

République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Témouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de sciences de la nature et de la vie



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

**Etude de l'effet des conditions de préparation du pain sur la
croissance des moisissures toxigenes : cas boulangeries de la région
d'Ain Témouchent**

Présenté Par :

- 1) Melle. BOUHADJAR Ikram
- 2) Melle. BOUDIEB Soumia

Devant le jury composé de :

Dr. OUADAH Y	M C B	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Présidente
Dr. CHIBANI H-E	M C B	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Examinatrice
Dr. ZIANE M	M C A	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2021/2022

Résumé :

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les moisissures toxigènes dans les produits alimentaires notamment le blé tendre et par la suite la farine boulangère. Par conséquent, leur présence dans les produits alimentaires peut engendrer des effets néfastes sur la santé humaine et animale. L'objectif de ce travail est de rechercher et dénombrer les moisissures omniprésentes dans la farine boulangère ainsi que de mettre en évidence leur pouvoir mycotoxinogène. Pour cela, un total de 63 échantillons de la farine a été collecté au niveau des boulangeries de la région d'Ain Témouchent (Hammam Bouhdjar, El malah, Ain Témouchent). Le dénombrement des moisissures a été réalisé sur milieu Dichloran contenant l'oxytétracycline. Les résultats ont montré que 98.91% des échantillons étudiés étaient contaminés par les moisissures. L'identification des genres fongiques omniprésents reposait uniquement sur l'analyse des critères microscopiques, révélée la présence de onze(11) genres fongiques à savoir *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Exopiala*, *Microsporum*, *Auerobasidium*, *Trichothecium*, *Trichosporon*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Streptomyces*, avec la dominance de trois premiers genres. Quant au pouvoir toxigène, la production de mycotoxine a été testée sur milieu CEA et milieu YES par la détection visuelle et CCM respectivement. La détection visuelle a montré que seulement les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont produit les mycotoxines traduites par une fluorescence sous l'UV (365 nm). Cette production a été confirmée sur milieu YES après révélation sur la CCM. En plus ces isolats ont montré une capacité de croissance représentée par les taux de croissance comprise entre 0.90 et 1. Cette capacité de croissance et de production de mycotoxine constitue un véritable danger qui menace la santé de consommateur. A cet effet, la simulation de la croissance durant le stockage de la farine chez la boulangerie a montré une croissance remarquable qui dépasse le seuil (4 log) régi par la réglementation algérienne pour la farine avec 0.06 pétrins durant le mois de Janvier. Les résultats de ce travail présentent un intérêt dans le management du risque microbiologique lié aux mycotoxines dans la consommation humaine.

Mots clés : Farine, moisissures, *Aspergillus*, *Penicillium*, mycotoxines, Algérie.

Abstract:

Mycotoxins are secondary metabolites produced by toxigenic molds in food products, especially soft wheat and subsequently bakery flour. Consequently, their presence in food products can cause adverse effects on human and animal health. The objective of this work is to research and enumerate the ubiquitous molds in the bakery flour and to highlight their mycotoxinogenic power. For this, a total of 63 samples of flour were collected from bakeries in the region of Ain-Temouchent (Hammam Bouhdjar, El Malah, and Ain Témouchant). The enumeration of molds was conducted on Dichloran medium containing oxytetracycline. The results showed that 98.91% of the samples studied were contaminated by molds. The identification of ubiquitous fungal genera was based solely on the analysis of microscopic criteria, revealed the presence of eleven (11) fungal genera namely *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Exopiala*, *Microsporum*, *Auerobasidium*, *Trichothecium*, *Trichosporon*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Streptomyces*, with the dominance of the first three genera. As for the toxinogenic power, the production of mycotoxin was tested on CEA medium and YES medium by visual detection and TLC respectively. The

visual detection showed that only the genera *Aspergillus* and *Penicillium* produced mycotoxins translated by a fluorescence under UV (365 nm). This production was confirmed on YES medium after revelation on TLC. In addition, these isolates showed a growth capacity represented by growth rates between 0.90 and 1. This capacity of growth and production of mycotoxin constituted a real danger that threatens the health of consumers. To this end, the simulation of growth during the storage of flour at the bakery showed a remarkable growth that exceeds the threshold (4 log) governed by Algerian regulations for flour with 0.06 kneaders during the month of January. The results of this work are of interest in the management of microbiological risk related to mycotoxins in human consumption.

Keys words: Flour, Molds, *Aspergillus*, *Penicillium*, Mycotoxins, Algeria

ملخص

السموم الفطرية هي نواتج أيضية ثانوية تنتجها العفن السمي في المواد الغذائية، وخاصة القمح ومن ثم دقيق الخبز. وبالتالي، فإن وجودها في المنتجات الغذائية يمكن أن يتسبب في آثار ضارة على صحة الإنسان والحيوان. الهدف من هذا العمل هو البحث عن الفطريات الموجودة في دقيق المخبوزات وحسابها، بالإضافة إلى تسليط الضوء على قوتها المسببة للسموم الفطرية. لهذا الغرض، تم جمع ما مجموعه 63 عينة طحين من المخازن في منطقة عين تموشنت (حمام بوحجر، المالح، عين تموشنت). تم تعداد الفطريات على وسط ديكلوران الذي يحتوي على أوكسي تتراسيكلين. أظهرت النتائج أن 98.91% من العينات المدروسة كانت ملوثة بالعفن. استند تحديد الأجناس الفطرية على تحليل المعايير المجهرية، وكشف عن وجود أحد عشر (11) جنسًا من الفطريات وهي اسبيرجلوس والبنسليوم والكلادوسبوريوم والإكسوبيالا والميكروسبوروم والأيروباسيديوم والتريكوثيكوم والتريكوذيرما والمخاطية. مع هيمنة الأجناس الثلاثة الأولى. بالنسبة لقوة السموم، تم اختبار إنتاج السموم الفطرية على وسط مستخلص جوز الهند ووسط مستخلص الخميرة عن طريق الكشف البصري وس.س.م على التوالي. أظهر الاكتشاف المرئي أن الأجناس اسبيرجلوس والبنسليوم فقط هي التي أنتجت السموم الفطرية التي يتم التعبير عنها بواسطة التآلق تحت الأشعة فوق البنفسجية (365 نانومتر). تم تأكيد هذا الإنتاج على وسط مستخلص الخميرة بعد الكشف على س.س.م. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت هذه العزلات قدرة نمو ممثلة بمعدلات نمو تتراوح بين 0.90 و1. تشكل هذه القدرة على النمو وإنتاج السموم الفطرية خطرًا حقيقيًا يهدد صحة المستهلكين. ولهذا الغاية، أظهرت محاكاة النمو أثناء تخزين الدقيق في المخبز نموًا ملحوظًا تجاوز العتبة (4 لو غاريمات) التي تحكمها اللوائح الجزائرية للدقيق بـ 0.06 عجن خلال شهر يناير. نتائج هذا العمل ذات أهمية في إدارة المخاطر الميكروبيولوجية المتعلقة بالسموم الفطرية في الاستهلاك البشري.

الكلمات المفتاحية: طحين، فطريات، اسبيرجلوس، بنسليوم، سموم فطرية، الجزائر

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné le courage et la force pour mener ce modeste travail jusqu'au bout.

*Nos sincères remerciements et notre respect vont à notre encadreur **Mr. ZIANE Mohammed**, MCA à l'université d'Ain Témouchent, pour les efforts qu'il a déployé, pour nous aider, conseiller, encourager et corriger.*

*Nous exprimons aussi notre profonde reconnaissance et nos remerciements aux membres **Dr OUADAH Yamina** & **Dr CHIBANI HE**, Maîtres de conférences à l'Université de Ain Témouchent d'avoir accepté d'évaluer notre travail, nous espérons qu'il puisse leur donner satisfaction.*

Nos salutations s'adressent aussi à tous nos enseignants pour leurs contributions à notre formation durant nos études.

En fin, nous profitons de l'occasion pour remercier tous ceux de près ou de loin qu'ont contribué à la réalisation de ce travail. Trouvent ici notre sincère reconnaissance.

Ikram & Soumia

Dédicaces

Arrivé au terme de mes études par la grâce de dieu.

Je dédie ce modeste travail :

À mes parents, à ma source de générosité et de patience tout au long de ma carrière scolaire. Que Dieu vous protège, vous prêtez bonne santé et longue vie.

A la mémoire de mes grands-mères, Qu'elles reposent en paix,

A mon grand-père, qui n'a jamais manqué de ses supplications bénies, je prie que Dieu te guérisse

A ma chère sœur Wafaa Et notre petit ange Jad

A mes chères cousines Wissem, Nor el Houda et Lina

Qui m'ont toujours soutenu.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fait de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

A Soumia chère sœur et amie avant d'être binôme

Merci énormément pour ton soutien plus que précieux, merci pour ton grand cœur pour tous les moments magiques qu'on a passé ensemble et pour le sourire que tu as su toujours dessiner sur mon visage.

Aux personnes qui m'ont accompagné durant mon cursus universitaire,

À mes amies pour ses encouragements Permanents, et son soutien

BOUHADJAR Ikram

Dédicaces

Arrivé au terme de mes études par la grâce de dieu.

Je dédie ce modeste travail :

À mes parents, à ma source de générosité et de patience tout au long de ma carrière scolaire. Que Dieu vous protège, vous prêtez bonne santé et longue vie.

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mes chères sœurs Hadjera, Hayet et Kholoud

A mon frère Aziz.

A ma chère cousine Lina

Qui m'ont toujours soutenu.

Les petits anges qui font la joie de la famille «Iyed, Ayoub, Lujaine»

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fait de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

A Ikram chère sœur et amie avant d'être binôme

Pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passés avec toi, pour tout l'amour, le soutien que tu m'as offert et de ton affection dont je ne peux me passer, je te remercie très fort et je ne t'oublierai jamais

Aux personnes qui m'ont accompagné durant mon cursus universitaire,

À mes amies pour ses encouragements Permanents, et son soutien

BOUDIEB Soumia

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 Généralités sur la farine du blé

1.1. Définition	3
1.2. Composition de la farine	3
1.2.1. L'eau	3
1.2.2. Protéines	3
1.2.3. Amidon	3
1.2.4. Matière grasse (Lipides)	3
1.2.5. Matière minérale	4
1.2.6. Vitamines	4
1.2.7. Les enzymes	4
1.3. Caractéristiques de la farine	4
1.3.1. Caractéristiques organoleptiques	4
1.3.1.1. Aspect	4
1.3.1.2. Essai au toucher	5
1.3.1.3. Odeur	5
1.3.1.4. Saveur	5
1.3.2. Caractéristiques physico-chimiques et technologiques	5
1.4. Types de farines	6
1.5. Qualité réglementaire de la farine	6
1.5.1. Contaminants chimiques	6
1.5.2. Qualité microbiologique de la contamination microbiologique des farines	6
1.5.3. Conditionnement	7
1.6. Panification	8

Chapitre 2 : Généralités sur les moisissures

2.1. Définition	9
2.2. Classification des moisissures	9
2.2.1. Zygomycotina	9
2.2.2. Ascomycotina	9
2.2.3. Basidiomycotina	10
2.2.4. Deuteromycotina	10
2.3. Écologie des moisissures	10
2.4. Morphologie des moisissures	11
2.5. Mode de vie	12
2.6. Reproduction des moisissures	12
2.6.1. Reproduction asexuée	13
2.6.2. Reproduction sexuée	13
2.7. Conditions de développement des moisissures	14
2.7.1. Éléments nutritifs	14
2.7.2. Activité d'eau	15
2.7.3. Température	15
2.7.4. pH	15
2.7.5. Lumière	16
2.7.6. Oxygène	16
2.8. Rôle de moisissures	16

Chapitre 3 Généralités sur les mycotoxines

3.1. Définition	17
3.2. Nature et origine des mycotoxines	17
3.3. Moisissures mycotoxinogènes	17
3.3.1. <i>Aspergillus</i>	18
3.3.2. <i>Fusarium</i>	18
3.3.3. <i>Penicillium</i>	18
3.3.4. <i>Alternaria</i>	19
3.4. Principales mycotoxines	19
3.4.1. Aflatoxines	19
3.4.2. Ochratoxines	20
3.4.3. Trichothécènes	20
3.4.4. Zéaralène	20
3.4.5. Fumonisines	20
3.4.6. Patuline	21
3.5. Facteurs de la mycotoxinogénèse	21
3.5.1. Composition du substrat	21
3.5.2. pH	21
3.5.3. Activité d'eau (a_w)	21
3.5.4. Composition gazeuse	22
3.5.5. Température	22
3.6. Effets des mycotoxines	22

MATERIEL ET METHODES

4.1. Echantillonnage	24
4.2. Analyses mycologiques	25
4.2.1. Préparation des échantillons	25
4.2.2. Dénombrement des colonies	25
4.2.3. Purification des moisissures	26
4.2.4. Identification des isolats fongiques	26
4.2.4.1. Observation macroscopique	26
4.2.4.2. Observation microscopique	27
4.3. Étude de la production des mycotoxines	27
4.3.1. Détection visuelle de la production de mycotoxine	27
4.3.2. Détection de mycotoxine par la CCM	27
4.4. Caractérisation de la croissance des isolats de moisissures	28
4.5. Effet des conditions de stockage de la farine sur la croissance de moisissure	29

Résultat et discussion

5.1. Prévalence de contamination de la farine	31
5.2. Dénombrement des moisissures	31
5.3. Identification des moisissures	32
5.4. Répartition de genres fongique et leur concentration	37
5.5. Révélation mycotoxicologique	39
5.5.1. Révélation des souches productrices de mycotoxines par milieu CEA	39
5.5.2. Révélation des souches productrices de mycotoxines par CCM	40
5.6. Caractérisation de la croissance des moisissures	41
5.7. Effet de condition de préparation de pain sur croissance de moisissures testées	42

Conclusion générale et perspectives	44
Références bibliographiques	45
Annexes	
Résumé	

Liste des figures

Figure 1 : Représentation systémique du processus de panification française et de ses variables	8
Figure 2 : Thalle filamenteux	12
Figure 3: Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée des champignons	14
Figure 1 : Région de prélèvement de la farine	24
Figure 2 : Répartition des genres fongiques isolés de la farine	38
Figure 3 : Détection sous UV des souches productrices de mycotoxines sur milieu CEA	39
Figure 4 : Détection des souches productrices de mycotoxines par CCM	40
Figure 9 : Cinétique de croissance d'<i>Aspergillus</i> B2	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Spécifications techniques de la farine	5
Tableau 2: Type des farines	6
Tableau 3 : Spécification microbiologique	7
Tableau 4: principaux genres de classes des moisissures	10
Tableau 5 : Principales mycotoxines et moisissures productrices et leurs effets probables des sur l'homme	23
Tableau 6 : Méthodologie, variable et distributions utilisés pour l'estimation de concentration de moisissure durant le stockage de la farine	30
Tableau 7 : Dénombrement de la flore fongique dans la farine de différentes boulangeries	32
Tableau 8: Identification macroscopique de moisissures isolées à partir de la farine boulangère	33
Tableau 9: Identification microscopique des moisissures	35
Tableau 10: Concentration des moisissures isolées dans cette étude	38
Tableau 11 : Répartition des isolats producteurs de mycotoxine	40
Tableau 12 : Paramètres de croissance de l'ensemble des moisissures testés	42
Tableau 13 : Paramètres de croissances de chaque genre de moisissures	42
Tableau 14 : Résultats de la simulation de Monte Carlo	43

LISTE DES ABREVIATIONS

AFs: Aflatoxines totales

AFB1: Aflatoxine B1

AFB2: Aflatoxine B2

AFG1: Aflatoxine G1

AFG2: Aflatoxine G2

AFM1: Aflatoxine M1

OTA: Ochratoxine A

NIV : nivalénol

DON : le déoxynivalénol

DAS : diacétoxyscirpéno

°C : Degrée Celsius

µl : Microlitre équivalent de 10⁻⁶ litre

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acideribonucléique

FAO: Food and Agriculture organisation of the United Nations

g : Gramme

min : Minute

µm : micromètre

sp : Specie (espèce)

a_w : Activité d'eau

pH: Potentiel hydrogène

Co₂ : Dioxyde de carbone

mL: Millilitre

PDA: Potato Dextrose Agar

YES: Yeast Extract Sucrose

CEA: Coconut Extract Agar

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

UV : Ultraviolet

% : Pourcentage

IARC : agence internationale de recherche sur le cancer

Introduction

Introduction :

Le blé représente 60% de la ration alimentaire des algériens (Sebai, 2010) en raison de leur source d'énergie et leur grande richesse en protéines. Il est consommé sous plusieurs formes brute ou transformée. La farine est le produit major issu de blé tendre. Elle est utilisée surtout pour la fabrication des gâteaux et du pain. L'Algérie est le premier pays consommateur de pain dans le monde avec 49 millions de baguettes chaque jour (Belhocine, 2010).

Durant la fabrication de la farine, aucun traitement d'élimination des microorganismes n'est appliqué. A cet effet, la farine garde toujours la flore initiale de contamination de la matière première utilisée. Il est très connu que la principale flore contaminant de blé est la flore fongique à cause de (1) ses propriétés physico-chimiques notamment activité d'eau faible, et (2) sa cultivation en plein air. Cette contamination fongique peut être augmentée par le changement climatique constaté ces dernières années. En effets, plusieurs auteurs ont montré la présence de certaines espèces fongiques à savoir *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium citreoviride*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium martensii*, *Penicillium patulum*, *Penicillium pubertum* (Rezazadeh et al., 2013).

Les travaux de Awuchi et al. (2021) ont montré la capacité de ces moisissures de se développer dans ces conditions en produisant des métabolites secondaires appelée mycotoxines. Ces derniers sont des substances naturelles produites par un métabolisme secondaire des moisissures tout en exerçant un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) une fois ingérées même en faibles concentrations. Leur problème réside également dans leur consommation répétée qui peuvent engendrer des intoxications chroniques.

Dans ce contexte, ce travail visait à (1) rechercher et dénombrer les moisissures mycotoxinogènes, (2) déterminer les paramètres de croissance de ces moisissures ainsi (3) d'évaluer l'effet de conditions de stockage de la farine boulangère chez le boulangers et l'effet de conditions de panification sur la croissance de moisissures mycotoxinogènes.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons divisé notre travail en trois parties après une introduction :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui est divisé en 3 chapitres : le premier chapitre est consacré aux généralités sur la farine, le deuxième chapitre est consacré aux généralités sur les moisissures, tandis que le troisième chapitre présente des généralités sur les mycotoxines ;
- La deuxième partie est consacré au matériel et méthodes qui décrit les protocoles expérimentaux ;
- Dans la troisième partie nous avons présenté les principaux résultats et leurs discussions.

Terminant avec une conclusion générale et quelques perspectives. Enfin, le manuscrit s'achève par la présentation des références bibliographiques et les annexes.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur la farine du blé

1.1. Définition :

Selon Codex.stan (1985), la farine de blé est le produit élaboré à partir des grains de blé ordinaire, *Triticum aestivum* L. ou blé ramifié, *Triticum compactum* Host., ou tous mélanges de ces derniers, par procédés de mouture ou de broyage dans lesquels le son et le germe sont partiellement éliminés et le reste réduit en poudre suffisamment fine.

1.2. Composition de la farine :

La farine boulangère est composée de plusieurs éléments nutritionnels.

1.2.1. L'eau :

Souhaitable et requis dans les moulins afin d'avoir un blé de qualité pour la mouture est de 14.5 à 15.5 %. Au-delà de 16 %, la farine se conserve difficilement (Anonyme, 2014).

1.2.2. Protéines :

La teneur en protéines des farines de blé destinées à la fabrication des produits de cuisson à base de céréales varie de 7 à 15 % (Salem, 2008). Elle est fonction de la teneur en protéines des blés mis en mouture, de la répartition de celles-ci dans le grain, et du taux d'extraction de la farine par rapport au grain (Salem, 2008). Selon Doumandji et al. (2003), les protéines de la farine peuvent être classées en fonction de leur solubilité dans différents solvants:

- L'eau et les solutions salines : Albumine et globuline;
- L'alcool : Prolamine;
- Solutions acides et basiques dilués : Glutaline.

1.2.3. Amidon :

Représente 65 à 70 % du poids total de la farine, c'est une forme de réserve des glucides chez les plantes. Il contient dans sa structure deux polymères: l'amylose et l'amylopectine. Ces molécules absorbent l'eau, et sous l'effet de la chaleur, elles forment un gel essentiel à la transformation de la farine (Feillet, 2000).

1.2.4. Matière grasse (Lipides) :

La farine du blé tendre renferme approximativement de 2 à 2,5% des lipides. Cette fraction grasse est traditionnellement classée, en fonction de leur solubilité lors de l'extraction

sélective, en lipides liés à l'amidon (polaires), et les lipides non liés à l'amidon. Ces derniers englobent les lipides libres (polaires et apolaires) et les lipides liés aux autres constituants (Fetouhi, 2014).

1.2.5. Matière minérale :

Appelées aussi cendres, représente 0.45 à 0.60 % du poids de la farine. Elles sont principalement composées de potassium, Phosphore, Magnésium, soufre ...etc. (Godon et al, 1998).

Les matières minérales sont actuellement utilisées comme critère de la pureté de la farine. En fonction de leur concentration dans la farine. Nous distinguerons des farines dites supérieures, panifiables ou de substitutions (Joradep 1993).

1.2.6. Vitamines :

Une farine complète de blé tendre contient la totalité des vitamines initialement présentes dans le grain. Une farine dont le taux d'extraction est de 75 à 80 % contient environ 20 % de la vitamine (B6), 25 % de biotine, 30 % d'acide nicotinique (B1), 55 % de l'acide pantothénique (B12) et 70 % de la vitamine E (Bornet, 1992).

1.2.7. Les enzymes :

Les enzymes sont présentes en petite quantité dans la farine. Les plus courants sont les protéases, les lipases, les lipoxygénases et les amylases. Quoique la documentation rapporte aussi la présence de phytases (une phosphatase), de peroxydases et de catalases (Boudreau et Ménard, 1992).

1.3. Caractéristiques de la farine :

1.3.1. Caractéristiques organoleptiques :

Boutroux (1897) a décrit les principales caractéristiques organoleptiques et les méthodes simples pour leur évaluation.

1.3.1.1. Aspect :

La couleur de la farine doit être d'un blanc jaunâtre.

1.3.1.2. Essai au toucher :

La farine ne doit pas s'agglomérer spontanément en grumeaux d'une certaine consistance. Frottée entre les doigts, elle ne doit pas être trop douce, trop glissant. Elle doit être légèrement granuleuse : pressée dans la main elle doit s'agglomérer mollement en pelote, et non échapper entièrement.

1.3.1.3. Odeur :

L'odeur ne saurait être décrite, mais fournit renseignements précieux : elle doit être agréable.

1.3.1.4. Saveur :

La saveur doit être douce, sans amertume ni gout de moisi. Introduite dans la bouche, la farine doit se mêler facilement à la salive : elle ne doit pas croquer sous la dent.

1.3.2. Caractéristiques physico-chimiques et technologiques :

Quant aux caractéristiques physicochimiques et technologiques de la farine, les dispositions du décret N°91-572 de 1991 relative à la farine et au pain, ont données les spécifications techniques de la farine :

Tableau 1 : Spécifications techniques de la farine (décret N°91-572 de 1991).

Spécification	Définition	Normes
Teneur en eau	Quantité d'eau	≤15.5%
Indice de chute	La quantité d'alpha-amylase	180 à 280 sec
Rapport de configuration P/L	La ténacité P/la longueur L	0.45 à 0.65
Indice de Zeleny	La quantité de gluten sec	22 à 30
Travail de déformation W	La force boulangère	= 180

1.4. Types de farines :

Comme montre le tableau 2, la désignation de type de la farine est basée sur le poids des cendres contenu dans 100 grammes de matières sèche.

Tableau 2: Type des farines (Guinet, 2004).

Dénomination Type	Taux de cendres de la farine (% ramené à la matière sèche)
45	Au-dessous de 0.50%
55	De 0.5 à 0.60 %
65	De 0.62 à 0.75%
80	De 0.75 à 0.90%
110	De 1.00 à 1.20
150	Au-dessus de 1.40%

1.5. Qualité réglementaire de la farine :

Selon codex *alimentarius* (Codex.stan, 1985) les critères régissant la qualité de la farine :

1.5.1. Contaminants chimiques :

- **Métaux lourds** : La farine de blé doit être exempte de métaux lourds en quantités susceptibles de présenter un risque pour la santé humaine.

- **Résidus de pesticides** : La farine de blé doit être conforme aux limites maximales de résidus fixées par la Commission du Codex Alimentarius pour ce produit.

- **Mycotoxines** : La farine de blé doit être conforme aux limites maximales de mycotoxines fixées par la Commission du Codex Alimentarius pour ce produit.

1.5.2. Qualité microbiologique de la contamination microbiologique des farines :

Selon la réglementation Algérienne, la farine doit être répondre aux spécifications microbiologiques illustrés sur le tableau 3.

Tableau 3 : Spécification microbiologique (Joradp, 2017).

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Farines et semoules	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10	10 ²
	<i>Staphylocoques à coagulase +</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Bacillus cereus</i>	5	2	10 ³	10 ⁴
	Moisissures	5	2	10 ³	10 ⁴
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	10 ²	10 ³

1.5.3. Conditionnement :

La farine doit être emballée dans des récipients fabriqués avec des matériaux sans danger et convenant à l'usage auquel ils sont destinés et qui permet la préservation des qualités hygiéniques, nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du produit.

1.6. Panification :

Le processus de panification est structuré par une succession d'opérations unitaires ou procédés unitaires.

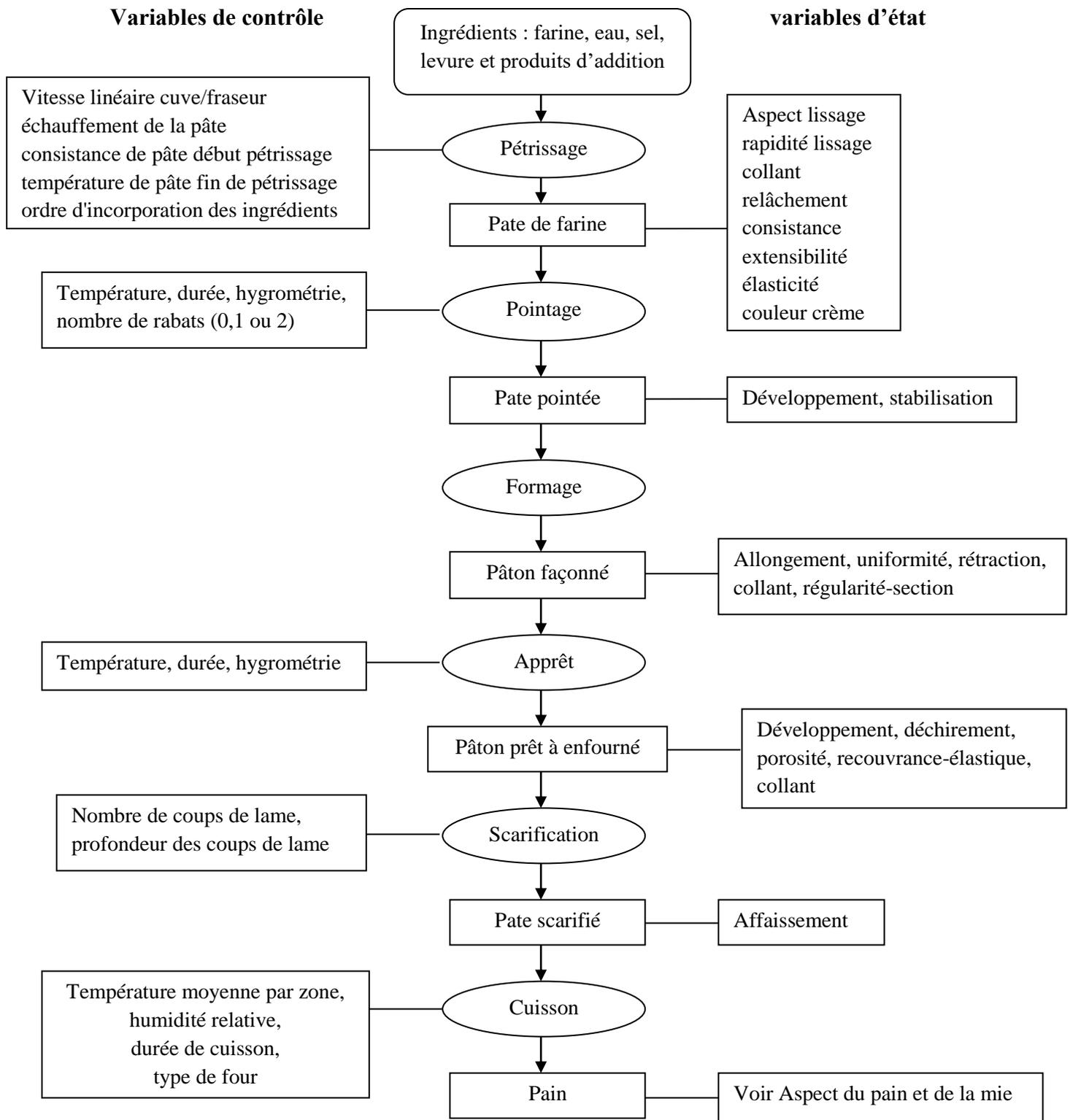


Figure 1 : Représentation systémique du processus de panification française et de ses variables (Aamir, 2010)

Chapitre 2

Généralités sur les moisissures

2.1. Définition :

Le terme "moisissure" est couramment utilisé pour désigner les champignons microscopiques. Ce sont des micro-organismes eucaryotes dont les cellules s'allongent pour former des filaments, coenocytiques (non cloisonnées) ou septés (cloisonnées), d'environ 2 à 12 µm de diamètre. L'enchevêtrement des filaments produit du mycélium.

Les champignons sont généralement hétérotrophes, saprophytes et capables de se multiplier dans divers environnements en raison de leurs capacités métaboliques étendues.

Les champignons filamenteux sont omniprésents dans l'air, l'eau, le sol, les plantes vivantes ou en décomposition, dans les matières premières (Carlotti, 2014).

2.2. Classification des moisissures :

La taxonomie est liée à la façon de percevoir les organismes, et la classification reflète cette perception. La classification actuelle tient compte de tous les caractères héréditaires des organismes, comme les caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques, écologiques et éthologiques, et les séquençages d'ADN, d'ARN et des protéines (McNeil, 2019).

La classification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères morphologiques (structure du mycélium), et au mode de reproduction (sexuée ou asexuée), pour définir les grandes classes de moisissures : les Zygomycotina, les Ascomycotina, les Basidiomycotina, et les Deutéromycotina (Fungi imperfecti).

2.2.1. Zygomycotina :

Cette division qui est caractérisée par la production de spores sexuées appelées zygospores. Ils sont considérés, comme des champignons inférieurs. Deux caractéristiques les différencient des autres champignons dits « supérieur » (Ascomycotina et Basidiomycotina) : le mycélium végétatif est plus large, souvent dilaté, peu ou pas cloisonné et la reproduction asexuée est dite endogène (Chabasse et *al.*, 2002).

2.2.2. Ascomycotina :

Les spores issues de la reproduction sexuée (appelées ascospores) sont produites de manière endogène à l'intérieur d'un sac appelé asque. Ces asques, généralement

octosporés, seront libres ou produites à l'intérieur d'un organe protecteur de forme variable appelé ascocarpe (Chabasse et *al.*, 2002).

2.2.3. Basidiomycotina :

Ils sont caractérisés par la production de spores sexuées (appelées basidiospores) formées par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées, les basides. Les Basidiomycètes ont un thalle cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons. Les cloisons des filaments mycéliens (« clamp connexion ») comportent le plus souvent un pore central unique de structure complexe appelé dolipore (Chabasse et *al.*, 2002).

2.2.4. Deuteromycotina :

Cet ensemble, très hétérogène, englobe toutes les espèces se multipliant sur le mode asexué. Des données récentes reposant d'une part sur la microscopie électronique, d'autre part sur la biologie moléculaire (comparaison des séquences d'ADN ribosomique par exemple), permettent d'établir des liens étroits avec de nombreux Ascomycètes ou Basidiomycètes. En pratique, le maintien de cette division s'avère utile car beaucoup d'espèces n'expriment pas en culture leur reproduction sexuée (Chabasse et *al.*, 2002).

Tableau 4: principaux genres de classes des moisissures

Classes	Principaux genres	Références
Zygomycotina	<i>Mucor, Rhizomucor, Absidia, Rhizopus</i>	Chabasse et <i>al.</i> , 2002
Ascomycotina	<i>Cladosporium, Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Stachybotrys, Neurospora Crasaa.</i>	Chabasse et <i>al.</i> , 2002
Basidiomycotina	<i>Chondrostereum, Thyphula, Phakopsara, Exobasidium, Sporisorium</i>	Nasraoui, 2015
Deuteromycotina	<i>Candida, Trichosporon, Trichoderma, Exopiala, Aureobasidium, Fusarium, Phoma, Phialophora, Microsporum</i>	Chabasse et <i>al.</i> , 2002

2.3.Écologie des moisissures :

Tout comme les végétaux, les champignons se propagent sous toutes les latitudes terrestres, avec la différence qu'ils colonisent une variété beaucoup plus large d'écosystèmes,

d'habitats et de substrats. On se retrouve tant sur la terre que dans l'eau et même dans l'air, qui leur sert principalement de vecteur de propagation (Després, 2012).

Les champignons s'adaptent à une grande diversité de conditions environnementales.

Quelques espèces sont adaptées à la sécheresse, d'autres vivent au contraire dans l'eau (eaux douces, océans, ou eaux usées). Certaines supportent bien des pressions osmotiques élevées (dans les milieux très salés, ou très sucrés, par exemple) et arrivent à contaminer les salaisons, le miel, ou les confitures. Des champignons aimant la chaleur se trouvent dans les composts (à 70-75°C). Mais on trouve aussi des champignons dans les toundras arctiques ; en haute montagne l'hygrophore printanier se récolte à la fonte des neiges (2°C); et certains champignons peuvent encore pousser dans les chambres réfrigérées (*Sporotrichum carnis*) peut altérer des viandes pourtant conservées à -5°C (Locquin, 1984).

Dans des conditions défavorables (froid ou chaleur intense, manque d'eau), ce sont des spores particulières qui constituent les formes de résistance (pouvant régénérer un mycélium plusieurs dizaines d'années après sa formation) (Tachenon, 1999).

2.4.Morphologie des moisissures :

Les champignons sont hétérotrophes et manquent de chlorophylle. Ils n'ont pas de tissus et par conséquent ils ne possèdent ni racines, ni tiges, ni feuilles, ni système vasculaire. Leur corps somatique (ou végétatif) est appelé thalle. Les thalles fongiques sont généralement filamenteux et multicellulaires, mais pour certains groupes, ils sont unicellulaires.

Le thalle filamenteux est formé par des hyphes qui sont des filaments tubulaires microscopiques, souvent ramifiées en différentes directions et se développant à la surface et/ou à l'intérieur du substrat à partir duquel les champignons se nourrissent (Nasraoui, 2015).

Le mycélium est constitué d'un réseau de minuscules filaments appelés hyphes. Lorsque ces hyphes sont sexuellement compatibles et dans des conditions particulières (de température et d'humidité) les hyphes fusionnent et forment des spores. Les structures à spores les plus grandes (plus d'1 mm) sont appelées champignons (Nieuwenhuijzen, 2007).

Le thalle peut être siphonné (non cloisonné) ou septé (cloisonné).

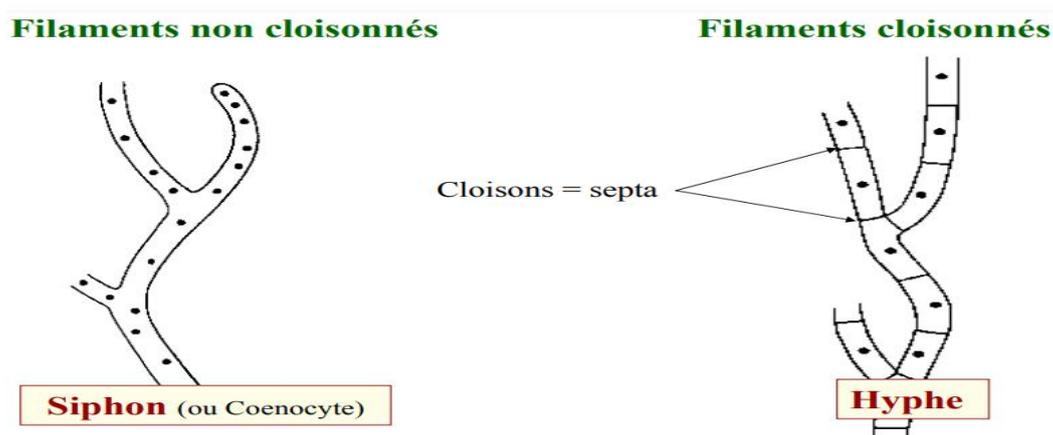


Figure 2 : Thalle filamenteux.

2.5. Mode de vie :

La nécessité où sont les champignons de se nourrir de substances déjà élaborées par d'autres organismes détermine leur mode de vie. Ils sont donc parasites, symbiotiques ou saprophytes :

- **Les saprophytes** : Vivent sur des substances organiques mortes (cadavres, excréments, débris végétaux) et contribuent ainsi au cycle de carbone, de l'azote et de soufre dans la nature (Deysson et Delcourt, 1980).
- **Les parasites** : Facultatifs ou obligatoires, prélèvent les substances organiques dont ils ont besoin chez un être vivant et déterminent des maladies chez l'hôte parasité (plante, animal, être humain) (Deysson et Delcourt, 1980).
- **Les symbiotes** : Créent avec certains être vivants des associations dans lesquelles les deux partenaires se tolèrent mutuellement sans subir de préjudice et même, dans une certaine mesure, en bénéficient (Deysson et Delcourt, 1980).

2.6. Reproduction des moisissures :

La reproduction est la formation d'un nouvel individu avec toutes les caractéristiques typiques de l'espèce parentale. Les champignons se reproduisent principalement par des spores, des structures unicellulaires ou multicellulaires de formes et de tailles variées qui, après germination, sont capables de reproduire l'espèce parente. Les spores peuvent se former par voie asexuée (similaire aux bourgeons qui se forment sur les branches des plantes) ou par

voie sexuée après fécondation. En outre, certains phénomènes parasexuels peuvent aussi être observés chez les champignons.

La reproduction asexuée n'implique pas de caryogamie (fusion des noyaux) et de méiose. Par contre, la reproduction sexuée est caractérisée par l'union de deux noyaux suivis par la méiose (Nasraoui, 2015).

2.6.1. Reproduction asexuée :

Elle est assurée par la production des spores qui se différencient à partir des cellules fongiques. Trois mécanismes principaux peuvent être rencontrés (Leyral et Vierling, 2007) :

- Des spores sont produites par la transformation des cellules du thalle: thllospores. Un mycélium arrête sa croissance, les cellules terminales se différencient, se divisent et se séparent.
- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour former une cellule particulière, le conidiophore, sur lequel se forment les spores : les conidies.
- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour donner des sporanges dans lesquels se forment des sporangiospores. Ces derniers sont libérés par l'ouverture du sporange parvenu à maturité.

2.6.2. Reproduction sexuée :

Certains champignons font appel à la reproduction sexuée lorsque les conditions deviennent défavorables (en nature) ou lorsque le milieu s'appauvrit en éléments nutritifs (en culture). Elle fait appel à 4 types de méiospores, selon les espèces de champignons : l'oospore, la zygosporé, l'ascospore, la basidiospore (Ripert, 2013).

La reproduction sexuée est le type de reproduction dans lequel les cellules germinales mâles et femelles (gamètes) se combinent pendant la fécondation pour former un embryon. Le type de division cellulaire qui forme ces cellules est appelé méiose et entraîne la formation de quatre cellules à partir d'une cellule mère. Toutes les cellules formées sont génétiquement uniques et possèdent la moitié du nombre de chromosomes, c'est-à-dire qu'elles sont haploïdes (n chromosomes, c'est-à-dire un seul exemplaire des chromosomes présents), ce qui les

distingue des cellules mères diploïdes ($2n$ chromosomes, c'est-à-dire que les chromosomes présents le sont en double exemplaire).

La variation génétique est introduite dans les premiers stades de la méiose par croisement et assortiment indépendant de chromosomes. Une cellule se divise également en quatre cellules, qui deviennent des cellules sexuelles appelées gamètes. Les gamètes fusionnent ensuite lors d'une fécondation aléatoire (Zylberberg, 2019).

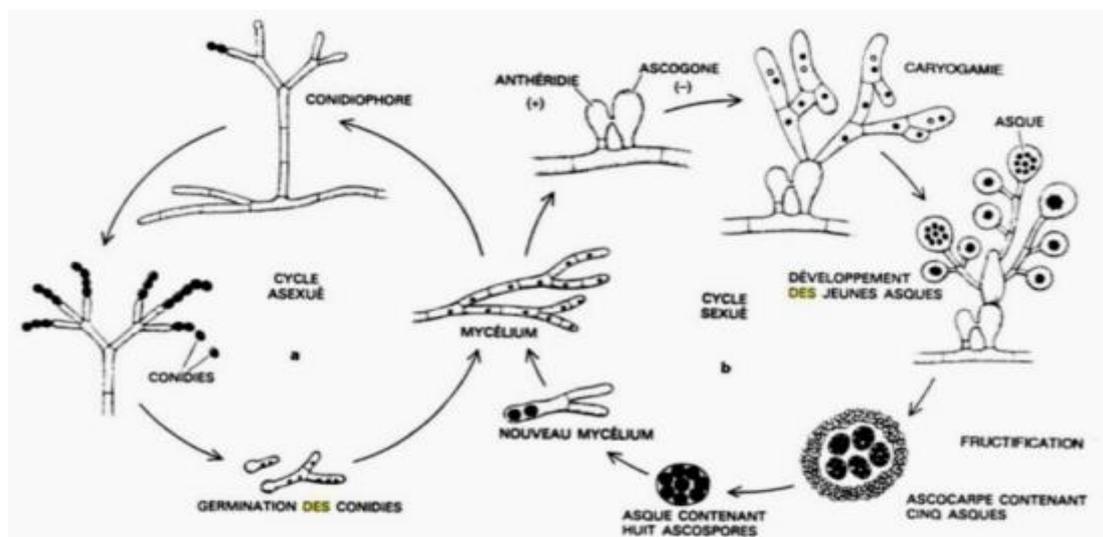


Figure 3: Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée des champignons (récupéré sur le site : <https://agronomie.info/fr/les-champignons-filamenteux/>)

2.7. Conditions de développement des moisissures :

2.7.1. Éléments nutritifs :

Les nutriments nécessaires au développement des moisissures sont Carbone, hydrogène, oxygène, azote, utilisés comme composés organiques et ions Minéraux (soufre, potassium et magnésium). Des oligo-éléments tels que le fer, Le zinc, le cuivre, le manganèse et dans certains cas, le calcium peuvent également nécessaires, ainsi que certaines vitamines. La plupart des composés naturels peuvent être utilisés par les moisissures comme sources de carbone et d'énergie. La cellulose fournit beaucoup de ces éléments, ainsi que les graisses animales et végétales et leurs composants acides et glycérine (Labeled *et al.*, 2013).

La plupart des moisissures ne sont pas très exigeantes en nutriments dont elles ont besoin pour se développer. En effet, leur contenu enzymatique permet de se servir des matières organiques retrouvées dans les matériaux de construction pour croître. Les produits celluloseux tels que le carton, le papier et le Placoplatre sont d'excellents supports pour leur

croissance. Beaucoup de moisissure peut également vivre sur les fibres naturelles et synthétiques, les tapis et les rideaux (d'Halweynet *al.*, 2002).

Outre les exigences nutritives, le développement fongique est sous la dépendance de conditions physico-chimiques dont la nature varie selon l'espèce. Ces facteurs conditionnent également la survie fongique.

2.7.2. Activité d'eau :

L' a_w d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure). Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures).

La plupart des moisissures se développent et synthétisent bien des mycotoxines pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures (Makhlouf, 2019).

2.7.3. Température :

La température est un facteur qui a une influence sur la vitesse de croissance des moisissures. Une température inférieure à 15°C ralentit la vitesse de croissance et la majorité des réactions biochimiques sont arrêtées à 0°C. La température négative, même si elle arrête la croissance et peut détruire les formes végétatives, n'éradique pas une contamination. La croissance optimale des moisissures est située entre 20 et 25°C. En dehors de cet intervalle de température les hyphes se développent plus (Laffont et Basset, 2011).

2.7.4. pH :

Il dépend de la concentration en proton d'un milieu, il a une grande incidence sur son équilibre ionique. Les moisissures en générale sont acidophiles dont le pH de développement est compris entre 3 et 7. Cependant, le développement maximum de moisissures sur les céréales s'opère entre les pH allant de 6 à 8. Ce dernier a une incidence sur le potentiel de croissance des moisissures xérophiles (Meghazi, 2012).

2.7.5. Lumière :

Les radiations du spectre visible (380–720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Bouderaoune, 2013).

2.7.6. Oxygène :

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies : les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeantes peuvent se développer en profondeur, certains peuvent même supporter une anaérobiose très stricte (Boucenna et *al.*, 2006).

2.8. Rôle de moisissures :

Les champignons ont diverses utilités dans la vie de tous les jours. Ainsi, ils ont un rôle primordial dans la dégradation des substances organiques, et en tant que tels, ils sont des destructeurs des denrées alimentaires, des peaux, des tissus, du bois, des livres, des œuvres d'art et d'autres biens courants. Ils sont aussi les agents de la plupart des maladies des plantes (mycoses) ainsi que de plusieurs infections qui affligent les animaux et les humains.

Leur rôle en agriculture peut être nocif (récoltes détruites) ou bénéfique (fertilité accrue des sols et augmentation du rendement des productions agricoles par les mycorhizes). Les champignons sont aussi à la base de nombreux procédés artisanaux et industriels des plus anciens, notamment dans:

- ✓ la production des aliments pour les humains et les animaux.
- ✓ la création des saveurs.
- ✓ la production d'antibiotiques ou d'agents antibactériens (la pénicilline).
- ✓ la fabrication de détergents.
- ✓ la fabrication (moisissures) des fromages et des salamis.
- ✓ la fabrication (levures) du pain.
- ✓ la fabrication de divers colorants pour l'industrie textile.
- ✓ lamycoremédiation environnementale et la dégradation de polluants pétroliers (McNeil,2019).

Chapitre 3

Généralités sur les mycotoxines

3.1. Définition :

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

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et doués de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seule une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes (Afssa, 2006).

3.2. Nature et origine des mycotoxines :

La formation de métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures peut être le résultat de trois mécanismes différents :

- Le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine.
- Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique par le jeu des bioconversions.
- La toxine est un métabolite propre de champignon : aflatoxine, zéaralénone (Tabuc, 2007).

Les structures chimiques des mycotoxines varient considérablement, mais ce sont tous des composés organiques de masse moléculaire relativement faible non volatils aux températures ambiantes. Ces petites molécules sont peu solubles dans l'eau, difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Edah, et al., 2021).

3.3. Moisissures mycotoxinogènes:

Les moisissures mycotoxinogènes appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*.

3.3.1. *Aspergillus* :

Aspergillus est un champignon comprend environ 180 espèces, réparties en 18 sections.

Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air.

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines (Morin, 1994).

3.3.2. *Fusarium* :

De nombreuses espèces produisent des mycotoxines dans les aliments, fumonisines, zéaralénone et trichotécènes, entraînant des intoxications alimentaires chez l'homme. Assez rarement isolé dans l'habitat, *Fusarium solani* peut entraîner des allergies respiratoires telles des sinusites, des MBPA, voire des cas d'alvéolites. Les *Fusarium* entraînent des mycoses graves chez les immunodéprimés et les grands brûlés et sont des agents fréquents de kératites (Reboux et al., 2010).

3.3.3. *Penicillium* :

Il y a plus de 200 espèces reconnues de *Penicillium*. Plusieurs espèces s'adaptent facilement aux conditions de croissance présentes à l'intérieur et se développent bien sur des matériaux de construction humides.

Les *Penicillium* sont très généralement retrouvés dans le sol, sur les végétaux en décomposition et le compost de même que sur le bois, les produits alimentaires secs, les épices, les céréales, les fruits frais et les légumes on les trouve également poussant sur des matériaux de construction dans des environnements endommagés par l'eau ainsi que dans l'air intérieur et la poussière domestique.

Plusieurs espèces de *Penicillium* sont des contaminants communs sur divers matériaux organiques et sont des productrices potentielles reconnues de mycotoxines.

Les espèces les mieux connues de moisissures toxigènes associées à la nourriture comprennent le *P. citreonigrum*, le *P. citrinum*, le *P. crustosum*, le *P. islandicum* et le *P. verrucosum* (INSPQ, 2019).

3.3.4. *Alternaria* :

Le genre *Alternaria* regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments. Si certaines espèces vivent à l'état saprophyte pouvant occasionnellement être des agents pathogènes opportunistes, d'autres sont responsables de maladies atteignant les plantes et les insectes (Calmes, 2011).

Les champignons du genre *Alternaria* appartiennent à la catégorie des nécrotrophes, ils tuent les cellules végétales, notamment par l'action de toxines, leur pouvoir pathogène et leur virulence tient en compte la nature des deux organismes, hôte- parasite, implique à la fois la notion d'aptitude parasitaire et celle de réceptivité. Bien que *A. alternata* a été considéré comme l'espèce principal productrice de mycotoxines, les autres membres du genre, tels que *A. ciri*, *A. solani*, *A. Aongipes*, *Atenuissima* et *A. arborescens* espèces infectoria groupes, sont également capables de produire ces contaminants toxiques dans leurs hôtes, ces champignons considérés comme polluant biologique (Nabahat, 2014).

3.4. Principales mycotoxines:

Plusieurs centaines de mycotoxines différentes ont été découverts jusqu'à présent, présentant une grande diversité structurale, ce qui se traduit par des propriétés chimiques et physico-chimiques différentes. Aflatoxines et ochratoxines (produites principalement par *Aspergillus sp.*), les fumonisines, trichothécènes et zéaralénone (produit par *Fusarium sp.*), patuline (produite par *Penicillium sp*) (Krska et al., 2008).

3.4.1. Aflatoxines :

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difurano-coumarine. Ces substances sont produites par des espèces d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*. Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent :la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunosuppression . Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 . Parmi les aflatoxines, l'AFB1 est la plus fréquente et la plus toxique. Elle est considérée comme étant le plus puissant hépatocancérigène pour les mammifères et elle est classée en tant que cancérigène probable du groupe 1 par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (Lahouar, 2016).

3.4.2. Ochratoxines :

L'ochratoxine (A et B) est un dérivé de phénylalanine, c'est la seule toxine produite par une espèce de *Penicillium*, et par une seule espèce *Penicillium verrucosum*. Cette toxine est également produite par plusieurs espèces d'*Aspergillus*, notamment *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius* (DeVries et al., 2002). L'ochratoxine A est le plus toxique des deux dérivés et connue par ses propriétés néphrotoxique, immunosuppressif, cancérigène et tératogénique. En effet, l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un composé cancérigène pour l'Homme (Leslie et al., 2008).

3.4.3. Trichothécènes :

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par de nombreux *Fusarium* dont les principaux sont *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* et *Fusarium sporotrichioides*. Plus de 190 molécules ont été identifiées comme appartenant à ce groupe de mycotoxines. Dans l'alimentation, les plus fréquemment retrouvés sont le nivalénole (NIV), le déoxynivalénole (DON), les toxines T2 et HT2 et le diacétoxyscirpénol (DAS). Ces toxines sont les plus fortement associées avec des toxicoses chroniques et fatales chez l'homme, ainsi que chez l'animal (Heit, 2015).

3.4.4. Zéaralénone :

La Zéaralénone est une lactone de l'acide résorcyclique (Jard, 2009), produit principalement par les membres du groupe *Fusarium* : *Fusarium culmorum*, *F. equiseti*, *F. gibbosum*, *F. lateritium*, *F. moniliforme*, *F. tricinctum*, *F. Avenaceum*, *F. roseum*, *F. roseum Graminearum* (*Gibberella zae*), *F. roseum Culmorum*, *F. roseum Equiseti*, *F. roseum Gibbasum* (IARC, 1983).

Les α et β zéaralénols, métabolites naturels, sont des produits du métabolisme animal ou humain. Ils peuvent être également détectés dans les céréales contaminées (Afssa, 2006).

3.4.5. Fumonisines :

Les fumonisines sont un groupe de mycotoxines principalement produites par *Fusarium verticilloides* et *Fusarium proliferatum*.

Aujourd'hui la famille des fumonisines comprend 15 molécules différentes. Les fumonisines B1, B2 et B3 sont les plus répandues dans le monde comme des contaminants naturels des céréales (Edah et al., 2021).

3.4.6. Patuline :

La patuline, encore appelée clavacine, claviformine, expansine ou pénicidine, est une lactone de nature polycétoacide. C'est une toxine élaborée par de nombreuses moisissures. Elle a été extraite de cultures de *Penicillium patulum*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. vulpinum*, *P. paneum*, *P. carneum*, *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *Byssochlamys nivea* et de *B. fulva*. Les contaminations les plus courantes sont celles résultant de la prolifération de *penicillium expansum* (Dragacci et al., 2011).

3.5. Facteurs de la mycotoxinogènes :

Les Champignons toxigènes ont la capacité de produire des mycotoxines, si les conditions écologiques sont favorables.

3.5.1. Composition du substrat :

La composition qualitative et quantitative du substrat peut influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines. En effet un taux élevé de sucres et/ ou de lipides est favorable à la toxinogénèse. Les céréales et les oléagineux, plus riches en sucres et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (Guezlane-tebibel et al., 2016).

3.5.2. pH :

Le pH du milieu est un facteur important dans la croissance des moisissures et la production des mycotoxines, dans lequel la gamme de pH permettant ces 2 phénomènes est très restreinte.

3.5.3. Activité d'eau (a_w) :

L'activité de l'eau nécessaire à la production de toxines est supérieure à celle nécessaire à la croissance fongique ($0,85 \leq a_w$).

3.5.4. Composition gazeuse :

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet inhibiteur important sur la toxinogénèse (Nguyen, 2007).

3.5.5. Température :

Etant donné que les souches toxigènes de champignons sont très répandues dans la nature on peut s'attendre à ce que la formation des toxines ait lieu dans un intervalle étendu de température (10 à 40°C) (FAO, 1977).

3.6. Effets des mycotoxines :

Les mycotoxines sont des toxines puissantes et ont un large éventail d'actions sur les animaux et les humains, ils ont des effets neurotoxiques, cancérigènes, mutagènes, immunosuppresseurs et oestrogéniques (Krska et *al.*, 2008).

En raison de leurs effets toxiques variés la présence de mycotoxines dans les aliments peut provoquer chez l'homme et les animaux des intoxications aiguës ou chroniques et parfois mortelles. A ces problèmes de santé, s'ajoutent des pertes économiques importantes pour les acteurs de filières (Lesel, 2005).

Tableau 5 : Principales mycotoxines et moisissures productrices et leurs effets probables des sur l'homme (Guezlane-tebibel et *al.*,2016).

Toxines	Genres	Effets
Aflatoxine	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius, A. bombyci, A. pseudotamarii et A. ochraceoroseus</i>	-cancer du foie (hépatocarcinome) et des voies biliaires, cancer broncho-pulmonaire et bronchonique. - anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN.
Ochratoxine A (OTA)	<i>Aspergillus ochraceus, A. westerdijkiae, A. carbonarius, A. niger, Penicillium viridicatum, P. verrucosum et P. nordicum</i>	-cancer du rein. - anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN Immunosuppresseur. - néphropathie endémique (Balkans), néphropathie interstitielle chronique.
Patuline	<i>Penicillium spp et Aspergillus spp</i>	-diminution du nombre de lymphocytes du sang (lymphopénie) si intoxication chronique. - troubles nerveux (action anti acétylcholinestérase).
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i>	cancers de l'œsophage.
Trichotécènes	<i>Fusarium spp</i>	-anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN (toxine T2). -altération de la phagocytose, inhibition de la synthèse protéique (Toxine T2 et désoxynivalénole). -pneumopathie interstitielle.
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum et F. Sporotrichoides</i>	-puberté précoce et gynécomastie.

Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau de Laboratoire pédagogique de microbiologie, Université Belhadj Bouchaïb Ain-Témouchent

4.1.Echantillonnage :

Au total 63 échantillons de la farine ont été prélevés auprès de boulangeries de différentes villes de la wilaya de Ain Témouchent (Ain Témouchent, Hammam Bouhadjar et El Malah). Les boulangeries ont été sélectionnées suivant la méthode aréolaire. Elle consiste à repérer d'une manière au hasard des zones sur la carte des régions à étudier. Puis chaque zone a été visitée pour prélever les échantillons de boulangeries disponibles dans les zones précédemment sélectionnées. Les villes ont été choisies pour l'accessibilité des données.

Le prélèvement consiste à prélever 50g de la farine à partir de pétrin. Les prélèvements ont été déposés dans des pots de prélèvement stériles en les attribuant un code désignant son lieu et date de prélèvement. Ensuite, les prélèvements ont été transférés au laboratoire dans les conditions de son utilisation.

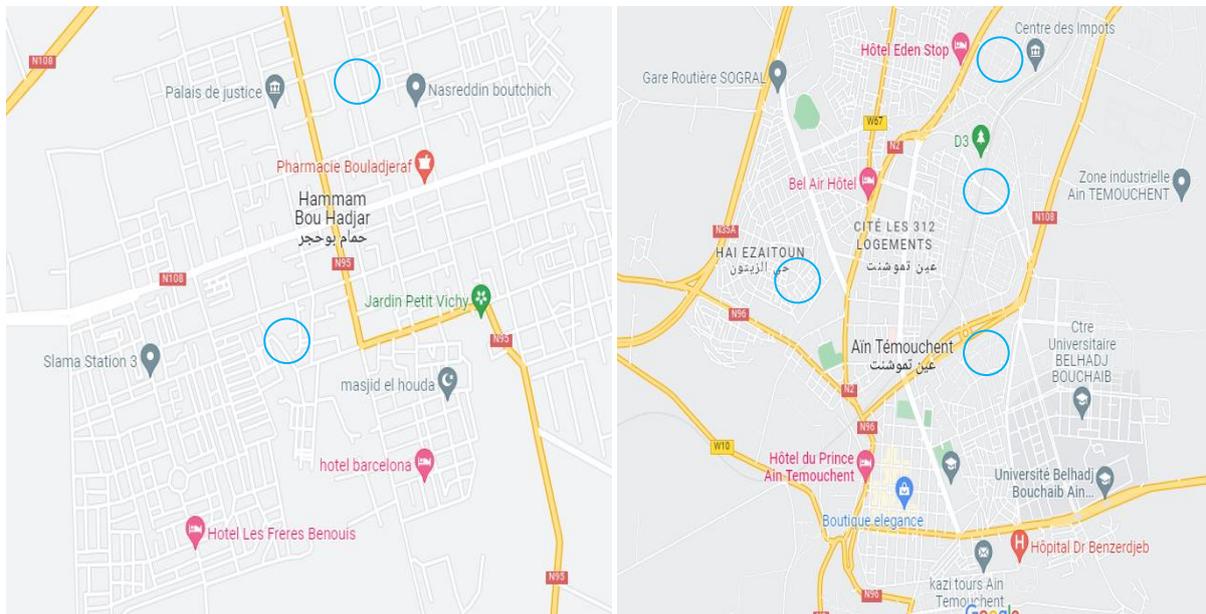


Figure 5 : Région de prélèvement de la farine. Ain Témouchent (35.29896,-1.13504) et Hammam Bouhadjar (35.37711, -0.98821). Cercle bleu : zone de prélèvement

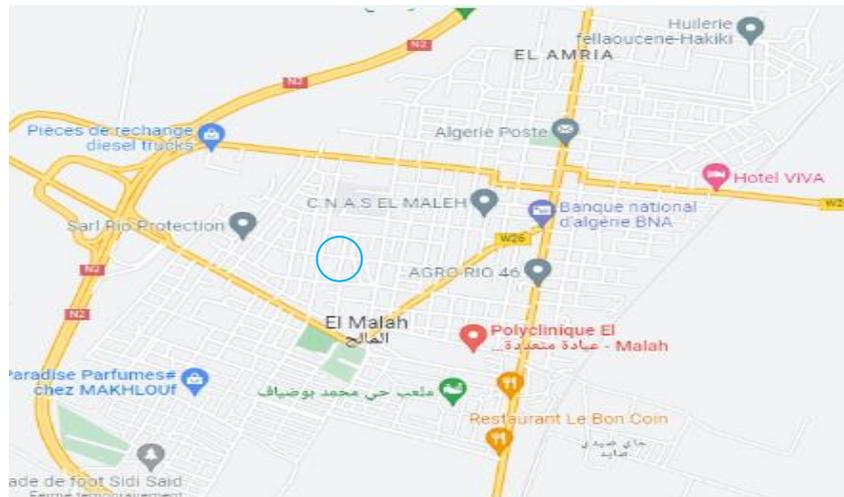


Figure 6 (Suite): Région de prélèvement de la farine. El malah (35.38675, -1.10038). Cercle bleu : zone de prélèvement

4.2. Analyses mycologiques :

4.2.1. Préparation des échantillons :

À l'aide d'une spatule stérile, 1g de farine de chaque échantillon a été transversé dans un tube contenant 9mL de l'eau physiologique stérile. Ce mélange constitue la première dilution (10^{-1}). A partir de cette dilution une série de dilutions décimale était préparée. Entre chaque dilution, homogénéisation au vortex.

4.2.2. Dénombrement des colonies :

Afin de dénombrer les moisissures, un ensemencement en surface était réalisé. Un volume de 0.1mL de chaque dilution était déposé dans une boîte de Pétri contenant un milieu Dichloran gélosé additionné d'une solution d'éléments trace ($ZnSO_4$, $CuSO_4$) et d'un antibiotique oxytétracycline (nom commercial : avicycline) pour que les moisissures présentent toute leur morphologie, et d'empêcher le développement des bactéries respectivement. Ensuite, l'inoculum a été ensemencé à l'aide d'une pipette pasteur. Les boîtes sont ensuite incubées cinq jours à $25^{\circ}C$.

Après l'incubation, le nombre de colonies était calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V (n1 + 0,1 n2) d}$$

Où :

Σc: Somme des colonies de moisissures sur l'ensemble des boîtes retenues, (dont le nombre compris entre 15-300 colonies);

V: Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n1: Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n2: Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;

d: Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution).

4.2.3. Purification des moisissures :

Les moisissures développées sur le milieu précédent (Gélose dichloran) étaient repiquées individuellement sur le milieu PDA. Les cultures sont ensuite incubées pendant cinq (5) jours à 25°C.

4.2.4. Identification des isolats fongiques :

4.2.4.1. Observation macroscopique :

La couleur : des colonies est un élément très important d'identification; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir.

L'aspect des colonies : qui représente un critère clef d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses.

4.2.4.2. Observation microscopique :

L'identification microscopique est basée sur les caractéristiques de thalle et des spores. Elle consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 40$ puis $\times 100$ à l'aide d'un microscope.

4.3. Étude de la production des mycotoxines :

4.3.1. Détection visuelle de la production de mycotoxine :

Afin de détecter visuellement les souches productrices de mycotoxines isolées de la farine, la méthode décrite par Lemek *et al.* (1989) a été utilisée.

Les souches fongiques étaient ensemencées par un point central (une souche par boîte) à la surface d'une boîte de Pétri contenant de milieu CEA. Ensuite les boîtes sont incubées à 25°C pendant 3-7 jours.

La détection de la production de mycotoxines sur le milieu CEA était réalisée par la projection des boîtes sous lumière UV, donnant une fluorescence visible.

4.3.2. Détection de mycotoxine par la CCM :

Des flacons contenant 50mL de bouillon YES étaient préparés puis ensemencés par un fragment de colonie de moisissures puis additionné de 1ml d'une solution de vitamine Tri B (B1, B6, B12) pour chaque flacon. Ensuite les flacons sont incubés pendant 14 jours à 25°C.

Après incubation, la culture sur milieu YES était filtré à travers du papier filtre.

Un volume de 10ml de chloroforme était ajouté au filtrat obtenu. Le mélange est agité pendant 10min puis décanté en utilisant une ampoule à décantater. A l'aide d'un rotavapeur, la phase chloroformique est concentrée par évaporation sous vide.

Les extraits précédemment obtenus sont analysés par chromatographie sur couche mince, ce qui permet une séparation efficace des mycotoxines.

- ✓ En utilisant une plaque de gel silice on dépose un spot de 10 µL et de 20µLde chaque extrait sur la même ligne droite (ligne de dépôt).
- ✓ La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant (toluène, éther diéthylique et l'acide formique) de volume 5ml, 4ml, 1ml respectivement.
- ✓ Le solvant migre jusqu'à ce qu'il atteigne la ligne limite du bord supérieur. Après migration la plaque est examinée sous une lampe à UV, la présence des métabolites secondaires se traduit par une fluorescence.

4.4. Caractérisation de la croissance des isolats de moisissures :

Les cultures ensemencées dans le milieu PDA ont été examinées chaque jour pour une croissance visible. Dès le début de la croissance, les diamètres des colonies ont été mesurés avec une règle. La croissance fongique a été observée deux fois par jour pendant une semaine.

Une approche de modélisation typique en deux étapes, comprenant une modélisation primaire en fonction de la température, a été utilisée pour estimer les paramètres de croissance de chaque isolat. L'estimation du taux de croissance des champignons ($\mu T^{\circ}C$) a été obtenue en traçant les rayons des colonies en fonction du temps. Pour chaque cinétique, une régression non linéaire a été appliquée pour estimer le taux de croissance maximal ($\mu T^{\circ}C$ max, mm/jour), la latence avant croissance (k) et le rayon maximal de la colonie (R_{max} , mm) en ajustant les données expérimentales au modèle primaire de Baranyi et Roberts (2004) (équations 1) :

$$y = y_0 + \mu_{max}A - \ln \left(1 + \frac{[\exp(\mu_{max}A) - 1]}{\exp(y_{max} - y_0)} \right) \quad (1)$$

$$A = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln \left[\frac{\exp(-\mu_{max}t) + \exp(-\mu_{max}\lambda)}{-\exp(-\mu_{max}t - \mu_{max}\lambda)} \right]$$

Où R_0 est le rayon de la colonie au temps 0, R_{max} est le rayon maximal de la colonie dans les boîtes de Pétri, A est une variable intégrale allant de 0 à t en fonction de la courbure du tracé, k (jours) est le temps de latence, et t (jours) est le temps.

4.5. Effet des conditions de stockage de la farine sur la croissance de moisissure :

L'effet de conditions de stockages (temps et température) a été estimé pour les deux mois plus froid (Janvier) et plus chaud (Aout) pour l'année 2022. Puisque l'ensemble des boulangeries, stockent leur farine à la température ambiante, les données de la température ont été collecté de la météo (Météo Ain Temouchent, Prévisions de 10 jours Ain Temouchent, Algérie Météo (dzmeteo.com)) pour la ville de Ain Témouchent. Quant au temps de stockage a été également collectés de boulangeries (Tableau 6).

Le Tableau 6 montre la méthodologie de la simulation de l'évolution de concentration de moisissures en fonction de conditions de stockage.

La simulation de Monte Carlo a été réalisé à l'aide de logiciel @risk version 5.

Tableau 6 : Méthodologie, variable et distributions utilisés pour l'estimation de concentration de moisissure durant le stockage de la farine.

Variable	Symbole	Distribution	
Contamination initiale de la farine boulangère			
Concentration de moisissures (UF)/échantillons	C_0	<u>RiskDuniform</u> ($N_1 ; N_{63}$)	Dans cette étude
Nombre des échantillons contaminé	-	\underline{n}	Dans cette étude
Nombre des échantillons non contaminé	-	\underline{c}	Dans cette étude
Prévalence de moisissures	P	RiskBeta($n+1 ; c+1$)	Dans cette étude
Distribution de la concentration de moisissures	D0	$C_0 \times P$	Dans cette étude
Croissance de moisissure durant le stockage chez la boulangerie			
Température de challenge test (°C)	$T^\circ C$	20	Dans cette étude
Temps de latence (jour) à 25°C	$\lambda_{25^\circ C}$	Equation 1	Dans cette étude
Taux de croissance (jour ⁻¹) à 25°C	$\mu_{25^\circ C}$	Equation 1	Dans cette étude
Température cardinale minimale	T_{min}	RiskDuniform(-9,1 ; ; -35,4) : 29 valeurs	Nguyen Van Long et al.
Température cardinale maximale	T_{max}	RiskDuniform(29 ; ; 30,3) : 29 valeurs	(2021)
Température cardinale optimale	T_{opt}	RiskDuniform(23 ; ; 28,5) : 29 valeurs	
Distribution gamma température	$\gamma_{T^\circ C}$	$\gamma_{T^\circ C} = \frac{(T - T_{min})^2 (T - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min}) [(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]}$	Ziane et al. (2019)
Taux de croissance optimum	μ_{opt}	$\mu_{25^\circ C} / \gamma_{25^\circ C}$	Ziane et al. (2014)
Température de stockage (°C)	$T^\circ C$	Janvier : 13,6 Aout : 27,5	Ziane et al. (2021)
Temps de latence à la température de stockage	$\lambda_{T^\circ C}$	$\mu_{25^\circ C} \times (\lambda_{25^\circ C} / \mu_{T^\circ C})$	Ziane et al. (2019)
Taux de croissance à T°C	$\mu_{T^\circ C}$	$\gamma_{T^\circ C} \times \mu_{opt}(farine)$	Ziane et al. (2019)
Temps de stockage (jour)	t	RiskPert(10 ; 12 ; 15)	
Concentration finale de moisissure dans la farine			
Proportion des moisissures mycotoxinogène	P_{myco}	RiskUniform(0 ; 1)	Dans cette étude
	[Mycoflore]	$P_{myco} \times D0 \times \exp(\mu_{T^\circ C} \times t)$	Dans cette étude

Résultat et discussion

5.1. Prévalence de contamination de la farine :

Les analyses mycologiques réalisées à partir des différents échantillons de farine ont révélé la présence des levures et des moisissures sur le milieu dichloran. Les résultats ont montré une dominance de cette dernière avec contamination de 98,91% des échantillons analysés, sur 63 échantillons. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Moreau (1970), Al-Defiery et Merjan (2015), Halt et *al.* (2004), Graves and Hesseltine (1966). La présence des moisissures dans la farine peut être due aux plusieurs facteurs à savoir :

- ✓ La contamination de la matière première « blé tendre » ;
- ✓ Les conditions d'hygiène insuffisantes qui pourraient constituer l'une des voies de contamination ;
- ✓ La formation des résidus de diverses origines dans les machines utilisées durant le processus de fabrication, stockage et la distribution du produit.

Ces hypothèses ont été proposées et confirmées également par Boulal et *al.* (2011), Rezazadeh et *al.* (2013), Zebiri (2020).

5.2. Dénombrement des moisissures :

La charge moyenne en moisissures des 63 échantillons de farine étudiés, est de 5.32 UFC par gramme de farine. Cette concentration excède le seuil « M = 4 log » régi par la réglementation algérienne de l'arrêté de 2 juillet 2017. L'analyse de variance ANOVA a montré une hétérogénéité de signification entre les différentes boulangeries. En effet, aucune différence de signification n'était constatée entre les échantillons issus de boulangeries A, B et C. Même constat a été observé entre les échantillons issus de boulangerie D, E et F. Cependant, des différences significatives ont été montrées entre l'échantillon issu de boulangeries (A, B et C) et (D, E, F), et les autres échantillons. Cette variabilité est probablement due notamment à la marque de la farine utilisée et aux conditions (temps, température, humidité...etc.) de stockage.

Les résultats obtenus sont en accordance avec les résultats (0–4.2 log UF) reportés par Halt et *al.* (2004) et Rezazadeh et *al.* (2013). Cependant, la contamination reportée dans cette étude est plus élevée par rapport à la contamination (1.5 à 1.7 log UF), (<2.3 log UF) et (<2 log UF) reportées par Al-Defiery et Merjan (2015), Tahani et *al.* (2008), Zebiri (2020) respectivement. Cette variabilité entre les différents travaux est due certainement à l'origine des échantillons, les caractéristiques climatiques de la récolte, conditions de stockage, origine de la matière première (local et/ou importation) ...etc.

Tableau 7 : Dénombrement de la flore fongique dans la farine de différentes boulangeries.

Boulangeries	Nombre des échantillons	Concentration moyenne (UFC/g)
A	9	6.12±1.68
B	9	6.12±2.24
C	9	5.82±3.14
D	9	5.04±1.35
E	9	4.80±0.55
F	9	4.87±1.15
G	9	4.26±0.67
Total	63	5.32±1.82

5.3. Identification des moisissures :

L'identification des souches fongiques a été faite essentiellement à partir des caractères d'identification microscopique des frottis à l'état frais en basant sur clés spécifiques à l'identification des moisissures. Dans notre étude l'identification macroscopique n'est pas assez fiable dû à la limite de disponibilité des milieux spécifiques à l'identification des moisissures. Dans cette étude, l'aspect macroscopique des colonies obtenu sur PDA, est dépendant de genre et de l'isolat. En effet, à titre d'exemples, les isolats identifiés comme *Penicillium* ont donné des colonies denses, poudreuses et duveteuses de couleur vert, blanc, bleu vert, vert gris, tandis que les isolats identifiés comme *Cladosporium* sont Les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse, parfois poudreuse. La couleur va du vert olive au brun noir très foncé et le revers brun noir. Par ailleurs au sein de même genre identifié, une variabilité d'aspect a été constatée. A titre d'exemple, les colonies d'*Aspergillus* sont variables de couleurs marron, orange, verte, jaune ou noire selon les espèces.

Quant à l'identification microscopique, les observations microscopiques et leur description sont illustrées sur le Tableau 8.

Tableau 8: Identification macroscopique de moisissures isolées à partir de la farine boulangère.

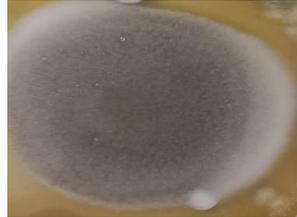
Genres	Observation macroscopique	Aspect de colonie	Couleur de la colonie
<i>Penicillium</i>		Denses Poudreuse Duveteuses	Vert, blanc, bleue vert, vert gris
<i>Aspergillus</i>		Poudreuses Granuleuses.	Marron, orange, verte, jaune ou noire
<i>Cladosporium</i>		Texture velouté Floconneuse, Parfois poudreuse.	Vert olive au brun noir très foncé et le revers brun noire
<i>Microsprum</i>		Duveteuses	Blanc et beige
<i>Aureobasidium</i>		Veloutées	Blanc, crème pâle ou jaunes; mais à maturité
<i>Exopiala</i>		Mucoïde devenant veloutée	Brun foncé à noire, et le verso foncé.

Tableau 8 (Suite) : Identification macroscopique de moisissures isolées à partir de la farine boulangère.

Genres	Observation macroscopique	Aspect de colonie	Couleur de la colonie
<i>Trichoderma</i>		Laineuses	Touffes verdâtres isolées ou disposées en anneaux concentrique sur le milieu de culture. Le verso reste incolore.
<i>Trichothecium</i>		Poudreuses Granuleuses	Blanche.
<i>Streptomyces</i>		Légèrement plissée, dure Coriace mycélium aérien crayeux ou poudreux.	Mauve.
<i>Trichosporon</i>		Irrégulièrement ridée, plutôt poudreuse ou friable ; Centre peut devenir en tas.	Blanc à crème Humide et molle.
<i>Mucor</i>		Texture floconneuse	Blanc au jaune Marron ou bien gris

Tableau 9: Identification microscopique des moisissures.

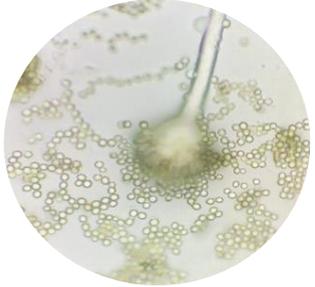
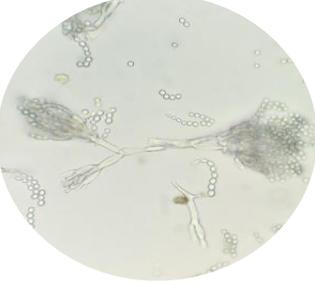
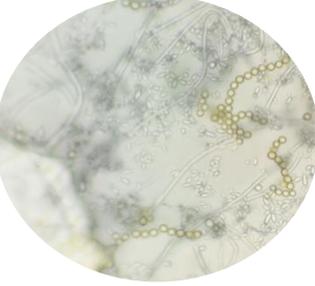
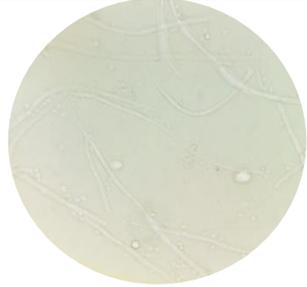
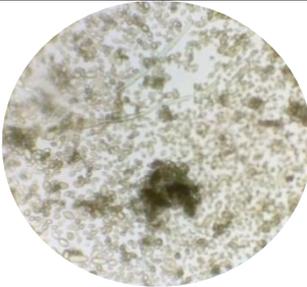
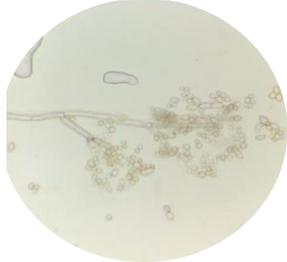
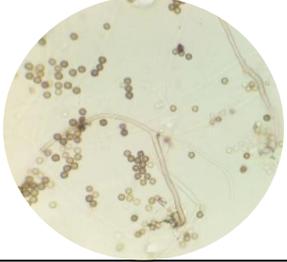
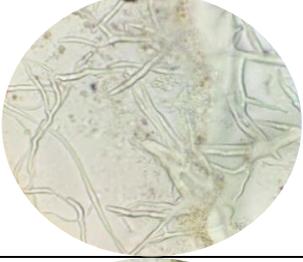
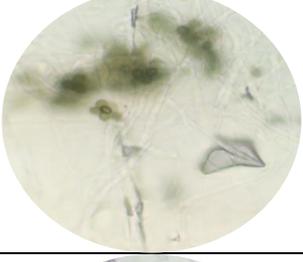
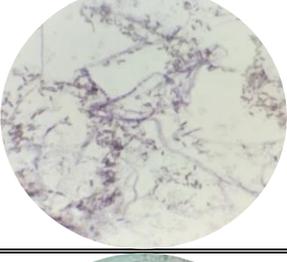
Genres	Caractères	Observation microscopique G × 100
<i>Aspergillus</i>	<p>Un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins. Ces filaments sont de diamètre fin et régulier, ils sont septés et ramifiés.</p> <p>L'identification repose sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique. En effet, sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés appelés conidiophores.</p>	
<i>Penicillium</i>	<p>Hyphes septés, phialides disposés en verticilles, phialides serrées les unes contre les autres donnant une image de pinceau ou pénicille</p>	
<i>Cladosporium</i>	<p>Les hyphes sont cloisonnés et hyalins. Leur conidiophore est de longueur variable. Les conidies pluricellulaires. Tous les organes forment des longues chaînes acropètes, ramifiées, de forme cylindrique</p>	
<i>Microsporum</i>	<p>Caractérisé par des macroconidies fusiformes de grande taille, à paroi épaisse verruqueuse. Ces macroconidies sont rondes. Les hyphes sont pectinés avec un mycélium en raquette,</p>	
<i>Aureobasidium</i>	<p>Hyphes septés.</p> <p>Présence des chlamydospores.</p> <p>Conidies unicellulaires.</p>	

Tableau 9 (suite): Identification microscopique des moisissures.

Genres	Caractères	Observation microscopique G × 100
<i>Exopiala</i>	Les hyphes, septés, sont brun pâle. Sur les filaments naissent des petites annellides cylindriques ou légèrement gonflées avec une extrémité effilée. Elles produisent des conidies hyalines ou brun pâle, ovales à cylindriques, uni ou bicelleulaire	
<i>Trichoderma</i>	Des conidies unicellulaires globuleuses Des phialides en forme de quille, en verticilles sur des conidiophores ramifiés à angle droit ou sur leurs branches latérales.	
<i>Trichosporon</i>	Filament mycéliens septé, des conidies unicellulaires dispersées.	
<i>Trichothecium</i>	Les hyphes, septé, hyalins. Les conidiophores simple, non ramifiés, portant à leur extrémité des conidies piriformes ou ellipsoïdales. Les conidies lisse, sont bicellulaire (une cloison transversale).	
<i>Streptomyces</i>	Les hyphes sont longues, fines et abondamment ramifiées Des conidies petites et oblongues sont produites en des points distincts du filament, souvent en chaînes. sur le filament. Les conidies peuvent être colorées.	
<i>Mucor</i>	Thalle siphonné (non ou peu cloisonné), les spores dans un sporange. Le sporocytophore unique (pas de bouquet) avec une partie terminale qui se dilate en columelle (entonnoir).	

5.4. Répartition de genres fongique et leur concentration :

L'identification microscopique des isolats a permis de révéler 11 genres fongiques dont les plus dominants étaient *Penicillium* (27%), *Aspergillus* (17%), *Cladosporium* (17%) et *Exophiala* (14%). De plus, d'autres genres moins dominants étaient également présents à savoir *Aureobasidium* (11%), *Microsporium* (7%), *Streptomyces* (3%) *Trichoderma* (2%), *Trichotecium* (1%), *Trichosporon* (1%) et *Mucor* (1%).

Les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Mucor* sont également identifiés par plusieurs chercheurs (Halt et al., 2004 ; Al-Defiery et Merjan, 2015 ; Rezazadeh et al., 2013).

Parmi les genres identifiés dans cette étude, Tahani et al. 2008 ont identifié seulement *Aspergillus Penicillium*.

L'ensemble des travaux de Halt et al. (2004) ; Al-Defiery et Merjan (2015) ; Rezazadeh et al. (2013) ont montré la dominance de *Penicillium* et *Aspergillus*. Ces deux genres sont qualifiés comme contaminants des denrées alimentaires maltraitées mais surtout mal conservées. C'est pour cette raison que Pelhate (1982) ; Berthier et Valla (1998), les considèrent comme contaminant de stockage. Également même distribution des genres a été reportée par les travaux de Halt et al. (2004).

Dans cette étude la liste de genres identifiés n'est pas exhaustive. C'est-à-dire l'absence des genres non identifiés ne nie pas leur présence. En effet, la présence et la prévalence est sensiblement liée aux nombres des échantillons testés, quantités et nombre de prélèvement, méthode d'échantillonnage et méthode et procédure d'analyse.

A cet effet, d'autres travaux ont reporté la présence des autres genres non identifiés dans cette étude à savoir *Rhizopus*, *Absidia*, *Fusarium*, *Alternaria*, (Halt et al., 2004), *Acremonium* (Rezazadeh), *Rhizoctonia* et *nigrospora* Al-Defiery et Merjan (2015).

Quant à la distribution de concentration est dépendante de genres. Les résultats de cette étude est inférieure aux résultats reportés par Tahani et al. (2008).

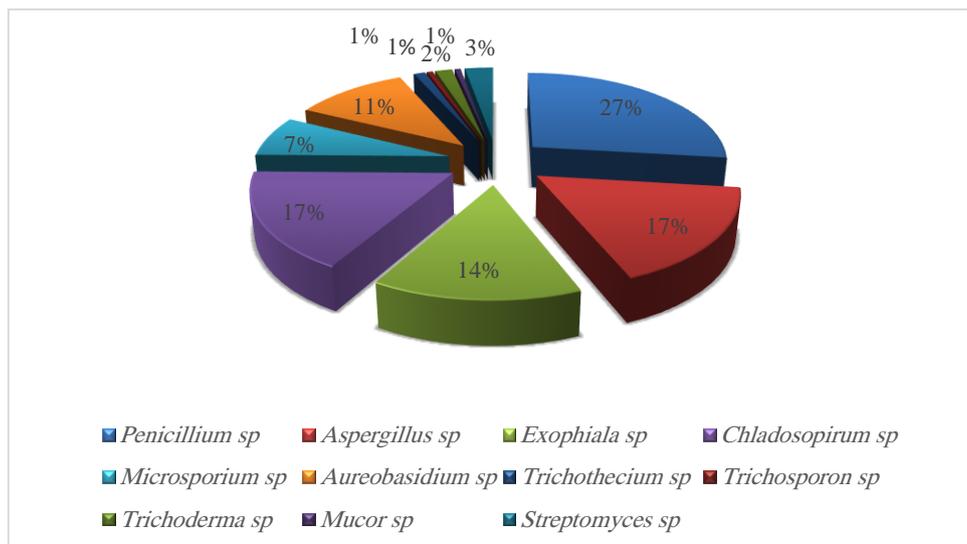


Figure 7 : Répartition des genres fongiques isolés de la farine.

Tableau 10: Concentration des moisissures isolées dans cette étude.

Genres espèces	Prévalence sur les échantillons (%)	Concentration de moisissure (uf)		
		Moyenne	Minimum	Maximum
<i>Penicillium spp</i>	14,63	1,94	1,00	3,18
<i>Aspergillus spp</i>	9,26	1,78	1,00	2,95
<i>Exophiala spp</i>	7,76	1,94	1,00	3,11
<i>Chladosporium spp</i>	9,26	1,81	1,00	3,20
<i>Microsporium spp</i>	3,88	1,92	1,00	2,95
<i>Aureobasidium spp</i>	5,97	2,04	1,30	3,26
<i>Trichothecium spp</i>	0,60	1,00	1,00	1,00
<i>Trichosporon spp</i>	0,30	2,00	0,00	0,00
<i>Trichoderma spp</i>	0,90	1,80	1,60	2,00
<i>Mucor spp</i>	0,30	1,00	0,00	0,00
<i>Streptomyces spp</i>	1,49	1,33	1,00	1,85

5.5. Révélation mycotoxicologique :

5.5.1. Révélation des souches productrices de mycotoxines par milieu CEA :

Après incubation à 25 °C pendant 7 jours sur milieu CEA, les cultures étaient exposées à la lumière UV_{365nm}. Les résultats ont montré que seulement les isolats d'*Aspergillus* et *Penicillium* ont donné une fluorescence à 365nm (Tableau11). Cette fluorescence est détectée autour des colonies d'*Aspergillus sp* et *Penicillium sp*. Cette fluorescence indique que les isolats ont produits une substance fluorescence probablement la mycotoxine. Ces résultats sont conformes aux résultats obtenus par Berthiers et *al.* (2001), Sahel (2014) et Ghaouti (2011).

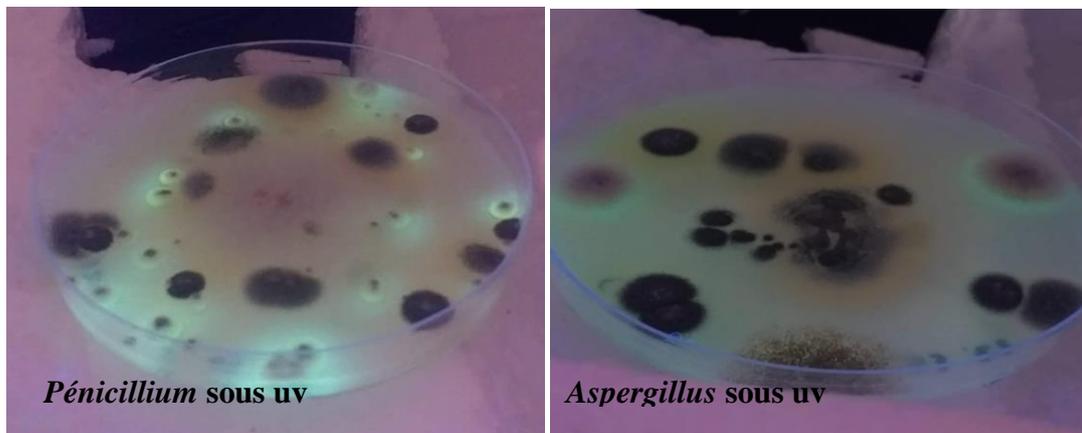


Figure 8 : Détection sous UV des souches productrices de mycotoxines sur milieu CEA.

Tableau 11 : Répartition des isolats producteurs de mycotoxine.

Genres espèces	Nombre des isolats obtenu	Nombre des isolats testés	Pourcentage des isolats producteurs de mycotoxine (%)
<i>Penicillium</i> spp	49	6	66.66
<i>Aspergillus</i> spp	31	8	75
<i>Exophiala</i> spp	26	4	0
<i>Chladosopirum</i> spp	31	3	0
<i>Microsporium</i> spp	13	1	0
<i>Aureobasidium</i> spp	20	2	0
<i>Trichothecium</i> spp	2	1	0
<i>Trichosporon</i> spp	1	1	0
<i>Trichoderma</i> spp	3	2	0
<i>Mucor</i> spp	1	1	0
<i>Streptomyces</i> spp	5	1	0

5.5.2. Révélation des souches productrices de mycotoxines par CCM :

La séparation chromatographique sur couche mince permet de confirmer le résultat obtenu avec la technique de (Lemek et *al.*, 1989). Les mycotoxines produites par les souches isolées de farine, développent une fluorescence marquée sur le chromatogramme.



Figure 9 : Détection des souches productrices de mycotoxines par CCM.

D'après la figure 8, la toxine qui apparaît avec une fluorescence bleue est probablement Aflatoxine B1 produite principalement par *Aspergillus*. Le genre *Penicillium* probablement produit l'ochratoxine A qui dévoile une fluorescence verte sous lampe UV.

5.6. Caractérisation de la croissance des moisissures :

Les cinétiques de croissance ont été ajustées à l'aide de modèle de Baranyi et Roberts (2004) (Figure 9). Il montre un bon ajustement avec de R^2 comprise entre 0.90 à 1. Les isolats testés montrent des capacités de croissance différentes renseignées par le temps de latence (jour) et taux de croissance $\mu_{T^{\circ}C}$ (jour^{-1}). En effet, les temps de latence et $\mu_{T^{\circ}C}$ s'étalent entre [0.01 à 2 jours] et [0.17 à 8 jours^{-1}] respectivement. Les résultats montrent que les paramètres de croissance dépendent de la souche (Tableau 12). En effet, une variabilité a été constatée au sein de même genres. Par ailleurs, les moisissures mycotoxinogène (*Aspergillus* & *Penicillium*) présentaient des temps de latence ($\lambda_{T^{\circ}C}$) et taux de croissance ($\mu_{T^{\circ}C}$) intermédiaire par rapport aux autres isolats testés (Tableau 13).

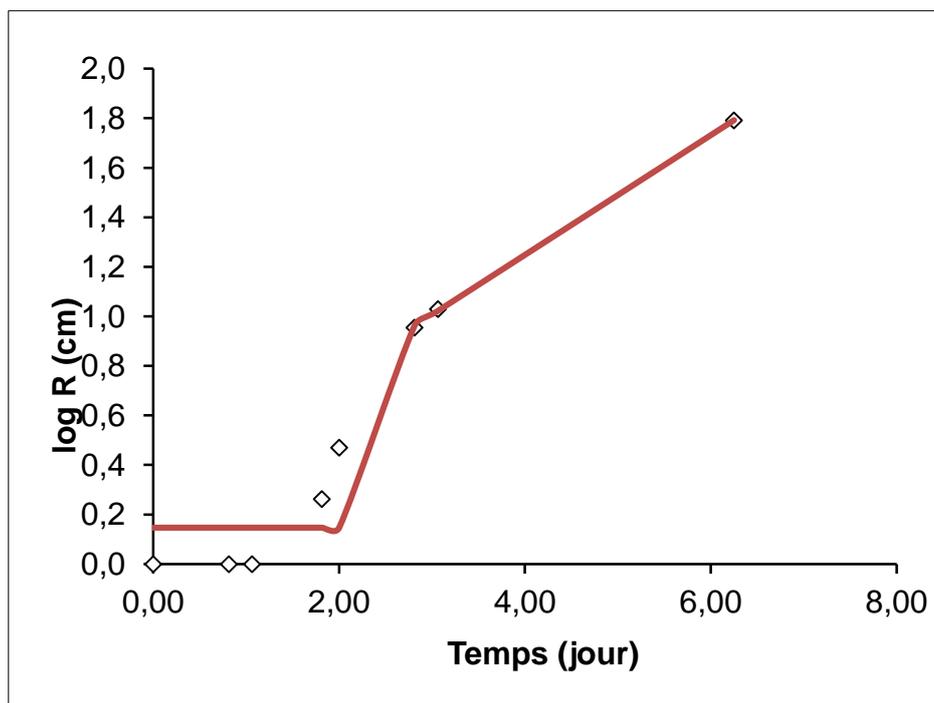


Figure 9 : Cinétique de croissance d'*Aspergillus* B2.

Tableau 12 : Paramètres de croissance de l'ensemble des moisissures testés.

	Moyenne	Minimum	Maxi
D0 (mm)	0,152	0	0,54
D_{max} (mm)	10,30	0	285,4
lag (λ) (jour)	0,35	0,01	2,42
μ_{max} (jours⁻¹)	0,83	0,17	8
SCE	0,37	0	4,11

Tableau 13 : Paramètres de croissances de chaque genre de moisissures

Genres	Nombre des isolats	D0 (cm)	D _{max} (cm)	lag (λ) (jour)	μ _{max} (jour ⁻¹)
<i>Penicillium spp</i>	49	0,17 ± 0,11	2,92 ± 0,84	0,079 ± 0,08	0,805 ± 0,92
<i>Aspergillus spp</i>	31	0,17 ± 0,13	28,80 ± 46,65	0,43 ± 0,64	0,397 ± 0,292
<i>Exophiala spp</i>	26	0,097 ± 0,064	2,300 ± 1,533	0,036 ± 0,0003	1,81 ± 2,21
<i>Chladosporium spp</i>	31	0,235 ± 0,162	2,091 ± 1,359	0,77 ± 0,74	0,85 ± 0,63
<i>Microsporium spp</i>	13	0,046	3,451	0,036	0,225
<i>Aureobasidium spp</i>	20	0,007 ± 0,007	1,725 ± 1,725	0,037 ± 0,0007	4,112 ± 3,887
<i>Trichothecium spp</i>	2	0	3,45	0,036	0,22
<i>Trichosporon spp</i>	1	0,14	3,45	0,036	0,22
<i>Trichoderma spp</i>	3	0,218 ± 0,031	3,45 ± 0	0,036 ± 0	0,22 ± 0
<i>Mucor spp</i>	1	0,000	4,000	2,00	0,225
<i>Streptomyces spp</i>	5	0,1463 ± 0,0001	2,72 ± 0,72	1,22 ± 1,19	0,34 ± 0,12

5.7. Effet de condition de préparation de pain sur croissance de moisissures testées :

L'évolution de la concentration moisissure durant la préparation de pain est simulée en tenant compte de données collectées de différentes boulangeries de la région d'Ain Témouchent. Le Tableau 14 montre les résultats de la simulation de l'effet de condition (temps et Températures) sur la croissance des moisissures testés. Les moisissures prises en considération seulement les moisissures toxigènes. Les résultats sont synthésés dans le Tableau 14. Les résultats ont montré qu'aucune préparation de pétrins n'accède la valeur seuil (4 log) durant le mois d'Aout contrairement au mois de Janvier. Cela est dû à la température favorable à la croissance de moisissures.

Tableau 14 : Résultats de la simulation de Monte Carlo.

	Janvier	Aout
Concentration initiale des moisissures : D (UF)		
Médiane	1.97	
99 th	3.05	
Concentration finale des moisissures mycotoxinogène [Mycoflore]		
Médiane	1.82	1.79
Nombre de portion $\geq 4^* \log$ UFC	0.062	0

* M régi par le tableau de spécification microbiologique de 2 Juillet 2017.

*Conclusion générale et
perspectives*

Tout au long de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'à l'assiette du consommateur, les moisissures sont susceptibles de se développer et de produire des toxines. Surtout si les conditions écologiques (humidité et la température) sont favorables. La contamination des aliments ou des graines peut avoir lieu avant ou pendant le stockage de la farine boulangère. La plupart des moisissures toxiques poussent dans les aliments à faible activité d'eau en élaborent des mycotoxines. Dans ce contexte, ce travail a été réalisé pour énumérer les mycoflore toxigène et d'évaluer leur croissance durant le stockage chez le boulanger.

Les principaux résultats ont montré la présence de moisissures mycotxinogène dans la farine utilisée pour la panification dans les boulangeries de la région d'Ain Témouchent, avec une dominance de *Penicillium* et *Aspergillus*. Les isolats obtenus de *Penicillium* et *Aspergillus* ont montré la capacité de produire la mycotoxine. Par ailleurs, l'ensemble des isolats obtenus ont montré leur capacité de croissance avec des paramètres variable. En fin, ma simulation de Monte Carlo de l'effet de conditions de stockage et préparation sur la mycoflore durant le stockage chez le boulanger ont montré une évolution significative ($P < 0.001$). Ces résultats présentent un impact socioéconomique apparu clairement dans le danger qui peuvent causer présente dans :

- Ingestion des mycoflore parfois pathogène ;
- Ingestion répétée des mycotoxine qui provoque des intoxications chroniques par la suite ;
- Altération de pain.

Face à cette recrudescence, il est recommandé d'assurer les bonnes pratiques d'hygiène et bonne pratique de fabrication, stockage.

Comme perspective, nous souhaitons d'effectuer d'autres études approfondies qui se résumant dans les points suivants :

- Etendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons ;
- Identification moléculaire des souches fongiques isolées de la farine pour connaître leur origine et leur toxicité (et même la possibilité de mutation).
- Modéliser la cinétique de production de mycotoxine durant la croissance de moisissures ;
- Estimation du risque liée à la consommation de pain.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Aamir, S. (2010). Rôle du pétrissage de farine de blé sur les propriétés rhéologiques de la pâte et la texture du pain. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes, France.
2. Afssa (2006). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale : Rapport synthétique.
3. Belhocine S. (2010). Les Algériens premiers consommateurs de pain dans le monde. Le Midi Libre. Récupéré sur <https://www.djazairress.com/fr/lemidi/1008100105>.
4. Bornet F. (1992). Le pain et produit céréaliers, alimentaire et nutrition humaines Edition, ESF. Paris.
5. Boucenna S., Herri M., Meliani L. (2006). Contribution à l'étude de la cinétique de croissance de quelques moisissures issues de produits alimentaires. En vue de l'obtention du diplôme d'études supérieure en biologie, Université de Jijel.
6. Bouderaoune S. (2013). La croissance des champignons filamenteux dans les milieux extrêmes. Mémoire de fin d'études Pour L'obtention du diplôme des études supérieures En Biologie, Université de Jijel.
7. Boudreau A., Ménard G. (1992). Le Blé: éléments fondamentaux et transformation. Sainte- Foy, Québec, Canada : Presses de l'Université de Laval.
8. Boutroux L. (1897). Le pain et la panification : chimie et technologie de la boulangerie et de la meunerie. Éditions J.B. Bailliere & Fils.
9. Calmes B. (2011). Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacees. Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases. Thèse de doctorat, Angers.
10. Carlotti A. (2014). Technologie/process Identification des moisissures. La Vague, 42: 10–12
11. Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., penn P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médical n°25, laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers, cedex. .
12. Codex.stan. (1985). Norme de codex pour la farine de blé. Codex Standard 1521985.
13. Després, J. (2012). L'univers des champignons. Canada: Les Presses de l'Université de Montréal.
14. DeVries J W., Trucksess M W., Jackson L S. (2002). Mycotoxins and Food Safety. Edition Springer Science & Business Media.

15. Deysson G., Delcourt A. (1980). Cryptogamie Mycologie générale et appliquée (2e édition revue et augmentée). Paris: SEDES-C.D.U.
16. D'halweyn M A., Leclerc J M., King N., Bélanger M., Legris M., Frenette Y. (2002). Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Quebec: Institut national de santé publique.
17. Doumandji A., Doumandji S., Doumandji M.B., (2003). Technologie de transformation des blés et problème dus aux insectes en stock, Ed : Office des publications universitaires, P.10.
18. Dragacci S., Zakhia-Rozis N., Galtier P. (2011). Danger dans l'assiette. Editions Quae.
19. Edah L., Ezin C., Latifou A B., Adda C., Vissienon C., Vissienon Z., *Ahyi v* (2021). Mycotoxines : Effets Sur La Santé Humaine. International Journal of Progressive Sciences and Technologies, Vol. 24 No. 2, p. 310-333. Bénin
20. FAO. (1977). Mycotoxines. Nairobi : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture Rome.
21. Feillet (2000). Le grain de blé: composition et utilisation, Editions QUAE
22. Fetouhi A. (2014). Panification à base de blé tendre ou de riz fêverole (sans gluten) : essai de prédiction de la qualité technologique par dissociation chimique des interactions impliquées. Mémoire de magister, Constantine.
23. Godon B Et Willm M.L., 1998:Les Industries De Première Transformation Des Céréales. Collection Sciences Et Techniques. Edit.Tech Et Doc-Lavoisier.Paris.
24. Guezlane-tebibel N., bouras N. etould el hadj M. D. (2016). Les mycotoxines: un danger de santé public. Algerian journal of arid environment 32 vol. 6, n°1, PP: 34-35
25. Guinet R. (2004). Technologie du pain Français. Paris: BPI.
26. Heit S. (2015). Identification de Fusarium et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Lorraine.
27. IARC. (1983). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans: Some food additives, feed additives and naturally occurring substances, volume31, IARC, Lyon, France.
28. INSPQ. (2019). *Penicillium* spp Récupéré sur : <https://www.inspq.qc.ca/>
29. Jard G. (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
30. Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., MacDonald S., Crews C. (2008). Mycotoxin analysis: An update Food Additives and Contaminants.

31. Labeled O., Labani F., Lakehal Z. (2013). La dégradation des hydrocarbures pétroliers par des moisissures. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme des études supérieures en Biologie Université de jijel.
32. Laffont C., Basset T. (2011). Les contaminations fongiques. La Lettre de l'OCIM, (138), 48-54.
33. Lahouar A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologiques. Thèse de doctorat en sciences biologiques et biotechnologie, université de Lleida.
34. Lemek P A., Davis N D., Creechgregory W. (1989). Direct visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of Aspergillus Species, Applied and environmental microbiology.
35. Lesel R. (2005). Agriculture in Brazil: sharing research. Editions Quae.
36. Leslie J F., Bandyopadhyay R., Visconti A. (2008). Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade. Wallingford: CAB International.
37. Leyral G, Vierling E, (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires, 4 ème éd,-Rueil –Malmaison: Doin ; Bordeaux: CRDP d'Aquitaine, (Biosciences et techniques: sciences des aliments).
38. Locquin, M. (1984). Mycologie générale et structurale. Paris; New York, Ed: Masson.
39. Makhlof J. (2019). Caractérisation de la biodiversité des souches d'Aspergillus de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
40. McNeil R. (2019). Le grand livre des champignons du Québec et de l'est du Canada — Édition revue et augmentée. Québec: Michel Quintin.
41. Meghazi N. (2012). Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké. En vue de l'obtention du diplôme de magistère, Uuniversité d'Alger.
42. Morin, O. (1994). Aspergillus et aspergilloses : Biologie. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses.
43. Nabahat, B. (2014). Isolement, identification et caractérisation des Altenaria sp responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Thèse de doctorat, Université d'Oran.
44. Nasraoui B. (2015). Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées. Univ Européenne; Illustrated édition. Publication de l'INAT, 180 p, Tunisie.

45. Nguyen M T. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
46. Nieuwenhuijzen, B. V. (2007). La culture des champignons à petite échelle - 2. Agrodok No. 41.
47. Pour ne pas se faire rouler dans la farine. (2014, octobre). Namure capitale. Récupéré sur <https://www.namur.be/fr/ma-ville/environnement/nature/publications/des-guides-pratiques/pour-ne-pas-se-faire-rouler-dans-la-farine>
48. Quillien J F. (2002). Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA), Paris, France.
49. Reboux G., Bellanger A P., Roussel S., Grenouillet F., Millon L. (2010). Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. Revue des Maladies Respiratoires, Elsevier Masson, 27, pp.169-179 France.
50. Ripert C. (2013). Mycologie médicale. Editions : Tec & Doc, Lavoisier, Paris
51. Salem S. (2008). Etude de l'effet de l'irradiation de la farine de blé sur ses propriétés microbiologiques et sur la rhéologie des pâtes obtenues. Projet de Fin d'Études Pour l'obtention du Diplôme National d'Ingénieur. Université de Carthage.
52. Sebai K. (2010). L'algérien consomme annuellement plus de 230 Kg de blé. Le Temps d'Algérie. Récupéré sur <https://www.djazairess.com/fr/letemps/37277>.
53. Tabuc C. (2007). Flore Fongique De différents Substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse doctorat, Université de Toulouse.
54. Tachenon, A. (1999). La science des champignons.
55. Zylberberg S. (2019). Différence entre la reproduction sexuée et la reproduction asexuée Récupéré sur <https://jeretiens.net/difference-entre-reproduction-sexuee-et-asexuee/>

ANNEXES

Annexe I

Tous les milieux de culture et les additifs ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

Gélose dichloran à 18% de glycérol (DG)

Ingrédients	Quantité (g)
Digestat enzymatique de caséine	5
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10
Phosphate monopotassique (KH ₂ PO ₄)	1
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ H ₂ O)	0.5
Dichloran (2, 6-dichloro-4-nitro-aniline)	0.002
Glycérolanhydre	220
Gélose	12
Chloramphénicol	0.1
Eau distillée ou déionisée qsp 1000mL	

Solution d'éléments trace (additif) pour milieu DG

Ingrédients	Quantité (g)
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.5
Eau distillée 100mL	

Gélose PDA (Potato Dextrose Agar)

Ingrédients	Quantité (g)
Pomme de terre	200
Dextrose (Glucose+saccharose)	10
Agar	15g
Eau distillée 1000mL	

Bouillon YES (Yeast Extract Sucrose)

Ingrédients	Quantité (g)
Sucrose	40
Extrait de levure	20
Eau distillée 1000mL	

Solution de vitamine B (additif) pour milieu YES

Ingrédients	Quantité
Vitamine tri B	10 comprimées
Eau distillée 100 mL	

Gélose CEA (Coconut Extract Agar)

Ingrédients	Quantité (g)
Noix de coco déchiqueté	100
Agar	20
Eau distillée chaude 300 mL	
Eau distillée 1000 mL	

