage

Les principaux genres inclus dans cette catégorie sont : *Aspergillus* et *Penicillium*. Le premier genre est considéré comme champignon d'entreposage, bien que la contamination débute fréquemment dans les champs. Le genre *Fusarium* (champignon des champs) peut apparaître durant le stockage avec un taux d'humidité élevé et une température basse.

Synthèse bibliographique

Presque tous les champignons des stocks envahissent d'abord, et de préférence, le germe des grains, ce qui a pour effet immédiat la réduction du pouvoir germinatif. Les différents facteurs environnementaux, la nature du substrat, le degré de contamination initial, ainsi que les modes de stockage, ont une incidence très importante sur les dégâts causés par le développement fongique, la production des mycotoxines, et la perte de qualité des grains (Atoui, 2006 ; FAO, 1984).

Moisissures mycotoxinogènes

A côté des effets très bénéfiques des champignons dans la vie courante, ils sont capables de provoquer également d'importantes détériorations, notamment dans le domaine agronomique (Nguyen, 2007).

Cinq genres de champignons, dits toxigènes, ont la capacité de produire des mycotoxines, si les conditions écologiques leurs sont favorables. Il s'agit des genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps*. Ces moisissures et leurs mycotoxines secrétées sont susceptibles de contaminer l'aliment, du champ jusqu'à l'assiette des consommateurs.

Tableau 06 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production (El Khouri, 2007).

Champignons	Toxine
<i>Aspergillus</i>	-Aflatoxines, Sterigmatocytine, Ochratoxine A (OTA).
<i>Penicillium</i>	-Patuline, Citrinine(CIT), Acide penicillique, Penitrem A, Acidecyclopiazonique, Ochratoxine A.
<i>Fusarium</i>	-Trichothecenes (DON: Deoxynivalenol, NIV: Nivalenol, Toxine T-2, DAS: Diacetoxyscipenol), Zearalenone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine.
<i>Alternaria</i>	-Alternariol, Acide Tenuazonique.
<i>Claviceps</i>	-Alcaloïdes de l'Ergot.

Les champignons majeurs connus comme précurseurs de l'Ochratoxine A (OTA) et de l'Aflatoxine B1 (AFB1) qui sont impliquées dans la chaîne alimentaire humaine et animale, appartiennent principalement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (El Khouri, 2007).

Généralités sur les mycotoxines

Définition

Le terme mycotoxine vient du grec «mycose» qui signifie champignon, et du latin «toxicum» qui signifie poison (**YiannikourisetJouany, 2002**).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de nature chimique, différents de protéines et de macromolécules, élaborées par plusieurs souches de champignons à certains stades de leur développement. Les mycotoxines sont des composés de faible poids moléculaire considérés comme haptènes. Ces métabolites résistent aux phénomènes d'oxydation et aux processus de cuisson (thermostables), et ont une durée de vie bien plus longue que celle des champignons les ayant synthétisés (**Gallot et al. 2000**). Comme leur nom l'indique, les mycotoxines sont douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 mycotoxines ont été identifiées mais seule une trentaine qui possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes (**Frémy et Thomann, 2009**)

Localisation

Les mycotoxines se trouvent accumulées dans le mycélium et les spores fongiques. Ils peuvent diffuser dans le substratum et contaminer les produits agricoles. Les mycotoxines sont adsorbées également dans les poussières, et sont transportées sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques, ce qui constitue une autre voie d'exposition pour l'homme et l'animal par inhalation (**Atoui, 2006**)

Origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont élaborées par des champignons -ou micromycètes- lors de quatre processus différents mettant en jeu respectivement le métabolisme secondaire fongique, la bioconversion de composés végétaux (dicoumarol), la réaction de la plante à des agressions (coumestrol), ou l'association plante-champignons (cas des champignons endophytes) (**Zbib et al., 2014 ; Repussard et al., 2013 ; Yiannikouris et Jouany, 2002**)

Structure des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés de structure variable ; aliphatique ou polycyclique, aromatique ou non. Elles sont neutres, acides ou basiques, mais presque toujours peu hydrosolubles (**Marasasetal., 1988**). La diversité des voies de synthèse et des espèces productrices fait qu'il existe de très nombreuses molécules, de structure relativement

différentes les unes des autres. Le plus souvent, les mycotoxines sont des molécules de faible poids moléculaire : de 154 Da pour la patuline qui est l'une des plus petites molécules, à 466 Da pour la toxine T2, qui est l'une des plus grosses molécules. Les mycotoxines sont, pour la plupart, des composés hétérocycliques insaturés. La présence de doubles liaisons C=C joue souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes. C'est notamment le cas pour les aflatoxines dont la double liaison à l'extrémité des groupements furanes permet l'addition d'O₂ et la formation d'un cycle triangulaire époxyde, extrêmement toxique (Tabuc, 2007).

Risques pour la santé humaine et animale

Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée (exposition unique à une forte dose), mais il est exceptionnel d'être exposé à des doses toxiques en une seule ingestion d'aliments contaminés. Les effets chroniques (exposition répétée à de faibles, voire de très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence de ces toxines (AFSSA, 2006)

Les différentes mycotoxines ont une toxicité variable ; certaines exercent un pouvoir hépatotoxique (*Aflatoxines*), d'autres se révèlent oestrogéniques (*zéaralène*), immuno/hématotoxiques (*patuline*, *trichothécènes*, *fumonisines*), dermonécrosantes (*trichothécènes*), néphrotoxiques (*ochratoxine A*) ou neurotoxiques (toxines thermogènes). Certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées être cancérigènes (Tableau 7). Notons que dans un même produit ou la même ration alimentaire plusieurs types de mycotoxines peuvent coexister (AFSSA, 2006).

Autres mycotoxines pouvant être retrouvées en l'alimentation humaine ou animale

Selon AFSSA (2006) il y'a des mycotoxines pouvant être retrouvées en l'alimentation humaine ou animale.

Claviceps purpurea

Les toxines de *Claviceps purpurea* ne semblent plus constituer un risque sanitaire majeur pour la santé de l'homme dans des conditions actuelles d'alimentation. Chez l'animal, même si le transfert des alcaloïdes dans les produits animaux est mal connu, la législation mise en place au niveau européen semble garantir l'intégrité de la santé en élevage et l'innocuité des produits d'origine animale

Synthèse bibliographique

Tableau 7: effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanisme d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement sur l'homme et l'animal (AFSSA, 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
<i>Aflatoxine B1+B2</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hépatotoxicité ▪ Génotoxicité ▪ Cancérogénicité 	Formation d'adduits à l'ADN Peroxydation lipidique Bio activation par des CYP 450 Conjugaison aux Glutathion transférases
<i>Ochratoxine A</i>	Néphrotoxicité Génotoxicité Immun modulation	Impact sur la synthèse des protéines Inhibition de la production d'ATP Détoxication par les peptidases
<i>Trichothécènes (A et B)</i>	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur Hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
<i>Patuline</i>	Neurotoxicité Mutagenèse in vitro	Inhibition indirecte d'enzymes
<i>Zéaralénone</i>	Fertilité Reproduction	Liaison aux récepteurs ostrogéniques Bio activation par des déshydrogénases Conjugaison aux glucuronyltransférases
<i>Fumonisine B1</i>	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide et altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

L'Afssa recommande

Au plan de la contamination : de surveiller le niveau de contamination des céréales en liaison avec l'évolution des techniques culturales et des variétés cultivées ainsi que dans les céréales importées (seigle) ;

Au plan analytique : de disposer de méthodes de dosage des principales toxines de *Claviceps* (AFSSA, 2006).**I.3.6.3. La citrinine**

Il est peu probable que la citrinine présente un risque pour l'homme. Le risque d'intoxication provient surtout de la consommation de céréales contaminées utilisées à l'état brut en alimentation animale, et particulièrement dans l'alimentation des porcs et des volailles (AFSSA, 2006).

Les toxines d'*Alternaria*

Si une attention doit être maintenue sur la qualification des propriétés toxiques de ces toxines, et sur leur occurrence, les données de contamination restant peu nombreuses, il n'existe pas actuellement de raison objective de considérer leur danger comme une priorité en sécurité sanitaire des aliments destinés à l'homme ou aux animaux d'élevage.

L'acide cyclopiazonique

Il est peu probable que l'acide cyclopiazonique présente un risque sanitaire majeur pour l'homme. Le risque d'exposition provient principalement de la consommation de céréales contaminées. En Amérique du Nord, la présence de ce contaminant de l'aflatoxine B1 est considérée sans conséquence néfaste car il est supposé atténuer le danger des aflatoxines en participant à leur inhibition métabolique.

Les toxines trémorgènes

La forte toxicité avérée chez l'animal du verruculogène et du penitrem conduit à s'interroger sur leur occurrence en alimentation animale et donc sur le risque qu'ils représentent. Et par transposition, la même interrogation se pose les concernant sur l'appréciation du risque en alimentation humaine.

Autres mycotoxines principalement retrouvées en l'alimentation animale

Les sporidesmines

La présence de sporidesmines constitue un réel problème sanitaire pour certaines productions animales, notamment chez les ovins. Le risque sanitaire pour l'homme est peu connu et peu d'informations sont disponibles sur le passage dans les produits animaux. Il serait donc important de connaître le devenir des sporidesmines chez l'animal et de mettre en place des recherches sur le transfert dans le lait.

Les stachybotryotoxines

Les stachybotryotoxicoses sont des affections des équidés dont la prévalence est difficile à évaluer. Si ces affections chez l'homme sont bien connues lors d'exposition par inhalation ou contact, il y a peu de préoccupations à avoir en termes d'exposition humaine par voie alimentaire.

Les toxines d'endophytes

Le risque d'intoxication provient de la consommation de fourrages verts contaminés par les ruminants, particulièrement les bovins. Ces toxines peuvent être responsables de pertes de productivité pour les animaux atteints. Il est peu probable que les toxines d'endophytes présentent un risque pour l'homme.

Les phomopsines

Le risque d'intoxication provient surtout de la consommation de graines de lupin contaminées utilisées en alimentation animale. Aucun cas n'a été rapporté en France mais la vigilance doit être maintenue en raison de la part croissante des graines importées. Il est peu probable que les phomopsines présentent un risque pour l'homme. Toutefois, en raison du profil toxicologique de ces toxines, il conviendrait de réaliser des études de transfert dans les productions animales.

MATERIEL ET METHODE

II. 1. Matériel et Méthode

Cette étude a été réalisée au niveau de laboratoire pédagogique de microbiologie du département de biologie, faculté des Sciences et de technologie, l'Université de Ain Témouchent Belhadj Bouchaib.

Échantillons et prélèvements

Les échantillons de différentes marques de lait en poudre ont été prélevés au niveau de la commune d'Ain Alarbaa et Hammam Bouhajar de la wilaya d'Ain Temouchent. **(Figure 5)**.

Au total 27 échantillons ont été prélevés aléatoirement parmi les ménages connus. Des boîtes de prélèvement stérile de 100 mL ont été remplis par la le lait en poudre. Chaque boîte porte en générale 50 g de lait en poudre. Ensuite, les échantillons ont été transportés au laboratoire dans un glacière à une température de 4°C.

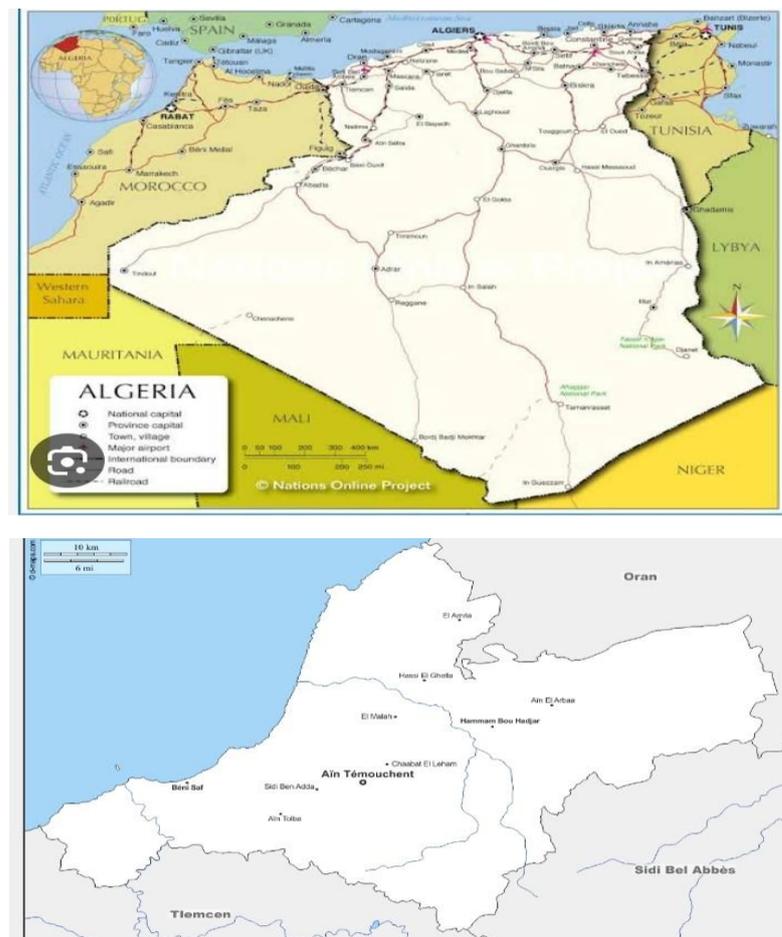


Figure 5 : Emplacement géographique de la région d'étude et localisation des zones de prélèvement des échantillons.

II.1.2. Recherche et dénombrement des moisissures

II.1.2.1. Préparation des échantillons

Cette étape consiste à dissoudre, à l'aide d'une spatule stérile, une quantité de 1g du lait en poudre dans un 9 ml de diluant TSE. L'ensemble des échantillons était préparé suivant la même procédure.

La dilution ainsi obtenue constitue la première dilution de 10^{-1} qui sert à préparer la gamme de dilution jusqu'à 10^{-3} .

La préparation de la gamme des dilutions consiste à transférer, à l'aide d'une micropipette, un volume de 1 ml de la première dilution dans un tube contenant 9mL de la TSE. Les dilutions étaient bien agitées, à l'aide d'un vortex, avant chaque transfert.

II.1.2.2. Dénombrement et isolement des moisissures

Un volume de 1 ml de chaque dilution était étalé par un râteau sur la gélose de l'extrait de levure, dextrose, oxytétracycline et agar-agar (**Annexe 1**). Ensuite, les boîtes étaient incubées à 25°C pendant 4 à 5 jours.

Après incubation, le dénombrement a été effectué à l'aide de la formule de l'équation 1. Les résultats de l'identification des espèces fongiques sont exprimés en UFC/g. (**Dutruc, 2003**).

$$N \text{ (UFC/g)} = \sum C / ((n_1 + 0,1n_2) d V) \quad \text{Eq. 1}$$

ΣC (UFC): Somme de colonies comptées sur toutes les boîtes retenues ;

V (mL) : Volume inoculé à chaque boîte ;

n_1 : Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 : Nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d : Facteur de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte.

Identification des moisissures

Dans cette étude, l'identification des moisissures est basée seulement sur l'observation microscopique suivant le guide de **Botton et al. (1990)**. Les sur les caractères cultureux (observation macroscopique).

1. Observation macroscopique

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'œil nu puis à la loupe binoculaire suivant les critères décrites par **El Khoury (2007)**, **Bennoudia (2016)**, **Djossou (2011)**, **Belmehdi et Beddar (2019)**.

L'observation macroscopique est réalisée sur la face et le revers de la boîte. L'étude des caractères morphologique macroscopiques à portée sur tous les groupes de moisissures isolées. Les caractères étudiés sont basées sur le :

- Au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle (veloute, laineux, etc.), la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie, la vitesse de croissance apicale et l'odeur
- Au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible et les exsudats.

2. Observation microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les méthodes les plus utilisées sont celles du ruban adhésif décrit par **Belmehdi et Beddar (2019)**.

La technique de scotch est une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent quel'on plaque légèrement à la surface de la culture jeune et au borde de la colonie fongique (méthode directe ou la méthode de dilution), puis que l'on colle sur une lame de microscope. **(figure 6)** L'observation microscopique se fait au grossissement X10, X40 et X100 à l'aide d'un microscope optique **(Bennoudia, 2016 ; Belmehdi et Beddar, 2019)**.



Figure 6 : Méthode de préparation de frottis pour l'observation microscopique des moisissures par la technique de scotch.

Etude de la production des mycotoxine

Dans cette étude, deux méthodes ont été utilisées pour détecter la capacité des isolats identifiés, à produire les mycotoxines.

II.1.4. 1. Détection visuelle des souches productrices de mycotoxine

Les souches isolées ont été réensemencées sur des boîtes de Pétri contenant 20 mL de milieu CEA (Coconut Extract Agar) (**Annexe 1**), et le désoxycholate de sodium à raison de 0,8%. Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C pendant 5 à 10 jours. Des boîtes de Pétri en verre non fluorescent ont été utilisées. Les zones de diffusion d'aflatoxine et d'ochratoxine sont détectées en utilisant une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence ou l'absence des mycotoxines est traduite par des fluorescences. (**Lemke et al. 1989**).

II.1.4. 2. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

Les isolats ont été repiqués séparément sur milieu **YES** (Yeast Extract Sucrose) (**Annexe 1**) ; riche en vitamines du groupe B complexes, ce milieu favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production des mycotoxines. L'incubation des flacons se fait à 25°C pendant 14 jours.

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée est éliminée en filtrant le milieu YES à travers du papier filtre type Wattman N° 01 (**Figures 7**). Les 50 ml du filtrat obtenu sont additionnés à 100ml de chloroforme, le mélange est rigoureusement agité pendant 10 min puis

laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.

La phase chloroformique ainsi obtenue est filtrée sur du papier Wattman N° 01 puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor type (Heidolphlaborota 4000 efficient) jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 à 3 ml (indice d'une évaporation achevée).



Figure 7: Méthode de filtration de milieu YES par papier Wattman.

Enfin, la détection est basée sur la séparation par la chromatographie sur couche mince. Elle est réalisée sur une plaque de gel de silice (gel de silice 60 F254) activée au four pasteur à 105°C pendant 30 min. Des spots de 20µl et de 40µl de chaque extrait chloroformique concentré étaient déposés sur la plaque. Elle est ensuite placée dans une cuve chromatographique contenant un mélange de solvant d'élution composé de toluène, d'acide formique et d'acétate d'éthyle de volume respectifs (5 ; 1 ; 4) (Multon,1982) (Figures 8).

Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque est examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence ou l'absence des mycotoxines est traduite par des fluorescences.

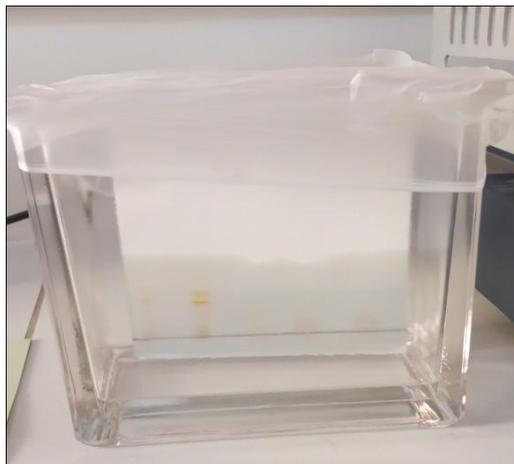


Figure 8: Séparation des mycotoxines sur plaque de CCM réalisé dans cette étude.

RESULTATS ET DISCUSSION

II.2. 1. Isolement et dénombrement des moisissures

Le résultat de dénombrement des moisissures sur le milieu de l'extrait de levure montre que 20 échantillons sont positifs sur 27 échantillons analysés. Cette contamination représente une fréquence de contamination de 74.07%. Les échantillons analysés dans cette étude s'était avéré moins contaminés par rapport à la fréquence (94 %) de contamination reportée par **Medina et Jordano (1993)**. Cependant, **Hadj Ahmed (2018)** a montré une fréquence faible (25%) par rapport aux résultats de cette étude. Cette variabilité de fréquence est probablement expliquer et/ou influencé par plusieurs :

Nombre des échantillons analysés, c'est-à-dire plus le nombre des échantillons s'élève plus la fréquence diminue ;

La nature de la matière et les conditions de fabrication :

Conditions de stockage (température e humidité).

Pour les échantillons contaminés les concentrations sont comprises entre 20 (1,30 log UFC/g) et 80 UFC/g(1,90 log UFC/g), avec une moyenne de 1,30 et médiane de 1,54. Ces résultats sont moins contaminés par rapport aux résultats de **Medina et Jordano (1993)** montré que l'ensemble des échantillons analysé sont contaminés avec des concentrations s'étalent entre 15-330 UFC.

Malgré l'étape de déshydratation qui limite normalement la présence des levures et moisissures, les **moisissures** était présent dans les échantillons analysés. Cette contamination sont à l'origine de contamination par l'environnement, l'emballage ou venir au cours de chaîne de fabrication (**Belin, 1996**). En plus, les spores des moisissures sont résistantes aux traitements thermiques appliqués durant la production de la poudre du lait (**Moreau, 1996**).

II.2. 2. Distribution des genres fongiques

Après identification plusieurs genres ont été identifiés. A partir de boites de dénombrement et d'isolement de moisissures, 20 isolats ont été repérés. Les isolats obtenus ont été identifié en basant sur l'observation microscopique. Dans ce travail, l'observation macroscopique n'était pas exploitée car s'est avérée difficile dû à la variabilité des aspects macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boites ...). Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont synthétisées sur le **Tableau 8**. Seulement l'observation microscopique d'un frottis (méthode de Scotch) pour l'identification des genres.

L'identification microscopique a permis d'identifier 6 genres appartenant à *Aspergillus* spp(33.33 %), *Trichoderma* spp (14.81%), *Penicillium* spp (11.11%), *Cladosporium* spp et *Ulocladium* spp (7,41%), *Rhizoctone* spp (3,70%) (**Figure 9**).

Aspergillus spp. est prédominants contaminants dans identification fongique, selon **Kandasamy et al. (2020)** et **Moubasher et al. (2018)** et **Torkar et al. (2008)**, montrée que *Aspergillus* est le genre a été largement signalé et associé à la contamination des produits laitiers. Et pour **Alzamily (2022)** ont montré le pourcentage de lunettes fongiques qui contamina les produits laitiers, comme il a été constaté que le pénicillium était dominant avec un pourcentage de 42,85%, suivi de *Aspergillus* avec un pourcentage de 32,14%, Ensuite, avec *Cladsporium* 14,30%, et isoler d'autres genres comme *Fusarium* par exemple 7,14% et enfin *Alternaria* 3,57%.

Une présence importante des différentes espèces fongiques dans la poudre du lait, est probablement due à la présence de conditions appropriées à leur croissance. Beaucoup d'autres auteurs reportent le développement et l'activité des moisissures (**Cuero et al., 1987 et lacey, 1990**). L'évolution du niveau de contamination par les moisissures est important car elle permet de fournir des informations aussi bien sur la qualité des produits alimentaires que d'éventuelle présence des mycotoxines.

Aspergillus spp(33.33 %)

Trichoderma spp (14.81%),

Penicillium spp (11.11%),

Clodosporium spp (7,41 %)

Ulocladium spp (7,41 %)

Rhizoctone spp (3,70 %)

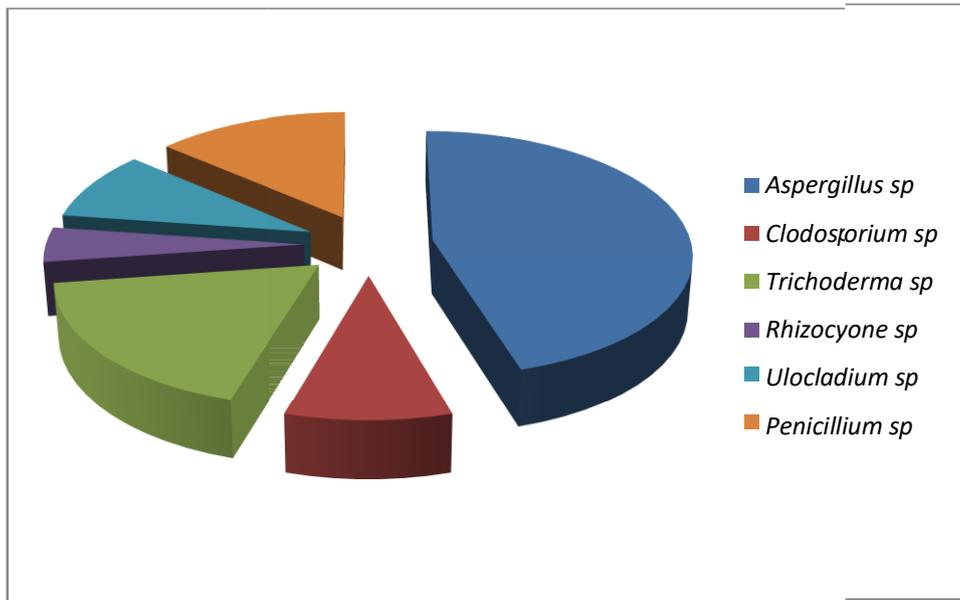


Figure 9 : Secteurs de répartition de différents isolats fongiques isolés à partir de l'échantillon de lait en poudre.

Tableau N°8 : Caractères cultures macroscopiques et microscopiques (×100) des isolats fongiques.

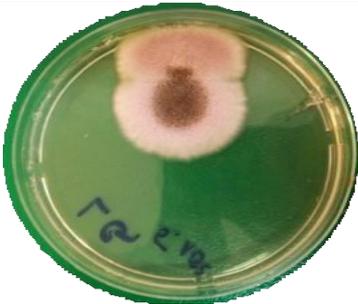
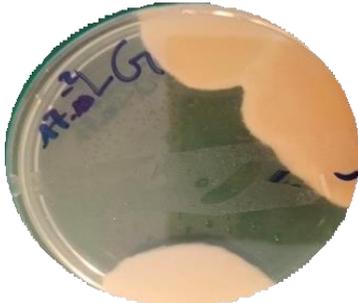
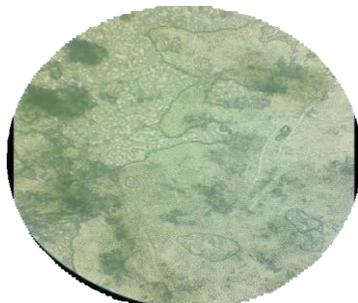
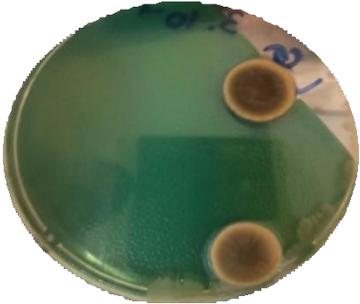
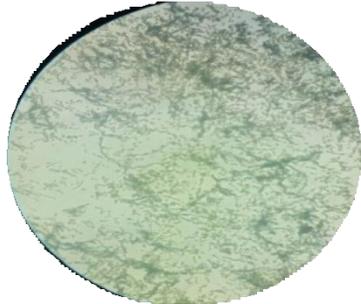
Genre	Aspect macroscopique en surface	Aspect macroscopique en revus	Aspect microscopique	Description macroscopique et microscopique
<i>Aspergillus</i> spp				Surface: colonie rose avec un centre marron foncé. Verso: colonie jaune avec un centre marron. Microscopique : grosses conidies globuleuses (disposition en tête aspergillaire)
<i>Rhizoctone</i> spp				Surface: colonie duveteuse à poudreuse, d'abord blanchâtre. Verso: brun colonie à croissance rapide Microscopique : des hyphes septés .
<i>Clodosporium</i> sp				Surface: colonie poudreuse bleu à centre beige. Verso: colonie beige à centre brun. Microscopique : -Des conidies en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes

Tableau N°8 (suite): Caractères cultures macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques.

Genre	Aspect macroscopique en surface	Aspect macroscopique en revus	Aspect microscopique à 100X	Description macroscopique et microscopique
<i>Aspergillus spp</i>				<p>surface: colonie blanchâtre poudreuse. Verso: colonie jaune.</p> <p>Microscopique : Hyphe : septés</p> <ul style="list-style-type: none"> -Conodiophore : long , et non cloisonné, hylines -Phialides : directement insérées sur la vésicule -Conidies : globulaires, -Tête aspergillaire : unisériée, Radiée
<i>Trichoderma spp</i>				<p>surface: colonie poudreuse, couleur brun avec un centre marron foncé. Verso: brun à centre marron foncé.</p> <p>Microscopiques : des conidies unicellulaires globulaires.</p>
<i>Aspergillus spp</i>				<p>surface: colonie vert foncé puis vert-jaune. Verso: colonie brun.</p> <p>Microscopique : Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire)</p>

II.2. 3 Détection visuelle du pouvoir producteur des mycotoxines

Afin de détecter visuellement la production de mycotoxines, les isolats, ont été ensemencés directement sur le milieu de culture d'extrait de noix de coco (CEA).

Après incubation à 25 °C pendant 7 jours sur milieu CEA (contenant le désoxycholate de sodium à 0,8% comme retardateur de croissance), les boîtes ensemencées par les isolats testés étaient exposées à la lumière UV. Comme montre la **figure(10)** les zones fluorescentes sont spécifiques aux mycotoxines produites par *Aspergillus* spp et *Penicillium* spp. La surface du milieu CEA est également très absorbante de la lumière UV et constitue un arrière-plan efficace pour détecter les zones fluorescentes entourant les colonies correspondant probablement aux aflatoxines et aux ochratoxines.

La détection de la production d'aflatoxines par la visualisation de la fluorescence sur milieu CEA est aussi performante que la détection par CCM. Selon la technique décrite par **Davis et al. (1987) et Fente et al. (2001)** et par chromatographie sur couche mince (CCM) selon **Calvo et al. (2004)**.

La contamination de la mycotoxine est l'un des problèmes majeurs associés à la survenue de champignons filamenteux dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produites principalement par l'espèce des genres d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, entre autres (**Anelli et al., 2019**).

Souza et al (2023) montre que les principaux effets des mycotoxines dans le corps humain sont la toxicité du foie et des reins, la déstabilisation du système immunitaire, la toxicité fœtale et la cancérogénicité; Cependant, il n'est pas facile de prouver que les espèces fongiques peuvent produire une mycotoxine ou si la mycotoxine provoquera des dommages si détectés dans un produit.



Figure 10: Mise en évidence par la fluorescence sous lumière UV (365nm) de la production de la mycotoxine sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CEA).

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

La technique de séparation chromatographique sur couche mince permet de confirmer le résultat obtenu avec la technique de **Lemke et al (1989)**. Dans le milieu YES, les mycotoxines produites par les souches isolées, développent une fluorescence marquée sur le chromatogramme (**Figure 11**).

Les résultats de CCM montrent que les isolats testés produisent au moins 0.5 ppb (poids par billion) qui représente le seuil de détection de la méthode CCM (**Zakaria et Majerus, 1992**).

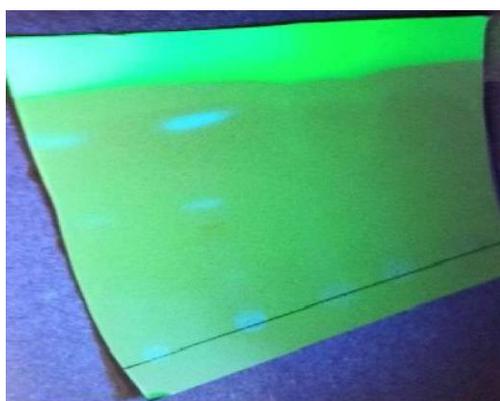


Figure 11: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (365nm) de la production de mycotoxines sur CCM

Parmi **Olsen et al. (2003)** ; **Blumenthal (2004)** ont montré que la sécrétion des métabolites secondaires par les souches fongiques toxigènes dans la poudre de lait dépend également d'autres facteurs liés à l'isolat, par exemple, l'Ochratoxine A (OTA) produite par *Penicillium nordicum* (**Olsen et al., 2003**) , *Aspergillus niger* (**Abraca et al., 1994**). Parmi ces facteurs:

- 1) activité d'eau de la poudre de lait : **Pfohl-Leszkowicz (2001)** ont montré que la disponibilité en eau a une influence déterminante pour les différentes mycotoxines y compris les aflatoxines ;
- 2) défaut d'oxygénation (**Le Bars, 1982**) ;
- 3) Température optimale de toxigénèse (**Moreau, 1991**) ;
- 4) pH permettant la toxigénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique (**Keller et al., 1997**).

CONCLUSION

Conclusion

Cette étude visait à rechercher la présence de champignons filamenteux dans le lait en poudre consommé dans la région d'Ain T'émouchent.

Aux termes de ce travail, les résultats ont montré que les échantillons analysés de lait en poudre étaient contaminés par des champignons filamenteux à un taux de 74% et 6 genres ont été identifiés dans des isolats d'*Aspergillus* et *penicillium* sont productrices de mycotoxines par les deux techniques utilisées sur milieu CEA et YES dont la révélation est visuelle et par CCM pour les deux méthodes respectivement.

La présence des moisissures et mycotoxines constitue une menace pour la santé du consommateur. Faire face au danger des mycotoxines reste difficile à atteindre d'un point de vue appliqué c'est pourquoi nous conseillons aux consommateurs de réduire la consommation de lait en poudre et de le remplacer par le lait du vache.

Les résultats obtenus ouvrent une perspective (1) d'étendre l'étude sur une gamme élevée des échantillons, (2) modéliser la croissance de moisissures dans le produit au long de sa fabrication, distribution et consommation, (3) modéliser la production de mycotoxines.

Le risque lié aux mycotoxines reste inévitable vu que les moisissures sont toujours présentes à cause de leurs caractères ubiquitaires et de leur désamination rapide. Cependant, la minimisation de la contamination et la croissance de champignons peuvent être ciblées.

Au terme de ce travail plusieurs recommandations, peuvent être proposées :

- 1) Respecter le principe d'hygiène et les bonnes pratiques de fabrication ;
- 2) Réduire les quantités de lait en poudre et le remplacer par du lait du vache ;
- 3) Améliorer les conditions de stockage de produits et de matières premières ;
- 4) Sensibiliser les acteurs et les sensibiliser aux dangers des mycotoxines de mycotoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

1. **Abarca, M.L, Bragulat, M.R, Castella, G, Cabanes, F.J. 1994.** Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var-*niger*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2650-2652.
2. **Abdenouri N., Idlimamet A., Kouhila K. 2008.** Etude hygroskopique du lait en poudre. Revue des Energies Renouvelables. Alger. P : 35-44.
3. **AFSSA. 2006.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique”. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines.pdf>
4. **Alais C., Stenne P. 1965.** Étude de la coagulation du lait concentré.45 (443_444), pp 129_136. Hal-00928377
5. **Alzamily, I. A. (2022).** Isolation and Diagnosis of Filamentous Fungi from Dairy Products and Detection their Toxicity. Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology, 8 (2), 1-10.
6. **ARIE. F, SriKumalaningsh et Ariesta .W (2012)**Process engineering of drying milk powder withFoam mat drying method.journal of basic and appliedscientificresearch 2(4) :3588-3592
7. **Anelli, P.; Haidukowski, M.; Epifani, F.; Cimmarusti, M.T.; Moretti, A.; Logrieco, A.; Susca, A.2019.** Fungal Mycobiota and Mycotoxin Risk for Traditional Artisan Italian Cave Cheese. Food Microbiol.78, 62–72.
8. **Atoui A.K. 2006.** Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: étude moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat, institut national polytechnique de Toulouse, 1-10p.
9. **Azza M., Deed M., Aihawary I.I., Aman I. Doaa M. ShahinH ,.2010.**Bactériologique investigation on milk powder in the Egyptien market with emphasis on its safety. Journal Global veterinaria. 4(5) : 424-433.
10. **Bekhouché G N 2011.** Evaluation de la Durabilité des Exploitations Bovines Laitières des Bassins de la Mitidja et d’Annaba. Thèse de Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique d’Alger (ENSA). Algerie. Pp : 49, 58.
11. **Belin J.M, 1996.** Levure In : Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Bourgeois C.M., Mesclé J.F., Zucca J. 2ème édition, France. P : 222-233.
12. **Belmehdi S., Beddar G. 2019.**Etude des moisissures productrices des mycotoxines

Références

isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de Master : Toxicologie. Université
Mohamed el Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj. 53p.

Références

13. **Bennoudia O. 2016.** Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus* section Flavia flatoxinogènes contaminant la farine de blé tendre commercialisées en Algérie. Mémoire de master,. Université Saad Dahlab-Blida. Blida.
14. **Berthier J., Valla G. 2002.** Moisissures-Mycotoxines et Aliments : Du risque à la prévention. Université Claude Bernard Lyon I. Page web consultée le 13 Janvier 2008 [http:// handy.univ-lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html](http://handy.univ-lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html).
15. **Blackwell M., Vilgalys R., James T.Y., Taylor J.W. 2012.** Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.. Version 30 January 2012. <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
16. **Blumenthal, C.Z. 2004.** Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39, 214- 228.
17. **Boiron P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Edition : NATHAN, Paris, 11-16, 28-39, 99-101.
18. **Boquet J. 1993.**Généralités sur les microorganismes 'Biotchnologie' Eds. R. Sriban.Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. pp : 38-46.
19. **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P, Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., et Veau P., 1990.**Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ième Ed. Masson. 512p.
20. **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P, Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau, P., 1999.**Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ième Ed. Masson. 512p.
21. **Bourgeois C.M., Leveau J.M. 1991.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Vol 3 : le contrôle microbiologique.-2ème éd.- Paris : Apria.-454p.
22. **Bourgeois C.M., Mescle J.F., Jucca J. 1996.** Microbiologie alimentaire. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France.
23. **Bousseboua H. 2004.** Cours de microbiologie générale. Edition : Université Mentouri-Constantine, 9-13 p.
24. **Branger A., Richer M.M., Roustel S. 2007.**Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Edition : Educagri. pp : 38.

Références

25. **Brisson J. 2003.** Nutrition, alimentation et reproduction : symposium sur les bovins laitiers, Saint-Hyacinthe. p66.
26. **Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage-Meessen L., Multon J.L., Richard-Molard D., Roquebert M.F. 1998.** Moisissures des aliments peu hydratés. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. 225p.
27. **Calvo AM, Bok J, Brooks W, Keller NP. 2004.** veA est requis pour la production de toxines et de sclérotés chez *Aspergillus parasiticus* .Appl. Environ. Microbiol. 70 : 4733–4739
28. **Carip C. 2008.** Microbiologie, hygiène, bases microbiologiques de la diététique. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. P : 123-128, 318.
29. **Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. 2002.** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France.
30. **Claude M. 1976.** Les mycotoxines dans les produits laitiers. Le Lait, 1976, 56 (555_556), pp.286-303.fhal-00928727f
31. **Cooke W.B., Brazis A.R. 1968.** Occurrence of molds and yeasts in dairy products. Appl. Mycol.Mycopathol. V, 281-289.
32. **Cuero R.G,Hernandez I, CardeanasH,Osorio E ,Onyiah . 1987.** In: M.S. Zuber, E.B.Lillehog and B.L. Renfro (eds). Aflatoxin in Maize. CIMMYT, Mexico.pp.323-333
33. **Damicz W., Budsla., Wski J., Pogorzelski K. 1965.**Influence du traitement thermique du lait sur la dénaturation des protéines du lactosérum.le lait 45(447), «379-386.
34. **Davet P., Rouxel F. 1997.** Détection et isolement des champignons du sol, techniques pratiques. Edition : INRA, pp 27, 32, 33.
35. **Davis, N. D; Iyes, S.K. et Diener, U.L.1987.** Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. Applied and Environmental Microbiology. Vol 53,p1593-1595.
36. **El Khouri A. 2007.** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse Présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
37. **El-Khoury A. 2007.** Champignons mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1). Dans les vignobles libanais : Occurrence et origine. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environ

Références

38. **F.A.O. 1984.** Pertes de qualité des grains alimentaires après la récolte. Édition ROME, 37,41- 42 p.
39. **FAO. 2007.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine [http://www.fao.org/docrep.T4280F.htm](http://www.fao.org/docrep/T4280F.htm).
40. **Fente C. A ,Ordaz J. J .,Vazquez B. I .,Franco C. M. ,Cepeda , A. 2001.** - New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin - producing *Aspergillus* strains . Applied and Environmental Microbiology, 67 (48) , 58-62 .
41. **Fremy J.M., Thomann C. 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments. p 8-10, 13, 14, 23, 47, 79, 127, 149, 179.
42. **Gallot J., Abenhaim L., Guillou M. 2000.** Guide de bonnes pratiques d'hygiène dans l'industrie de semoulerie de blé dur. Édition : Les journaux officiels, 105- 108 p.
43. **Groupe d'Etude des Marchés de Restauration Collective et de Nutrition (GEMRCN). 2009.** Laits et produits laitiers. spécification technique N° B3-07-09 destinée à l'achat public l'OEAP.
44. **Groupement d'Etude des Marchés de la Restauration Collective et de la Nutrition (GEMRCN).2009** .Spécification technique N°B3-07-09 applicables aux laits et produits laitiers, destinée à l'achat public par le GEMRCN et approuvée par décision du 30 juillet du comité exécutif de l'OEAP.
45. **Guezlane T N, Bouras N, Ould el hadj M D. 2016.**les mycotoxines: un danger de santé public. Algerian Journal of arid environment 32 vol. 6, n°1: 32-49
46. **Guinon L., Ribadeau-Dumas L., Vincent E. 1925.** De l'utilisation de la poudre de lait dans les centres d'élevage. 5(46), pp.585-594. Hal-00894807
47. **Guiraud J.P. 1998.** Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 7-9, 98-100 p.
48. **Hachana Y., Aouini W., Lanouar L. Guider M. 2018.**Influence of raw milk quality on skimmed milk powder quality. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology. 50(2). 3015-3024.
49. **Hadj Ahmed I, 2018.** Les risques de contamination du lait infantile Dus à des défauts de conditionnement et à son inadéquate conservation. Spécialité : Technologie agroalimentaire et contrôle de la qualité.
50. **Heritage J., Evans E.G.V., Killington R.A. 1996.** Introductory microbiology. Edition : Cambridge University Press, pp : 8-18-23.

Références

51. **International Commission or Microbiological Specification for Foods (I.C.M.S.F.), 1980.** Microbial Ecology of foods: Vol 2: Food Commodities.- New York : Academic Press.- 997p.
52. **Jeanet R., Croguennec T.L., Mahaut M., Sschuck P., Brulé G. 2008.** Produit laitiers. Lavoisier Tec et Doc. Paris,. P : 4-41.
53. **Jephcott H., Bacharach A.L. 1965.** L'effet de la dessiccation sur les vitamines du lait. 6(54),249-259.
54. **Journal of Animal & Plant Sciences, 2011.** Vol. 10 ,Issue 1 : 1232-1238.
55. **Kandasamy, S.; Park, W.S.; Yoo, J.; Yun, J.; Kang, H.B.; Seol, K.-H.; Oh, M.-H.; Ham, J.S. 2020,** Characterisation of Fungal Contamination Sources for Use in Quality Management of Cheese Production Farms in Korea. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 33, 1002–1011.
56. **Keller, S.E, Sullivan, T.M, Chirtel, S. 1997.** Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH .Industrial Microbiology, Biotechnology. 19, 305- 309.
57. **Kendrick B. 1999.** The fifth kingdom. 2nd edition. Mycologue publications. <http://www.mycolog.com/fifhtoc.html>.
58. **Lacey, J. 1990.** Mycotoxins in UK cereals and their control. Annals of Applied Biology. 25,395-405.
59. **Le Bars,J. 1982.** Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grain/microorganismes, In « Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés», Multon J. L., Tec & Doc Lavoisier Paris (F), 376-393 (1982).
60. **Lemek, P.A., DAVIS, N.D. & CREECHGREGORY, W., 1989.** Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species, applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology 55(7), 1808-1810.
61. **Lemke P.A., Davis N.D., Creechgregory W., 1989.** Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species, applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology 55(7), 1808-1810.
62. **Leveau J.Y., Bouix M. 1993.** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition : Tec&Doc Lavoisier et APRIA. France. p114-115.
63. **Leyral G., Vierling E. 2001.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 3ème Edition, DOIN, Paris, 15-20, 268p

Références

64. **Majerus P, Zakaria Z.,1992.** A rapid, sensitive and economic method for the detection, quantification and confirmation of aflatoxins. *Z LebensmUntersForsch.* Oct;195(4):316-9. doi: 10.1007/BF01187906.
65. **Marasas W.F.O., Kellerman T.S., Gelderblom W.A., Coetzer J.A.W., Thiel P.G., Vander-Lugt J.J. 1988.** Leucoencephalomalacia in a horse induced by Fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. 55 : 197-203.
66. **Marie A., Jean M.L., Norman K., Marcel B., Michel L., Yves F. 2002.** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut National de Santé Publique Quebec. P : 3-19.
67. **Mateo J.J., Mateo R., Jimenez M.2002.** Accumulation of type Atrichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology.* 72, 115-123.
68. **Medina,L.M, Jordano,R (1993).**growth of fungal contamination in fermented milk containing *Bifidobacteria* and *Lactobacillus addophtus*
69. **Michel J.C., Pouliot M., Richard J. 2002.** Lait de consommation In : Science et technologie du lait. Vignola C. 3ème édition. Ecole polytechnique de Montréal Canada, P : 277-316.
70. **Moreau C., 1996.** les Moisissure In : Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. 2ème édition. France, . P : 236-248.
71. **Moreau, C.1991.** Les moisissures, In Bourgeois C. M., and Leveau J. Y. (Eds.), Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires 234-235. Ed Tec. & Doc.
72. **Moubasher, A.-A.H.; Abdel-Sater, M.A.; Soliman, Z.S.M.2018,** Yeasts and Filamentous Fungi Associated with Some Dairy Products in Egypt. *J. Mycol. Med.* 28, 76–86.
73. **Multon J.L., 1982.** Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Derivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. *Technique & Documentation Lavoisier, Paris,* pp. 57.
74. **Nguyen M.T. 2007.** Identification des espèces de moisissures potentiellement productricesde mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam .Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 23- 28, 32- 35p

Références

75. **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000.**L'essentiel en microbiologie. Édition BERTI, Paris, 209- 213, 215- 217, 231- 235 p.
76. **Niro G, Copenhagen.2010.** Milk powder technology evaporation and spray drying écrémé. P: 65, 193, 197.
77. **Olsen, M,Jonsson, N, Magan, N, Banks, J, Fanelli, C, Rizzo, A, Haikar, A, Dabson, A, Frisvad, J, Holmes, S,Olkku, J, Persson, S,J,Borjesson, T. 2003.** Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final report. Quality of Life and Management of Living Ressources. Project No. QLK1-CT-1990-00433.
78. **Penda N.N. et Sow E. 2002.** Contrôle de qualité de déférentes marques de lait en poudre commercialisé en Sénégal. Université Cheikh Anta Dop de Dakar.
79. **Pfiffner A., 2009.** Lait en poudre, <http://www.hls-dhs-dss.ch/textes>
80. **Pfohl-Leszkowicz A. 1999.** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion durisque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Edition : Tec&Doc.
81. **Pfohl-Leszkowicz, A. 2001.**Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed : Tec & Doc, 3-14.
82. **Piyasena P., Moharebv E., McKellar R.C. 2003.** Inactivation of microbes using ultrasound: are views. International Journal of Food Microbiology. 87 - 207–216.
83. **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2007.** Microbiologie. 2ème édition française. Edition : DE BOECK, Bruxelles, 553- 558 p.
84. **Repussard C., Zbib N., Tardieu D., Guerre P. 2013.** Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française..164(12) : 583-606.
85. **Roquebert M.F. 1984.** Introduction à la mycologie : morphologie et systématique des principales espèces de moisissures. In : Multon et Cahagnier. Les mycotoxines : connaissances actuelles et risques pour la santé publique dans la chaîne alimentaire. Edition : APRIA, Paris, 3-8 p.
86. **Salahudin A., Nuralanwar M. 2006.** Microbial counts of dried powder Milk Available in local Markets of bangladesh. 23(2): 162-164.
87. **Schuck P., Piat M., Méjean S., Fauquant J., Brulég., Maubais J.L. 1994.** Déshydratation des laits enrichis en caséine micellaire par microfiltration; comparaison des propriétés des poudres obtenues avec celles d'une poudre de lait ultra-propre. Elsevier INRA. P : 47-63.
88. **Souza, L.V.; Rodrigues, R.d.S.; Fusieger, A.; da Silva, R.R.; de Jesus Silva, S.R.; Martins, E.; Machado, S.G.; Caggia, C.; Randazzo, C.L.; de Carvalho, A.F.2023.**

Références

- Diversity of Filamentous Fungi Associated with Dairy Processing Environments and Spoiled Products in Brazil. 12, 153. <https://doi.org/10.3390/foods12010153>
89. **Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
90. **Torkar, K.G.; Vengušt, A.2008.** The Presence of Yeasts, Moulds and Aflatoxin M1 in Raw Milk and Cheese in Slovenia. *Food Control*, 19, 570–577.
91. **Watier B. 1992.** Vitamines et technologie alimentaire In "Aspects nutritionnels des constituants des aliments. Influence des technologies". Edition. Tec et Doc . Lavoisier, Paris. pp : 197-216.
92. **Yiannikouris A., Jouany J.P. 2002.** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal, *INRA Prod.*, 15 (1) : 3-16.
93. **Zbib N., Repussard C., Tardieu D., Guerre P. 2014.** Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. 165 (3-4) : 116-135.
94. **GAIANI CLAIRE. (2006).** Étude des mécanismes de réhydratation des poudres laitières, influence de la structure et de la composition des poudres. Thèse de doctorat de l'INPL Spécialité. Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut national polytechnique de LORRAINE.
95. **SCHUCK PIERRE, DOLIVET ANNE, JEANTET ROMAIN. (2012) .** Les poudres laitières et alimentaires. Edition TEC et DOC. Lavoisier
96. **THOMAS MARIE E. C.(2004).**Influence de l'activité de l'eau sur les interactions lactose / β lactoglobuline de poudres laitières modèles lyophilisées. Thèse de doctorat de l'INPL Spécialité Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut National Polytechnique de LORRAINE.
97. **AZZA M., DEEB M., Al HAWARY I., AMAN I et DOAA SHAHINE. (2010).** Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian Market With Emphasis on its Safety. *Global Veterinaria*, 4(5), 424-433.
98. **JEANTET R., CROGUENEC T., MAHAUT M., SCHUCK P. et BRULE G., (2008) .** Les produits laitiers ,2ème édition, Tec et Doc, Lavoisier:
99. **Dutruc-Rosset G. (2003).** Techniques analytiques et de contrôle (Codex œnologique). Partie microbiologique. Office International de la Vigne et du Vin. 23 pp.
100. **Chabasse D, Bouchra J-P, De Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. 2002.** Les Moisissures d'Intérêt Médical. Cahier de formation N° 25, Bioforma : Paris ; 160.

Références

101. **Nicklin J., Graeme-Cook K., Page T., Kikington R. (2000):** L'essentiel en microbiologie, Edition BERTI, Paris.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture : milieu à l'extrait de levure, dextrose, oxytétracycline et agar-agar :

Composition	quantité
Extrait de levure en poudre	5g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillé	900ml

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15min avec **pH=6,6**

Annexes

Milieu YES (Yeast Extract) :

Milieu de culture	Composition
Milieu YES	Sucrose..... 40g
	Extrait de levure 20g
	L'eau distillée..... 1000ml

Autoclave pendant 15min à température de 121°C

Milieu CEA (noix de coco) :

Milieu de culture	Composition
Milieu CEA	noix de coco100g
	Agar-agar.....20g /l
	L'eau distillé..... 300ml

Autoclave pendant 15min à température de 121°C

Annexes

Annexe 2:

Les préparations des milieux de cultures utilisés

Milieu solide :

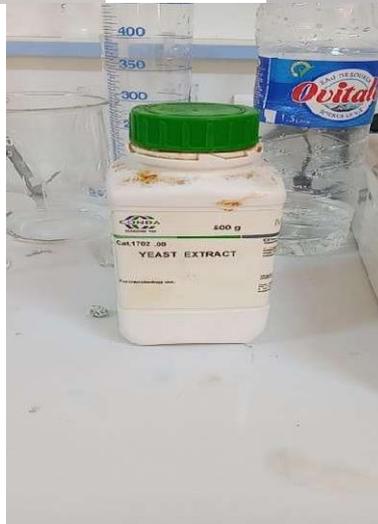
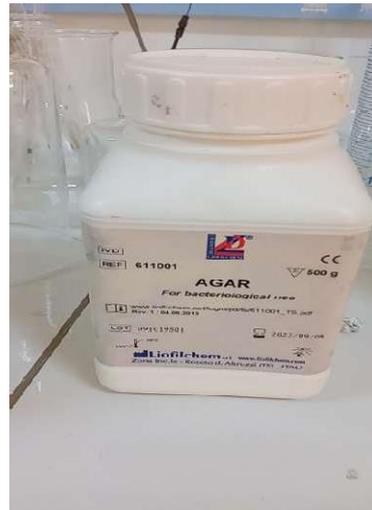
Mode opératoire du milieu de base :

Dans une balance électronique, On pèse sur verre de montre un 15g du agar, puis 5g du l'extrait de levure et 20g du glucose ensuite en ajoutant 900ml de l'eau distillé . on l'agit jusqu'à homogénéisation ,On le met dans le bain marin jusqu'à solidification , puis on le met directement dans l'autoclave d'une durée de 15 MIN (118-120°C) .

Pour chaque échantillon, On prend 2 boîtes de pétri recouvertes le milieu de la gélose à l'extrait de levure, dextrose, oxytétracycline et agar-agar (on a préparé le milieu de levure selon le **journal officiel 2017**) et stériliser à l'autoclave à 121 C° pendant 15 min puis refroidie à 45°C

Ajouté 1 ml de la solution chlorhydrate d' oxytétracycline dans le milieu (préparation selon le **journal officiel 2017**) , puis solidifier le milieu dans les boîtes de Pétri.

Annexes



Mode opératoire de milieu à base d'extrait de noix de coco :

100grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisé pendant 5min avec 300ml D'eau distillé chaude dans un bécher .la solution est filtré à l'aide du tissu d'agar a été (20g/litre) .le mélange a été alors stérilisé à 121°C pendant 15min



Annexes

Milieu liquide :

Mode opératoire du milieu YES:

Sur une balance électronique, On pèse dans un bécher 20g d'extrait de levure et ajoute 40g de sucre, puis 1g de phosphate dihydrogène de potassium anhydre (KH_2PO_4), ensuite ajoute 0,5 g de sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO_4), puis 15g d'agar. Finalement ajoute 1 litre d'eau distillée. On agite le mélange jusqu'à l'homogénéisation.

Dans chaque flacon on met 50mL du bouillon préparé (Milieu YES) , puis ajoute dans chaque flacon 0,5ml de vitamine B12.



