

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
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 Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département des Sciences Biologiques



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

**Etude mycologique et recherche de mycotoxines à partir de la flore
fongique présente dans les grains de blé entreposés dans les unités CCLS
de deux wilayas (Tlemcen et Aïn –Témouchent)**

Présenté Par :

- Melle BEN MOSTEFA Milouda

Devant le jury composé de :

Dr. BENELHADJ DJELLOUL Saadia	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. BENYAMINA Sofiane Mourad	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinateur
Pr. BELLAHCENE Miloud	Professeur	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2024/2025

Remerciements

*Tout d'abord, louange à «**ALLAH**» qui, m'a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail, m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes et m'a donné la volonté et le Courage. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrant, **Pr. BELLAHCENE Miloud**, pour sa disponibilité, sa patience et ses conseils précieux tout au long de ce travail. Son accompagnement rigoureux, sa bienveillance et sa pédagogie ont grandement contribué à la réalisation de ce projet. Grâce à son expertise et à ses encouragements constants, j'ai pu progresser tant sur le plan scientifique que personnel.*

Je le remercie sincèrement pour la confiance qu'il m'a accordée et pour l'enrichissement que cette expérience m'a apporté.

*Je remercie sincèrement les membres du jury qui ont bien voulu évaluer mon travail. Je remercie tout particulièrement, **Dr. BENELHADJ DJELLOUL Saadia**, présidente du jury, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider cette soutenance, ainsi que pour l'attention portée à mon travail. Mes remerciements s'adressent également au **Dr. BENJAMINA Sofiane Mourad**, examinateur, pour l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de mon mémoire.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des techniciens du laboratoire notamment **M. Ahmed Drif** pour leur aide précieuse tout au long de ce travail. Leur disponibilité, leur professionnalisme et leur sens du partage ont grandement facilité la réalisation des expériences. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.*

Enfin, nos remerciements s'adressent également à nos professeurs qui ont contribué à notre formation durant nos années d'études.

Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude :

À mes chers parents, Djamal, Farida

*Pour votre amour inconditionnel, votre soutien constant et vos sacrifices silencieux. Merci de m'avoir toujours cru capable, même quand moi, je doutais
Ce travail est aussi le vôtre.*

*À une personne qui a été pour moi un véritable soutien et un refuge sûr durant toutes ces années. Elle est pour moi comme une grande sœur. Si j'ai pu arriver là où je suis aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à elle, après Dieu. Je lui souhaite une santé durable et du bien-être, ainsi qu'à ses enfants, Ma petite sœur **Mariem** et mon petit frère **Zakaria**. Qu'ils atteignent, si Dieu le veut, les plus hauts sommets. **Khadija**, merci du fond du cœur.*

*À ma sœur **Yusra** et à mon frère **Mouhamed***

*À mon amie d'enfance et chère amie **Houda**, avec qui j'ai partagé tant d'années d'amour et de respect. J'aurais tant aimé partager ce travail avec toi, mais le destin en a décidé autrement et nous a séparées. Merci pour tous les merveilleux moments passés ensemble : chaque éclat de rire, chaque moment de tristesse, de faiblesse et même de force.*

À mes amis

Merci pour les moments de travail et de plaisir que nous avons partagés. Votre compagnie a rendu cette aventure d'apprentissage encore plus plaisante et mémorable

Table de matière

Remerciements	I
Dédicace	II
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES TABLEAUX	IV
LISTE DES ABRIVIATIONS	V
LISTE DES ANNEXES	VI
Introduction	1
Synthèse bibliographique	3
I. Généralité sur le blé	3
1. Définition et origine.....	3
2. Position systématique du blé.....	3
3. Structure et composition du grain de blé.....	4
3.1. Structure.....	4
3.2. Composition du grain de blé.....	5
4. Les Type du blé.....	5
4.1. Blé tendre.....	5
4.2. Blé dur.....	5
5. Importance du blé.....	6
5.1. A l'échelle mondiale.....	6
5.2. A l'échelle nationale.....	6
6. Stockage du blé.....	7
6.1. Modes de stockage.....	7
6.1.1. Silos souterrains « El matmoura ».....	7
6.1.2. Stockage du blé en silos.....	7
6.1.3. Stockage en sac.....	7
6.1.4. Stockage en vrac (courte durée).....	8
7. Importation du blé en Algérie.....	8
8. Facteurs d'altération du blé	8
8.1. Altération d'origine environnementale.....	8
8.1.1. L'humidité.....	8

8.1.2. Température.....	9
8.2. Altérations enzymatiques.....	9
8.3. Altération d'origine mécanique ou physique.....	9
8.4. Altération d'origine biologique.....	9
9. Effets néfastes des altérations.....	10
II. Les moisissures pathogènes du blé	11
1. Généralités sur les moisissures.....	11
2. Caractéristiques des moisissures.....	12
3. Habitat et pathogénicité.....	13
4. Classification des champignons filamenteux.....	14
5. Mode de vie des moisissures.....	14
6. Moisissures pathogènes du blé.....	15
6.1. Flore des champs.....	15
6.1.1. Le genre <i>Alternaria</i>	15
6.1.2. Le genre <i>Fusarium</i>	15
6.2. Flore de stockage.....	16
6.2.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	16
6.2.2. Le genre <i>Penicillium</i>	17
6.3. Flore intermédiaire.....	18
III. Les mycotoxines.....	18
1. Généralités sur les mycotoxines.....	18
2. Historique.....	20
3. Nature et origine des mycotoxines.....	20
4. Biosynthèse des mycotoxines.....	21
5. Production des mycotoxines.....	22
6. Principales mycotoxine.....	22
6.1. L'aflatoxine.....	22
6.2. L'ochratoxine A.....	23
6.3. La patuline.....	23
7. Méthodes d'analyse des mycotoxines.....	24
7.1. Méthode physico-chimique	25
7.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	25

7.1.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	25
7.1.3. Chromatographie en phase gazeuse.....	25
7.2. Méthodes immunologiques.....	26
8. Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines.....	26
8.1. Respect des bonnes pratiques agricoles "BPA".....	26
8.2. Respect des bonnes pratiques de stockage "BPS ".....	27
8.3. Décontamination et détoxification (Méthodes scientifiques de lutte).....	27
8.3.1. Méthodes physiques.....	27
8.3.2. Méthodes chimiques.....	28
8.3.3. Méthodes biologiques.....	29
Matériel et méthodes.....	31
I. Origine des échantillons et objectif de travail.....	31
II. Echantillonnage.....	31
III. Analyses physico-chimiques.....	32
1. Procédure de stérilisation avant les manipulations.....	32
2. Détermination de l'humidité.....	32
3. Détermination du pH.....	32
IV. Analyses mycologiques.....	33
Isolement, purification et identification de la flore fongique	33
1. Isolement de la flore fongique.....	33
1.1. Milieu d'isolement.....	33
1.2. Méthodes d'isolement.....	33
1.2.1. Méthodes directe.....	34
1.2.2. Méthode d'isolement indirecte (Méthode de dilution).....	35
2. Repiquage et purification des isolats.....	38
3. Conservation des isolats.....	38
4. Identification des moisissures.....	39
4.1. Identification macroscopique.....	39
4.2. Identification microscopique.....	39
4.2.1. Méthode de ruban adhésif au bleu de méthylène.....	40
4.3. Caractères morphologiques d'identification du genre <i>Aspergillus</i>	40
4.3.1. Description macroscopique d' <i>Aspergillus</i>	40

4.3.2. Description microscopique d' <i>Aspergillus</i>	40
4.4. Caractères morphologiques d'identification du genre <i>Penicillium</i>	41
4.4.1. Aspect macroscopique.....	41
4.4.2. Caractères microscopiques.....	41
V. Recherche des isolats producteurs de mycotoxines.....	42
1. Méthode de détection visuelle des isolats producteurs de mycotoxines.....	42
2. Technique de chromatographie sur couche mince (CCM).....	42
2.1. Ensemencement sur milieu YES.....	42
2.2. Extraction des mycotoxines.....	43
2.3. Analyse chromatographique par CCM.....	44
2.3.1. Séparation chromatographique.....	44
Résultats et discussion.....	46
I. Résultats des analyses physicochimiques des deux types de blé.....	46
1. L'humidité relative (HR).....	46
2. Résultats du pH.....	47
II. Résultats des analyses mycologiques des deux types de de blé	48
1. Mise en évidence de la flore fongique.....	48
2. Résultats de l'identification des isolats fongiques.....	52
2.1. Résultats de l'étude macroscopique.....	52
2.2. Résultats de l'étude microscopique par la méthode de ruban adhésif et bleu de méthylène.....	54
III. Pouvoir toxigène des moisissures.....	59
1. Mise en évidence de mycotoxines.....	59
1.1. Résultats de la méthode de détection visuelle sur le milieu CEA.....	59
1.2. Résultats de la méthode de CCM.....	60
Conclusion et Perspectives.....	64
Références bibliographiques	65
Annexes.....	80
Résumé.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de grain de blé.....	4
Figure 2 : Blé Tendre.....	5
Figure 3 : Blé dur.....	5
Figure 4 : Classification des champignons filamenteux.....	14
Figure 5 : Prélèvement d'échantillons de blé auprès de l'unité CCLS d'Ain Témouchent	31
Figure 6 : Appareillage utilisé pour le calcul le taux d'humidité des grains de blé.....	32
Figure 7 : Isolement des moisissures par la méthode de buvard modifié.....	34
Figure 8 : Méthode directe d'Ulster.....	35
Figure 9 : Isolement des moisissures de blé par la méthode de dilution.....	36
Figure 10 : Technique d'isolement des isolats fongiques à partir des grains de blé par la méthode indirecte.....	37
Figure 11 : Repiquage et purification de isolats fongique.....	38
Figure 12 : Conservation des isolats.....	38
Figure 13 : Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de scotch et coloration bleu de méthylène.....	40
Figure 14 : Caractéristiques microscopiques des <i>Aspergillus</i>	41
Figure 15 : Caractéristiques microscopiques des <i>Penicillium</i>	41
Figure 16 : Préparation et ensemencement des rondelles sur milieu YES.....	42
Figure 17 : Diagramme d'extraction et de purification du mycotoxine à partir du milieu liquide YES.....	43
Figure 18 : Extraction de l'extrait contenant des métabolites secondaires.....	44
Figure 19 : Séparation chromatographique par CCM.....	45
Figure 20 : Taux d'humidité des échantillons de blé tendre et dur pour les deux wilayas.....	47
Figure 21 : Valeurs moyennes de pH des échantillons de blé tendre et dur pour les deux wilayas.....	48
Figure 22 : Colonies fongiques obtenues par la méthode de dilution à partir des grains de blé dur et tendre pour les deux wilayas.....	50
Figure 23 : Colonies fongiques obtenues par la méthode directe (Ulster) à partir des grains de blé dur et tendre provenant de la wilaya de Tlemcen.....	50
Figure 24 : Pourcentages des isolats fongiques obtenus à partir de chaque type de blé.....	51
Figure 25 : Répartition des isolats selon leur genre.....	57
Figure 26 : Colonies fongiques obtenus sur milieu CEA avec zone de fluorescence, prises sous UV à une longueur d'onde de 365 nm.....	59
Figure 27 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots de mycotoxines produites par les moisissures.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Position systématique du blé dur et blé tendre.....	3
Tableau 2 : Principales caractéristiques des champignons.....	12
Tableau 3 : Certains espèces de <i>Fusarium</i> et leurs mycotoxines.....	16
Tableau 4 : Certains espèces d' <i>Aspergillus</i> et leurs mycotoxines.....	16
Tableau 5 : Espèces de <i>Penicillium</i> et leurs mycotoxines.....	17
Tableau 6 : Moisissures et les mycotoxines retrouvées dans divers aliments.....	19
Tableau 7 : Origine chimique des mycotoxines.....	21
Tableau 8 : Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines.....	24
Tableau 9 : Taux d'humidité des échantillons de blé dur et tendre.....	46
Tableau 10 : Résultats obtenus par la méthode de dilution.....	49
Tableau 11 : Résultats obtenus par la méthode directe.....	49
Tableau 12 : Caractères macroscopiques des différents isolats obtenus à partir des grains de blé analysés par les deux méthodes.....	52
Tableau 13 : Caractères microscopiques des isolats obtenus à partir des grains de blé par les deux méthodes et pour les deux wilayas.....	55
Tableau 14 : Nombre des moisissures obtenus dans les échantillons de blé après identification macroscopique et microscopique.....	57

LISTE DES ABRIVIATIONS

Aw : Activité de l'eau

UV : Ultra-Violet

T ° : Température

C ° : Degrés Celsius

g : gramme

mg/l : Milligramme par litre

pH : Potentiel hydrogène

CCLS : Coopérative des Céréales et Légumes Secs

AFB1 : Aflatoxine B1

OTA : Ochratoxine A

PAT : Patuline

COA : Coenzyme A

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

IARC : Centre international de recherche sur le cancer

CCM : Chromatographie sur couche mince

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

RIA : Radioimmunologique

BPA : Bonnes pratiques agricoles

BPS : Bonnes pratiques de stockage

PDA : Milieu Potato dextrose agar

CDA : Milieu Czapek Dox Agar

PCA : Milieu Plate Count Agar

MEA : Milieu Malt Extract Agar

CYA : Milieu Czapek Dox + Extrait de levure

YES : Milieu Yeast Extract Sucrose

CEA : Milieu Coconut extract agar

ng/Kg : nanogramme par kilogramme

µg/Kg : microgramme par kilogramme

LISTE DES ANNEXES

Composition des milieux de culture.....	80
Composition des milieux CDA, MEA, CYA, PDA.....	80
Composition des milieux Sabouraud, PCA, Eau gélosée, Eau physiologique, CEA.....	81
Composition de milieu YES... ..	82
Préparation de bleu de méthylène.....	82

Introduction générale

Pour les sociétés humaines, les risques en matière d'alimentation sont de deux ordres : la quantité de nourriture disponible (sécurité alimentaire) et la qualité des produits alimentaires (sûreté alimentaire). Il y a moins de deux siècles, la population humaine souffrait énormément par manque de nourriture que par toxicité alimentaire. Après-guerre, un système de production intensif s'est tout d'abord développé pour répondre aux besoins quantitatifs. Ce système s'est ensuite organisé pour améliorer la qualité des produits alimentaires (Botton *et al.*, 1990).

La sûreté alimentaire est un problème de santé publique. Elle est liée à des phénomènes biologiques (bactéries et moisissures), à la pollution de l'alimentation par des produits chimiques (métaux lourds, pesticides, nitrates, dioxines) ou à des techniques inadaptées (mycotoxines résultant d'un mauvais séchage des produits récoltés, par exemple). Elle représente aujourd'hui des enjeux économiques considérables, puisque 20 à 25% des intoxications alimentaires relevées sont dues à l'utilisation de matières premières altérées (contaminations d'origine chimique ou microbiologique) (Le Bars, 1984).

La mondialisation du commerce a entraîné une mondialisation des normes : pour pouvoir exporter, il faut désormais respecter les règles sanitaires spécifiques des zones de commercialisation. Depuis des siècles, l'homme comme les animaux consomment quotidiennement des céréales sans crainte et sans danger. Depuis quelques décennies, à la lumière d'analyses dont les limites de détection ne cessent d'être repoussées, nous nous préoccupons de substances présentes dans des proportions infinitésimales de l'ordre de partie par million. Ces substances, appelées métabolites secondaires synthétisés par des champignons microscopiques, méritent toute notre vigilance car ces mycotoxines peuvent, en forte concentration, rendre inutilisable un lot pour la consommation humaine ou animale (Le Bars, 1984).

Plus que jamais la sécurité de l'alimentation est au cœur de toutes les préoccupations. Quand les technologies repoussent sans cesse les limites de détection des molécules, arrivant désormais à l'échelle de quelques microgrammes par kilo, on pourrait craindre des exagérations dans la fixation des seuils réglementaires (Botton *et al.*, 1990).

La présence des champignons pathogènes dans les produits agricoles occasionnent des pertes de rendement et l'altération de leur qualité. Certaines espèces fongiques sont susceptibles de synthétiser des mycotoxines, quasi-inévitables pour les denrées alimentaires, qui rendent les récoltes impropres à la consommation, peuvent influencer négativement la croissance et la fertilité des animaux d'élevage ainsi que la santé humaine et peuvent avoir des conséquences économiques très graves (Botton *et al.*, 1990).

La lutte contre les mycotoxines et leurs producteurs dans les aliments est l'un des axes des travaux menés par plusieurs équipes de recherche au niveau mondial. Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination. Tandis que les professionnels de l'agro-industrie prennent des mesures de plus en plus strictes pour garantir l'innocuité des aliments, les pouvoirs publics mettent également en place des normes de plus en plus sévères pour prévenir au mieux les risques sanitaires. S'inspirant de ces connaissances et face aux dangers que peuvent apporter les mycotoxines, il est devenu indispensable de contrôler ces agents phytopathogènes et leurs métabolites secondaires (Dieme *et al.*, 2016).

De ce fait, le but de ce travail consiste à apporter une contribution à l'étude de certaines espèces fongiques ayant des propriétés toxinogènes. Ces espèces se développent mutuellement dans des produits agricoles, notamment dans des grains de blé dur et tendre entreposés.

Le mémoire comprend trois chapitres, avec une introduction justifiant l'intérêt de ce travail. Le premier chapitre est consacré à la présentation d'une synthèse bibliographique consacrée essentiellement à quelques généralités sur les céréales (blé tendre et blé dur), origine, systématique, structure et composition ensuite à la présentation des moisissures pathogènes et responsables de production des mycotoxines chez les céréales. Cette partie est complétée par la présentation des mycotoxines et les méthodes d'analyses de ces métabolites.

Le second chapitre expose la partie expérimentale. Dans ce chapitre, tous les protocoles expérimentaux sont décrits. Le troisième et dernier chapitre présente les résultats et leurs discussions. Enfin, ce travail est achevé par une conclusion et quelques perspectives.

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur le blé

1. Définition et origine

Le blé est une monocotylédone de la famille des Poaceae appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscant, le caryopse. Le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde (Debiton, 2010). Il fournit plus de 60 % de calories et des apports en protéines de l'alimentation humaine. Une particularité du blé réside dans la forte teneur en amidon (70 %) et en gluten (15 %) (Zouaoui, 2012 ; El Hadeff El Okki, 2015). Le blé est la seule céréale donnant une farine panifiable grâce à la nature et ces protéines de réserve qui permettent la formation du réseau de gluten (Lesage, 2011). Il est aussi utilisé depuis plusieurs années comme matière première pour la fabrication de biocarburants (Debiton, 2010), et constitue également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et pour de multiples applications industrielles (Nour et Louhichi, 2015). La détermination de l'origine des génomes du blé est difficile du fait de l'évolution des espèces. Les connaissances actuelles ont été acquises grâce à des études cytologiques. Mais, le développement des outils moléculaires a permis d'affiner et de compléter ces connaissances (Ben Kaddour, 2014).

2. Position systématique du blé

Le blé est un fruit sec et indéhiscant, appelé caryopse, constitué d'un grain et de téguments. Il est monocotylédone appartenant au genre *Triticum*, tribu des Triticeae, famille des Poaceae (Feillet, 2000). Le tableau 1, présente la Position systématique du blé dur et blé tendre.

Tableau 1 : Position systématique du blé dur et blé tendre (Doumandji *et al.*, 2003 ; Mazoyer, 2002).

	Blé dur	Blé tendre
Règne	Végétale	Végétale
Embranchement	Stomatifères	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes	Angiospermes
Classe	Monocotylédones	Monocotylédos
Ordre	Glumales	Graminales
Famille	Graminées (graminacées) (Poacées)	Graminacées (Poacées)

Genre	<i>Triticum</i>	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum turgidum</i> (synonyme : <i>Triticum durum</i>).	<i>Triticum</i> vulgaire aussi appelé <i>Triticum aestivum</i>

3. Structure et composition du grain de blé

3.1. Structure

Le grain de blé est un caryopse, ce fruit sec indéhiscent est constitué d'une unique graine intimement soudée à l'enveloppe du fruit qui la contient. Sur l'épi le grain est entouré d'enveloppes : les glumes et les glumelles (Kedia *et al.*, 2016). Au niveau morphologique le grain de blé est ovoïde et présente sur la face ventrale un sillon qui s'étend sur toute sa longueur (Surget et Barron, 2005).

Structure du grain à maturité : Enveloppes : Composées de cinq tissus péricarpe externe, péricarpe interne (couche tubulaire et cellules croisées) (Kara *et al.*, 2015), testa (ou tégument séminal) et bande hyaline (épiderme du nucelle). Germe (3 %) : Constitué du scutellum et d'un embryon formé de la coléoptile, gemmule, radicule, coléorhize et coiffe. Albumen : Comporte la couche à aleurone (seul tissu vivant à maturité, non présent dans la farine après broyage car lié au péricarpe) et l'albumen amylicé, riche en granules d'amidon dans une matrice protéique (Lesage, 2011). La figure 1, présente la structure de grain de blé.

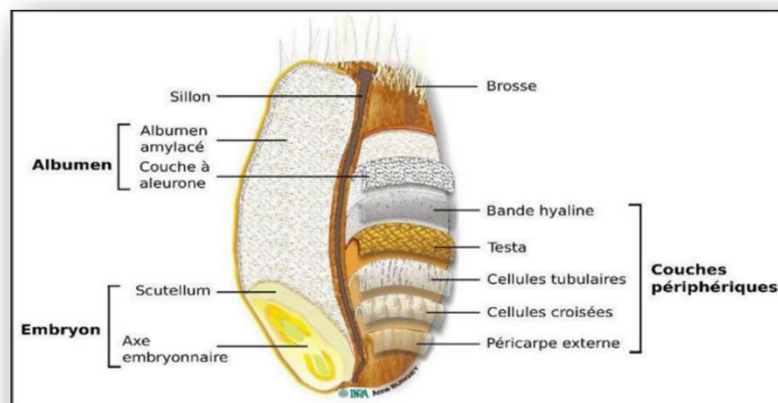


Figure 1 : Structure de grain de blé (Micard *et al.*, 2009).

3.2. Composition du grain de blé

Il est constitué majoritairement d'amidon qui représente environ 70 % de la matière sèche du grain et qui est situé dans l'albumen (Bamidele *et al.*, 2019). Les protéines représentent entre 10 et 15 % de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus des grains de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (Pomerayn, 1988). Les pentosanes (polysaccharides non amyliques) représentent quant à eux entre 2 et 3 % de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80 %) (Debiton, 2010).

4. Les Type du blé

Le blé est en effet l'une des cultures les plus anciennes et importantes au monde (Alba *et al.*, 2017). Les céréales, comme le blé, constituent une part essentielle de l'alimentation humaine, fournissant des glucides, des protéines et d'autres éléments nutritifs importants. La distinction entre le blé tendre et le blé dur est cruciale dans de nombreuses applications culinaires (Aidani, 2015 ; Benakriche *et al.*, 2016).

4.1. Blé tendre

Le blé tendre (*Triticumaestivum*), ou blé panifiable se caractérise par une forte teneur en protéines et en gluten, et par un albumen de texture plus ou moins dure (Dawlal *et al.*, 2019). Ses débouchés sont : 20 % vers la meunerie (fabrication du pain, des pâtisseries et des biscuits); 20 % vers l'amidonnerie ; 10 % vers l'alimentation animale et 50 % exportée (Aidani, 2015). La figure 2, présente le blé tendre.

4.2. Blé dur

Le blé dur (*Triticum Durum*) ou blé pastifiable est connu pour sa dureté, sa forte teneur en protéines, sa couleur jaune intense, son goût de noisette et ses excellentes qualités de cuisson, 25 à 30 millions de tonnes de blé dur sont produites chaque année, soit 4 % de la production mondiale de blé (Aidani, 2015). La figure 2, présente le blé tendre et la figure 3, présente le blé dur.



Figure 2 : Blé Tendre (Aidani, 2015)



Figure 3 : Blé dur (Aidani, 2015)

5. Importance du blé

5.1. A l'échelle mondiale

La production de blé est répartie sur l'ensemble du globe puisque le blé pousse même si la température n'est guère favorable ou que l'eau est rare (Ben Braiek et Smaoui, 2019). Le blé occupe la première place pour la production mondiale comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15 % de ses besoins énergétiques (Bajji, 1999). Il est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climat arides et semi-arides (Mahideb et Merrouche, 2015). Elle se classe au quatrième rang mondial en matière de culture, derrière le riz, le maïs et la canne à sucre (Kezih *et al.*, 2016). Grâce à de multiples techniques culturales et de sélection génétique ayant permis une augmentation et une amélioration du rendement et de la production (Jacquemin *et al.*, 2017). Il présente, un rôle social, économique et politique dans la plupart des pays dans le monde (Zettal, 2017).

5.2. A l'échelle nationale

Depuis l'indépendance, les différentes politiques et interventions de l'état dans le secteur agricole avaient pour but d'améliorer le niveau de production des céréales en Algérie, et du blé dur en particulier (Bourras, 2001). La production nationale des céréales demeure insuffisante et couvre moins de 25 à 30 % des besoins nationaux. Selon le ministère de l'agriculture, la production annuelle des céréales varie d'une année à l'autre. La production céréalière a enregistré un record, durant la campagne agricole 2017-2018, récoltant environ 6,1 millions de tonnes. En 2020-2021, la production a été estimée à environ 1,3 million de tonnes, cette production était inférieure à celle de la saison précédente (3,9 millions de tonnes) en raison d'une baisse de 40 % de la production céréalière due à la rareté des pluies. Le ministère algérien de l'Agriculture a prévu, avec le début de la récolte début mai dernier, que la production de blé durant la saison 2023-2024 se situerait entre 5 et 5,5 millions de tonnes, contre 3,5 millions de tonnes lors de la saison précédente. Malgré cette production, l'état a toujours recours au marché étranger pour assurer à tous les citoyens un accès équitable à cet aliment (Morsli, 2010 ; Louze et Hadjaïssa, 2018). Sa consommation augmente rapidement, principalement du fait d'une augmentation démographique et de la nature du régime alimentaire de l'Algérien accès essentiellement sur les céréales (Zettal, 2017).

6. Stockage du blé

C'est une pratique essentielle pour garantir la sécurité alimentaire et assurer la disponibilité de semences pour la prochaine saison de plantation. Le stockage adéquat des grains est important pour préserver leur qualité et leur valeur alimentaire (Molinie *et al.*, 2005). Le but de la conservation est de maintenir l'intégrité des principales qualités des grains par des méthodes appropriées qui ne peuvent pas être améliorées pendant le stockage (Kezih *et al.*, 2016). Ces méthodes traditionnelles ont sans aucun doute été innovantes pour leur époque, mais les silos modernes offrent maintenant des avantages supplémentaires en termes de préservation et de gestion des récoltes (Druvefors, 2004). Le blé est récolté une seule fois par an et quelquefois deux fois dans l'année dans certains pays d'où la nécessité du stockage (Druvefors, 2004). Les conditions d'entreposage jouent un rôle important dans la préservation des graines, car des conditions inadéquates peuvent entraîner la germination et la croissance de moisissures (Morsli, 2010 ; Louze et Hadjaissa, 2018). Éviter la ré-humidification des graines et le chauffage biologique est essentiel pour maintenir leur qualité (Martí-Quijal *et al.*, 2020). Il existe une grande diversité de méthodes de stockage, chacune adaptée aux besoins et aux ressources disponibles localement (Belaid, 2014).

6.1. Modes de stockage

6.1.1. Silos souterrains « El matmoura »

Le paysan algérien, sur les hauts plateaux, conservait surtout le produit de ses champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées dans un sol argileux; c'est ce qu'on appelle « El matmour » ou dans des sacs en toile de jute, entreposés dans divers locaux, magasins ou hangars (Martí-Quijal *et al.*, 2020). La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes (Doumandji *et al.*, 2003).

6.1.2. Stockage du blé en silos

Les silos permettent de stocker les différents types de céréales en même temps (blé dure, blé tendre, orge...) (Duron, 1999). On trouve des enceintes silos cylindriques en béton armé ou en métal inoxydable (Belaid, 2014). L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux (Doumandji *et al.*, 2003 ; Mahideb et Merrouche, 2015).

6.1.3. Stockage en sac

C'est une méthode courante pour conserver les grains des céréales, utilisant des sacs en toile de jute ou en polypropylène, souvent de manière temporaire (Doumandji *et al.*, 2003 ; Mahideb et Merrouche, 2015). Lorsque les locaux de grande capacité sont saturés en raison

d'une forte production, des hangars et des magasins annexes sont utilisés pour entreposer les sacs supplémentaires (Doumaindji *et al.*, 2003).

6.1.4. Stockage en vrac (courte durée)

Le stockage en tas dans des hangars ouverts à charpente métallique expose les grains à différents risques (Martí-Quijal *et al.*, 2020). Les contaminations restent possibles en raison des espaces entre les murs et le toit, permettant le passage des nuisibles tels que les souris, les rats, les oiseaux et les insectes (Wang et Xie, 2020). De plus, l'influence des intempéries demeure, favorisant le développement de moisissures et de bactéries, ce qui peut compromettre la qualité des grains stockés (Doumaindji *et al.*, 2003). La topographie des lieux est essentielle pour le stockage des grains, qu'il soit en vrac ou en sac. Il est préférable d'éviter les zones basses et inondables, en privilégiant les points hauts d'où les eaux de pluie peuvent s'évacuer facilement (Cassier *et al.*, 1998).

7. Importation du blé en Algérie

Sur le marché mondial, l'Algérie reste l'un des principaux importateurs de céréales, notamment de blé dur et le blé tendre, en raison de l'incapacité de la production nationale à satisfaire les besoins croissants de la population (Ammar, 2014). Au cours des cinq dernières années, l'Algérie a importé entre 6 et 7 millions de tonnes de blé par an (Hales et Rush, 2016). En 2015, le blé tendre représentait environ 80 % du total des importations, tandis que le blé dur en représentait seulement 20 % (Wang et Xie, 2020). Cela est dû à une production domestique plus faible de blé tendre par rapport au blé dur, et malgré l'augmentation des rendements grâce à une stratégie agricole, la production nationale ne parvient pas encore à répondre à la demande (Ammar, 2014). La France est le principal fournisseur de blé pour l'Algérie, représentant 54 % des importations en 2015, principalement en blé tendre. L'Algérie importe également du blé dur du Canada, du Mexique et des États-Unis (Hales et Rush, 2016).

8. Facteurs d'altération du blé

8.1. Altération d'origine environnementale

8.1.1. L'humidité

La teneur en humidité est cruciale lors du stockage des grains. Un taux d'humidité élevé favorise la croissance d'insectes et de moisissures entraînant des pertes importantes (Ammar, 2014). C'est pourquoi le contrôle de l'humidité est essentiel pour préserver la qualité des grains (Vasquez *et al.*, 2008).

8.1.2. Température

La température joue un rôle important dans la conservation des grains (Mahideb et Merrouche, 2015 ; Darocha *et al.*, 2002). Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité des grains au cours de stockage (Mahideb et Merrouche, 2015 ; Kachour, 2005). Elle intervient d'une part sur la valeur de l'activité de l'eau (A_w) et d'autre part sur les vitesses de réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes (Richard-Molard, 1998).

8.2. Altérations enzymatiques

Les altérations enzymatiques dues aux enzymes propres aux grains se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies (Multon, 1982). C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxigénase. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation (Afnor, 1986). Les réactions de Maillard donnent aussi un grand nombre de composés intermédiaires aboutissant dans leur stade ultime à la formation de composés brunâtres avec une destruction des vitamines B1, E et les caroténoïdes (Afnor, 1986).

8.3. Altération d'origine mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des cassures et favorisant les autres causes d'altération (Martí-Quijal *et al.*, 2020). L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (Afnor, 1986).

8.4. Altération d'origine biologique

La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique (Magan *et al.*, 2003). Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (Mills, 1990). L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de la valeur nutritive ainsi qu'à des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques, et aussi aux modifications des propriétés rhéologiques du grains (Molinie *et al.*, 2005).

- **Les macroorganismes**

Divers petits vertébrés rongeurs (souris, rats et oiseaux) peuvent vivre aux dépens des stocks de grains mal protégés, dont ils peuvent consommer des quantités considérables (Multon, 1982). De plus, ils peuvent jouer le rôle d'un vecteur de germes pathogènes provoquant des contaminations et des lésions physiques dans les tissus végétaux qui favorisent donc la pénétration des spores (Jouany *et al.*, 2002). La présence de la plupart des arthropodes, et singulièrement d'acariens, est révélatrice de mauvaises conditions de conservation (Cui *et al.*, 2015). Les acariens vivant sur les grains moisissés, récupèrent et transportent les spores de champignons sur leur corps, mais également dans leur tube digestif et leurs fèces (Maja, 2016). Beaucoup d'acariens consomment les moisissures, préférant d'ailleurs les espèces les plus abondantes (Molinie *et al.*, 2005). Les insectes endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration des moisissures à l'intérieur de la graine (Martí-Quijal *et al.*, 2020). . . Quelques insectes disséminent des espèces mycotoxinogènes. Là où les insectes et les rongeurs sont contrôlés, les moisissures sont souvent la cause unique de la détérioration (Magan *et al.*, 2003).

- **Les microorganismes**

Des très grands nombres de moisissures sont capables de détériorer les denrées alimentaires. Ces moisissures sont le plus souvent des saprophytes banaux. La mycoflore est estimée 80 000 et 100 000 espèces (Pfohl-Leskowicz, 1999). Les plus répandues sont les *Penicilliums* et les *Aspergillus* qui sont aérobies strictes (omniprésentes dans la nature), hétérotrophes, peu exigeantes et possédant un potentiel élevé de sécrétion d'enzymes extracellulaires (Martí-Quijal *et al.*, 2020). Ces types de moisissures sont capables de se développer sur toutes sortes de nourriture : céréales, viande, lait, fruits, légumes, ... (Filtenborg *et al.*, 1996).

9. Effets néfastes des altérations

Les grains de céréale forment un excellent milieu de culture pour les moisissures. Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, assurée par une infection des mycètes (Spadaro *et al.*, 2012). Cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (Mills, 1990). L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de la valeur nutritive ainsi qu'à des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques (Olsson, 2000), et aussi aux modifications des propriétés rhéologiques du grain

(MOLINIE *et al.*, 2005). Certaines espèces fongiques sont responsables de mycoses et de réactions allergiques chez l'homme et l'animal (Steyn, 1995). Les effets les mieux connus sont ceux provoqués par *Aspergillus fumigatus* responsable d'aspergillose pulmonaire et de mammites chez les animaux (Bauer et Garie, 1987).

II. Les moisissures pathogènes du blé

1. Généralités sur les moisissures

Le terme «moisissure» est utilisé dans le langage courant pour désigner les champignons microscopiques unicellulaires ou pluricellulaires englobant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), présentant une apparence filamenteuse ou levuriforme (Oueslati *et al.*, 2012). Ce sont des micro-organismes eucaryotes dont les cellules s'allongent pour former des filaments coénocytiques (non cloisonnés) ou septés (cloisonnés) d'environ 2 à 12 μm de diamètre (Diao *et al.*, 2015). L'enchevêtrement des filaments donne naissance à un mycélium visible à l'œil nu sur les milieux de culture (colonie fongique) ou les substrats colonisés (Gilbert *et al.*, 2016). Dans la classification du vivant, les mycètes forment un règne distinct de celui des végétaux et des animaux (Chabasse *et al.*, 2002). Ces champignons sont généralement hétérotrophes, saprophytes et capables de se propager dans différents environnements grâce à leurs aptitudes métaboliques étendues (Gilbert *et al.*, 2016). Les champignons interagissent avec les espèces animales et végétales sous diverses formes : saprophytisme, parasitisme, commensalisme et symbiose (Carlotti, 2014 ; Chabasse *et al.*, 2002). Ils se reproduisent par voie sexuée ou asexuée et se multiplient végétativement en générant de nombreuses spores de dissémination. La classification des champignons repose sur les caractéristiques des filaments (champignons inférieurs et champignons supérieurs), des cultures, de reproduction sexuée, de multiplications végétatives, physiologiques et moléculaires (Spadaro *et al.*, 2012). Les champignons filamenteux sont ubiquitaires, retrouvés dans l'air, l'eau, les sols, sur les plantes vivantes ou en décomposition ainsi que sur les matières premières (Carlotti, 2014 ; Chabasse *et al.*, 2002). Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3° C et 7 °C) (Nicklin *et al.*, 2000), et mésophiles (température optimale 20 - 30 °C) (Botton *et al.*, 1990). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ($T^{\circ} < 4^{\circ}\text{C}$ ou même parfois $< 0^{\circ}\text{C}$ (*Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*) (Guezlane-Tebibel *et al.*,

2016). Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) (Boiron, 1996).

Les moisissures n'ont malheureusement pas que des effets bénéfiques, elles possèdent également de nombreuses activités néfastes comme l'altération des produits alimentaires, le parasitisme chez l'homme, les animaux et les plantes (Johns *et al.*, 2022). Certains produits du métabolisme secondaire comme les mycotoxines peuvent avoir des effets nocifs divers pour la santé et par conséquent, représenter une grave menace pour les êtres humains et les animaux (Di Gregorio *et al.*, 2014). Ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps. Ils peuvent entraîner des intoxications alimentaires ou des mycotoxicoses suite à la consommation d'aliments contaminés (Johns *et al.*, 2022 ; Di Gregorio *et al.*, 2014). Les effets nocifs peuvent être immédiats, comme l'intoxication aiguë, ou sur le long terme, comme la déficience immunitaire ou le cancer (Belmehti et Beddar, 2019 ; Hissein *et al.*, 2019). Les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques (Kara *et al.*, 2015). La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques ; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon, 1982).

2. Caractéristiques des moisissures

Les moisissures sont des microorganismes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique, les champignons microscopiques sont généralement hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires grâce à leurs aptitudes métaboliques étendues (Houansou *et al.*, 2020). Le tableau 2, présente les principales caractéristiques des champignons.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des champignons (Nicklin *et al.*, 2000 ; Multon, 1982).

Structure cellulaire	Les champignons sont des organismes macroscopiques unicellulaires ou pluricellulaires dont les cellules possèdent un noyau (eucaryotes). (Nicklin <i>et al.</i> , 2000).
Mode de nutrition	Ils se nourrissent par absorption et utilisent le carbone organique comme source de carbone (hétérotrophe) (Nicklin <i>et al.</i> , 2000).
Paroi cellulaire	Leur paroi cellulaire contient typiquement de la chitine et du glucane (Nicklin <i>et al.</i> , 2000).
Reproduction	Ils peuvent se reproduire de manière sexuée et/ou asexuée (Nicklin <i>et al.</i> , 2000).

Appareil végétatif	Le thalle, appareil végétatif des champignons, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés appelés hyphes (Nicklin et al., 2000).(Nicklin <i>et al.</i> , 2000).
Mycélium	Lorsque la croissance est suffisante, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu et apparaît comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (Nicklin <i>et al.</i> , 2000).
Substrat de développement	Les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides (Multon, 1982).
Impact écologique et physiologique	En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques, les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon, 1982).
Caractères physiologiques	Non photosynthétiques, hétérotrophes et immobiles sur milieu a pH acide (pH compris entre 3 et 7). Elles sont mésophiles et sont à l'origine d'altérations superficielles (Ait Abdelouahab, 2007).
Classification des moisissures	La classification de Kwon Chung et Bennett (1992), modifiée par de Hoog et Guarro (1995), est la plus utilisée actuellement : le règne des champignons est divisé en quatre « phylum » ou embranchements : Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, et Basidiomycota

3. Habitat et pathogénicité

Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropicales (Swann *et al.*, 1999). Environ 80.000 espèces de mycètes sont décrites. L'intervention néfaste des champignons filamenteux se manifeste essentiellement dans l'industrie alimentaire et agroalimentaire (Swann *et al.*, 1999). Les moisissures les plus connues pour leur pathogénicité sont : *Aspergillus flavus*, *A. nomius* et *A. parasitica* connus pour leur production d'aflatoxine (substance cancérigène) (Johns *et al.*, 2022 ; Di Gregorio *et al.*, 2014). Ces espèces se développent à la surface de certains aliments tels que les céréales et les arachides (Guiraud, 1998), la moisissure *Penicillium citreonigrum* produit la citreoviridine (mycotoxine neurotoxique) alors que *P. citrinum* produit la citrinine un néphrotoxique, *Fusarium sporotrichoides* et des espèces voisines produisent diverses toxines comme les trichothécènes, la zéaralénone, les fumonisines etc... . Certaines de ces toxines sont très thermostables (Guiraud, 1998).

4. Classification des champignons filamenteux

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques (Kedia *et al.*, 2016). Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures, à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Bourgeois, 1989). La figure 4, présente la classification des champignons filamenteux.

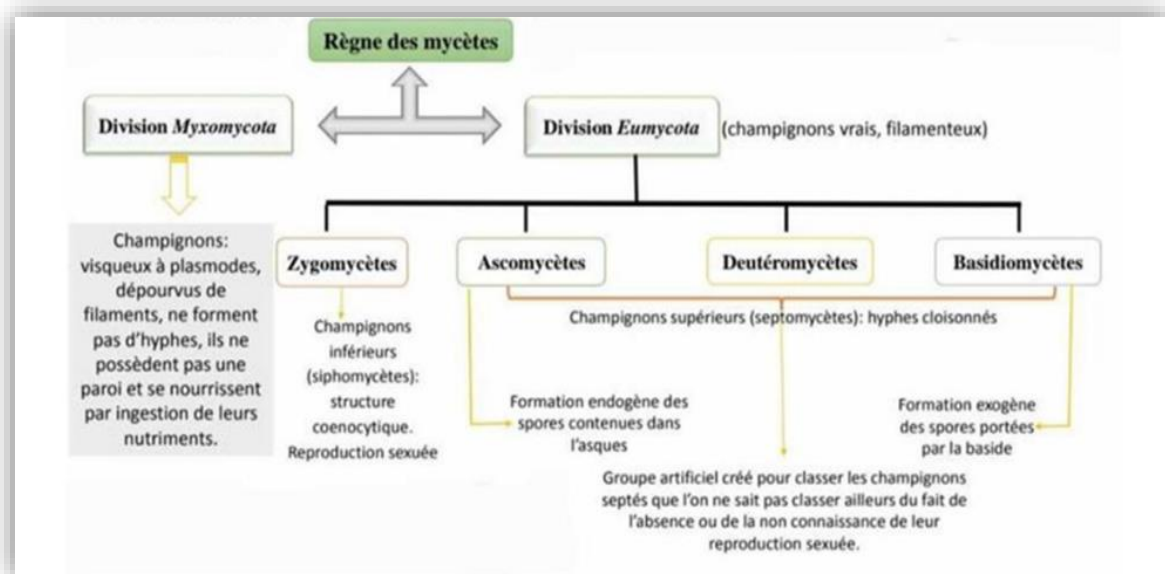


Figure 4 : Classification des champignons filamenteux (Kachour, 2005).

5. Mode de vie des moisissures

La quasi-totalité des mycètes vivent aux dépens de la matière organique en décomposition, ce sont des agents de recyclage de la matière minérale dans la nature, connus sous la nomination de (Saprophytes) (Johns *et al.*, 2022 ; Di Gregorio *et al.*, 2014). Dans des conditions particulières, beaucoup de micromycète (parasitent) des organismes végétaux ou animaux ou même d'autres mycètes (c'est le cas de l'espèce *Penicillium rugulosum* qui infecte la tête d'*Aspergillus niger*, enformant dessus, des phialides regroupés en pénicilles et le conduit finalement à la mort) (Swann *et al.*, 1999). D'autres, cohabitent avec différentes formes de vie dans le contexte du bénéfice réciproque ou ce qu'on appelle (la symbiose). Donc, dans la nature, les champignons mènent trois modes de vie : le saprophytisme, le parasitisme et la symbiose (Kachour, 2005).

6. Moisissures pathogènes du blé

On trouve sur les grains des céréales plus de 150 espèces de moisissures comme contaminants extérieures (Jouany *et al.*, 2002 ; Belmehdi et Beddar, 2019). Les grains sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage (Belyagoubi, 2006). Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25 %), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (Molinie *et al.*, 2005 ; Mahideb et Merrouche, 2015). Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes, connus sous le nom de moisissures de champ, de stockage et la flore intermédiaire (Magan *et al.*, 1988).

6.1. Flore des champs

Les grains de blé peuvent être contaminés avant la récolte par une microflore dite "du champ" (Breton, 1990 ; Belyagoubi, 2006). Cette microflore est dominée par des moisissures (Mahideb et Merrouche, 2015). Les genres rencontrés sont : *Alternaria* (le plus fréquent), *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Helminthosporium* (moins fréquents), *Chaetomium*, *Curvularia*, *Rhizopus* et *Stemphylium* (Sauer *et al.*, 1982 ; Zillinsky, 1983 ; Mahideb et Merrouche, 2015). Cette flore est bien adaptée à des changements rapides des conditions dans le champ, pour une croissance optimale, elle exige des activités en eau relativement élevées. Ces champignons peuvent survivre pendant de longues périodes en fonction des conditions environnementaux (Roberts, 2005). Les genres les plus rencontrés sont :

6.1.1. Le genre *Alternaria*

Il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides (Dendy *et al.*, 2000 ; Belmehdi et Beddar, 2019). Les espèces les plus fréquentes sont : *A. alternata* est connue par la production des mycotoxines ; *A. tenuissima* est capable de produire des toxines tel que l'acide ténuazonique (Andersen *et al.*, 2002).

6.1.2. Le genre *Fusarium*

Les espèces de ce genre ont à la fois des pouvoirs pathogènes et saprophytes (Mahideb et Merrouche, 2015). Les espèces les plus répandues sont surtout : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae*. Les *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines (Belmehdi et Beddar, 2019). Il existe d'autres espèces, telles que *Fusarium culmorum* et *Fusarium*

graminearum (Adams *et al.*, 2008 ; Mahideb et Merrouche, 2015). Le tableau 3, présent certaines espèces de *Fusarium* et leurs mycotoxines.

Tableau 3 : Certaines espèces de *Fusarium* et leurs mycotoxines (Pitt, 2000).

Espèces	Toxines produites
<i>Fusarium culmorum</i>	Trichothécènes B, Zéaralénone, Culmorine, Fusarine C
<i>Fusarium avenaceum</i>	Moniliformine, Fusarine C
<i>Fusarium graminearum</i>	Trichothécènes B, Zéaralénone
<i>Fusarium oxysporum</i>	Acide fusarique, Moniliformine, Oxysporine
<i>Fusarium poae</i>	Trichothécènes A, Fusarine C

6.2. Flore de stockage

Les moisissures de blé stocké sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface des grains (Lahouar, 2016). Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés, une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques moisissures peuvent être exercés par les facteurs environnementaux (Magan *et al.*, 2003). Les principaux genres rencontrés sont :

6.2.1. Le genre *Aspergillus*

À une teneur d'humidité inférieure à 15 % et une température d'environ 70 °C l'espèce *Aspergillus restrictus* est l'espèce qui prédomine dans le blé stocké (Belmehdi et Beddar, 2019). Au-dessus de 15 % d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que : *Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus ruber* prédominant et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18 % (Christensen *et al.*, 1969 ; Belmehdi et Beddar, 2019). Plusieurs espèces de ce genre sont capables de produire des mycotoxines (Bennoudia, 2016 ; Lahouar, 2016). Le tableau 4, présente certaines espèces d'*Aspergillus* et leurs mycotoxines.

Tableau 4 : Certains espèces d'*Aspergillus* et leurs mycotoxines (Tabuc, 2007).

Espèces d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus niger</i>	Malformine, naftoquinone.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide kojique, acide neoaspergillique, ochratoxine, acidepenicillique, acide sécalonique A.

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavine, fumagiline, fumitoxine, fumitremorgine A et C, gliotoxine
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique,
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique, acide kojique.

6.2.2. Le genre *Penicillium*

Les espèces de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies (Louze et Hadjaissa, 2018). Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au-dessus d'un seuil de 14 % et d'un taux d'humidité de 75 % (Neergaard, 1977). Les principales espèces connues du genre *Penicillium* sont : *P. notatum* (synthétise la pénicilline) ; *P. camembertii*, *P. glaucum* et *P. roqueforti* (utilisés en fromagerie) ; *P. griseofulvum* (largement répandu dans le sol et les matières en décomposition, responsable de la production d'une mycotoxine dangereuse pour l'homme, qui est la patuline) et *P. chrysogenum* (espèce très commune dans le sol) (Chabasse *et al.*,2002). Le tableau 5, présente quelques espèces de *Penicillium* et leurs mycotoxines.

Tableau 5 : Espèces de *Penicillium* et leurs mycotoxines (Tabuc, 2007).

Espèces	Toxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Acide cyclopiazonique, Roquefortine C
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxine A
<i>Penicillium roqueforti</i>	Acide pénicillique, Roquefortine C
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinine, Patuline, Roquefortine C
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxine A, Citrinine

6.3. Flore intermédiaire

Cette flore est très diversifiée et regroupe des germes capables d'un développement limité, au début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Parmi les genres appartenant à cette flore : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (Godon *et al.*, 1997 ; Mahideb et Merrouche, 2015 ; Belmehdi et Beddar, 2019).

III. Les mycotoxines

1. Généralités sur les mycotoxines

En se développant dans ou sur les denrées alimentaires, les champignons toxigènes produisent plusieurs métabolites secondaires hautement toxiques appelées couramment mycotoxines (Maja, 2016 ; Nakasugi *et al.*, 2021). Ces métabolites persistent tout au long de la chaîne alimentaire du fait de leur résistance aux traitements physiques et chimiques (FAO, 2004). Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison (Jagoda et Wioletta, 2021). Les mycotoxines sont considérées parmi les contaminants alimentaires les plus significatifs en terme d'impact sur la santé publique et l'économie de nombreux pays (Steyn, 1995 ; Pitt *et al.*, 2000). La majorité des espèces fongiques connues productrices de la plupart des mycotoxines appartient aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Alternaria* à cause de leur nature ubiquitaire (Sidhu, 2009). Les céréales, les fruits secs, les graines oléagineuses, les raisins, les grains de café et les noix sont des produits agricoles bruts très sensibles à l'infestation par les mycètes avant, pendant ou après la récolte et donc souvent contaminés par les mycotoxines (D'mello et McDonald, 1997 ; Scudamore et Livesey, 1998). Vue leur remarquable capacité d'adaptation, les champignons contaminent aussi les produits transformés. La contamination des produits alimentaires par les mycotoxines se produit lorsqu'un ensemble de conditions environnementales au champ, ainsi que des procédés mal maîtrisés de récolte, de stockage et de transformation sont réunis (FAO, 2004). L'enquête réalisée à l'échelle mondiale montre que 40 % des céréales sont contaminées par des mycotoxines (Jouany et Yiannikouris, 2002). La présence de moisissures ne signifie pas nécessairement la formation de mycotoxines (Pfohl-Leskowicz, 1999). Il existe des souches produisant des mycotoxines et des souches qui n'en produisent pas ou peu. La plus dangereuse de ces mycotoxines est l'aflatoxine B1 (AFB1) à cause de ces dégâts pathologiques sévères, elle est produite par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Godon et Loisel, 1997). D'une façon générale, les mycotoxines pénètrent dans le corps par la consommation d'aliments contaminés (Oueslati *et al.*, 2012). L'exposition aux

mycotoxines peut être directe par la consommation des denrées alimentaires contaminées d'origine végétale appelée voie primaire, ou indirecte par le biais de produits alimentaires d'origine animale provenant d'animaux exposés appelée voie secondaire ou toxicité de relais (Pena *et al.*, 2006). D'autres voies d'exposition peuvent avoir lieu tel que l'inhalation des spores transportés dans les poussières sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales et organiques et le contact dermique des mycotoxines (Miller, 1992 ; Jarvis et Miller, 2005). L'exposition aux mycotoxines se traduit par des pathologies et des perturbations métaboliques appelées mycotoxicoses (Pfohl-Leskowicz, 1999). Ces maladies ne sont ni infectieuses ni contagieuses, leur allure pseudo-épidémique est due à l'ingestion des mêmes toxines par l'intermédiaire d'un aliment commun. L'ingestion des aliments contaminés par des mycotoxines engendre une intoxication à condition que leur concentration soit suffisamment élevée pour produire un effet biologique quelconque (Miller Vincent, 2001 ; Johanning *et al.*, 2002).

Les manifestations cliniques peuvent être soit aiguës (hémorragies, diarrhée, convulsions, tremblements, vomissement, léthargie, œdème, voire la mort) observées après exposition à une seule dose élevée, soit chroniques apparaissant après ingestion de doses modérées de toxine pendant une longue durée (Rkiba, 2020). Elles se traduisent par une diminution des performances de l'animal ou de l'homme et parallèlement à une altération de nombreux organes vitaux dont les modifications conduisent en particulier, à l'apparition de cirrhose ou d'hépatite atrophique, infiltration graisseuse au foie, hyperplasie nodulaire, cancers (Jagoda et Wioletta, 2021). Parmi les effets des mycotoxines : hémorragiques, immunotoxiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques, oestrogéniques, tératogène ainsi que des effets mutagènes et cancérogènes (Adebanjo et Bankole, 2003). Plusieurs sortes de mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires (Miller et Trenholm, 1994). Le tableau 6, présente les moisissures et les mycotoxines retrouvées dans divers aliments.

Tableau 6 : Moisissures et les mycotoxines retrouvées dans divers aliments (Moliné *et al.*, 2005).

Denrées alimentaires	Espèces toxiques	Mycotoxines
Blé, Farine, pain, maïs, chips.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> .	Aflatoxines, Ochratoxine, Fumonisine.
Viande, viande cuite, fromage.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i>	Aflatoxines, Acide pénicillique.
Pomme et produits, dérivés de pomme.	<i>Penicillium expansum</i> .	Patuline.

2. Historique

Pendant des siècles, plusieurs épidémies signalées dans l'histoire humaine ont été attribuées à la consommation d'aliments moisissés mais elles sont passées presque inaperçues (Zillinsky, 1983). Les moisissures étaient souvent considérées comme des souillures désagréables des denrées alimentaires, à l'exception de l'ergot du seigle dont l'agent causal *Claviceps purpurea* élabore l'ergotamine, une toxine mortelle responsable de plusieurs catastrophes au moyen âge (Adams et Moss, 2008). En 1900, au Japon, la consommation de « riz jaune », qu'on découvrira plus tard contaminé par une espèce de *Penicillium*, entraîne de très graves intoxications, notamment hépatiques. L'ATA (aleucie toxique alimentaire) a tué des milliers d'hommes à l'Est de la Russie entre 1942 et 1947. Bien qu'en 1950, il ait été suspecté que l'agent causal soit la toxine T-2, ce n'est que 25 ans après que cela a été confirmé (Pitt et Hocking, 1997). Dans les années soixante du dernier siècle, des élevages de dindons en Angleterre étaient atteints d'une grave intoxication appelée maladie X des dindons « Turkey-X-Disease », provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachides provenant du Brésil (Hocking, 1997 ; Adams et Moss, 2002 ; Adebajo et Bankole, 2003). Les symptômes de la pathologie étaient la perte de l'appétit, la faiblesse des ailes, la léthargie et puis la mort brutale. Par la suite, il s'est révélé que ces tourteaux étaient contaminés par une moisissure appelée *Aspergillus flavus*. En 1961, des chercheurs anglais du « Tropical Products Institute » montraient qu'*Aspergillus flavus* produisait une substance toxique qu'ils baptisèrent aflatoxine. Par la suite, les recherches montrèrent qu'il y avait en fait 4 aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dont B1 est considérée comme étant le plus puissant cancérigène connu dans le monde (Adams et Moss, 2002). Depuis cette époque, les champignons filamenteux ont fait l'objet d'une vague de recherches et de publications à cause de leur contribution à une large part à la diminution des valeurs d'utilisation technologique, nutritionnelles et hygiéniques des produits alimentaires et à des modifications biochimiques des produits occasionnant chez l'Homme et l'animal des maladies de nature infectieuse (mycoses) et des allergies (Adams et Moss, 2002 ; Wagacha *et al.*, 2008).

3. Nature et origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites toxiques secondaires produits par certaines moisissures qui se développent dans divers produits agricoles sous des conditions environnementales spécifiques (Krska *et al.*, 2009). Ces substances sont de faible poids moléculaire, variant entre 200 et 10 000 daltons. Actuellement, on connaît entre 300 et 400

mycotoxines (Pamel *et al.*, 2010). Ces molécules sont caractérisées par leur faible solubilité dans l'eau, leur faible volatilité, et leur difficulté à être métabolisées par les organismes (Wagacha *et al.*, 2008). De plus, elles sont très stables en présence d'acidité et de chaleur (Ruppel *et al.*, 2004). Les mycotoxines sont des substances chimiques complexes. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, salframine, gliotoxine, roquefortine, sporidesmine, Fumitremorgines), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005; Mahideb et Merouch, 2015 ; Bennoudia, 2016 ; Belmehdi et Beddar, 2019). Le tableau 7, présente l'origine chimique des mycotoxines.

Tableau 7 : Origine chimique des mycotoxines (Riba, 2008).

Mycotoxines dérivées des acides aminés	Mycotoxines dérivées Des Polycétoacides	Mycotoxines dérivées des Terpènes
<ul style="list-style-type: none"> - Alcaloïdes de l'ergot. - Acide cyclopiazonique (CPA). - Acide aspergillique. - Fumitremorgines. - Gliotoxine. - Roquefortine. - Slaframine. 	<ul style="list-style-type: none"> Aflatoxines. - Acide pénicillique. - Citrinine. - Ochratoxines. - Patuline. - Rubratoxines. - Stérigmatocystine. - Zéaralénone 	<ul style="list-style-type: none"> Diacétoxyscirpénol (DAS). - Désoxynivalénol. - Fusarénone. - Roridines. - Toxine T2. - Verrucarines

4. Biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont synthétisées pendant la phase idiopathique, c'est-à-dire après la phase active de multiplication cellulaire (trophopase) ; l'hypothèse la plus probable est qu'en fin de prolifération les cellules fongiques sont épuisées en alcalis non utilisés (Roze *et al.*, 2014). Les précurseurs sexuels conduisent à la lyse cellulaire. En conséquence, les cellules parviennent à modifier leur métabolisme, conduisant à la synthèse de « produits de détoxification cellulaire » (Krska *et al.*, 2012). Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysés par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire (Logrieco *et al.*, 2003). La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendu possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs

enzymatiques et de précurseurs métaboliques (Luchese et Harrigan, 1993 ; Steyn,1980). La diversité de structure d'une mycotoxine à une autre résulte de la variabilité des voies de biosynthèse (Roze *et al.*, 2014). Les différentes voies de synthèse des mycotoxines dérivent du coenzyme A (CoA) (Louze et Hadjaissa, 2018). Celui-ci est ensuite acétylé en un polycétide ou polycétoacide via une polycétide synthase (PKS), pour conduire à la synthèse des mycotoxines dérivées de polycétoacides (Gherras et El himer, 2017 ; Fang *et al.*, 2020). Les mycotoxines sont regroupées en fonction de leur origine biosynthétique en trois catégories principales, à savoir les terpènes, les polycétides et les peptides cycliques non-ribosomiques (Lahouar, 2016). En outre, une quatrième catégorie regroupant les peptides hybrides NRPS/PKS qui contiennent à la fois des unités peptidiques et polycétides, a été identifiée (Tannous, 2015).

5. Production des mycotoxines

Les mycotoxines sont générées par cinq genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Les mycotoxines les plus significatives comprennent les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique et les fumonisines (Dieme *et al.*, 2017).

Il est également important de noter que, dans la plupart des cas, les consommateurs humains et animaux sont exposés à plusieurs mycotoxines simultanément. Cette situation s'explique par trois raisons principales :

- ✓ Une mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces de champignons différentes.
- ✓ Une même espèce de champignon peut produire plusieurs mycotoxines en même temps.
- ✓ Les repas (ou rations pour les animaux) sont généralement composés de divers aliments ou d'aliments préparés à partir de plusieurs matières premières, chacune pouvant être une source différente de toxines (Binder et Krska, 2012).

6. Principales mycotoxine

6.1. L'aflatoxine

Les aflatoxines (AFs) sont des métabolites secondaires produits par des champignons tels qu'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* (Kensler *et al.*, 2011). Ces contaminants naturels, présents dans les aliments pour humains et animaux, sont à l'origine de divers problèmes, notamment des carences nutritionnelles, une immunosuppression, un cancer du foie, ainsi que des effets mutagènes et tératogènes (Wagacha *et al.*, 2013). Elles ont été découvertes pour la première fois en Angleterre en 1960, après des cas d'intoxication dans

un élevage de dindonneaux (Adams *et al.*, 2008 ; Chapeland *et al.*, 2005). Ces champignons prolifèrent principalement dans les régions chaudes et humides (Kezih *et al.*, 2016). On les retrouve dans divers aliments tels que les noix (arachides, pistaches, noisettes), les grains (maïs, millet, sorgho, blé), le coton, les épices et le lait (Brochard et le Bacle, 2009). Les conditions idéales pour la croissance et la production d'aflatoxines nécessitent une faible activité en eau, entre 0,84 et 0,86, ainsi qu'une température comprise entre 25 et 40 °C (Alban, 2016). Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 (kensler *et al.*, 2011). 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 (IARC) (Iarc, 1993).

6.2. L'ochratoxine A

Les ochratoxines, incluant les types A, B et C, sont une famille de mycotoxines produites par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. L'ochratoxine A (OTA) est la plus répandue et la mieux connue (Rkiba, 2020). En fait, cette mycotoxine qui était décrite pour la première fois en 1965, et il pourrait être trouvé comme un contaminant de plusieurs matrices alimentaires tels que les céréales et ses dérivés, le café, les épices, noix, fruits secs, olives, raisins, viande, lait, vin, bière, et cacao (Ana Júlia Benites *et al.*, 2016).

Actuellement les mycotoxines qui ont été décrites sont les ochratoxines B, C, α , β mais ils sont moins toxiques et beaucoup plus rares, et seuls l'ochratoxine A qui est le plus toxique, le plus fréquent et le plus connu, et très rarement ochratoxine B (Brocard et le Bacle, 2009). L'OTA est connue par ses propriétés néphrotoxiques, cancérogènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées (Pitt *et al.*, 2001). En effet, l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un composé cancérogène pour l'homme (Iarc, 1999). Après consommation d'aliments contaminés, l'OTA est fréquemment détectée dans le sang humain (kara *et al.*, 2015). Elle est caractérisée par une longue demi-vie d'élimination (environ 35 jours dans le sérum), à cause de sa liaison aux protéines plasmatiques, sa circulation entéro-hépatique et sa réabsorption dans l'urine (Studer-Rohr *et al.*, 2000). Par conséquent, l'OTA est la mycotoxine la plus détectée dans le sang humain dans le monde (Pena *et al.*, 2006).

6.3. La patuline

La patuline (PAT) est un métabolite toxique produit par environ 30 genres appartenant à *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* et *Byssoschlamys* (Pena *et al.*, 2006 ; Iarc, 1999). Il a été évalué en médecine humaine sous le prénom médicament Tercinin comme antibiotique

probable mais avait été abandonné en raison de sa toxicité pour l'homme et l'animal (Johanning *et al.*, 2002). En raison de sa toxicité suspectée, le PAT a été inclus dans la liste des mycotoxines et son niveau dans les aliments est limité dans plusieurs pays. Il provoque des ulcères, des inflammations et des hémorragies intestinales (Navale *et al.*, 2021). Le tableau 8, résume les effets des principales mycotoxines. Certaines d'entre elles sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes.

Tableau 8: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines
(Pamel *et al.*, 2010).

Toxine	Effets
- Aflatoxine B1 + M1	- Hépatotoxicité – Génotoxicité – Cancérogénicité Immunomodulation
- Ochratoxine A	- Néphrotoxicité – Génotoxicité - Immunomodulation
- Patuline	- Neurotoxicité - Mutagenèse in vitro
- Zéaralène	- Fertilité et reproduction
- Fumonisine B1	- Lésion du système nerveux central – Hépatotoxicité - Génotoxicité - Immunomodulation

7. Méthodes d'analyse des mycotoxines

La détection des mycotoxines est extrêmement importante en raison de leur toxicité et le contrôle de leur présence dans certains produits est obligatoire pour assurer la sécurité alimentaire et protéger la santé des consommateurs potentiels (Jagoda et Wioletta, 2021 ; navale *et al.*, 2021). Les méthodes analytiques pour la détection des métabolites secondaires des moisissures comprennent des méthodes physico-chimiques comme la « chromatographie sur couche mince » (CCM), « chromatographie liquide-spectrométrie de masse » LC–MS/MS, la « chromatographie liquide à haute performance » (CLHP) et la « chromatographie liquide en phase gazeuse » (CLPG), permettent la quantification des mycotoxines (Gauthier, 2016). Des méthodes plus récentes et plus rapides fondées sur des principes immuno-chimiques comme le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), spectrophotométrie de fluorescence, spectroscopie infrarouge frontière, fluorimètre, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), radioimmunos dosage (RIA), sont couramment utilisés pour la détection et la quantification des mycotoxines dans les cultures vivrières agricoles (Jagoda et Wioletta, 2021 ; navale *et al.*, 2021). Des techniques d'immunos dosage se sont développées au cours de la

dernière décennie, y compris les bandelettes de test d'interaction immunochromatographique des toxines (Navale *et al.*, 2021).

7.1. Méthode physico-chimique

7.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique couramment utilisée pour séparer des composés, dans un but analytique ou de purification, permettant une détection qualitative et semi-quantitative des mycotoxines (Tannous, 2015) . Elle a l'avantage d'être rapide et peut traiter plusieurs échantillons en parallèle (Jagoda et Wioletta, 2021 ; navale *et al.*, 2021). Elle est peu coûteuse et fournit des résultats plus fluctuants que les techniques chromatographiques liquides et gazeuses (Gauthier, 2016 ; Huybrechts *et al.*, 2013). Elle comprend une phase stationnaire, constituée d'une couche mince de matériel absorbant (gel de silice), qui est plongée dans une phase mobile liquide (éluant), composée d'un solvant qui va obliger les molécules à se séparer le long de la phase stationnaire (Jagoda et Wioletta, 2021 ; navale *et al.*, 2021). Cette méthode est fondée sur les différences d'affinité des composés vis-à-vis des deux phases (Gauthier, 2016).

7.1.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse par chromatographie liquide permet une analyse quantitative. Cette technique présente un intérêt important pour la quantification des mycotoxines et elle est considérée aujourd'hui comme une méthode de choix dans ce cadre (Ghanmi *et al.*, 2022 ; Gacem, 2011). Différentes normes définissent l'HPLC comme méthode de dosage de référence pour certaines mycotoxines (Heit, 2015). Différents types de séparation existent en fonction de la phase stationnaire utilisée : adsorption, partage (en phase normale à polarité de phase inversée avec appariement d'ions), échange d'ions et exclusion (Heit, 2015).

7.1.3. Chromatographie en phase gazeuse

La CPG s'applique aux composés gazeux. Le mélange à étudier est vaporisé à l'entrée d'une colonne contenant la phase stationnaire (liquide ou solide) (Ghanmi *et al.*, 2022 ; Gacem, 2011). Il est ensuite transporté à travers cette colonne à l'aide d'un gaz vecteur (phase mobile). Les différents composés du mélange vont se séparer et sortir de la colonne, les uns après les autres, suivant leur affinité avec la phase stationnaire (Jagoda et Wioletta, 2021). La CPG est peu utilisée car elle impose de volatiliser la molécule à analyser. Cependant, elle présente

l'avantage d'être aisément associée à la spectrométrie de masse, qui facilite l'identification de la molécule (Gauthier,2016).

7.2. Méthodes immunologiques

Deux techniques sont utilisées pour l'analyse des mycotoxines : le dosage radioimmunologique (RIA) et dosage immuno-enzymatique (ELISA) (Gauthier,2016). Le RIA ajoute à la réaction milieu un anticorps spécifique et une quantité de mycotoxine radiomarquée, qui est incubée avec l'échantillon d'essai (Sauer *et al.*, 2009). La concentration de mycotoxines est déterminée en comparant les résultats d'un motif rectiligne (Spadaro *et al.*, 2012 ; Studer-Rohr *et al.*, 2000). La technique ELISA est basée sur la réaction spécifique antigène-anticorps, elle peut être concurrentielle directe ou indirecte. En technique directe, un extrait de l'échantillon est ajouté à la solution et la dissolution de la mycotoxine liée de manière covalente à l'enzyme est observée (Steyn, 1995). La compétition indirecte utilise un deuxième anticorps dirigé contre la région constante du premier anticorps. La liaison du premier anticorps dépend de la quantité d'antigène dans l'échantillon (Bueno *et al.*, 2014 ; Bouchafaa et Kherchi Medjden, 2015).

8. Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines

Pour protéger les consommateurs contre les risques liés aux mycotoxines, il est important d'appliquer les règles pratiques permettant de limiter la survenue de ces contaminants (Farah, 2009 ; Njobeh *et al.*, 2010 ; Dieme *et al.*, 2016). Actuellement, en agriculture vouloir empêcher la contamination fongique relève de l'impossible, mais il est essentiel d'éviter une surinfection des graines et des fruits par des contacts avec le sol et du matériel souillé. En plus, ces contacts sont générateurs de blessures qui favoriseront ensuite la pénétration des hyphes dans le végétal (Tabuc, 2007). Lorsque la contamination fongique ne peut être évitée, il est impératif d'inhiber la germination des conidies et le développement des hyphes (Ghezlen-Tebibel *et al.*, 2016). Bien que les facteurs environnementaux soient déterminants dans la survenue des contaminations par les moisissures et leurs mycotoxines, toutefois, la maîtrise des étapes pré-récolte, post-récolte et de stockage permet de réduire la contamination (Lacey, 1989 ; Riba, 2008).

8.1. Respect des bonnes pratiques agricoles "BPA "

Il faut d'abord réduire autant que possible la présence d'inoculum à proximité de la plante en éliminant tous les restes des cultures précédentes, ainsi que tout substrat qui serait

propice à la croissance de champignons producteurs de mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Il faut souligner que les plantes stressées sont plus susceptibles à la contamination par les moisissures et les mycotoxines (Wang et Xie, 2020). La semaison, tout comme la récolte, doivent être effectuées à une période où ne sévissent pas des conditions de températures trop élevées ou des conditions de sécheresse, celles-ci contribuant au stress de la plante. Il est recommandé que le grain soit récolté à pleine maturité et que les dommages mécaniques, liés à la récolte, soient limités autant que possible (Riba, 2008). Pratiquer la rotation des cultures, labourer en profondeur pour enfouir les déchets végétaux, utiliser des variétés plus résistantes aux attaques fongiques et aux insectes, récolter par temps sec et régler les machines de récolte afin d'éliminer les grains abîmés au moment de la récolte des céréales (Wilson *et al.*, 2002). Les grains devront être conservés secs et l'humidité devra être éliminée au cours du stockage par une ventilation appropriée des silos (Jouany *et al.*, 2006).

8.2. Respect des bonnes pratiques de stockage "BPS "

Les lieux de stockage doit être : frais, propre, secs, aérés, T ° contrôlée. Éviter les points d'échauffement lors du transport et du stockage, et effectuer un pré -tri avant le séchage et l'entreposage, pour retirer les contaminations superficiels apportées par les débris de végétaux et la terre (Zettal, 2017 ; Zheng *et al.*, 2013). Ainsi il convient d'appliquer les bonnes pratiques d'hygiène "BPH " pour assurer la sécurité sanitaire des aliments et du consommateur (Blay et Carre , 2005).

En cas de contamination par des champignons d'une précédente récolte stockée, il est recommandé d'assainir les locaux par des traitements chimiques et d'équilibrer et d'abaisser la température ; au cours du stockage, la cellule doit être sèche et ventilée pour limiter la condensation (Scudamore, 2005). Les grains infectés seront séparés des grains sains et des prélèvements seront constitués pour analyse (Zettal, 2017 ; Zheng *et al.*, 2013). Il faut cependant souligner que le suivi de ces bonnes pratiques agricoles n'est toujours pas suffisant pour empêcher la contamination. Des stratégies de décontamination se sont développées pour faire face à ce problème (Riba, 2008).

8.3. Décontamination et détoxification (Méthodes scientifiques de lutte)

8.3.1. Méthodes physiques

Les méthodes physiques sont nombreuses. Elles sont basées en général sur le lavage, le séchage, le broyage, le tri manuel, la séparation mécanique ou le traitement thermique

(Zillinsky, 1983). Parmi les traitements physiques, un simple brossage superficiel ou un décorticage des grains seront particulièrement efficaces puisque les mycotoxines sont préférentiellement fixée sur leur enveloppe externe (Doumandji *et al.*, 2003). Ces procédés simples permettent d'éliminer 60 à 80 % de déoxynivalénol. Un traitement par flottation permet d'éliminer 90 % des aflatoxines dans les arachides (Jouany *et al.*, 2006). Les mycotoxines sont en général thermostables et elles résistent à tous les procédés utilisés pour l'élimination des microorganismes (chauffage et stérilisation). Peers et Linsell (1975), ont observés dans leur étude que les aflatoxines restent stables dans les arachides ou dans le maïs après un chauffage à 200 ° C pendant 30 minutes (Dieme *et al.*, 2016).

8.3.2. Méthodes chimiques

Les produits toxiques et « d'arôme anormal » utilisés dans les procédés de conservation et de détoxification ont conduit les scientifiques à chercher des fongicides naturels, sans risque et respectueux de l'environnement (Bamidele *et al.*, 2019). Dans ces recherches menées en Afrique, l'extrait de la feuille de *Lippia multiflora* a montré un effet statique fongique sur *Aspergillus flavus* et *Fusarium verticillioides* (Anjorin *et al.*, 2008). Les huiles essentielles, l'ozone, la terre à diatomées et les antioxydants alimentaires tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT) et le parabène de propyle (PP) sont des options rentables non toxiques et prometteuses qui peuvent remplacer les conservateurs chimiques toxiques dans la lutte contre divers champignons y compris *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Chulze, 2010). Au Bénin par exemples une revue des écrits scientifiques publiés faite par Ba *et al.* (2015) a révélé une large gamme de produits chimiques utilisés pour inhiber la production d'aflatoxine dans les stocks de maïs en y limitant la prolifération des moisissures. Parmi ces produits nous pouvons noter l'acide propionique (0,1 – 0,5 %), l'ammoniac (0,5 %), le Copper sulfate (0,5 – 1 %) et l'acide benzoïque (0,1 – 0,5 %) qui inhibent complètement la croissance d'*A. parasiticus*, le benzoate de sodium quant à lui, a un effet antimicrobien sur la croissance d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. L'hypochlorite de sodium (0,1– 0,5 %) présente une activité antifongique (4 – 68 %). Il a été démontré dans cette revue que les extraits de plante comme les composants du neem (*Azadirachta indica*) et la scopolétine qui est extraite à partir de plusieurs plantes principalement, *Nicotiana glauca*, *Lycium chinense*, *Angelica dahurica* et les racines de *Trigonella foenum-graecum*, ont des propriétés antifongiques et inhibent aussi la production d'aflatoxine (Badillet *et al.*, 1987). Les huiles essentielles peuvent être aussi appliquées sous forme de vapeur, ce qui rend leur

application pratique utile et convenable pour une utilisation dans des entrepôts fermés (Chulze, 2010 ; Dieme *et al.*, 2016).

8.3.3. Méthodes biologiques

Les méthodes biologiques s'avèrent plus spécialisées, plus efficaces et plus respectueuses de l'environnement (Ana *et al.*, 2016 ; Amoura et Baz, 2014). Les méthodes de contrôle biologique de la contamination par les mycotoxines comprennent, par exemple, l'utilisation de bactéries. Certaines d'entre elles ont une capacité de fixation des mycotoxines dans les aliments ou les liquides. *Flavobactérie aurantiacum* B- 184 s'est avéré être la seule bactérie, parmi plus de 1 000 testées pour une éventuelle dégradation de l'aflatoxine, capable d'éliminer de manière irréversible l'aflatoxine des solutions (Jagoda et Wioletta, 2021). L'ochratoxine A est aisément dégradée en phénylalanine et en ochratoxine α non toxique par les carboxypeptidases A produites par de nombreux microorganismes comme *Phenylobacterium immobile*, *Acinetobacter calcoaceti* ou des levures (Abarca *et al.*, 2004 ; Aidani, 2015). Ces activités microbiennes ont été utilisées pour produire des additifs alimentaires destinés à réduire les effets délétères des mycotoxines dans l'alimentation animale (Jouany *et al.*, 2006). Ainsi, les glucomannanes issus de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines (Alkadri et Fauhl-Hassek, 2018 ; Alba *et al.*, 2017). Leur grande capacité de liaison est due à leur large surface d'échange. Le ligand issu de la paroi cellulaire de la levure réduit de 58 % les concentrations d'AFM1 dans le lait de vache recevant des aliments contaminés par l'aflatoxine lorsqu'il est utilisé à un taux d'inclusion de 0,05 % de la matière sèche de la ration (Yiannikouris et Jouany, 2002).

Parmi les antagonistes biologiques naturels, les bactéries lactiques ont plusieurs possibilités d'application. Ces microorganismes, qui font partie de la flore intestinale, sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour la production des aliments fermentés (Alkadri et Fauhl-Hassek, 2018 ; Alba *et al.*, 2017). Les bactéries lactiques produisent plusieurs antagonistes capables de contrôler les bactéries pathogènes et la flore de détérioration. L'utilisation des bactéries lactiques pour contrôler les moisissures peut être une alternative intéressante aux méthodes physiques et chimiques pour leurs propriétés antimicrobiennes importantes (Dalié *et al.*, 2010). Selon Magnusson *et al.* (2003) trois mécanismes peuvent expliquer l'efficacité antimicrobienne des bactéries lactiques : l'effet des acides organiques, la compétition sur les nutriments avec les autres microorganismes et la production des composés

antagonistes. Plusieurs composés ayant une forte activité antifongique ont été isolés à partir des cultures bactériennes (Amoura et Baz, 2014). La majorité de ces composés sont des métabolites de faible poids moléculaire incluant : des acides organiques, des composés phénoliques, des bactériocines (nisine, reutéline), du peroxyde d'hydrogène, des acides gras (Anjorin *et al.*, 2008). Cette nouvelle approche microbienne aura probablement ses limites pour les raisons suivantes : la grande spécificité des enzymes n'est pas adaptée à la grande variabilité des contaminants potentiels, la concentration des enzymes et les conditions de leurs activités doivent être optimales car le temps de réaction dans le tube digestif est plutôt court, de plus les métabolites doivent être moins toxiques que la toxine native (Dalié *et al.*, 2010).

Matériel et méthodes

I. Origine des échantillons et objectif de travail

Le présent travail porte sur l'étude mycologique et mycotoxique des échantillons de grains de blé tendre et dur obtenus à partir des unités CCLS de la wilaya d'Ain Témouchent et Tlemcen. Ce travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Microbiologie de l'Université Belhadj Bouchaib-Ain Témouchent (UBBAT). Parmi les objectifs de ce travail :

- L'isolement et l'identification des moisissures ayant des propriétés mycotoxinogènes.
- La détection des mycotoxines visuellement et par la chromatographie sur couche mince (CCM).

II. Echantillonnage

Les analyses effectuées ont porté sur les grains de blé dur (*Triticum durum*) et tendre (*Triticum aestivum*) qui nous ont été aimablement fournies par les deux unités CCLS précédemment cités. Au total, 04 échantillons ont été analysés, dont 02 échantillons de blé dur et 02 autres de blé tendre. Ils ont été choisis d'une manière aléatoire et ont été prélevés dans des conditions stériles (Sutra *et al.*, 1998). Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier où ils sont soumis à des analyses microbiologiques. Les échantillons étaient stockés dans des sacs d'environ 100 kg, dans un entrepôt bien aéré, à l'abri de l'humidité. Un échantillon de 100 g a été prélevé ensuite mis dans des sachets en papier. Tous les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur analyse. Le prélèvement des échantillons a été effectué à l'aide d'une louche stérile. La figure 5, présente le prélèvement d'échantillons de blé auprès de l'unité CCLS d'Ain Témouchent.



Figure 5 : Prélèvement d'échantillons de blé auprès de l'unité CCLS d'Ain Témouchent.

III. Analyses physico-chimiques

1. Procédure de stérilisation avant les manipulations

Toutes les expérimentations ont été réalisées dans des conditions d'asepsie. Avant toute manipulation, les milieux de culture utilisés ont été stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes, et toute la verrerie a été lavée, puis stérilisés au four Pasteur à 170 °C pendant 20 minutes.

2. Détermination de l'humidité

Le principe de la technique consiste à effectuer un séchage de chaque échantillon à une température de 105 ± 2 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le taux d'humidité de chaque échantillon est mesurée par la formule suivante (Multon, 1982 ; Gacem *et al.*, 2011) :

$$\text{Taux d'humidité \%} = \frac{\text{poids avant séchage} - \text{poids après séchage}}{\text{poids avant séchage}} \times 100$$

En raison d'un manque de matériel et afin d'éviter la destruction des grains, la méthode couramment utilisée a été modifiée. La quantité d'échantillon à analyser pour chaque type de blé a été broyée pour faciliter son séchage. Les échantillons de blé ont été broyé ensuite pesés (poids frais) puis placés dans une étuve ventilée à 80 °C pendant 24h (poids sec). Ils sont ensuite placés dans un dessiccateur pendant 1h 30 afin d'absorber le reste de l'humidité. Le traitement a été répété plusieurs fois jusqu'à ce que le poids se stabilise. La figure 6, présente l'appareillage utilisé pour le calcul le taux d'humidité des grains de blé.



Figure 6 : Appareillage utilisé pour le calcul le taux d'humidité des grains de blé.

3. Détermination du pH

L'estimation de l'acidité ou l'alcalinité de nos échantillons consiste à préparer une solution composée de 45 ml d'eau distillée et de 5 g d'échantillon broyé. Après agitation et repos pendant une heure, la mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH mètre. Pour la fiabilité des résultats, chaque mesure est repérée 3 fois, ensuite la moyenne est calculée (Rashdi, 2004).

IV. Analyses mycologiques

➤ Isolement, purification et identification de la flore fongique

1. Isolement de la flore fongique

1.1. Milieu d'isolement

Les milieux de cultures utilisés pour les isolements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques sont les suivants. La composition chimique de ces milieux est présentée en annexe 1, 2, 3.

- PDA (Potatoes Dextrose Agar) (Raper et Fennell, 1965)
- CDA (Czapek Dextrose Agar) (Pitt et Hocking, 1997)
- PCA (Plate Count Agar) (Raper et Fennell, 1965)
- MEA (Malt Extract Agar) (Roy *et al.*, 2007)
- CYA (Czapek Yeast Agar) (Pitt et Hocking, 1997)
- Sabouraud (chloramphénicol) (Raper et Fennell, 1965)

Les milieux sont acidifiés jusqu'à un pH de 5 en ajoutant 1 ml d'acide lactique à 25 % par flacon de 250 ml. L'ajout du rose Bengale ou d'antibiotique permet également l'inhibition de la croissance bactérienne (Larpen, 1990).

Dans ce travail nous avons utilisé du chloramphénicol, après stérilisation, à une concentration de 5 mg/l (Botton *et al.*, 1999).

1.2. Méthodes d'isolement

Chaque germe viable forme un thalle après incubation en milieuensemencé. Le nombre de thalles correspond donc au nombre de germes viables présents dans l'inoculum. Compte tenu de la dilution, ce nombre pourra être ramené au nombre de germes contenu dans 1g de produit analysé (Botton *et al.*, 1999). L'étude mycologique des grains de blé a été réalisée en utilisant deux méthodes :

- La méthode d'Ulster et Buvard (ou la méthode directe)
- La méthode des dilutions (ou la méthode indirecte) (Compaor *et al.*, 2016).

✓ **La méthode directe** comprend : La méthode d'Ulster et méthode Buvard qui ne s'applique qu'aux grains entiers.

✓ **La méthode classique ou méthode indirecte** « des dilutions -ensemencement » qui concerne également les produits fractionnés et ou broyés (Cahagnier, 1998).

1.2.1. Méthodes directe

La méthode directe comprend la méthode d'Ulster, que nous l'avons utilisé pour l'échantillon de Tlemcen alors que la méthode Buvard a été utilisée pour l'échantillon d'Ain Témouchent.

- **Méthode buvard**

La méthode du buvard a été recommandée dans le cadre des règles internationales pour l'analyse des semences afin de détecter les différentes moisissures contaminants les grains de blé. Cette méthode consiste à analyser 14 grains de chaque type de blé et à raison de 7 grains par boîte de Petri de 90 mm de diamètre. Ces grains n'ayant subi aucun traitement préliminaire, sont placés sur papier filtre (buvard) et humidifiés avec de l'eau distillée stérile (Iserin *et al.*, 1997). La méthode a été modifiée par trempage des grains dans de l'eau de Javel (5 %) pendant 1 min, ensuite rincés soigneusement dans de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces du désinfectant. Après deux rinçages à l'eau distillée stérile, les grains ont été séchés avec du papier filtre stérile dans des conditions d'aseptise pour être ensuite déposés. Les grains désinfectés et séchés ont été placés à l'aide d'une pince stérile dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre (buvard humidifié avec de l'eau distillée stérile). Les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm et incubées à 25 °C pendant 5 à 7 jours (Pacin *et al.*, 2002 ; Ghiasian *et al.*, 2004). La figure 7, présente les étapes de l'isolement des moisissures par la méthode de buvard modifié.

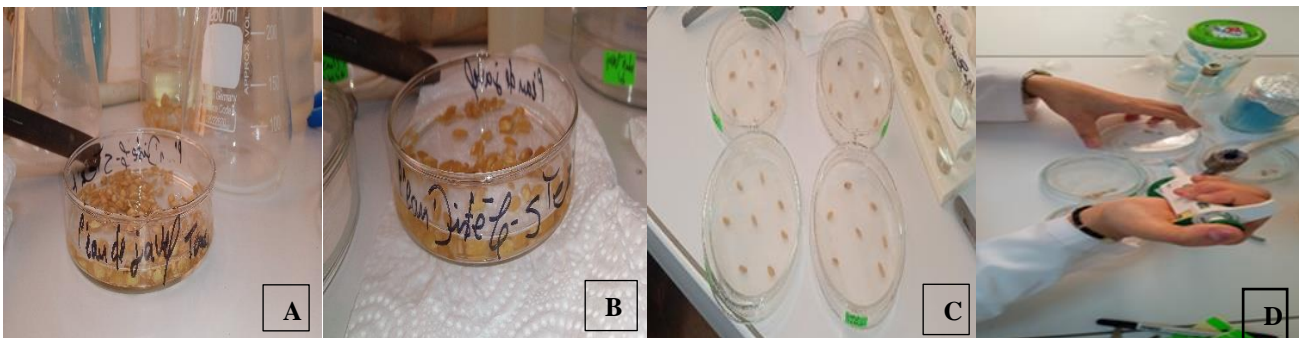


Figure 7 : Isolement des moisissures par la méthode de buvard modifié.

(**A :** Désinfection superficiel, **B :** Rinçage, **C :** Dépôt des grains, **D :** Humidification des grains.)

Les boîtes sont humidifiées tous les deux jours avec de l'eau distillée stérile afin de garantir un environnement humide à la croissance fongique.

- **Méthode Ulster**

Pour évaluer la spermoflore, on utilise généralement la méthode Ulster, dont le principe est de placer les grains de blé dans des boîtes de Petri contenant du milieu synthétique, approprié pour le développement des moisissures. Tout grain portant une moisissure naturellement acquise au cours de son cycle de développement ou pendant l'entreposage, permet à cette dernière de se développer dans la boîte de Petri (Laouid et Neftia, 2007). Les grains sont tout d'abord désinfectés avec de l'eau de Javel à 5 % pendant une minute, suivies de deux rinçages à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les contaminations superficielles. Les grains sont ensuite séchés avec du papier filtre stérile à proximité du bec benzène pour être ensuite déposés. Sous des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les grains désinfectés ont été placés dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée (annexe 2), à raison de 7 grains par boîte. Les boîtes de Petri en verre scellées à l'aide du parafilm ont été incubées à 25 °C pendant 5 à 7 jours. La figure 8, présente les étapes de la méthode directe d'Ulster.

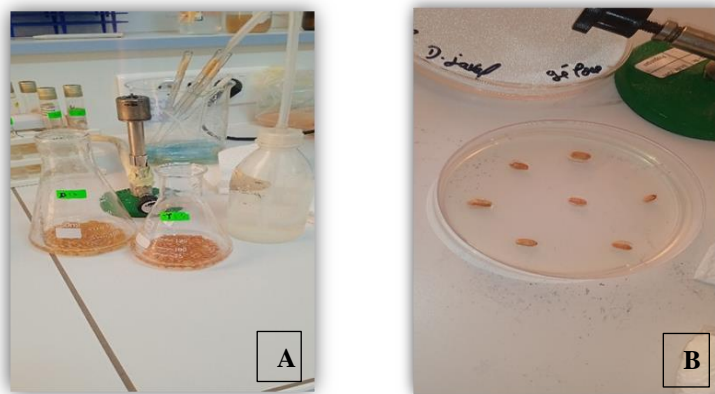


Figure 8 : Méthode directe d'Ulster

(**A :** Désinfection superficielle et rinçage avec de l'eau distillée stérile ; **B :** Dépôt des grains)

1.2.2. Méthode d'isolement indirecte (Méthode de dilution)

Le principe de cette méthode consiste à isoler la flore fongique se situant à l'intérieur et à l'extérieur des grains, dont le but est de diminuer la charge fongique de l'échantillon de blé à analyser. Elle est réalisée également pour l'obtention de colonies bien séparées. Après rinçage par l'eau distillée et broyage des grains de blé dans un mortier stérile, la suspension mère est préparée en mélangeant 1g de chaque échantillon avec 9 ml d'eau physiologique stérile (annexe 2) contenu dans un tube à essai (10^{-1}). La suspension mère est homogénéisée par agitation à l'aide d'un vortex pendant 1 à 2 min. A partir de cette solution, une série de dilutions décimales a été réalisée jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} . A partir des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} , 100 μ l

sont déposées puis étalées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans des boîtes de Petri contenant les milieux : PDA (Potatoes Dextrose Agar), CDA (Czapek Dextrose Agar), PCA (Plate Count Agar), MEA (Malt Extract Agar), CYA (Czapek Yeast Agar), Sabouraud (chloramphénicol), CDA (Czapek Dox Agar). Cette opération a été réalisée en duplicata pour chaque milieu. Les boîtes sont ensuite incubées à 25 ± 2 °C pendant 5 à 7 jours jusqu'à le développement des moisissures. La figure 9, présente la technique indirecte d'isolement des moisissures et la figure 10, présente un schéma résumant la technique indirecte.

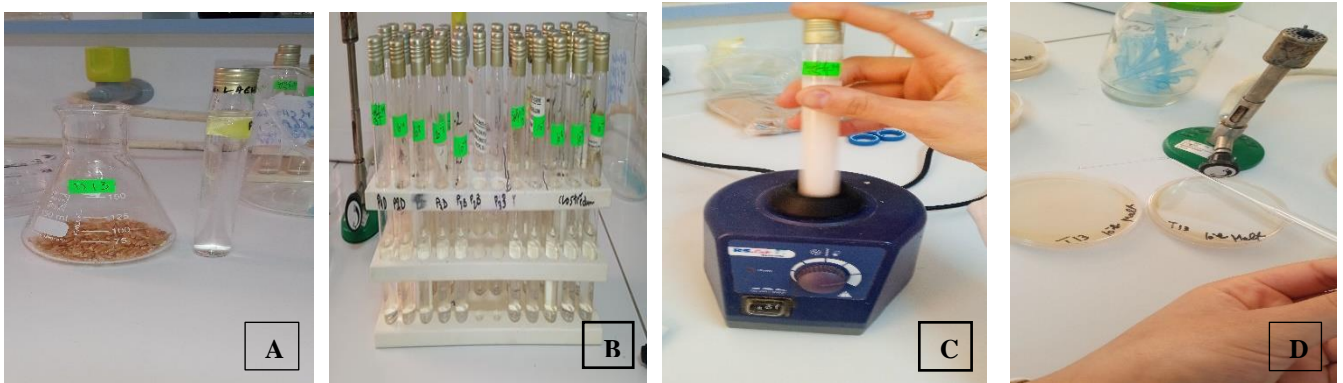


Figure 9: Isolement des moisissures de blé par la méthode de dilution.

(**A** : Rinçage avec de l'eau distillée stérile ; **B** : Préparation d'une série de dilution ; **C** : Préparation de la solution mère ; **D** : Ensemencement par étalement dans les milieux)

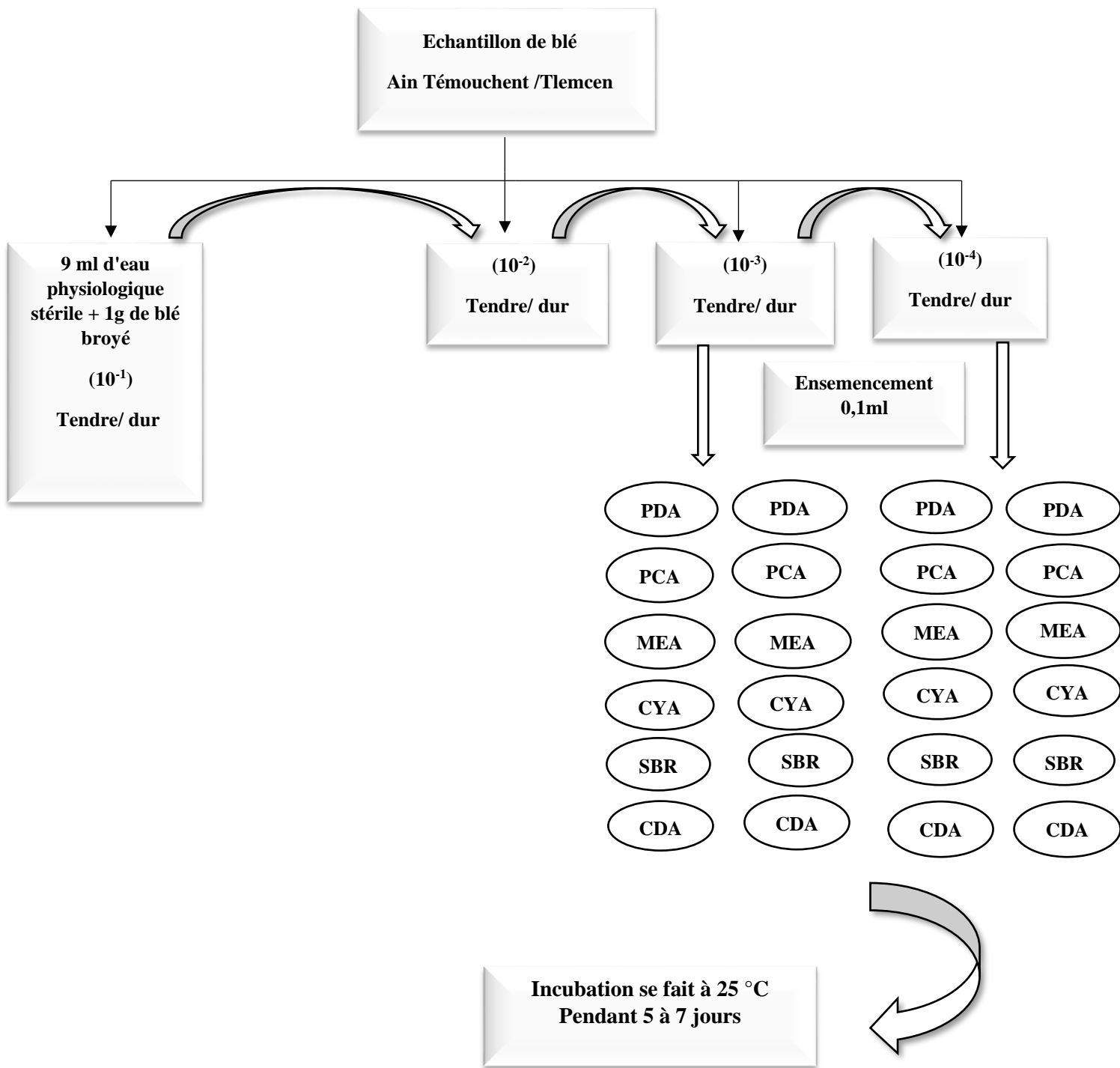


Figure 10 : Technique d’isolement des souches fongiques à partir des grains de blé par la méthode indirecte.

2. Repiquage et purification des isolats

Après incubation, les isolats obtenus sont repiqués sur milieu PDA (annexe 1), jusqu'à l'obtention des cultures pures. Pour ce faire, à l'aide d'un scalpel et d'une pince bien stérilisée (flambé sous une flamme bleue de bec benzène) puis refroidis dans de l'alcool, nous avons prélevons un fragment mycélien à la périphérie du thalle de chaque colonie, et le transférer dans une nouvelle boîte de Petri contenant du milieu PDA, Afin d'économiser les boîte, nous avons divisé ces dernières en trois parties ensuite placer chaque type de moisissures dans une partie séparée. Le fragment mycélien est placé à la surface du milieu de sorte que la partie supérieure du thalle soit en contact avec le milieu. Après 7 jours d'incubation à $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, des cultures pures sont obtenues (Botton *et al.*, 1990). La figure 11, présente la purification des isolats fongiques.

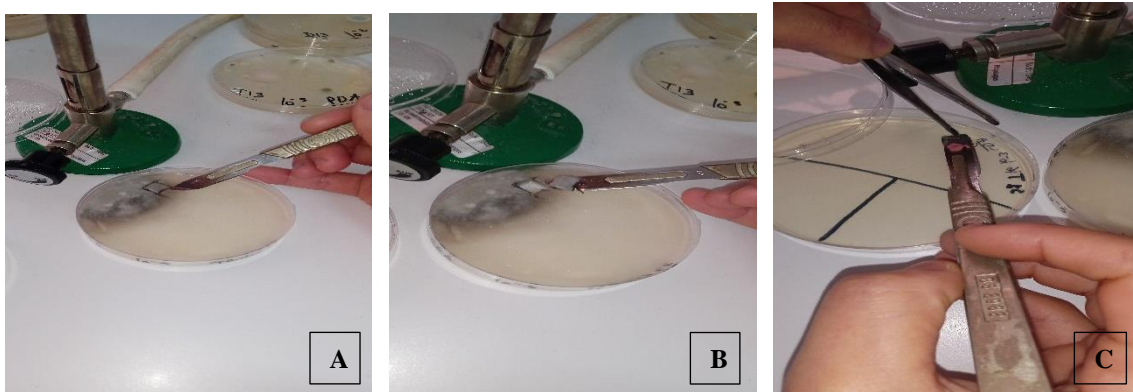


Figure 11 : Repiquage et purification des isolats fongiques

(A, B : Résection d'une partie du thalle, C : Transfert sur un nouveau milieu)

3. Conservation des isolats

Après incubation, les moisissures purifiées sont conservées à 4 °C sur PDA incliné en tube à essai. La figure 12, présente la conservation des isolats.



Figure 12 : Conservation des isolats

4. Identification des moisissures

L'identification des moisissures fait appel aux caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Elle nécessite d'abord l'utilisation d'un milieu adéquat, et ensuite le montage de préparations microscopiques des fragments de mycélium avec une coloration au bleu de méthylène (annexe 3) ou au bleu de coton du matériel à examiner. L'identification des champignons contaminants les grains de blé repose sur plusieurs critères d'ordre macroscopiques (morphologiques) tel que l'aspect, la couleur et le diamètre de la colonie, leur revers, et la présence des pigments et d'ordre microscopique tel que, la présence ou l'absence des spores, leur forme, leur structure, leur taille et l'aspect de mycélium (cloisonné ou siphonné) (Pitt et Hocking, 2009). Les genres sont déterminés par les caractères cultureux et microscopiques en se référant au manuel de Barnett (1972). Pour chaque groupe de champignons, la stratégie d'identification a été la suivante :

4.1. Identification macroscopique

L'observation macroscopique est réalisée en observant à l'œil nu les deux faces de la boîte. L'étude des caractères morphologiques a porté sur tous les genres de moisissures isolées. Les caractères étudiés sont les suivants :

- Au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle (veloute, laineux, etc..), la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie, la vitesse de croissance apicale et l'odeur (Djossou, 2011 ; Belmehti et Beddar, 2019).
- Au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores et la présence de pigment diffusible (Djossou, 2011).

Parmi les moisissures isolées les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques. L'identification est faite à l'œil nu puis à l'aide d'un binoculaire (Bennoudia, 2016).

4.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des moisissures repose sur plusieurs méthodes. Parmi les méthodes les plus utilisées celles du ruban adhésif et la méthode au bleu de coton lactophénol ou Bleu de méthylène (Belmehti et Beddar, 2019). Cette méthode est fondée essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes ou en amas, etc...) (Belaib et Bouhala, 2016).

4.2.1. Méthode de ruban adhésif au bleu de méthylène

La technique de scotch est une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent que l'on dépose légèrement à la surface de la culture jeune et à la périphérie de la colonie fongique. Le ruban adhésif est ensuite placé sur une lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène. L'observation microscopique est effectuée au grossissement X40 et X100 à l'aide d'un microscope optique (Bennoudia, 2016 ; Belmehdi et Beddar, 2019). La figure 13, présente la méthode de ruban adhésif au bleu de méthylène

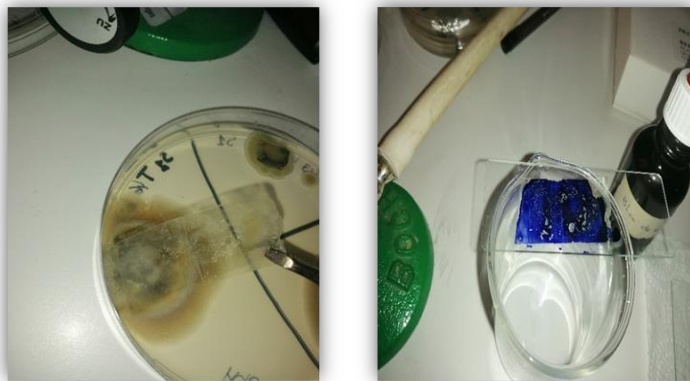


Figure 13 : Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de scotch et coloration bleu de méthylène.

4.3. Caractères morphologiques d'identification du genre *Aspergillus*

4.3.1. Description macroscopique d'*Aspergillus*

L'aspect de la colonie : les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994). La texture de la colonie : forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuse (Bennoudia, 2016). Vitesse de croissance : croissance rapide entre 2 à 7 jours (El-Khoury, 2007). Structure marginale des colonies : épais, minces, lisses, rugueux et lobés (El Khoury, 2007).

4.3.2. Description microscopique d'*Aspergillus*

Les *Aspergillus* possèdent un thalle formé de filaments mycéliens hyalins, cloisonnés, ramifiés et de diamètre régulier. Des conidiophores se développent à partir de ces filaments, terminés par une vésicule portant les cellules conidiogènes appelées phialides (Benadoud, 2014). Celles-ci peuvent être directement insérées sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des métules (ou stérigmates) formant des têtes bisériées (Raper et Fennell, 1965 ; Badillet *et al.*, 1987). L'ensemble formé par la vésicule, les métules, les phialides et les conidies

constitue la tête aspergillaire, typique du genre (Lahouar, 2016). Les conidies sont sèches, unicellulaires, arrangées en chaînes ou en colonnes compactes. Elles sont de forme globuleuse, sub-globuleuse ou elliptique, avec une surface lisse ou ornée (Bendaoud-Tabet Aoul, 2014). La figure 14, présente les caractéristiques microscopiques des espèces appartenant au genre *Aspergillus*.

4.4. Caractères morphologiques d'identification du genre *Penicillium*

4.4.1. Aspect macroscopique

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement, la sporulation confère aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Peuvent former des colonies floconneuses, funiculeuses, veloutées (Chermette et Bussieras, 1993).

4.4.2. Caractères microscopiques

Les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Leur thalle est constitué d'un mycélium hyalin et cloisonné, portant des conidiophores simples ou ramifiés (Raper et Fennell, 1965 ; Badillet *et al.*, 1987). À l'extrémité de ces conidiophores, les phialides (cellules conidiogènes) sont organisées en verticilles. Elles peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou via une ou plusieurs rangées de métules (*Penicillium* biverticillé, triverticillé, etc..) (Bendaoud-Tabet Aoul, 2014). Les phialides produisent des conidies unicellulaires, de formes variées (globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes), à surface lisse ou rugueuse, et de couleur hyaline, grisâtre ou verdâtre (Chermette et Bussieras, 1993). Les caractéristiques des pénicilles permettent de différencier les groupes et les espèces.). La figure 15, présente les caractères morphologiques microscopiques des *Penicillium* (Benadoud, 2014).

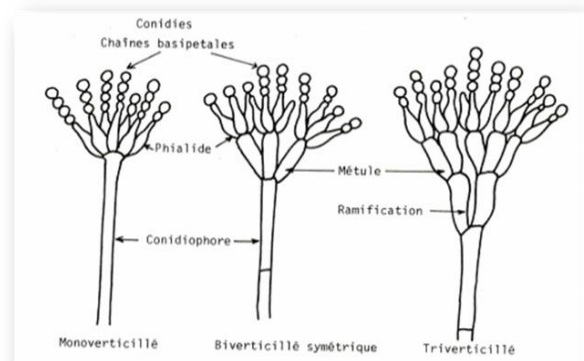
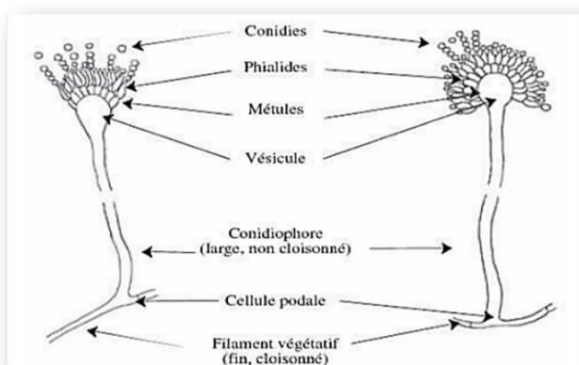


Figure 14 : Caractéristiques microscopiques des *Aspergillus* (Ripert, 2013).

Figure 15 : Caractéristiques microscopiques des *Penicillium* (Tabuc, 2007) .

V. Recherche des isolats producteurs de mycotoxines

Tous les isolats obtenus ont fait l'objet de cette analyse. Après l'étape d'identification des isolats et afin de compléter notre travail, les différentes moisissures ont été soumises à des analyses mycotoxicologiques. Il s'agit de deux isolats d'*Aspergillus* (*niger* et *sp2*), un isolat de *Penicillium sp*, deux isolats d'*Alternaria* (*sp1* et *sp2*) et un isolat de *Cladosporium sp*. Afin de déterminer leur capacité à sécréter des mycotoxines, deux méthodes classiques ont été choisies, il s'agit de la méthode de chromatographie sur couche mince CCM et la méthode de détection visuelle des cultures productrices de mycotoxines sur le milieu CEA (Coconut Extract Agar) (annexe 2) en boîtes de Petri.

1. Méthode de détection visuelle des isolats producteurs de mycotoxines

Les isolats précédemment cités sont réensemencés dans des boîtes de Petri en verre contenant 20 ml de milieu CEA additionné de désoxycholate de sodium à raison de 0,8 %. Les boîtes sont ensuite incubées à 25 + 2 °C pendant 3 à 7 jours. Après incubation, les cultures fongiques sont observées et les zones de diffusion de toxines au tour des colonies sont détectées en utilisant une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm (Lemke *et al.*, 1989). La zone est ensuite photographiée.

2. Technique de chromatographie sur couche mince (CCM)

2.1. Ensemencement sur milieu YES

Dans un flacon de 250 ml, 50 ml de milieu YES (Yeast Extract Sucrose) (annexe 3) ont été ajoutés. L'ensemble a été stérilisé à 121 °C pendant 30 minutes. Les isolats précédemment cités sont ensemencés dans les flacons contenant 50 ml de milieu YES, riche en vitamines B. Ce milieu favorise le métabolisme secondaire et induit les réactions anabolisme. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous avons préparé des disques à partir de chaque culture fongique. 8 disques provenant de chaque isolat sont introduits séparément dans des flacons contenant 50 ml de milieu semi synthétique YES afin de favoriser la production des mycotoxines. L'incubation est effectuée à 25 °C pendant 14 jours (Davis *et al.*, 1987). La figure 16, présente la préparation et l'ensemencement des rondelles sur milieu YES.



Figure 16 : Préparation et ensemencement des rondelles sur milieu YES.

2.2. Extraction des mycotoxines

Après incubation et à partir des cultures sur YES, la biomasse formée est éliminée par filtration à l'aide du papier filtre. L'extraction des mycotoxines à partir des filtrats a été réalisée selon le protocole ci-dessous :

Le filtrat obtenu est additionné à 100 ml de chloroforme avec une agitation énergétique pendant 30 min. Le mélange est ensuite laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation afin de récupérer le maximum de mycotoxines, Cette opération est répétée 3 fois successivement avec l'ajout de la phase chloroformique de 50 et 30 ml pendant 15 et 10 min.

Les 3 phases chloroformiques ainsi obtenues sont soigneusement mélangées afin d'obtenir une solution homogène. Après évaporation, l'extrait purifié est alors soumis à une séparation chromatographique (CCM). La phase chloroformique est récupérée successivement, ainsi le filtrat obtenu est concentré au rotavapor afin d'obtenir un volume inférieur à 1 ml. (Lillard *et al.*, 1970 ; Gattier *et al.*, 1974). La figure 17 présente le diagramme d'extraction de mycotoxine à partir du milieu YES, et la figure 18, présente les étapes de l'extraction de l'extrait contenant des métabolites secondaires.

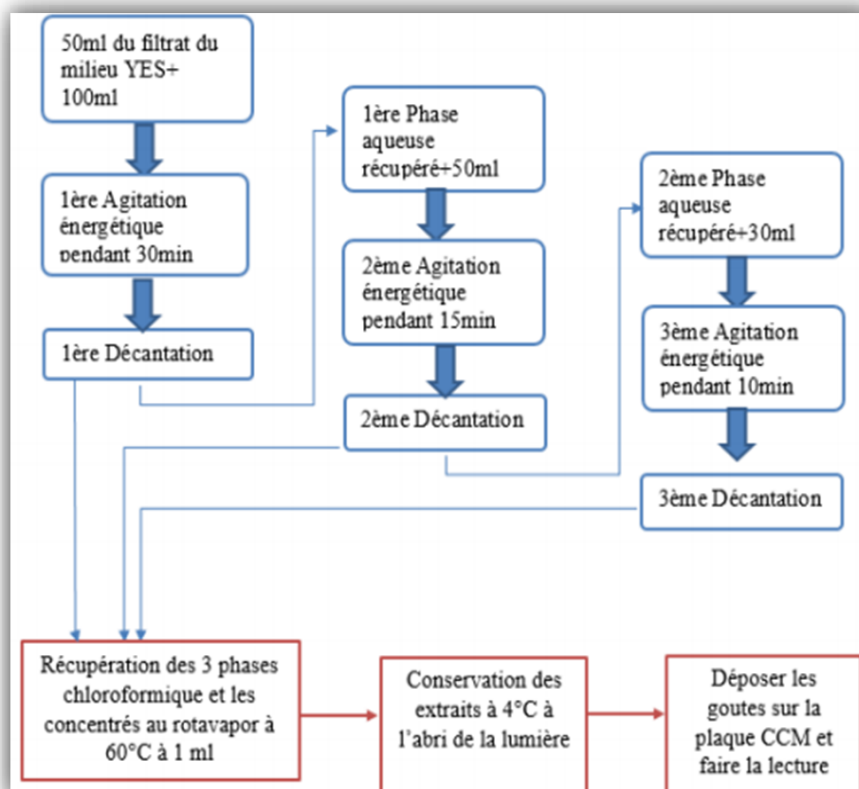


Figure 17 : Diagramme d'extraction de mycotoxines à partir du milieu YES (Davis *et al.*, 1987).



Figure 18 : Extraction de l'extrait contenant des métabolites secondaires.

(A : Biomasse formée après 14 jours d'incubation ; B : Filtration de la biomasse ; C : Décantation ; D : Evaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur)

2.3. Analyse chromatographique par CCM

2.3.1. Séparation chromatographique

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base sur ce genre de recherche. Elle permet une séparation efficace des produits, leur identification et leur quantification avec une bonne précision (Frayssinet et Cahagnier, 1982). La détection des mycotoxines est réalisée par la méthode de CCM. Cette dernière permet une détection qualitative et semi-quantitative des mycotoxines dans les produits alimentaires (AOAC, 1984).

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines. Elle se fait sur une plaque de gel de silice (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé à l'aide d'une micropipette un spot de 10 à 15 μL de chaque extrait à analyser et 5 μl de solution standard de toxines. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'élution constitué de Toluène, Acétaldéhyde et acide formique de volume respectivement (50/40/10 v/v/v). Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque a été examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par la présence d'une tâche fluorescente (Elsaadani, 2019). La figure 19, présente la méthode de séparation chromatographique.

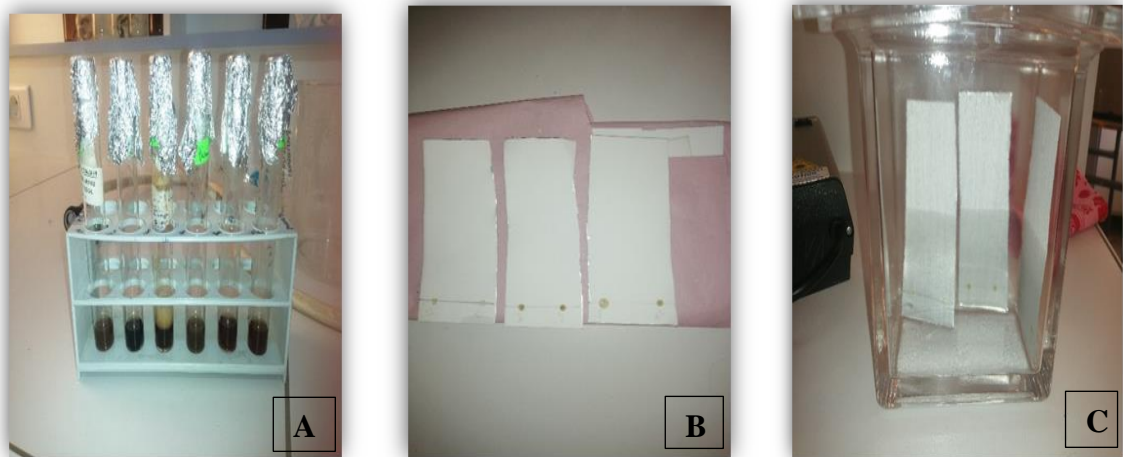


Figure 19 : Séparation chromatographique par CCM

(A :Extrait analysé ; B : Dépôt des spots sur la plaque ; C : placement des plaques dans une cuve chromatographique)

Résultats et discussions

I. Résultats des analyses physicochimiques des deux types de de blé

1. L'humidité relative (HR)

L'humidité relative est un paramètre d'une très grande importance qui conditionne le démarrage des manifestations microbiologiques. Elle explique les différents comportements des microorganismes, reflète les conditions de stockage et nous permet de connaître la quantité d'eau présente dans l'échantillon. Le tableau 9 présente les taux d'humidité des échantillons de blé dur et de blé tendre pour chaque wilaya. Le taux d'humidité a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{\text{poids avant séchage} - \text{poids après séchage}}{\text{poids avant séchage}} \times 100 \text{ (Multon, 1982 ; Gacem } et al., 2011)$$

Tableau 9 : Taux d'humidité des échantillons de blé dur et tendre.

	Blé dur (A.Témouchent)	Blé Tendre (A.Témouchent)	Blé dur (Tlemcen)	Blé tendre (Tlemcen)
Poids avant séchage (g)	18,50	19,74	19.03	22.94
Poids après séchage (g)	15,60	17,41	15,89	19,73
Taux d'humidité (%)	16	12	16	14

D'après les résultats, les variétés de blé dur et blé tendre révèlent des taux d'humidités plus ou moins importantes. Nous avons noté que le blé dur provenant de la wilaya d'Ain Témouchent et de Tlemcen a une teneur en humidité plus élevée que le blé tendre des deux wilayas. Les valeurs moyennes d'humidité relative peuvent être lues respectivement : blé dur A.Témouchent (16 %), blé tendre (12 %), tandis que blé dur Tlemcen (16 %) et blé tendre (14 %). L'échantillon de blé dur de Tlemcen et A.Témouchent avait la teneur en humidité la plus élevée par rapport au reste des échantillons, comme indiqué par la figure 20. L'humidité relative correspondant à la quantité d'eau libre disponible dans l'échantillon est généralement responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment notamment, mycologique. Les faibles teneurs en humidité relative permet de classer nos échantillons dans la catégorie des produits peu hydratés, avantage qui n'exclut pas leur contamination par une flore fongique xérotolérante prépondérante (Belli *et al.*, 2004).

Ces taux représentent donc un facteur limitant de la croissance et de développement des moisissures. Notant que beaucoup de produits pauvres en eau non altérables par les bactéries

peuvent être altérés par les moisissures (Duron, 1999). Les résultats de notre étude confirment cette hypothèse et concordent avec ceux obtenus par Hamel *et al.*, (2021) ainsi que Ferhi et Bouazza (2024).

Selon Benmansour Brixi (2005), les moisissures de stockage sont capables de se développer sur des substrats contenant un taux allant de 10 à 18 % d'humidité, avec une croissance optimale de 11 à 13 %. D'ailleurs, Moussaoui *et al.* (2021) ont montré que l'humidité relative est un facteur essentiel au développement des moisissures et à la production de mycotoxines, notamment dans les aliments mal hydratés. D'après Le Bars et Le Bars (2000), les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* pourraient croître sur une large gamme de denrées alimentaires, sous des conditions très variées et dans différents milieux à faible humidité.

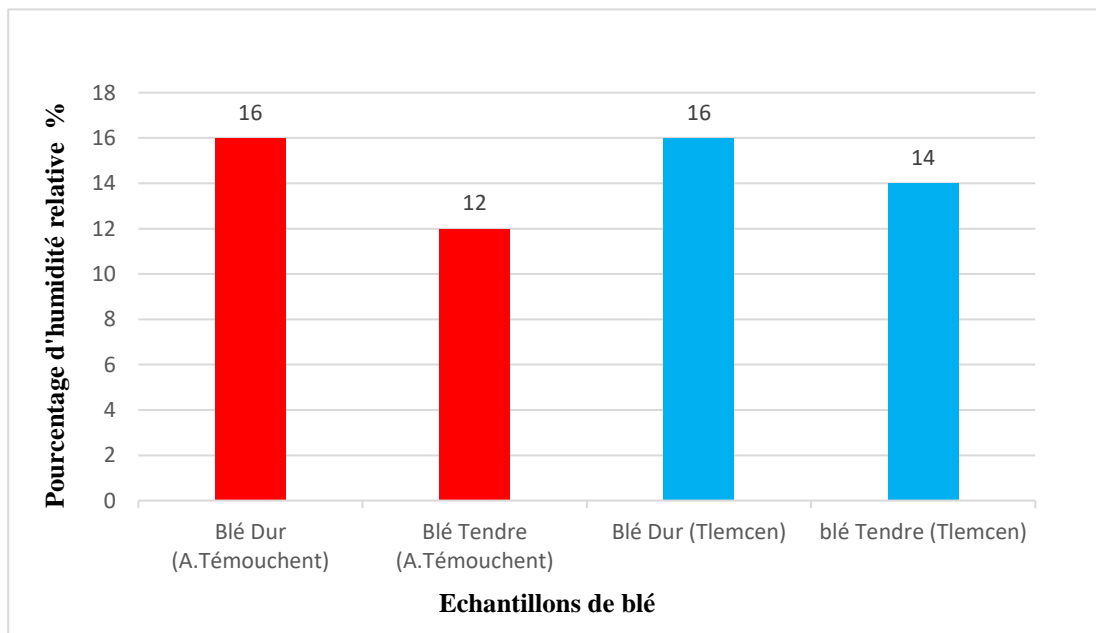


Figure 20 : Taux d'humidité des échantillons de blé tendre et dur pour les deux wilayas

2. Résultats du pH

Les valeurs moyennes du pH des différents échantillons illustrées par la figure 21 montrent que l'ensemble des échantillons présentent un pH neutre avec des valeurs allant de : blé dur A.Témouchent 7,4 blé tendre 7,36 et blé dur Tlemcen 7,44 blé tendre 7,38. Les résultats obtenus montrent que nos échantillons constituent un milieu favorable pour le développement des moisissures. D'ailleurs, selon Duron (1999), les moisissures peuvent se développer à des pH compris entre 3 et 8 avec un optimum de croissance compris entre 5 et 6. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Hamel *et al.* (2021) et Ferhi et Bouazza (2024).

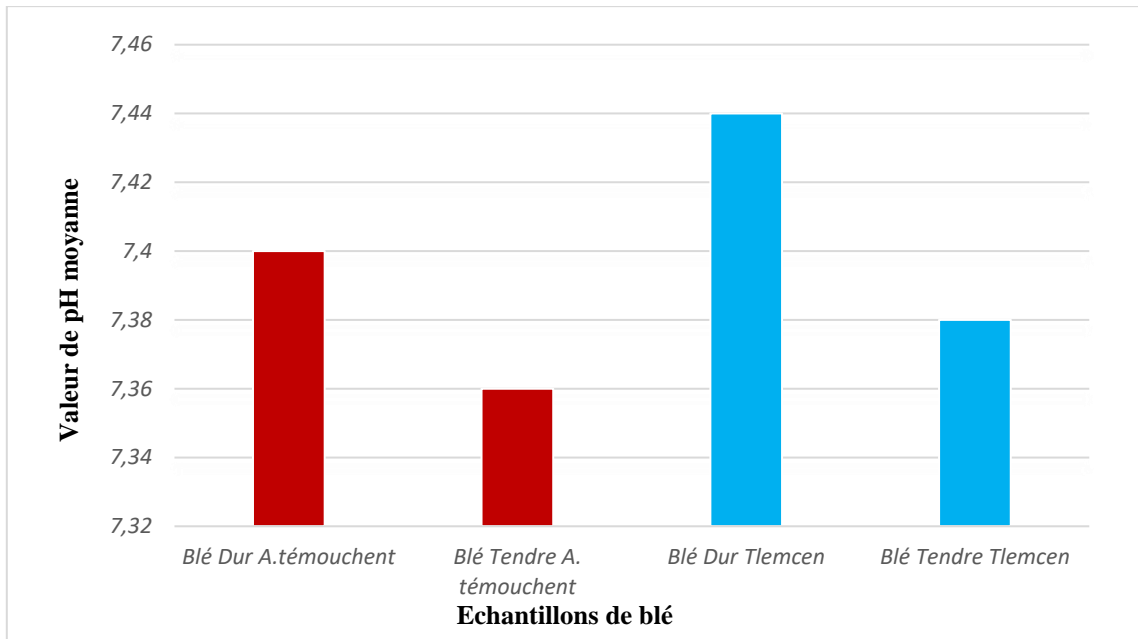


Figure 21 : Valeurs moyennes de pH des échantillons de blé tendre et dur pour les deux wilayas

II. Résultats des analyses mycologiques des deux types de de blé

1. Mise en évidence de la flore fongique

L'analyse mycologique de quatre échantillons, dont deux de blé dur et deux de blé tendre nous a permis d'isoler 21 isolats (tableau 10 et 11). Les résultats ont révélé la présence de plusieurs moisissures avec des taux de contamination différents. Selon l'origine des échantillons et les méthodes d'isolement, l'analyse par la méthode indirecte des échantillons de blé dur et blé tendre de la wilaya de Ain Témouchent a permis l'obtention de 04 et 02 isolats respectivement. En revanche, aucun isolat n'a été obtenu par la méthode de buvard en papier filtre pour les deux types de blé.

Les résultats de l'analyse des échantillons de la wilaya de Tlemcen ont permis d'isoler à partir de blé dur 7 isolats, dont 2 par la méthode directe (Ulster) et 5 par la méthode indirecte (méthode de dilution). A partir des échantillons de blé tendre, 8 isolats ont été obtenu, dont 2 isolats par la méthode directe et 6 par la méthode de dilution. Les figures 22 et 23 présentent les colonies obtenues à partir des grains de blé. Les tableaux, 10 et 11 présentent les résultats cités précédemment.

Résultats et discussions

Tableau 10 : Résultats obtenus par la méthode de dilution.

Les milieux de culture utilisés	Blé Ain Témouchent								Les milieux de culture utilisés	Blé Tlemcen							
	Blé dur				Blé tendre					Blé dur				Blé tendre			
	10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻⁴			10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
Sabouraud	-	-	-	-	-	-	-	-	PDA	+	+	+	-	+	+	+	+
PDA	+	-	+	-	-	-	-	-									
MEA	+	+	-	-	-	-	-	-									
CDA	-	-	-	-	+	+	-	-	MEA	-	-	-	-	-	-	-	-
PCA	-	-	-	-	-	-	-	-									
CYA	-	-	-	-	-	-	-	-									

(+) : Croissance fongique ; (-) : absence de croissance

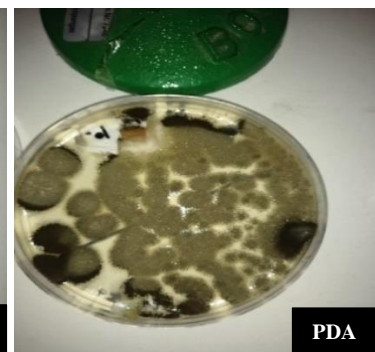
Tableau 11 : Résultats obtenus par la méthode directe.

Ain Témouchent								Tlemcen							
Méthode buvard								Méthodes d'Ulster							
Blé dur				Blé tendre				Blé dur				Blé tendre			
B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-

(+): Croissance fongique

(-): Aucune croissance fongique

(B): boîte de Petri



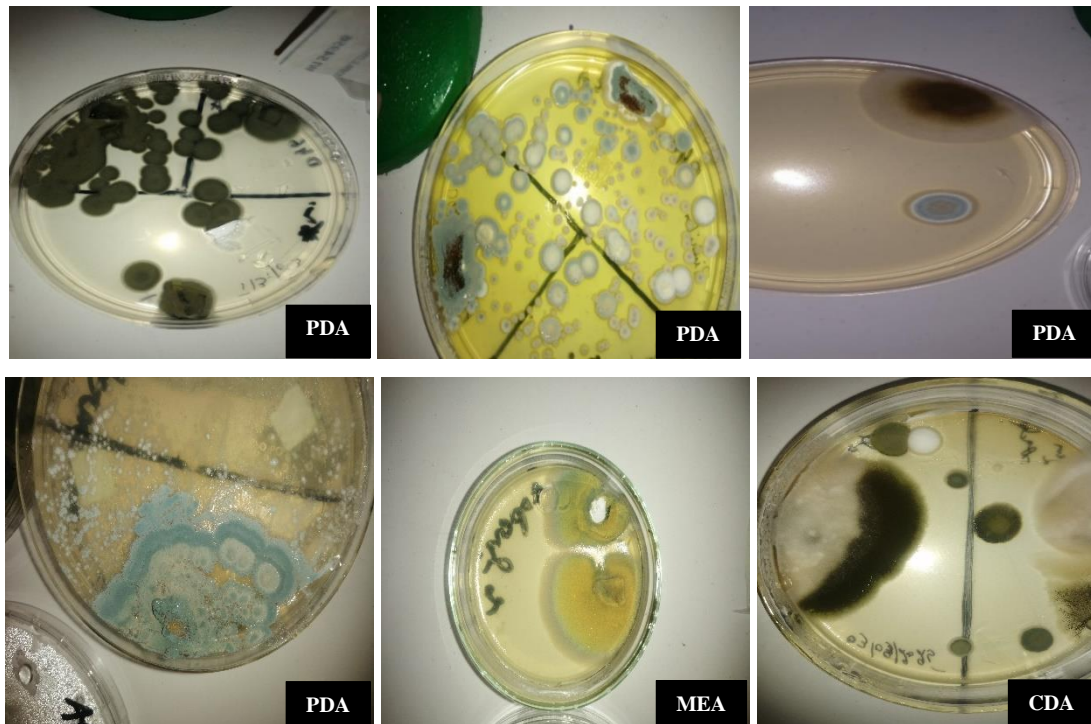


Figure 22: Colonies fongiques obtenues par la méthode de dilution à partir des grains de blé dur et tendre pour les deux wilayas.



Figure 23 : Colonies fongiques obtenues par la méthode directe (Ulster) à partir des grains de blé dur et tendre provenant de la wilaya de Tlemcen

A la lumière de ces résultats, nous constatons que la méthode d'isolement indirecte (grains non désinfectés = microflore externe et interne) nous a permis d'isoler un nombre non négligeable de moisissures par rapport à la méthode directe (grains désinfectés = microflore interne). Plusieurs auteurs ont constaté que la mycoflore externe est plus abondante que la mycoflore interne. Les résultats des travaux de Weidenborner (2001) ; Jianqiang *et al.* (1999); Hamel *et al.* (2021) ; Ferhi et Bouazza (2024), ont affirmé cette hypothèse.

A travers les analyses mycologiques effectuées sur les milieux de culture précédemment cités, on a constaté que les moisissures préfèrent les milieux : PDA, CDA et MEA par rapport aux autres milieux. Les milieux utilisés au cours de cette étude ont été recommandés par

plusieurs auteurs pour l'isolement et l'identification des moisissures rencontrées sur les matières premières végétales notamment, les céréales (Azzoun, 2012 ; Gacem, 2011 ; Hamel *et al.* 2021 ; Ferhi et Bouazza, 2024). Les trois milieux précédemment cités, ont permis une croissance variable, cela peut probablement être expliqué par la différence dans la composition de ces milieux et le choix des substrats préférés par les isolats fongiques, tel que rapporté par l'organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (Oepp, 2003). Rappelant que ces milieux sont généralement non sélectifs et que les milieux PDA et MEA sont à base d'éléments organiques alors que le milieu CDA est à base d'élément minéral (annexe 1).

Il est à signaler que sur un total de 21 isolats, les échantillons de blé dur et blé tendre provenant de la wilaya d'Ain Témouchent représentent respectivement environ 19 % et 10%. En revanche, ceux de la wilaya de Tlemcen, représentent 33 % pour le blé dur et 38 % pour le blé tendre. Les pourcentages des isolats obtenus selon chaque type de blé analysé sont illustrés par la figure 24.

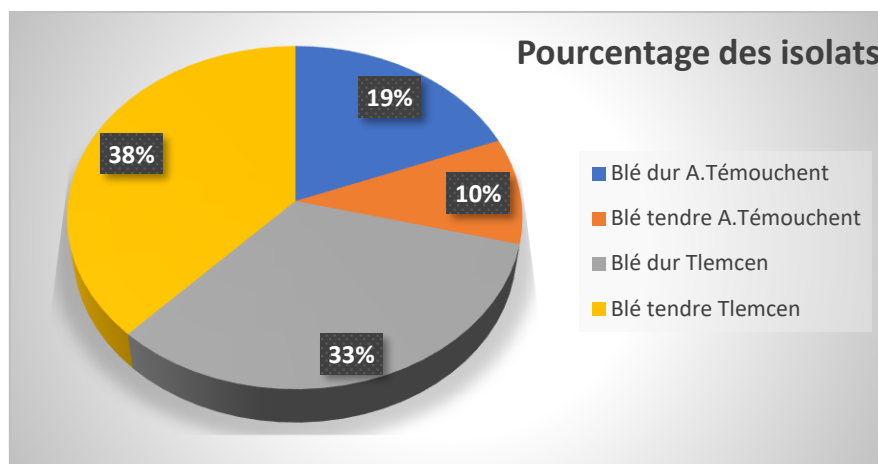


Figure 24 : Pourcentages des isolats fongiques obtenus à partir de chaque type de blé.

Nos résultats concordent avec ceux de Tahani *et al.* (2008). Les travaux de Mahideb et Merrouche (2015), ont montré des résultats légèrement similaires par rapport à nos résultats , ces auteures ont démontré que sur 25 isolats révélés dans les grains de blé 16 ont été détectés dans les grains de blé tendre et 09 dans les grains de blé dur. Cette similarité peut être expliquée soit par la méthode d'entreposage, soit par les conditions environnementales.

La différence de contamination fongique entre les deux types de blé peut probablement être expliquée par la composition biochimique et la région de culture des deux céréales, sans oublier également les conditions climatiques, les conditions de stockage (humidité, température et système de ventilation) et l'installation d'une charge fongique importante avant et après la récolte, ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la mycoflore (Le

Bars et Le Bars, 1987). Miller (2002) ; Wilson *et al.* (2002) rapportent que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement liée aux conditions hygrothermiques. La nature de la microflore dans les grains dépend aussi des conditions environnementales et édaphiques, de récolte et de stockage. Elle dépend également des approches d'analyse utilisées (Bennoudia, 2016). D'après Senouci *et al.* (2012) les céréales sont les matières premières végétales les plus exposées à la contamination fongique.

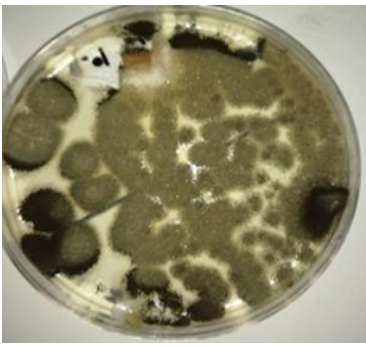
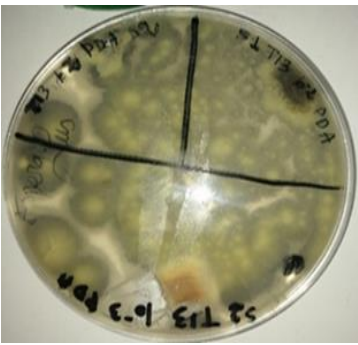
2. Résultats de l'identification des isolats fongiques

Selon Barnett et Hunter (1972), l'étude des caractères macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boîtes ...) et microscopiques (forme de thalle et des spores conidies...) des isolats fongiques constitue les premières étapes d'identifications des germes microbiens.



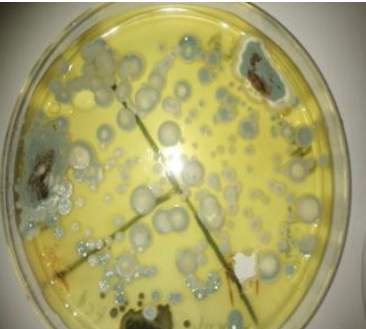
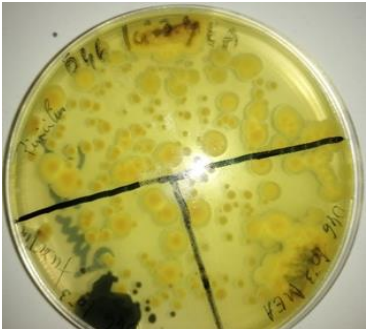
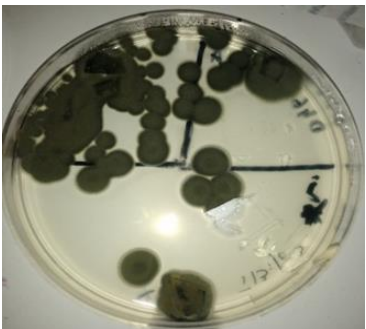

2.1. Résultats de l'étude macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation à l'œil nu, des caractères culturaux (aspect de la colonie, couleur, la taille, le relief des colonies, revers, et la vitesse de la croissance). Les différents isolats ont été cultivés sur le milieu PDA. Le tableau 12, regroupe les résultats de l'étude macroscopique.





Tableau 12 : Caractères macroscopiques des différents isolats obtenus à partir des grains de blé analysés par les deux méthodes.

Aspect macroscopique des isolats			Aspect macroscopique
Isolat	Surface (recto de la boîte)	Revers (verso de la boîte)	
I.1			<ul style="list-style-type: none"> -Croissance : rapide, visible en 2 à 3 jours à 25 °C. -Surface (aspect des colonies) : -Texture : colonies cotonneuses/blanchâtres devenant rapidement denses et granuleuses, poudreuses. -Couleur : noire caractéristique due à la production abondante de conidies foncées. -Relief et contour : contour régulier à légèrement lobé colonie épaisses surélevées. -La taille des colonies: étendues 4 à 5 cm. -Revers : Centre jaune avec bords noirs.

Résultats et discussions

<p>I.2</p>			<ul style="list-style-type: none"> -Croissance : rapide. - aspect de la colonie : -Texture : poudreux à velouté. -Couleur :Colonies verdâtres à vert foncé au centre avec une zone périphérique plus pâle, jaunâtre. -Relief et contour : Colonies circulaires bien délimitées,plat. -La taille des colonies: petite colonie à 3 cm. -Revers : verdâtres à vert foncé au centre avec une zone périphérique plus pâle, jaunâtre
<p>I.3</p>			<ul style="list-style-type: none"> -Croissance: lent, Colonies denses, recouvrant rapidement le milieu. -Surface (aspect des colonies) : -Texture: Aspect poudreux,velouté, dû à la production abondante de spores (conidies). -Couleur : vert-grisâtre, avec des bords plus clairs. -Relief et contour : Marges régulières à légèrement ondulées, Circulaire, colonie épaisses surélevées. -La taille des colonies: petite colonies à 1 cm. - Revers de la colonie : jaune
<p>I.4</p>			<ul style="list-style-type: none"> -Croissance : rapide -Surface (aspect des colonies) : -Texture :veloutée,duveteuses -Couleur : vert olive -Relief et contour : Marges régulières à légèrement ondulées, Circulaire, colonie épaisses surélevées. -Revers de la colonie : noir

Résultats et discussions


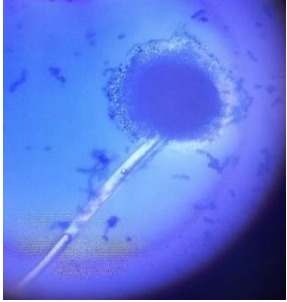
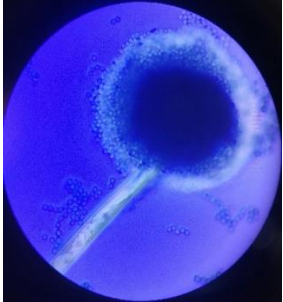
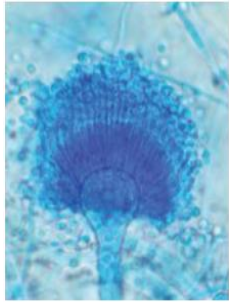
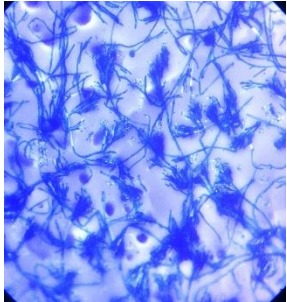


<p>I.5</p>			<ul style="list-style-type: none"> - Croissance : rapide, la colonie couvre toute la boîte en quelques jours à température ambiante 25 ° C. -Surface (aspect de la colonies) : -Texture : laineuses. -Couleur : centre verdâtres avec bords bruns. -Relief et contour : contour irrégulier colonie épaisses surélevées. - La taille de la colonie : taille importante de la colonie, environ 6 cm de diamètre. - Revers de la colonie : souvent brun foncé à centre noir.
<p>I.6</p>			<ul style="list-style-type: none"> -Croissance : rapide. -Surface (aspect de la colonie) : -Texture : laineuses. -Couleur : verdâtres mélangée à des rayures blanches et grises. -Relief et contour : contour irrégulier colonie épaisses surélevées. La taille de colonie : grande colonie à 6 cm. -Revers de la colonie : noir

2.2. Résultats de l'étude microscopique par la méthode de ruban adhésif et bleu de méthylène




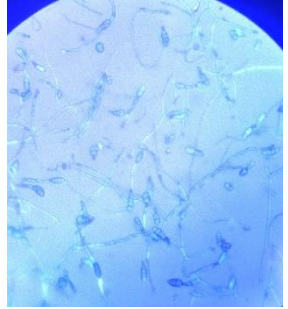





Toutes les moisissures isolées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100. Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores ou des conidies (forme, couleur, texture de parois, forme des organes de fructification, etc.). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Caractères microscopiques des isolats obtenus à partir des grains de blé par les deux méthodes et pour les deux wilayas.

Résultats et discussions

Aspect microscopique		Description	Photo microscopique de référence	Genre identifié
X40	X100	<ul style="list-style-type: none"> •Thalle à mycélium non cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non cloisonné, long, hyalin, non ramifiés, terminés en vésicule globulaire. •Phialides formées sur des métules. •Conidies (spores): claires, globuleuses, en chaînes unicellulaires. •Tête aspergillaire: bisérée, radiée, unisériées ou bisériées. 	 <p>(Abarca <i>et al.</i>, 2004)</p>	I.1 : <i>Aspergillus niger</i>
		<ul style="list-style-type: none"> •Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non cloisonné, long, hyalin, non ramifiés, terminés en vésicule. •Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore. •Conidies (spores): claires, globuleuses, en chaînes unicellulaires. 	 <p>(Tabuc, 2007)</p>	I.2 : <i>Aspergillus sp2</i>
		<ul style="list-style-type: none"> •Structure en forme de pinceau. •Filaments mycéliens fins, septes et hyalin, terminés par un pénicille. •Pénicille constitué de phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore. •Phialides insérées par l'intermédiaire d'une ou plusieurs rangées de métules (triverticillé). •Conidies: Unicellulaires, globuleuse. 	 <p>(FERHI et BOUAZZA, 2024)</p>	I.3 : <i>Penicillium sp</i>
		<ul style="list-style-type: none"> •Thalle septé ou cloisonné. •Portant de nombreux conidiophores dressés, cloisonné, long, hyalin, ramifiés. •Conidies :ovoïdes à ellipsoïdales ,Disposées en longues chaînes 		I.4 : <i>Cladosporium sp</i>

Résultats et discussions

		acropètes ramifiées, multicellulaires, avec cloisons transversales.		
		<ul style="list-style-type: none"> •Thalle septé ou cloisonné. •Portant de nombreux conidiophores dressés, cloisonné, long, hyalin, ramifiés. •Conidies :ovoïdes à ellipsoïdales ,Disposées en longues chaînes acropètes ramifiées, multicellulaires, avec cloisons transversales très caractéristiques.		I.5 : <i>Alternaria sp1</i>
		<ul style="list-style-type: none"> •Thalle septé ou cloisonné. •Portant de nombreux conidiophores dressés, cloisonné, long, hyalin, ramifiés. •Conidies :ovoïdes à ellipsoïdales, acropètes ramifiées, multicellulaires, avec cloisons transversales très caractéristiques. •Les conidies ne sont pas enchaînées. 		I.6 : <i>Alternaria sp2</i>

L'observation de la couleur et de la texture de la colonie sur le milieu PDA, ainsi que les structures micromorphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres. Sur les 21 isolats, Quatre genres fongiques ont été identifiés, il s'agit de : *Aspergillus niger* ; *Cladosporium sp* ; *Aspergillus sp2* ; *Alternaria sp1* ; *Penicillium sp et Alternaria sp2*. Le tableau 14, présente le nombre des moisissures obtenus dans les échantillons de blé après identification microscopique et macroscopique. Ces résultats indiquent d'une part,

qu'il s'agit d'une faible diversité fongique et d'autre part, la majorité des espèces fongiques sont des mésophiles.

Tableau 14 : Nombre des moisissures obtenus dans les échantillons de blé après identification macroscopique et microscopique

Échantillon du blé (wilaya d'Ain Témouchent)				Échantillon du blé (wilaya de Tlemcen)			
Méthode directe buvard		Méthode indirecte dilution		Méthode directe Ulster		Méthode indirecte dilution	
Blé dur	Blé tendre	Blé dur	Blé tendre	Blé dur	Blé tendre	Blé dur	Blé tendre
0 isolat	0 isolat	4 isolats :	2 isolats :	2 isolats :	2 isolats :	5 isolats :	6 isolats :
		-2 <i>Cladosporium spp</i> -2 <i>Penicillium spp</i>	- <i>Alternaria sp1</i>	-1 <i>Penicillium spp</i> -1 <i>Alternaria sp2</i>	-1 <i>Alternaria sp1</i> -1 <i>Alternaria sp2</i>	-1 <i>Aspergillus niger</i> -2 <i>Cladosporium spp</i> -1 <i>Penicillium spp</i> -1 <i>Alternaria sp1</i>	-2 <i>Cladosporium spp</i> -2 <i>Aspergillus niger</i> -1 <i>Aspergillus sp2</i> -1 <i>Penicillium spp</i>

Les résultats indiquent également que l'échantillon de blé tendre de la wilaya de Tlemcen présente le plus grand nombre d'isolats fongiques comparé à celui d'Ain Témouchent. Il a été constaté aussi que le genre *Cladosporium sp* est classé en première position avec un pourcentage avoisinant (7 %), suivi par le genre *Penicillium sp* (6 %), puis *Alternaria sp1* (5 %), le genre *Aspergillus niger* avec un pourcentage de (4 %). Le reste concerne le genre *Alternaria sp2* (2 %), et *Aspergillus sp2* (1 %). La figure 25, présente la répartition des isolats selon leur genre.

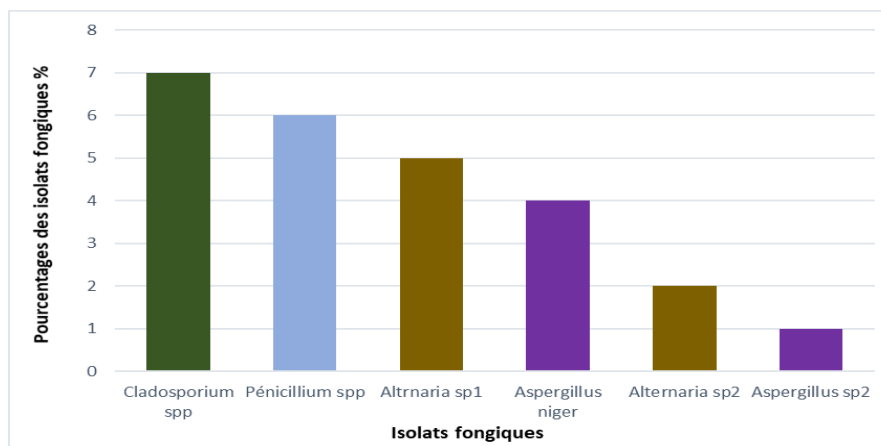


Figure 25 : Répartition des isolats selon leur genre

Il est à signaler que l'identification au stade de l'espèce de certains genres demande, des clefs spécifiques et des approches plus précises et plus fiables, tels que les outils moléculaires.

L'altération des céréales entreposés a fait l'objet de nombreuses études ayant mis en évidence que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales expliquée par des variations dans les paramètres technologiques du grains, Ces paramètres incluent la qualité physique, la qualité chimique, et la qualité sanitaire (Présence de moisissures et de mycotoxines) et par les pertes considérables (Gagiu *et al.*, 2018 ; Ferrara *et al.*, 2022 ; Singh *et al.*, 2023). Dans ce contexte, une analyse mycologique des grains de blé dur et tendre a été effectuée. Les résultats de cette analyse ont révélé une contamination par les moisissures dans les deux échantillons analysés. La dominance est représentée par les genres *Cladosporium sp.*, et *Penicillium sp.*, suivi par *Alternaria sp1*, puis *Aspergillus niger*, *Alternaria sp2* et *Aspergillus sp2*. La flore fongique des grains de blé est constituée essentiellement des moisissures filamenteuses, très sporulantes, dotées d'un grand pouvoir de dissémination dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus rencontrés (Mahidebet Merrouche, 2015). Alors que les espèces d'*Alternaria* sont assez souvent rencontrées.

La présence des genres *Aspergillus* et *Penicillium* dans la flore contaminant des grains de blé a été reportée dans plusieurs travaux (Ferhi et Bouazza, 2024 ; Hamel *et al.*, 2021 ; Gacem, 2012). Ces moisissures sont considérées comme des germes de stockage (Mathew *et al.*, 2011). Selon Ayari-Guentri *et al.* (2020), les espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* sont capable de se développer dans une large gamme de température allant de 25 à 40 °C et en présence d'humidité. La présence d'*Aspergillus* est vraisemblablement liée à des conditions climatiques (température élevée et humidité importante), tandis que le genre *Penicillium* préfère des environnements plus frais mais humides. Duan *et al.* (2023) et Nakasugi *et al.* (2021) rapportent que leur présence dans le blé stocké indique généralement un problème d'hygiène ou de gestion des conditions de stockage ou d'un séchage inefficace.

Les genres *Alternaria* et *Cladosporium* sont des moisissures de champ, présents dans le sol, l'air et sur les résidus végétaux. Leur développement sur les grains est favorisé par des conditions climatiques surtout en période de maturation et de récolte. Le stress abiotique subi par la plante, tel qu'une sécheresse suivie de fortes humidités favorise également leur prolifération (Mazaheri, 2023). Des études ont montré que les genres d'*Alternaria* et de *Cladosporium* figurent parmi les genres fongiques les plus fréquemment isolés des grains de blé entreposés, en particulier lors des phases de post-récolte et de stockage inappropriées. Leur présence varie selon la région géographique, les pratiques culturales et les conditions de

stockage (Okorski *et al.*, 2022). Cette étude a permis également de montrer l'absence de *Fusarium spp*, champignon qui contamine les produits agricoles. Cette moisissure produit des fumonisines et la zéaralénone, deux mycotoxines cancérigènes et génotoxiques (Riley *et al.*, 1999 ; Bacha *et al.*, 1998).

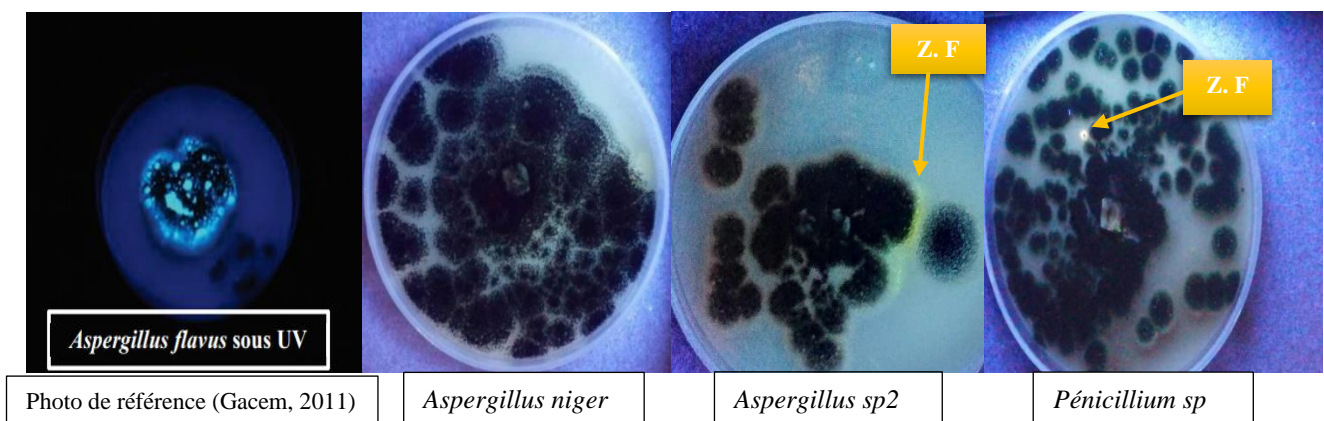
III. Pouvoir toxigène des moisissures

1. Mise en évidence de mycotoxines

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la mise en évidence des mycotoxines (extraction, purification et mise en évidence et identification), les unes sont traditionnelles alors que d'autres plus performantes et présentent l'inconvénient d'être coûteuse, et nécessitent des moyens plus spécifiques (HPLC, méthode et/ou kits d'immunoaffinité).

1.1. Résultats de la méthode de détection visuelle sur le milieu CEA

Au cours de notre étude, la mise en évidence des mycotoxines produites par les moisissures a été effectuée selon la méthode de Lemke *et al.* (1989). Le principe de cette approche est de cultiver les espèces fongiques sur milieu spécifique (CEA) (annexe 2), ensuite détecter visuellement les souches productrices de mycotoxines. Les moisissures sont ensemencées sur milieu gélosé (CEA) en boîte de Petri, puis incubées pendant 24 h à 25 °C. La présence de mycotoxines est révélée par une zone d'environ 3 à 40 mm de diamètre à la périphérie de la colonie fongique. Cette zone est détectée par examen visuel sous une lampe UV et à une longueur d'onde de 365 nm. Ces zones généralement fluorescentes sont spécifiques à la production des mycotoxines. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 26.



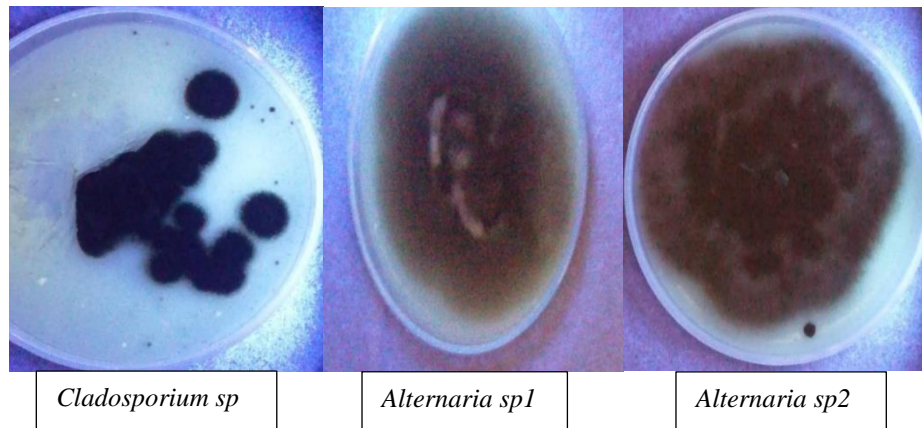


Figure 26 : Colonies fongiques obtenus sur milieu CEA avec zone de fluorescence, prises sous UV à une longueur d'onde de 365 nm ; **Z. F** = Zone de Fluorescence

Les observations des boîtes révèlent une zone de fluorescence autour des colonies des isolats d'*Aspergillus sp2* colorée en vert et de *Penicillium sp* colorée par une couleur crème à blanche. La fluorescence est un indicateur positif pour les isolats fongiques producteurs de mycotoxines. L'absence de zone fluorescente chez les autres isolats suggère qu'ils ne produisent pas de mycotoxines dans les conditions expérimentales utilisées. Cette méthode simple et rapide, utilisant le milieu CEA est certainement très avantageuse dans ce genre de recherche. Ce milieu est opaque et la blancheur de sa surface est utile en tant que toile de fond pour distinguer les différences entre les colonies. La surface du milieu CEA est également très absorbante de la lumière UV et constitue un arrière-plan efficace pour détecter les zones fluorescentes entourant des colonies correspondantes (Gacem, 2012).

1.2. Résultats de la méthode de CCM

Dans le but de vérifier confirmer les résultats obtenus avec la technique de Lemke *et al.* (1989) (Détection visuelle des isolats producteurs de mycotoxine sur milieu CEA), nous avons choisi d'entreprendre cette analyse par la technique de chromatographie sur couche mince (CCM). Après mise en culture des moisissures et obtention des extraits après extraction. L'analyse par CCM de l'extrait d'*Aspergillus sp2* a permis de séparer un spot, apparu sous forme de tache colorée en vert après révélation sous lumière UV. Ce qui laisse supposer qu'il s'agit de mycotoxines synthétisés par le genre *Aspergillus sp2*. Pour les autres extraits de (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp1 et sp2 et Cladosporium sp*), la CCM n'a révélé aucune tache, ce qui suggère l'absence de production de mycotoxines. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 28. L'échec de la mise en évidence de mycotoxines par cette méthode s'explique probablement par le fait que les isolats testés soient toxigènes et les

conditions physicochimiques n'étaient pas favorables à la toxinogénèse (Mahideb et Merrouche, 2015), ou que ces moisissures n'ont pas les potentialités de synthétiser les mycotoxines. Cette approche reste incomplète en raison d'absence d'un standard de toxines, car en absence de ce dernier, la chromatographie se limite à une détection semi-quantitative incomplète qui doit être confirmée par d'autres méthodes telle que la méthode de détection visuelle sur le milieu CEA. Ces résultats préliminaires confirment ceux obtenus par la technique de détection visuelle. Donc, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Gacem (2012) ; Mahideb et Merrouche (2015) ; Lemloum et Chennb (2024), qui ont démontré que certaines espèces d'*Aspergillus* synthétisent des mycotoxines, notamment l'OTA, AFB1, AFB2 et la gliotoxine.

La différence entre ces deux approches réside dans le fait que la méthode de détection visuelle a révélé une très petite zone fluorescente sous lumière UV pour *Penicillium sp*, tandis que la CCM n'a montré aucune tache fluorescente (spot 3, figure 27) pour cette espèce de moisissure. Les études de Ferhi et Bouazza (2024), par la CCM ont montré la présence de mycotoxines synthétisées par une souche de *Penicillium*. A travers ces résultats nous pouvons conclure que la mise en évidence des mycotoxines nécessite la combinaison de différentes méthodes analytiques. La méthode de détection visuelle offre un premier aperçu qualitatif, tandis que les approches plus spécifiques comme la chromatographie couplée à des standards permettent une identification plus précise des toxines assurant une évaluation fiable et précise de la contamination.

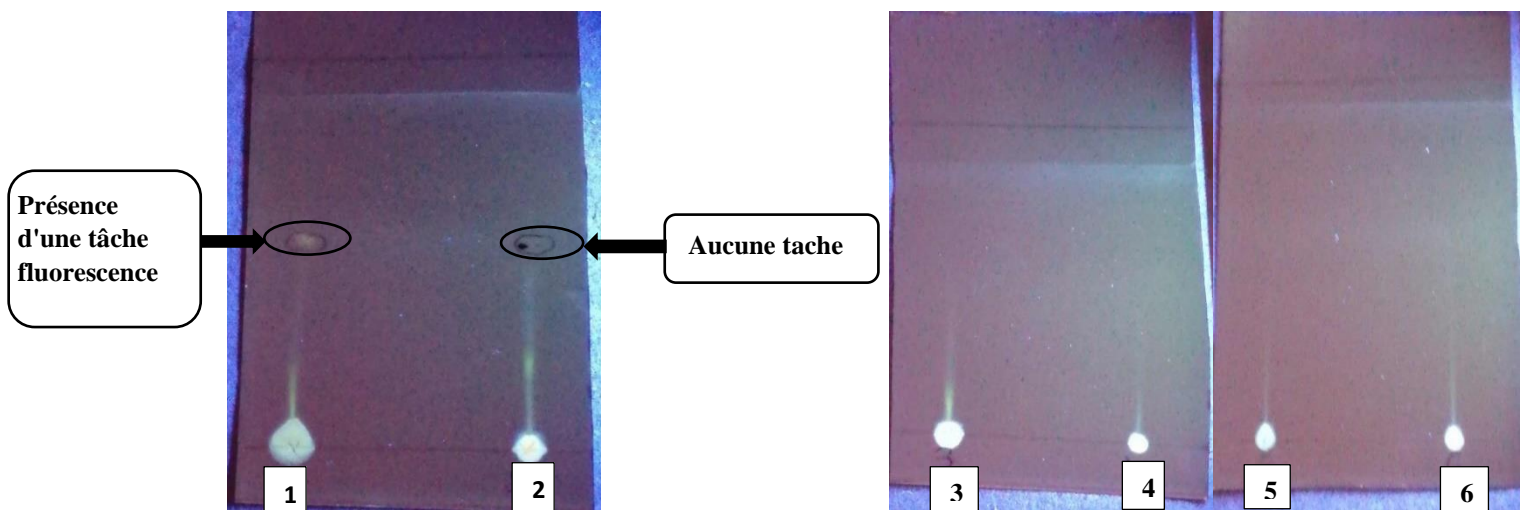


Figure 27 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots de mycotoxines produites par les moisissures.

(**spot 1** : *A. sp2* ; **spots 2** : *A. niger* ; **spot 3** : *Penicillium sp* ; **spot 4** : *Alternaria sp1* ; **spot 5** : *Alternaria sp2* ; **spot 6** : *Cladosporium sp*).

Les travaux rapportant la contamination des céréales par les aflatoxines constituent une preuve indirecte que les moisissures sont capables de se développer et de sécréter leurs toxines dans les céréales. De plus, l'aptitude de ses substrats à favoriser la toxinogénèse a été vérifiée.

Le stockage inadéquat des céréales et leur séjour prolongé au niveau des unités CCLS portent atteinte à la qualité des grains. Ces conditions particulières de récolte et de stockage des grains de blé laissent supposer que ces derniers pourraient présenter un risque de contamination par les mycotoxines (Johns *et al.*, 2022). Des études antérieures ont montré sur les grains de blé des moisissures réputées toxigènes notamment des *Aspergillus*. Certaines espèces appartenant à ce genre, en particulier *A. flavus* et *A. ochraceus* se sont montrées capables d'élaborer l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A sur les grains de blé (Alkadri *et al.*, 2014 ; Schaarschmidt et Fauhl-Hassek, 2018).

La consommation des grains de blé contaminés par des mycotoxines présente des risques pour la santé humaine et animale (Gargouri, 2020). Ces mycotoxines sont des composés très stables lors du stockage et du traitement de torréfaction. Ils résistent à des températures moyennement élevées aux traitements techniques lors de la préparation (Moussaoui *et al.*, 2021). Selon Wagacha *et al.* (2013) certaines moisissures, comme *Aspergillus* et *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines dans les grains de blé et leurs dérivés. Leurs effets résident dans la modification des substrats (qualités sensorielles : goût, couleur, saveur, texture) et dans la sécrétion d'aflatoxines, dont l'aflatoxine B1 la plus toxique. La présence, la quantité et les types de mycotoxines retrouvés dans le blé sont influencés par différents facteurs, notamment les conditions environnementales, la présence d'espèces fongiques spécifiques, la gravité de l'infection et le type de culture ou de cultivar (Zhang *et al.*, 2014 ; Johns *et al.*, 2022).

De nombreuses études ont démontré comment certains facteurs environnementaux, tels que les conditions climatiques, les pratiques agronomiques, la localisation géographique et la présence de micro-organismes coexistant peuvent influencer la croissance des champignons toxigènes et la biosynthèse des mycotoxines (Gaggiu *et al.*, 2018 ; Ferrara *et al.*, 2022 ; Singh *et al.*, 2023 ; Chen *et al.*, 2018 et Venkatesh et Keller (2019).

Les produits alimentaires sont fondamentaux à l'équilibre et à la stabilité des nations. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Le Bars et Le Bars 2000). Elles peuvent être produites sur une large gamme de denrées alimentaires et sous des conditions

très variées. En raison de la diversité de leurs effets toxiques et de leur bonne stabilité thermique, la présence de mycotoxines dans les aliments destinés à la consommation humaine ou animale est potentiellement dangereuse. Les mycotoxines, dont la présence avait été identifiée dans un premier temps en Europe, en Afrique et en Amérique du Sud, ont vu leur aire d'extension se développer progressivement au cours des dernières décennies. A côté des aflatoxines, bien connues depuis les années 60, on constate l'importance croissante, notamment en Asie et aux USA, des mycotoxines appartenant aux groupes des ochratoxines, des trichothécènes, des fumonisines dues au développement de diverses moisissures. La difficulté de l'analyse et de la caractérisation des résidus de ces mycotoxines ne cesse d'encourager les experts de la filière agroalimentaire à élaborer des projets de recherche pour renforcer leurs capacités, fournir des recommandations pour une utilisation efficace des ressources et pour l'élaboration de stratégies sanitaires et phytosanitaires.

Le stockage des céréales est une opération indispensable. Cependant, la contamination par les moisissures est favorisée dans ces conditions. Après récolte, lors du stockage des céréales, un certain nombre de moisissures, notamment des *Aspergillus* et des *Penicillium*, sont capables de se développer et produire des mycotoxines. Le développement de moisissures sur les grains des céréales peut être à l'origine d'une part, à une baisse de qualité nutritionnelle et d'autre part, les toxines susceptibles d'être formées sont particulièrement dangereuses puisqu'à long terme elles peuvent engendrer des cancers du foie ou des voies urinaires. La dose est généralement de quelques ng/Kg ou µg/Kg. Or, la présence de ces mycotoxines augmente les risques toxiques. Il est donc, indispensable d'avoir une bonne maîtrise du stockage des grains de céréales après récolte.

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, il y avait un double objectif à atteindre. Tout d'abord, connaître la nature de la microflore naturelle présente, dans les grains de blé dure et tendre entreposés. Ensuite, mettre en évidence la production de mycotoxines par les moisissures isolées à partir de ces biotopes. Les analyses physico-chimiques ont montré que les échantillons de blé, représentent un substrat favorable pour la croissance des moisissures.

Selon les analyses mycologiques, une charge fongique non négligeable a été mise en évidence. Les résultats obtenus sur la diversité de moisissures nuisibles sur les céréales contribuent à évaluer et à empêcher leur prolifération afin d'obtenir des céréales saines et de qualité. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la flore mésophile dominante de céréales entreposées appartient essentiellement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, qui renferment tous deux de nombreuses espèces toxigènes. Parmi les genres identifiés, l'espèce *Aspergillus sp2*, s'est montrée productrice de mycotoxines par les deux méthodes d'analyse.

Au vu de ces résultats et afin d'améliorer sensiblement la qualité des céréales stockées, on recommande fortement le respect des points suivants afin d'éviter les effets négatifs dus à une contamination par les moisissures :

- Eviter les sources de contamination et les pratiques qui la favorisent avant et après la récolte.
- Ecarter les échantillons présentant un aspect moisi, car ils contaminent très vite les autres.
- Stocker les céréales dans des locaux propres et désinfectés périodiquement, couverts et aérés.
- Minimiser le temps de stockage autant que possible.

Plus que jamais, la sécurité de l'alimentation est au cœur de toutes les préoccupations. C'est pourquoi, il est urgent de prendre les devants pour mettre en œuvre des programmes d'études visant à mieux connaître ces champignons, les contaminations engendrés par ceux-ci et, surtout, les méthodes et techniques permettant de limiter les facteurs prédisposant à leur expression.

Parmi les perspectives de cette contribution :

- Dresser une liste de la flore toxigène et leurs conditions de croissance et de toxigenèse.
- Prévenir et réduire les mycotoxines dans les filières agroalimentaires, en particulier dans les céréales.
- Développer et valider des mesures préventives en pré-récolte (notamment de lutte biologique) et en post-récolte ainsi qu'à promouvoir leur adoption par les opérateurs des filières.
- Développer des approches moléculaires afin de confirmer l'identité des moisissures et d'étudier les gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines.
- Mise au point de stratégies de bio contrôle, en explorant l'utilisation de microorganismes antagonistes pour inhiber la croissance des moisissures mycotoxinogènes.
- Évaluation des risques pour la santé humaine et animale, à travers des analyses toxicologiques.
- Quantification fiable et précise des mycotoxines en utilisant des méthodes de référence reconnues internationalement et validées par des autorités spécialisées dans le domaine (Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS)).

Références bibliographiques

Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., Cabanes, F. J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 33–49.

Adams Martin, R., Moss Maurice, O. (2008). *Food Microbiology* (3e ed., Vol. 429). RSC Publishing. The Royale Society of Chemistry. Third Edition; p: 463.

Adebanjo, A. & BANKOLE, S. A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology* 2(9), 254-263.

Afnor, S. (1986). Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2^{ème}Ed, Lavoisier TEC et DOC, Paris, p: 250-263.

Aidani, H. (2015). Effet des attaques de Capucin des grains (*Rhizopertha dominica*) sur les céréales stockées « Estimation sur la perte pondérale et le pouvoir germinatif Cas de blé dur dans la région de Tlemcen ». Mémoire de master en Agronomie Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen : 15p.

Alkadri, L., Fauhl-Hassek, K. (2018). Mycobiome mediates the interaction between environmental factors and mycotoxin contamination in wheat grains.

Alba, C., Alberto, A., Leticia, G., Domingo, F. (2017). Effect of fermentation on microbiological, physicochemical and physical characteristics of sourdough and impact of its use on bread quality. *Czech J. Food Sci.* 35 (6), 496–506. <https://doi.org/10.17221/68/2017-CJFS>.

Amoura, A., Baz, S. (2014). Identification des souches fongiques productrices des protéases, isolées à partir de source chaude. Mémoire de Master : Microbiologie. Université Constantine 1. Constantine.67p.

Andersen, B., Kroger E., Roberts R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria Arborescens*, *Alternaria* Infectoria and species-groups. *Mycol Res*, p: 170-180. *Alternaria Tenuissima*.

Ana, J., Marlene, F., Ana Rita, B., Sandra, A., Sandra, S., Ana, L. (2016). Occurrence of ochratoxinA in roasted coffee samples commercialized in Portugal.

Anjorin, S., Makun, H., Ihenacho, H. (2008). Effects of *Lippia multiflora* leaf extract and *Aspergillus flavus* on germination and vigour of *Sorghum bicolor* (Moench). *International Journal of Tropical Agriculture and Food Systems*, 2(2).

Ayari-guentri, S., Djemouai, N., Gaceb-terrak, R., Rahmania F. (2020). Abondance et diversité de la mycoflore associée à *Hyoscyamus muticus* L. subsp. falezlez (Coss.) Maire, une plante médicinale de la région d'Adrar. *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)* ,14 (1): 141-149 p.

Références bibliographiques

Badillet, G., Brieve, C., Gheho, E. (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique. Ed. Varia, Paris. 228p.

Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of Imperfect fungi. 3thEd, Burgess publishing company, Minnesota, pp. 62- 197.

Bamidele, T. A., Adeniyi, B. A., Smith, S. I. (2019). *In vitro*, acidic, non-proteinaceous antifungal activities of lactic acid bacteria isolated from salad vegetables against human pathogenic *Candida albicans*. Afr. J. Clin. Exp. Microbiol. 20 (2), 137–142. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v20i2.7>.

Ba, R., Monteiro, N. M. F., Koudjega, H., Adjagbo, C., Kohoude, J., Djinadou Igue, F., Gbaguidi, F., Mensah, G. A., Baba Moussa, L. (2015). Synthèse bibliographique sur l'utilisation de la scopolétine pour la réduction des aflatoxines du maïs en stock au Bénin. Ann. Sci. Agronom, 201-211.

Bajji, M. (1999). Étude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur : caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance à la sécheresse et de variantes somaclonales sélectionnés *In vitro*. Thèse de doctorat. Univ. Louvain.

Ben Kaddour, M. (2014). Modifications physiologiques chez des plantes de blé (*Triticum durum Desf*) exposées à un stress salin [En ligne]. Thèse de doctorat. Algérie : Université Badji Mokhtar Annaba, p 108.

Benakriche, B. M., Benabdelmoumene, D., Mortet, A. (2016). Identification des *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse de l'Université de Lorraine Faculté de Pharmacie. P :23, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 38, 39, 41.

Benmansour-Brixi, G.N. (2005). Étude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de magister de biologie, Université de Djillali Liabes de Sidi Bel Abbés, Algérie.

Belli, N., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. International Journal of Food Microbiology 96 (1), 19-27.

Bendaoud, T., Aoul, S. (2014). Isolement de souches fongiques de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), de Ain Franine et Cap Carbon du littoral oriental oranais. Mémoire de Magister. Université d'Oran. 148p.

Références bibliographiques

Belaib, M., et Bouhala, I.,(2016). Etude de l'effet antihépatotoxique d'une plante médicinale du genre *lycium*. Mémoire de Master : Biotechnologie des Mycètes, Fermentation et Production de Substances Fongiques. Université des Frères Mentouri Constantine 1. Constantine.73p.

Belmebdi, S., Beddar, G. (2019). Etude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de Master : Toxicologie. Université Mohamed el Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj. 53p.

Bennoudia, O. (2016). Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes contaminant la farine de blé tendre commercialisées en Algérie. Mémoire de master., Université Saad Dahlab-Blida. Blida.

Belyagoubi, L. (2006). Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de Magistère. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.108p.

Ben Braiek, O., Smaoui, S. (2019). Aflatoxins: medical, economic impact, and prospects for control. Proc. Biochem. 167-174.

Belaïd, D. (2014). Agriculture Algérie - stockage céréales. Agriculture Algérie.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P. H., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2^{ième} Ed. Masson. 512p.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P. H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y. & Veau, P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2^{ème}Ed, Masson, Paris, pp. 442.

Bouchafaa, B., Kherchi Medjden, H. (2015). Essai de modélisation de la demande de blé en Algérie. Revue d'économie et de statistique. 12(1), 72-81.

Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., Zucca, J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspectmicrobiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

Boiron, P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.

Botton, B., Buton, A., Fèvre, M. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Paris : Masson 2^{ème} édition. 442 P.

Bourras, L., (2001). Effet du stress hydrique sur les composantes du rendement de quelques géotypes de blé dur. Thèse de Magistère .Alger : IN A El Harrach, 189p.

Références bibliographiques

Brochard, G., Le Bacle, C. (2009). Mycotoxines en milieu de travail. I. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. Document pour le médecin du travail, DMT n°129, Septembre 2009.

Bueno, P., Guignard, J. L., Pouchus, Y.V. (2014). Les champignons, mycologie fondamentale et appliquée. Paris : Masson 2^{ème} édition ,109-111 P.

Cassier, P., Brugerolles, G., Combes, C. (1998). Le parasitisme : un équilibre dynamique Enseignement des sciences de la vie. Edition Masson, 366P.

Cahagnier, B., Richard-Molard, D. (1998). Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158.

Chabasse, D., Bouchra, J. P., Gentile, L., Brun, S., Penn, P. (2002). Cahier de formation Biofarma: les moisissures d'intérêt medical. Labo Analyse de Biomédicale.

Christensen Clyde, M., Kaufmann Henry, H. (1969). Grain storage. The role of fungi in quality loss. Minnesota archive Editions; p: 153.

Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël, T., Villard, J. (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses), Revue Française des Laboratoires, 373 P.

Chulze, S. N. (2010). Les stratégies visant à réduire les niveaux de mycotoxines dans le maïs pendant le stockage. Food Additives and Contaminants, 651-657.

Chermette, R., Bussieras, J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons – Alfort.

Chen, R., Ma, F., Li, P. W., Zhang, W., Ding, X. X., Zhang, Q., Li, M., Wang, Y. R., Xu, B. C. (2018). Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. Food Chemistry, 146,284–288.

Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou, D., Traore, A. F. (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. International Journal of Biological and Chemical Sciences. 10(1), 198-210.

Cui, A., Hua, H., Shao, T., Song, P., Kong, Q., Luo, T., & Jiang, Y. (2015). Aflatoxin B1 induces Src phosphorylation and stimulates lung cancer cell migration. Tumor Biology, 1–7.

Références bibliographiques

Davis, N. D., Diener, U. L. (1987). Mycotoxins, in: Food and Beverage Mycology, 2nd Ed, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 517-570.

Dawlal, P., Brabet, C., Thantsha, M. S., Buys, E.M. (2019). Visualisation and quantification of fumonisins bound by lactic acid bacteria isolates from traditional African maizebased fermented cereals, ogi and mahewu. Food Additives Contaminants - Part A Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess. 36 (2), 296–307. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1562234>.

Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.

Darocho Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C. E., Dalcero, A. M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food and Additives Contaminants. 19(4), 408-414.

Debiton, C. (2010). Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L) Favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. Thèse de doctorat Présentée à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de docteur d'université, Clermont-Ferrand France : p1-132.

Dendy, D. A. V., Dobraszczyk, M. (2000). Cereals and Cereal Products: Technol.Chemistry.Springer; p: 370.

Dieme, E., Fall, R., Sarr, I., Sarr, F., Traore, D., Seydi, M. (2016). Contamination des céréales par l'aflatoxine en Afrique : revue des méthodes de lutte existantes. International Formulae Group, 2285-2299.

Diao, E., Dong, H., Hou, H., Zhang, Z., Ji, N. & Ma, W. (2015). Factors Influencing Aflatoxin Contamination in Before and After *Harvest Peanuts*: A Review. Journal of Food Research, 4, 148–154.

Di Gregorio, M. C., Neeff, D. V., Jager, A. V., Corassin, C. H., Carão, Á. C. P., Albuquerque, R., Azevedo, A. C., & Oliveira, C. A. F. (2014). Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. Toxin Rev., 33, 125–135.

Dieme, E., Fall, R., Sarr, I., Sarr, F., Traore, D., Seydi, M. (2017). Contamination des céréales par l'aflatoxine en Afrique : Revue des méthodes de lutte existantes. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 10(5), 2285.

<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i5.27>.

D'Mello, J. P. F., MacDonald, A. M. C. (1997). Mycotoxins; Animal Feed Science Technology, 69, 155-166.

Références bibliographiques

Doumandji, A., Doumandji-mitiche, B., Salaheddine, D. (2003). Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, p: 1-22.

Druvefors, U. A. (2004). Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala* (Thèse). University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, Department of Microbiology.

Duan, O., Delfosse, P., Hornick, J. L. (2023). Terpinen-4-ol from tea tree oil prevents *Aspergillus flavus* growth in postharvest wheat grain.

Duron, B. S. (1999). Le Transport Maritime des Céréales. Mémoire de D.E.S.S. Université d'Aix-Marseille, 81p.

El Hadeff, M., El Okki, L. (2015). Valeurs d'appréciation de la qualité technologique et biochimique des nouvelles obtentions variétales de blé dur en Algérie. Mémoire de Magister en Agronomie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Sétif. 97p.

El-Khoury, A. (2007). Champignons mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1). Dans les vignobles libanais : Occurrence et origine. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement, De l'institut National Polytechnique De Toulouse. France. 213p.

Farah, A. (2009). Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin P, editor. Functional and speciality beverage technology. 1st ed. Cambridge (UK): Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.

Fang, Q., Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., Jonker, M. A. (2020). Dégradation et détoxification de l'aflatoxines B1 par des dérivés du thé *Aspergillus niger* RAF16. Toxines, 12 (12), 777.

FAO, (2009). Principales and methods for the risk assesement of chemicals in food. (240).

Feillet, P. (2000). Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris; p:308.

Ferrara, C., Fabiani, A., Stockenstrom, S., Mshicileli, N., Sewram, V. (2022). Mycobiome mediates the interaction between environmental factors and mycotoxin contamination in wheat grains.

Filtborg, O., Frisvad, J. C. & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. International Journal of Food Microbiology 33, 85-102.

Gauthier, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse. Université de Bordeaux. 132p.

Références bibliographiques

Gacem, M. A., Ould El Hadj, K. A., Gacemi, B. (2011). Étude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Algerian Journal of Arid Environment*. 1(2): 67-76.

Gagiu, P., Elamrani, A., Serghini-Caid, H., Ouzouline, M., Khalid, A. (2018). Mycobiome mediates the interaction between environmental factors and mycotoxin contamination in wheat grains.

Ghanmi, W., Albarka, I., & Kadri, Y. (2022). Etude et état des lieux des systèmes de culture de la culture du Blé dans le sud Algérien (Doctoral dissertation, UNIVERSITE AHMED DRAIA-ADRAR)

Giraud, J. (1998). *Microbiologie alimentaire*. p 8-101.p 330 Edition Donod, Paris.

Gilbert, M. K., Mack, B. M., Wei, Q., Bland, J. M., Bhatnagar, D., & Cary, J. W. (2016). RNA sequencing of an nsdC mutant reveals global regulation of secondary metabolic gene clusters in *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 182, 150–61.

Godon, B., Loisel, W. (1997). *Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales* Edition Technique et Documentation Lavoisier., Paris. p: 819.

Guezlane-Tebibel, N., Bouras, N., Ould El Hadj, M. D. (2016). Les Mycotoxines: Un Danger De Santé public. *Algerian journal of arid environment* 6(1), 32-49.

Heit, S. (2015). Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse de Doctorat : Science pharmaceutiques. Université de Lorraine. 129p.

Huybrechts, B., Tangni, E. K., Debongnie, P., Geys, J., Callebaut, A. (2013). Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles: une revue. *Cahiers Agricultures*, 22(3), 202-215 p.

IARC, (2002). International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France.

IARC, (1999). Ochratoxin A. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer 56, 26-32.

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P. (1997). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse-Bordas, pp. 336.

Références bibliographiques

Jarvis, B. B., Miller, J. D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 67-372.

Johns, K., Nesheim, S., Friedman, L. (2022). Mycobiome mediates the interaction between environmental factors and mycotoxin contamination in wheat grains.

Jouany, J. P., Morgavi, D., Boudra, H. (2006). Le risque mycotoxique dans la chaîne alimentaire en France. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 41(3).

Johanning, E., Gareis, M., Nielsen, K., Dietrich, R., Martlbauer, E. (2002). Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis. Rotterdam (Netherlands). Indoor Air 2002- 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate. In-house publishing, p: 1-6.

Jouany J. P., Yiannikouris, A. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales*. p: 3-16.

Kara, G. N., Ozbey, F., & Kabak, B. (2015). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control*, 54, 275–281.

Kachour, L. (2005). Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité, Mémoire de magister en microbiologie de l'environnement .université baji mokhtar Annaba, 90 P.

Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., Groopman, J. D. (2011). Aflatoxine : Une odyssée de 50 ans de toxicologie mécaniste et translationnelle. *Sciences toxicologiques*, 120, S28– S48 P.

Kedia, A., Dwivedy, A. K., Jha, D. K., & Dubey, N. K. (2016). Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action. *Protoplasma*, 253, 647–653.

Kezih, R., Bekhouche, F., Merazka, A., 2016. Some traditional Algerian products from *durum wheat*. *Afr. J. Food Sci.* 8 (1), 30–34. <https://doi.org/10.5897/AJFS2013.1095>.

Krska, R., Pettersson, H., Josephs, R., Lemmens, M., Mac Donald, S., Welzig, E. (2009). Zearalenone in maize: stability testing and matrix characterisation of a certified reference material. *Food additives and contaminants*, 20 (2009) 1141-1152.

Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie: Incidence et profils écophysiologicals. Thèse de doctorat en sciences

Références bibliographiques

biologiques et biotechnologie et santé. Institut Supérieur de biotechnologie de Monastir. Uniiversitat de Lleida.225p.

Laouid, A., Neftia, H. (2007). Isolement et identification des champignons de stockage des arachides cultivés à Oued-souf. Mémoire d'études supérieures en biologie. Université de Kasdi Merbah-Ouargla. 95p.

Larpent, J. P. (1990). Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2^{eme}Ed, Masson, Paris, pp. 512.

Le Bars, J., et Le Bars, P. (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section Midi Pyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987, (cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l'Institut Pasteur, 4e trimestre 1987).

Le Bars, J., Le Bars, P. (2000). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987.

Lemke, P. A., Davis, N. D., Creechgregory, W. (1989). Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species, applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology 55(7), 1808-1810.

Lesage, V. (2011). Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen du grain de blé par l'étude de lignées quasi isogéniques. Thèse de doctorat présenté à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de docteur d'université : p17-18.

Louze, H., Hadjaissa, F. (2018). Isolement et identification des moisissures de stockage du blé tendre (*Triticum aestivum L*) et blé dur (*Triticum durum L*). Mémoire de Master.

Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology 109, 645-667.

Luchese, R. H., Harrigan, W. F. (1993). Biosynthesis of Aflatoxin – the role of nutritional factors, J. Appl. Bacteriol., 74(1), 5-14.

Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. (2003). Post – harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and Mycotoxin accumulation in stored grain. European Journal of Plant Pathology 109 (7):723-730.

Références bibliographiques

Mazaheri, A. (2023). Assessment of mycobiota in Thai pigmented rice: Insights into ochratoxin A and citrinin production by *Aspergillus* and *Penicillium* species.

Mazoyer, M. (2002). Pourquoi est-il vital pour les agriculteurs d'ici et d'ailleurs de comprendre les agricultures du monde.

Martí-Quijal, F. J., Princep, A., Tornos, A., Luz, C., Meca, G., Tedeschi, P., Manes, J., (2020). Isolation, Identification and investigation of fermentative bacteria from sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Evaluation of antifungal activity of fermented fish meat and by-products broths. *Foods* 9 (5), 576.

Mahideb, N., et Merrouche, H. (2015). Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées à partir des grains de blé dur (traités et non traités). Mémoire de Master, Biotechnologie des Mycètes. Université des frères Mentouri Constantine. Constantine.107p

Maja, P. (2016). Chapitre5- Mycotoxicoses. Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management. *Environmental Mycology in Public Health* page 45-49.

Magan, N., et Lacey, J. (1988). Ecological determinants of mould growth in stored grain. : Rothamsted Research. *International Journal of Food Microbiology*. Les moisissures d'intérêt médical (N°25 éd.). (2002). Cahier de formation Bioforma.

Mills, J. T. (1990). Mycotoxins and toxigenic fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 68(7) ,982-986.

Miller, J. D. (1992). Fungi as contaminants in indoor air. *Atmospheric Environment journal*, 26, 2163-2172.

Miller Vincent, R. (2001). Mycotoxins in Mold-Colonized Drywall Obtained from a Field Investigation. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona.

Miller, J. D., & Trenholm, H. L. (1994). Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxins. Eagan Press, St Paul MN.

Miller, J. D. (2002). Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol* 504, 19-27.

Micard, V., Petitot, C., Barron, C., Larré, C., et Morel, M. (2009). Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects on the in vitro digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates.

Références bibliographiques

Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., et Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their contents for OTA, Citrinin and Fumonisin B1: Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry* 92(3), 391-400.

Multon, J. L. (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. *Technique et Documentation Lavoisier*, Paris 105-130.

Morin, O. (1994). *Aspergillus* et aspergillose : biologie. *Techniques Encycl.Elsevier*, Paris, 8(10).

Nakasugi, R., Santos1, A., Venancio, A., et Lima, N. (2021). Terpinen-4-ol from tea tree oil prevents *Aspergillus flavus* growth in postharvest wheat grain.

Neergaard, P. (1977). Seed pathol (11). MacMillan; p:1187.

Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T., and Killington, R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. p :210-217.

Njobeh, B., Dutton, F. M., et Makun, H. A. (2010). Mycotoxins and human health : Significance, prevention and control prevention. *Smart Biomol. Medicine*, Edited by Ajay K. Mishra, Ashutosh Tiwari, and Shivani B. Mishra, 133-166.

OEPP, (2003). Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. Normes OEPP Bulletin 33, 245–247.

Okorski, D., Sabaou, N., Mathieu, F., et Lebrihi, A. (2022). Assessment of mycobiota in Thai pigmented rice: Insights into ochratoxin A and citrinin production by *Aspergillus* and *Penicillium* species.

Oueslati S, Romero-Gonzalez R, Lasram S, Frenich AG, Vidal JLM, 2012. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* ; 50(7): 2376-2381

Pamel, E. V., Vlaemyneck, G., Heyndrickx, M., Herman, L., Verbeken, A and Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p: 1 11.

Références bibliographiques

Pena, A., Seifrtova, M., Lino, C., Silveira, I., Solich, P. (2006). Estimation of ochratoxin A in Portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1449-1454.

Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris, pp. 478.

Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Ecotoxicogénèse. In : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risqué, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17—35.

Pitt, J. I. (2000). Toxicogenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull*, 56 (1), 184-192P.R.A. Pitt J.I.(1986). *Advances of Penicillium and Aspergillus systematics*. London&New- York, Plenum Publi.

Pitt, J. I., et Hocking, A. D. (1997). *Aspergillus* and related teleomorphs. In *Fungi and food spoilage* (pp.339-416).Springer, Boston, MA.

Pomerayn, Z. (1988).Wheat chemistry and technology. *Am Assoc Cereal Chem St Paul* : p4794.

Qi, B., Costarrica, M. L., et Pacin, A. (2022). Assessment of mycobiota in Thai pigmented rice: Insights into ochratoxin A and citrinin production by *Aspergillus* and *Penicillium* species.

Raper, K., et Fennell, D. J. (1965). The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.686p.

Richard-Molard, D. (1998). Microbiologie des céréales et farines. In Godon B. et Willm C. «Les industries de première transformation des céréales». Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris. France. Pp. 177-190.

Riba, A. (2008). Recherche sur les champignons producteurs d'Aflatoxines et d'Ochratoxine A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 190p.

Ripert, C. (2013). Mycotoxin prevention and decontamination - a case of study on maize. *Food, Nutrition and Agriculture*, 23, 25–32.

Rkiba, Z. (2020). Les mycotoxines alimentaires. Thèse : Sciences pharma-ceutiques : Université de Mohamed DE Rabat .Maroc . 120 P.

Roberts, T. A. (2005). Microorganisms in foods. *Microbial Ecology of food Commodities*. Second Edition. Springer; p: 776.

Références bibliographiques

Roze, L. V., Arthur, A. E., Hong, S. J., British Medical Journal II. (2014). *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 179, 10–17

Roy, R. K., Thakur, M., & Dixit, V. K. (2007). Development and evaluation of polyherbal formulation for hair growth-promoting activity. *J. Cosmet. Dermatol* 6, 108-112.

Ruppel, P., Delfosse, Ph., and Hornick, J. L. (2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* p: 141-146.

Sauer, D. B., Storey, C. L., Ecker, O., and Fulk D. W. (1982). Fungi in U.S. Export wheat and corn. *Postharvest Pathology and Mycotoxins.* p: 11,1449.

Scudamore, K. A. (2005). Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives & Contaminants*, 17-25.

Scudamore, K. A., Livesey, C. T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *Journal of Science of Food and Agriculture* 77, 1-7.

Sidhu, O. P., Harish, C. H. M., & Behl, A. (2009). Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica Gmel*) seeds: Synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Food and Chemical Toxicology* 47, 774-777.

Singh, M., Storey, C. L., Ecker, O., et Fulk, D. W. (2023). Mycobiome mediates the interaction between environmental factors and mycotoxin contamination in wheat grains.

Spadaro, D., Patharajan, S., Lorè, A., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2012). Ochratoxigenic black species of *Aspergillus* in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCRRFLP procedure. *Toxins* 4, 42-54.

Studer-Rohr, I., Schlatter, J., Dietrich, D. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* 74, 499-510.

Steyn, P. S. (1980). The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism, Academic Press, INC.

Steyn, P. S. (1995). The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism, Academic Press, INC.

Steyn, P. S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure.

Références bibliographiques

Sutra, L., Frederich, M., & Jouve, J. L. (1998). Manuel de Bactériologie Alimentaire. Polytechnica, Paris, pp.15-20.

Surget, A., et Barron, C. (2005). Histologie du grain de blé. Industrie des céréales 145 : 37.

Swann, E. C., Frieders, E. M., & McLaughlin, D. J. (1999). Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. Mycologia 91. p:51-66.

Tabuc, C. (2007). Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Pathologie, Mycologie, Génétique Et Nutrition. Toulouse : Institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France. 190p.

Tannous, J. (2015). Patuline, mycotoxine de *Penicillium expansum*, principale pathogène post-récolte des pommes: nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approche préventive. Thèse du doctorat de l'université de Toulouse (INP de Toulouse).208p.

Tahani, N., Elamrani, A., Serghini-Caid, H., Ouzouline, M., et Khalid, A. (2008). Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn 2(01), 81-91.

Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. International Journal of Food Microbiology, 124, 1–12.

Wagacha, J. M., Mutegi, C. K., Christie, M. E., Karanja, L. W., Kimani, J. (2013). Changes in Fungal Population and Aflatoxin Levels and Assessment of Major Aflatoxin Types in Stored Peanuts (*Arachis hypogaea Linnaeus*). Journal of Food Research, 2(5), 10-23P.

Wang, J., Xie, Y. (2020). Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. Grain Oil Sci. Technol. 3, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.05.002>.

Zebiri, S., Mokrane, S., Verheecke-Vaessen, C., Choque, E., Reghioui, H., Sabaou, N., Mathieu, F., Riba, A. (2019). Occurrence of ochratoxin A in Algerian wheat and its milling derivatives. Toxin Rev 38 (3), 206–211. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1438472>.

Weidenborner, M. (2001). Pine nuts: The mycobiota and potential mycotoxins. Canadian journal of microbiology 47(5):460-464.

Références bibliographiques

Wilson, D. M., Mubatanhema, W., et Jurjevic, Z. (2002). Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol* 504, 3-17.

Yiannikouris, A., & Jouany, J. P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal.

Zettal, Y. (2017). Le blé : importance, santé et risque.

Zheng, N., Sun, P., Wang, J. Q., Zhen, Y. P., Han, R. W., & Xu, X. M. (2013). Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control*, 29, 198–201

Zillinsky, F. J. (1983). Common diseases of small grain cereals. A guide to identification. *Cimmyt*. p:141.

Annexes

Annexe 1**Composition des milieux de culture****Milieu Czapek Dox Agar (CDA)**

NaNO ₃	30 g
KCL.....	05 g
MgSO ₄	05 g
FeSO ₄	0.1g
Agar.....	2 g
Eau distillée	100 ml

Extract de Malt Agar (MEA)

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20g
Agar.....	20 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu Czapek Dox + Extrait de levure (CYA)

Sucrose.....	3 0 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0 . 5 g
MgSO ₄	0 . 5 g
FeSO ₄	0 . 0 1 g
NaNO ₃	3 g
Extrait de levure	2 , 5 g
Agar.....	20 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

Pomme de terre	200 g
Agar	20 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 2**Gélose Sabouraud Chloramphénicol**

Peptone de caséine.....	5 g
Peptone de viande.....	5 g
Glucose monohydraté.....	40 g
Chloramphénicol.....	5 mg
Agar.....	20 g
d'eau distillée.....	1L

Milieu PCA

Peptone de caséine.....	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose.....	1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1 L

Eau gélosée

Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1 L

Eau physiologique

NaCl.....	9 g
Eau distillée.....	1000 ml

Milieu Coconut extract agar (CEA)

La noix de coco déchiquetée.....	100
Agar.....	6 g
d'eau distillé.....	300 ml

Annexe 3**Milieu YES (Yeast Extract Sucrose)**

Extrait de levure.....	20 g
Saccharose.....	150 g
MgSo4	0.5 g
Eau distillée	1000 ml

Bleu de méthylène

Bleu de méthylène.....	200 mg
Éthanol.....	50 ml
Eau distillée.....	100 ml

Dans une fiole de 100 ml, dissoudre 200 mg de bleu de méthylène dans 50 ml d'éthanol. Compléter à 100 ml avec de l'eau et agiter pendant 1 heure. Cette solution doit être préparée au moins 24 heures avant son utilisation.

Résumé

Les produits alimentaires sont fondamentaux à l'équilibre et à la stabilité des nations. En Algérie, le blé représente un aliment de base. Il est exposé à la contamination lors du stockage, surtout en cas d'humidité élevée et une mauvaise aération. Cette étude a permis de mettre en évidence la contamination des échantillons de blé dur et tendre stockés au niveau des unités CCLS de Tlemcen et Ain Témouchent par les moisissures et la production de mycotoxines par les isolats fongiques isolés. Les résultats des analyses physico-chimiques ont confirmés que le blé constitue un substrat favorable pour la croissance des moisissures. Les résultats de l'isolement par les deux méthodes d'analyse et, de l'identification des moisissures ont révélés la présence d'une charge fongique non négligeable. La diversité fongique est représentée par quatre principaux genres. Les genres les plus fréquents étaient *Cladosporium sp* (7 %), *Penicillium sp* (6 %), *Alternaria sp1* (5 %) et *Aspergillus niger* (4 %). En revanche, les genres *Alternaria sp2* et *Aspergillus sp2* se sont retrouvés avec des taux inférieurs, respectivement (2 %) et (1 %). Les résultats de la détection des isolats producteurs de mycotoxines par les deux méthodes ont révélés que la souche d'*Aspergillus sp2* est capable de produire des mycotoxines. Cette analyse reste incomplète et mérite d'être confirmée par d'autres méthodes fiables et précises.

Ces résultats soulignent l'existence d'un risque potentiel pour la santé, ce qui nécessite une amélioration des conditions de stockage, un contrôle rigoureux de la qualité des grains et la mise en œuvre de pratiques agricoles et d'hygiène strictes, afin de limiter la prolifération fongique et réduire le risque mycotoxique, garantissant ainsi un produit sain et sûr pour le consommateur.

Mots-clés : Algérie, Blé dur, Blé tendre, Moisissures, Mycotoxines, *Penicillium spp*, *Aspergillus spp*.

Abstract

Food products play a crucial role in maintaining the balance and stability of nations. In Algeria, wheat serves as a staple food however, it is vulnerable to contamination during storage, particularly under conditions of high humidity and inadequate ventilation. This study highlighted contamination of stored durum and soft wheat samples in the CCLS units of Tlemcen and Ain Témouchent, focusing on the presence of molds and the mycotoxins produced by the isolated fungal strains. Physicochemical analyses confirmed that wheat provides a conducive environment for mold growth. The isolation and identification of molds revealed a significant fungal presence, with four primary genera identified. The most prevalent genera included *Cladosporium sp* (7 %), *Penicillium sp* (6 %), *Alternaria sp1* (5 %), and *Aspergillus niger* (4 %). Additionally, the genera *Alternaria sp2* and *Aspergillus sp2* were detected at lower frequencies, specifically (2 %) and (1 %), respectively. Detection of mycotoxin-producing isolates indicated that the *Aspergillus sp2* strain has the potential to produce mycotoxins. However, this analysis remains incomplete and requires confirmation through other more reliable and accurate methods.

These findings underscore a potential health risk, emphasizing the need for improved storage conditions, stringent quality control of grains, and the adoption of rigorous agricultural and hygiene practices in order to limit fungal proliferation and reduce the mycotoxic risk, thereby ensuring a healthy and safe product for the consumer.

Keywords : Algeria, Durum wheat, Soft wheat, Molds, Mycotoxins, *Penicillium spp*, *Aspergillus spp*.

الملخص

تعدّ المنتجات الغذائية من الأسس الحيوية لتوازن واستقرار الأمم. وفي الجزائر، يُعتبر القمح غذاءً أساسياً. إلا أنه معرض للتلوث أثناء التخزين، خاصةً في حالات الرطوبة العالية وسوء التهوية. أتاحت هذه الدراسة إبراز تلوث عينات القمح الصلب واللين المخزنة على مستوى وحدات تعاونية الحبوب والخضر الجافة بتلمسان وعين تموشنت بالفطريات وإنتاج الميكوتوكسينات من قبل العزلات الفطرية. وقد أكدت نتائج التحاليل الفيزيائية-الكيميائية أن القمح يُشكّل وسطاً ملائماً لنمو الفطريات. كما كشفت نتائج العزل باستخدام الطريقتين التحليليتين وتحديد هوية الفطريات عن وجود حمولة فطرية لا يُستهان بها. وتمثلت التنوعات الفطرية في أربعة أجناس رئيسية، كانت الأجناس الأكثر تكراراً هي: (*Cladosporium sp* (7 %)، (*Penicillium sp* (6 %)، (*Alternaria sp1* (5 %) و(*Aspergillus niger* (4 %))، أما الجنسان *Alternaria sp2* و(*Aspergillus sp2* فقد ظهرا بنسب أقل، بلغت على التوالي (2 %) و(1 %). وقد أظهرت نتائج الكشف عن العزلات المنتجة للميكوتوكسينات باستخدام الطريقتين أن سلالة *Aspergillus sp2* قادرة على إنتاج الميكوتوكسينات. غير أن هذا التحليل لا يزال غير مكتمل ويستحق التأكيد باستخدام طرق أخرى أكثر موثوقية ودقة.

وتؤكد هذه النتائج وجود خطر محتمل على الصحة، مما يستدعي تحسين ظروف التخزين، والقيام برقابة صارمة على جودة الحبوب، وتطبيق ممارسات زراعية وصحية صارمة، بهدف الحد من انتشار الفطريات وتقليل خطر الميكوتوكسينات، وبالتالي ضمان منتج صحي وآمن للمستهلك.

الكلمات المفتاحية : الجزائر، القمح الصلب، القمح اللين، الفطريات، الميكوتوكسينات، *Aspergillus spp.*، *Penicillium spp.*