

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Dr Moulay Tahar Saida

Faculté des Sciences

Département de Biologie



Laboratoire de Biotoxicologie , Pharmacognosie

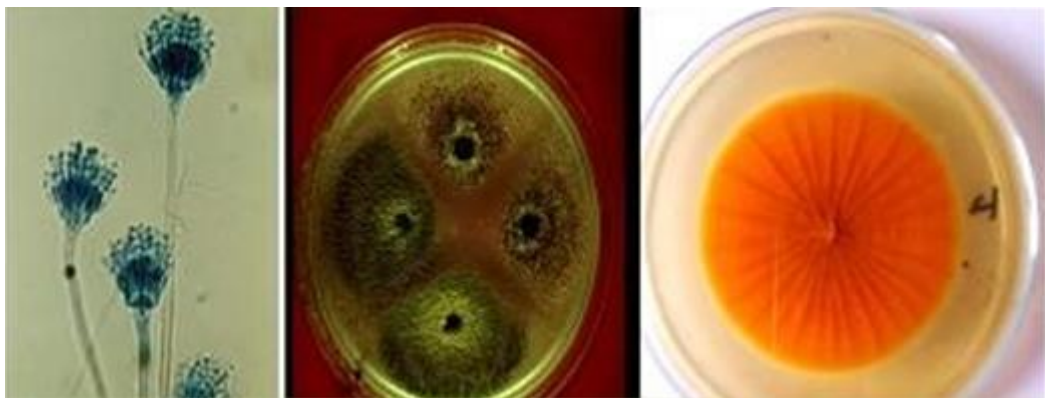
et Valorisation Biologique des Plante

POLYCOPIE

Mycologie Appliquée (Cours)

Elaboré par:

Dr. GHOUTI Dalila



Ce fasciculer est destiné aux étudiants de biologie

3^{ème} année Licence et 1^{ère} année Master

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Année Universitaire 2020-2021

Préface

Ce cours est la synthèse d'années d'enseignement de Mycologie Appliquée, et une part de ma thèse de Magister. Il est destiné à supporter l'apprentissage de Mycologie par l'étudiant de master I de Spécialité Microbiologie Appliquée et de troisième année de la même spécialité. D'autre part, ce document pourrait aider les étudiants des Sciences d'agro-alimentaire et de nutrition à renforcer leurs connaissances dans le domaine de la Mycologie. Je tiens à remercier les collègues qui ont bien voulu relire le manuscrit et m'encourager, Comme tout travail, il peut être sujet d'erreurs et de manques. De ce fait, il est toujours motivant de recevoir des corrections, conseils et recommandations de la part des collègues enseignants et chercheurs activant sur terrain.

GOUTI Dalila

Docteur en Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments.

Email: dalila_biologie@yahoo.fr

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction..... | 1 |
| I. Les champignons..... | 2 |
| I.1.Définition..... | 2 |
| I.2. Caractéristiques morphologiques des champignons..... | 2 |
| I.3. Développement des champignons filamenteux..... | 3 |
| I.4. Phylogénie des champignons filamenteux..... | 6 |
| I.5. Habitat et Conditions de Développement..... | 7 |
| I.6. Les Problèmes liés aux champignons filamenteux et à leurs métabolites..... | 8 |
| I.6.a. Secteur agroalimentaire..... | 8 |
| I.6.b. Secteur pharmaceutique et médical..... | 9 |
| II- Champignons mycotoxinogènes..... | 11 |
| II.1-a-Le genre Aspergillus..... | 11 |
| II.1.b- Le genre Penicillium..... | 12 |
| II.1.c- Le genre Fusarium..... | 13 |
| III- Les mycotoxines..... | 14 |
| III 1. Introduction..... | 14 |
| III 1. 1- Aflatoxines..... | 15 |
| III 1. 2- Ochratoxine A..... | 16 |
| III 1.3- Zéaraléonone..... | 17 |
| III 1.4- Trichothécès..... | 18 |
| III 1.5- Citrinine..... | 18 |
| III 1.6- Fumonisines..... | 18 |
| III-2- Biosynthèse des mycotoxines..... | 19 |
| III.3. Propriétés physico-chimique..... | 20 |
| IV. Les mycotoxines dans les céréales et dans la chaîne alimentaire..... | 21 |
| VI.1.Effet des mycotoxines sur la santé..... | 22 |
| V. La Mycotoxinogènes..... | 24 |
| V.1- Facteurs intrinsèques de la mycotoxinogénèse..... | 24 |
| V.2- Facteurs extrinsèques de la mycotoxinogénèse..... | 24 |
| V.2.1- Activité de l'eau..... | 25 |
| V.2.3- Présence d'oxygène..... | 25 |
| V.2.4- Température..... | 25 |
| V.5- Composition du substrat..... | 26 |
| V.3- Facteurs biologiques affectant la production des mycotoxine..... | 26 |
| VI- Prévention et détoxification..... | 26 |
| VI.1. Prévention..... | 26 |
| VI.1.1. Le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA)..... | 26 |
| VI.1.2. Le respect des bonnes pratiques de stockage(BPS)..... | 27 |
| VI.2.Décontamination et détoxification..... | 27 |
| VI.2.1.Méthodes physiques..... | 27 |
| VI.2.2.Méthodes chimiques..... | 27 |
| VI.2.3. Méthodes biologique..... | 27 |
| VI.2. Détection des mycotoxines..... | 28 |
| VI.2.1.Lachromatographie sur couche mince(CCM)..... | 28 |
| VI.2.2. La chromatographie à haute performance(HPLC)..... | 28 |
| VI.2.3.Méthodes immunochimiques..... | 28 |
| VI.2.4.Méthodes biologiques..... | 29 |
| VI.3.Régulation et législation des mycotoxines dans le monde..... | 29 |

Introduction:

ℒ

La mycologie appliquée occupe une place importante au sein des disciplines biologiques et étudie les champignons microscopiques et les pathologies communément appelées mycoses dues à ces derniers. Les champignons sont avant tout des organismes telluriques qui Co-évoluent étroitement avec les végétaux.

Si aujourd'hui on admet que les champignons constituent un règne individualisé au sein du monde vivant, il n'en a pas toujours été ainsi. Leurs morphologies (thalle, spore), leur comportement (absence de motilité) et leur nutrition qui semble se faire par « des racines » les ont longtemps assimilés au règne végétal. En 1968 Wittaker proposa une vision globale du monde vivant en individualisant nettement le règne des champignons au sein d'un système taxinomique à 5 règnes.

Ces cours abordent deux grandes parties, la première définit les champignons, leur développement, phylogénie et classification, habitat et conditions de développement ainsi que les Problèmes liés aux champignons et à leurs métabolites. La seconde partie est réservée à l'étude des champignons mycotoxinogènes, les mycotoxines, leurs propriétés physico-chimiques, aussi l'effet des mycotoxines sur la santé humaine et enfin, les facteurs favorisant la mycotoxinogénèse.

I.1.Définition

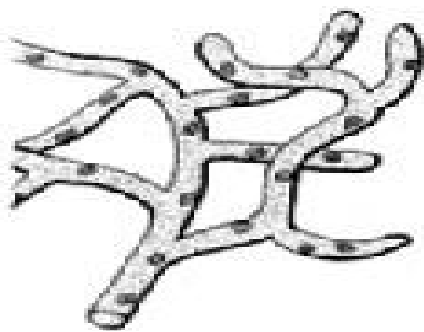
Les champignons, encore appelés Mycètes ou Fungi sont des organismes uni- ou pluricellulaires incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), d'aspect filamenteux ou levuriforme. Les champignons sont ubiquitaires et se trouvent partout dans la nature. Leur rôle essentiel est la biodégradation et le recyclage des matières organiques. Il s'agit de microorganismes hétérotrophes qui nécessitent une source de carbone et d'azote pour leur développement. Dans la classification du monde vivant, les mycètes constituent un règne distinct de celui des végétaux et des animaux. Leur particularité morphologique est d'être étroitement liée à leur substrat nutritif grâce à un réseau mycélien très développée. A l'opposé des macromycètes, les micromycètes représentent les agents habituels de mycoses et peuvent être à l'origine d'infections animales et végétales. Les champignons établissent avec les espèces animales et végétales différents types d'interactions comme le saprophytisme, le parasitisme, le commensalisme et la symbiose.

I.2. Caractéristiques morphologiques des champignons

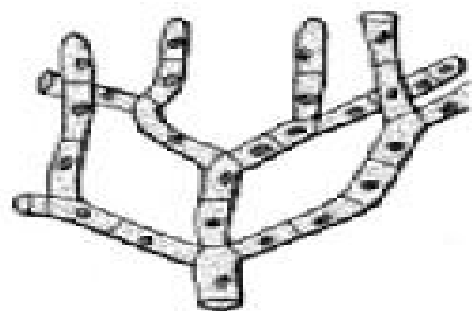
Les champignons filamenteux sont composé d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 μm et sont plus ou moins ramifiés.

Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (**Figure 1**).

Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes.



(A)



(B)

Figure 1: Structure de l'hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné.

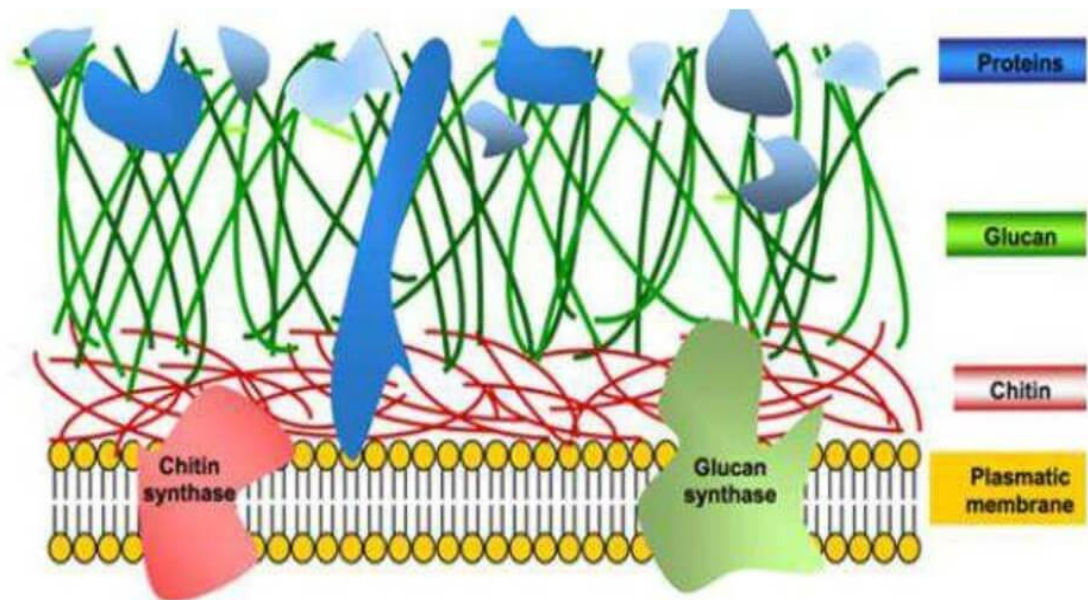
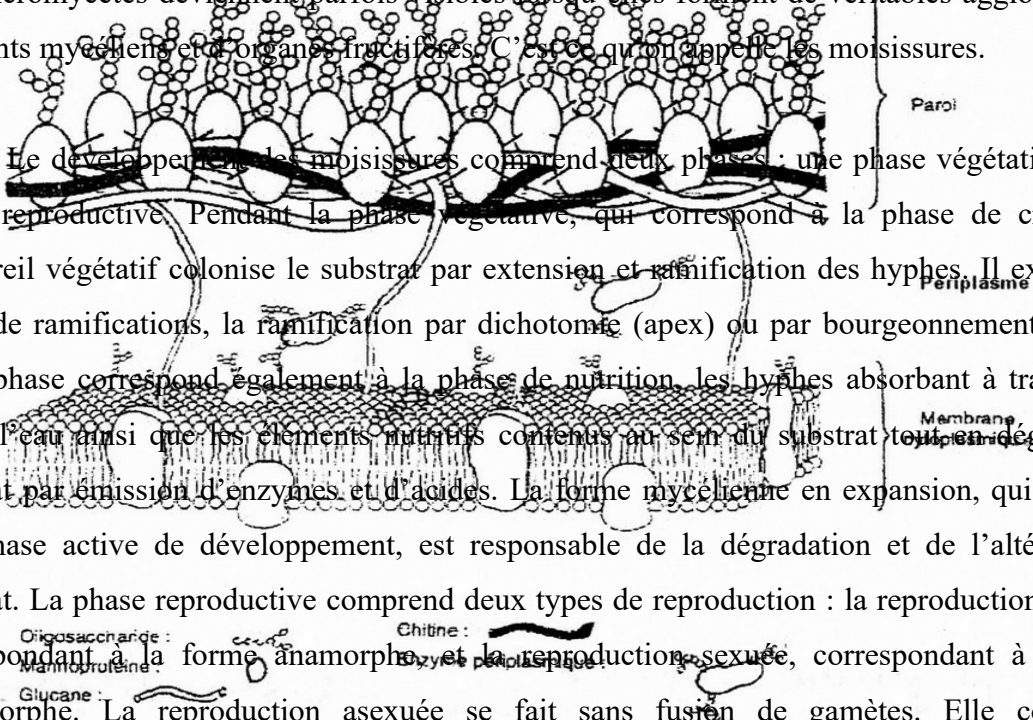


Figure 2: Schéma de la structure de la paroi fongique.

I.3. Développement des champignons filamenteux

La reproduction des champignons est une caractéristique remarquable. En fait, ils produisent un très grand nombre de spores, ce qui leur assure un grand pouvoir de diffusion ou de contamination. Ces spores sont issues de deux modalités de reproduction sexuée ou asexuée. Les micromycètes deviennent parfois visibles lorsqu'elles forment de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères. C'est ce qu'on appelle les moisissures.

Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative et une phase reproductive. Pendant la phase végétative, qui correspond à la phase de croissance, l'appareil végétatif colonise le substrat par extension et ramification des hyphes. Il existe deux types de ramifications, la ramification par dichotomie (apex) ou par bourgeonnement (latéral). Cette phase correspond également à la phase de nutrition, les hyphes absorbant à travers leur paroi, l'eau ainsi que les éléments nutritifs contenus au sein du substrat tout en dégradant le substrat par émission d'enzymes et d'acides. La forme mycélienne en expansion, qui constitue une phase active de développement, est responsable de la dégradation et de l'altération du substrat. La phase reproductive comprend deux types de reproduction : la reproduction asexuée, correspondant à la forme anamorphe, et la reproduction sexuée, correspondant à la forme téléomorphe. La reproduction asexuée se fait sans fusion de gamètes. Elle correspond majoritairement à la dispersion de spores asexuées, permettant la propagation des moisissures



afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction asexuée est appelée la sporulation. Au cours de la sporulation, ces spores, petites cellules déshydratées au métabolisme réduit et entourées d'une paroi protectrice les isolant du milieu environnant, sont produites en grande quantité par des structures spécialisées développées à partir du mycélium. Leur diamètre varie de 2 à 250 μm . Il existe différentes formes de reproduction asexuée et différents types de spores (**Figure 3**). Les spores peuvent être le résultat de la fragmentation. Dans ce cas, un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent de mycélium (arthroconidies ou arthrospores). Les spores peuvent aussi être produites de manière endogène à l'intérieur du sporocyste (sporocystiospores), ou de manière exogène en continu à l'extrémité des structures spécialisées appelées phialides (conidiospores). Ensuite, les spores se détachent du mycélium sous l'effet d'un petit choc mécanique, d'un frôlement ou d'un courant d'air. Il existe différents modes de propagation des spores. Les spores appelées gloeiospores sont véhiculées sur un nouveau substrat soit par contact, soit par des insectes ou soit par l'eau. Ces spores présentent une paroi épaisse et humide leur permettant de rester collées entre elles par un mucus et de former ainsi des amas difficilement transportables par l'air.

Après propagation et lorsque les spores se sont déposées sur un nouveau substrat, celles-ci peuvent rester inertes tant que l'environnement n'est pas favorable à leur développement. Ce n'est que lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, qu'elles « germent » comme des graines et émettent du mycélium.

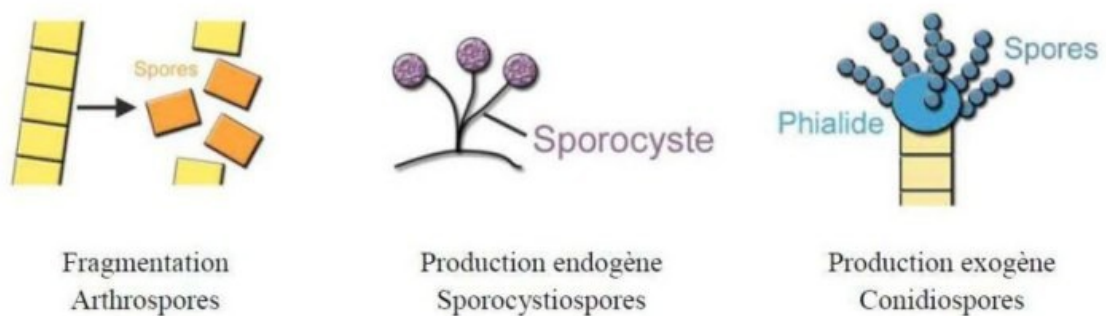


Figure 3: Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées.

La reproduction sexuée se base sur la fusion de deux gamètes haploïdes (n) donnant un zygote diploïde ($2n$). Une structure (+) à n chromosomes rencontre un autre structure (-) et la fusion des cytoplasmes donne naissance à un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes (Figure 4). Il existe différents modes de fécondation en fonction des champignons : planogamie (fusion de gamètes complémentaires et flagellés), oogamie-siphonogamie (fécondation des gamètes femelles dans le sporocyste femelle par des gamètes flagellés provenant des gamétocystes mâles

par l'intermédiaire d'un siphon), siphonogamie (accolement du gamétocyste mâle non flagellé au gamétocyste femelle puis émission d'un siphon, il n'y a pas de production de gamète flagellé mâle), trichogamie (fusion des parois du gamète mâle non flagellé appelé spermatie et de l'organe femelle appelé ascogone puis injection du noyau mâle), cystogamie (émission d'un diverticule par deux mycélia compatibles, accolement des deux diverticules et production d'une cloison appelée gamétocyste permettant le mélange des cytoplasmes) et la somatogamie (fusion de deux mycélia compatibles)

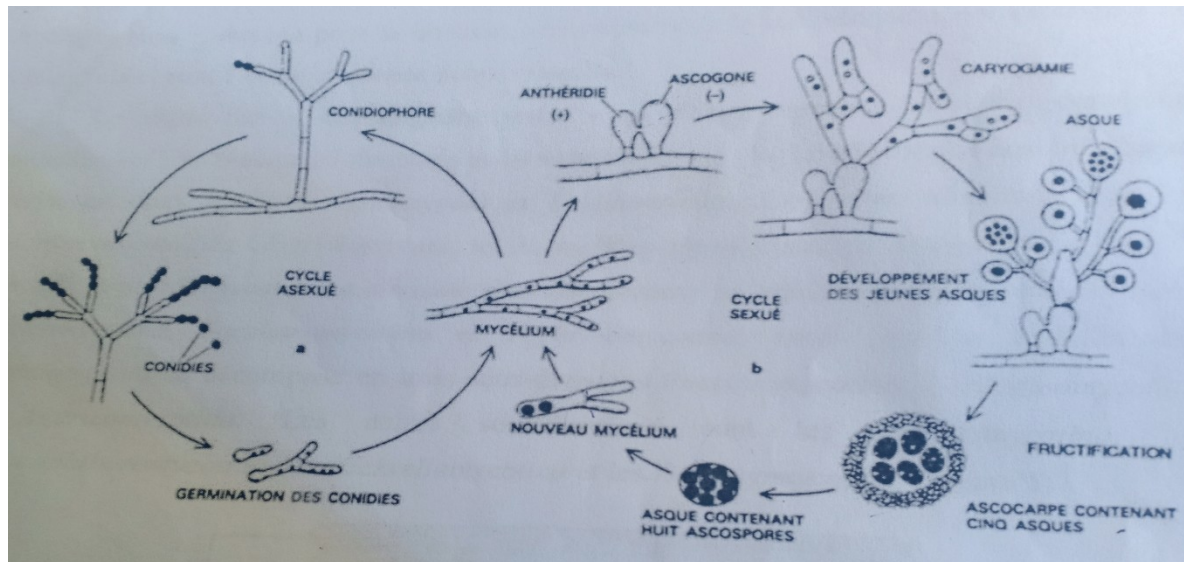


Figure 4: Schéma de la reproduction asexué et sexué d'une moisissure.

I.4. Cratères d'identification des mycètes:

L'identification des mycètes repose sur des critères macroscopiques (aspect et couleur des colonies) et microscopiques (observation des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores). La température et la vitesse de croissance peuvent être des données compléments d'identification.

I.4. 1- Examen macroscopique des cultures

La vitesse de croissance peut être rapide comme chez les *Aspergillus* ou lente comme chez les *Penicillium*. Elle varie aussi selon la richesse de l'inoculum. Elle est d'autant plus rapide quand l'inoculum est important. L'aspect des colonies est également un critère d'orientation. Les champignons luviriformes donnent des colonies lisses, glabres, humides, d'aspect brillant ou mat, parfois ruheuses. Par contre, les champignons filamenteux ont une texture différente : duveteuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse. La couleur de la colonie est également un élément pertinent d'orientation ainsi que la présence d'un pigment dans la gélose, bien que ces derniers critères sont soumis aux conditions de culture. Les pigments peuvent être

localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*). La taille des colonies peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*), ou colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

I.4. .2- Examen microscopique des cultures

L'examen microscopique d'une colonie fongique est réalisé après prélèvement d'un ou plusieurs fragments de la culture et étalement de la préparation entre lame et lamelle. Généralement, l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence les éléments importants du diagnostic.

I.4. .2.1- Le thalle végétatif

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes), l'ensemble est appelé thalle ou mycélium. On distingue :

- Le thalle siphonné ou coenocytique : Il est constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifiés, de diamètre large et irrégulier et non cloisonnés. Ces filaments caractérisent les champignons inférieurs (*Zygomycètes*, *Chytridiomycètes*).
- Le thalle septé ou cloisonné : Il correspond aux champignons dits « supérieurs » :

Ascomycètes, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* filamenteux. Ces filaments ont un diamètre étroit et régulier : leurs bords sont parallèles. Ils sont divisés par des cloisons ou *septa* en articles uni ou pluricellulaires.

I.4. .2.2- L'origine endogène ou exogène des spores

Il y a deux modes de formation de spores asexuées :

- Spores endogènes : Chez les *Mucorales*, les endospores sont produites à l'intérieur d'un sac appelé sporocyste (ou sporange) porté par un filament spécialisé. Ainsi les spores asexuées sont libérées par déchirement de la paroi du sporocyste à maturité.
- Spores exogènes : Chez les *Basidiomycètes*, les *Ascomycètes* et les *Deutéromycètes*, les spores asexuées sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée appelée cellule conidogène. Les spores ainsi produites sont appelées conidies.

I.4. .2.3- Aspect des spores

L'examen des spores et leur organisation est une étape primordiale de l'identification des moisissures. La forme des spores et leurs modalités éventuelles de septation sont à la base de la classification des *Deutéromycètes*. Selon leur aspect, on distingue cinq groupes de spores chez les champignons.

- Amérospores : spores unicellulaires de petite taille (exemple : *Penicillium*, *Aspergillus*)

- Didymospores : spores bicellulaires (exemple : *Trichothecium*)
- Phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (exemple :

Drechslera, Bipolaris, Curvularia)

- Dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (exemple : *Alternaria, Ulocladium*)
- Scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (exemple : *Fusarium*).

I.4.2.4- Le mode de groupement des conidies

Les conidies sont, en général regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. Le regroupement des conidies représente aussi un critère d'identification.

On distingue :

- En grappes : *Beauveria, Trichothecium*
- En masses : *Botrytis*
- En têtes ou « balles » : *Acremonium, Trichoderma*
- En chaînes basipètes : *Scopulariopsis, Aspergillus, Penicillium*

En chaîne acropètes : *Cladosporium, Alternaria*

I.4.3- Identification des moisissures par PCR (polymerase chain reaction)

La méthode traditionnelle de l'identification des moisissures est fondée sur les caractéristiques morphologiques. Cette identification nécessite une culture, parfois sur des milieux spécifiques, pendant 7 jours minimum afin d'obtenir la formation des conidies. L'absence de l'apparition des conidies rendra impossible l'identification du mycélium. D'autre part, la présence d'un très grand nombre d'espèces au sein d'un seul genre rend la distinction très difficile et nécessite un haut degré de spécialisation. En outre, les changements constants dans la taxonomie peuvent conduire à une mauvaise identification et une fausse évaluation de son potentiel toxigène.

Par conséquent, de nombreuses études visant à développer des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire, essentiellement sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction), ont été réalisées. L'identification par PCR est utilisée aussi bien en mycologie médicale qu'en mycologie alimentaire. De nombreux travaux utilisent la biologie moléculaire pour dépister les souches fongiques toxigènes. Les outils de biologie moléculaire sont également utilisés pour prédire le risque potentiel des mycotoxines par la quantification des espèces toxigènes.

Les premières méthodes basées sur la PCR et destinées à l'identification des champignons toxigènes ont été développées pour les espèces productrices d'aflatoxines qui sont les composés les plus toxiques parmi les mycotoxines. Le point de départ du diagnostic des *Aspergillus* section *flavi* par PCR était deux tests de PCR publiés 1996, dans les deux études, les auteurs ont utilisé des séquences des mêmes trois gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines chez *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. versicolor*. Au cours de son travail, Geisen (1996) a fait usage des trois paires d'amorces dans une PCR multiplex dans laquelle il a été démontré que *A. sojae* et *A. oryzae*, morphologiquement identiques à *A. flavus*, ne sont pas producteurs d'aflatoxines à cause de l'absence du gène *nor-1*. L'absence de produits de PCR suite à l'utilisation de ces paires d'amorces a été aussi observée dans le cas des souches d'*A. flavus* non aflatoxinogènes. D'autre étude ont utilisé des séquences du gène *nor-1* pour mettre en place des amorces et une sonde pour une analyse TaqManTM-PCR en temps réel avec lequel *A. flavus* a été quantifié dans des échantillons d'aliments contaminés et dans les céréales. Des chercheurs ont décrit un système de détection spécifique d'*A. nomius* basé sur l'amplification des amorces spécifiques de la région ITS du gène de l'ARNr couplé à une sonde fluorescente par une TaqManTM-PCR en temps réel.

Plusieurs méthodes quantitatives de PCR en temps réel ont été développées pour la détection de certains membres d'*Aspergillus* section *Nigri*, principalement pour la détection et la quantification d'*A. carbonarius*. Pour la détection et la quantification des espèces ochratoxinogènes, les gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines sont les meilleurs cibles. A nos jours, il y a peu d'informations sur les gènes impliqués dans le biosynthèse de l'OTA, mais il est bien connu que la polykétide synthase (PKS) est nécessaire. Parmi les champignons ochratoxinogènes, différents gènes de PKS impliqués dans la biosynthèse de l'OTA ont été identifiés chez *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *Penicillium nordicum* et *P. verrucosum*. Certains de ces gènes ont été utilisés comme une cible pour développer des méthodes précises qui permettent une identification et une quantification rapide, sensible et spécifique des souches productrices d'OTA. Pour la détection des *A. niger* agrégats, Selma et al. (2009) ont mis au point une PCR multiplex en temps réel pour la détection simultanée d'*A. carbonarius* et *A. niger* agrégats par la conception d'une paire d'amorces et d'une sonde spécifique aux espèces appartenant à *A. niger* aggregate à partir d'une région conservée dans le domaine de l'acyltransférase des gènes PKS. Cette méthode permet la détection de toutes les espèces appartenant à *A. niger* aggregate sans distinction entre espèces ochratoxinogènes et non ochratoxinogènes.

Plusieurs méthodes PCR suivies par un séquençage d'ADN ont été développées pour la quantification des espèces individuelles de *Fusarium* dans les grains infectés ou les tissus des plantes

I.5. Phylogénie et classification des champignons filamenteux:

Dans le monde du vivant, les champignons (microscopiques et macroscopiques) représentent un règne à part au sein des eucaryotes, bien distinct du règne des protistes, des plantes ou de celui des animaux. La classification traditionnelle des champignons filamenteux basée sur les critères phénotypiques a été supplantée par le développement des méthodes de biologie moléculaire. La classification phylogénique basée sur des critères génotypiques a permis une révision et une modification de la classification des champignons filamenteux.

Actuellement, les champignons filamenteux sont classés parmi «les Opisthokontes » constituant un groupe particulier d'eucaryotes. Différents rangs taxonomiques sont utilisés pour la classification des être vivants. ces rangs hiérarchiques sont: le règne, l'embranchement ou division, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. Il existe des rangs intermédiaires comme par exemple sous embranchement ou la sous division, la sous famille ou sous espèce qui peut elle-même se diviser en variétés. La nomenclature utilisée pour déterminer le nom scientifique des espèces est binomiale. Elle fait référence au genre puis à l'espèce. Cette nomenclature suit les règles énoncées par le naturaliste Carl Von Linné en 1753. La nomenclature des différents taxons présente une terminologie codifiée, le suffixe permettant de définir chaque rang taxonomique dans la classification hiérarchique. On distingue ainsi: *mycota* pour la division, *-mycotina* pour la sous division, *-mycètes* pour la classe, *-ales* pour l'ordre, et *aceae* pour la famille.

Le règne des «champignons vrais» ou *Fungi*, appelé *Eumycota*, comprend actuellement 1 sous- règne, 7 divisions et 10 sous- divisions. Le sous règne des *Dikarya* se divise en deux divisions, *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Les autres divisions sont les *Glomeromycota*, les *Chytridiomycota*, les *Neocallimastigomycota*, les *Blastocladiomycota* et les *Microsporidiomycota*. La division des *Ascomycota* se scinde en trois sous- divisions *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina*, *Taphrinomycotina*, tandis que la division des *Basidiomycota* se décompose en trois sous-divisions sont les *Mucoromycotina*, les *Entomophthoromycotina*, les *Kickxellomycotina* et les *Zoopagomycotina*.

La classification des champignons est basée sur le mode de reproduction sexuée. Les champignons appartenant au règne des *Eumycota* sont des champignons pour lesquels le mode de reproduction sexuée est connu. On parle alors de champignons téléomorphes. Pour certains

champignons appelés anamorphes, le mode de reproduction sexuée est inconnu et seule une multiplication asexuée ou végétative est observée. L'ensemble de ces champignons sont regroupés au sein de la division des *Deutereomycota*, que l'on appelle aussi «champignons imparfaits» ou *Fungi imperfecti*.

Le développement des méthodes moléculaires a permis de classer certains d'entre eux dans le règne des *Eumycota* et plus particulièrement dans les *Ascomycota* en les rattachant à une forme sexuée connue. Ce groupe ne représentant pas un véritable groupe de champignons, il est constitué de nombreuses espèces, il est très hétérogène et il ne constitue pas un ensemble phylogénétique. Les *Deutereomycota* sont divisés en trois classes : les *Blastomycètes*, regroupant les levures, *Hyphomycètes* et les *Coelomycètes*.

I.6. Habitat et Conditions de Développement:

Le développement des moisissures est dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux. Les champignons filamenteux étant cosmopolites et hétérotrophes, ils présentent différents types d'habitat au sein desquels ils vont établir des interactions différentes avec l'environnement et il existe donc différents modes de nutrition des champignons filamenteux. Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote comme composés organiques, les ions minéraux comme le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre. Les acides aminés peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation, alors que des molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines nécessitent une digestion préalable. Cette digestion s'effectue par production d'enzymes ou d'acides par les moisissures, permettant ainsi une altération du substrat.

Le premier mode de nutrition est le **saprophytisme**. Dans ce cas, les champignons dégradent la matière organique morte ou en décomposition afin de prélever les éléments minéraux essentiels. Ils jouent un rôle très important dans le recyclage des matières mortes comme les débris végétaux et animaux. Le deuxième mode de nutrition est le **sybiose**. Les champignons filamenteux obtiennent leurs nutriments grâce à un autre organisme en échange de certains bénéfices, tels une production, de l'eau ou des sels minéraux. Les deux organismes sont alors qualifiés symbiotes. Le troisième mode de nutrition est le **commensalisme**. Les champignons filamenteux dits commensaux tirent un bénéfice de leur hôte sans leur nuire et sans leur rapporter un quelconque avantage. Les bénéfices observés peuvent être la récupération des débris nutritifs de l'hôte, le transport ou le refuge. Enfin, le quatrième mode de nutrition est le **parasitisme**. Dans ce cas, les champignons filamenteux extraient leurs nutriments de la matière vivante. Ils tirent profit de leurs hôtes en vivant à leurs dépens entraînant parfois leur mort.

I.7. Les Problèmes liés aux champignons filamenteux et à leurs métabolites:

Les champignons filamenteux présentent un intérêt au sein de l'environnement humain, de manière bénéfique ou néfaste, avec des conséquences économiques. Ils sont impliqués dans différents domaines tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique, ainsi que dans le secteur médical.

I.7.a. Secteur agroalimentaire:

Au sein de l'industrie agroalimentaire, certaines moisissures sont utilisées pour présenter des avantages économiques intéressants pour l'Homme. Elles sont utilisées pour conférer aux produits alimentaires des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* utilisés dans l'affinage des fromages, *Penicillium jensenii* ou *P. nalgiovense* utilisés en salaisonnerie. D'autres sont exploitées pour la production des enzymes (par exemple la protéase et la pectinase produites par *A. niger*), d'acides organiques (acide citrique et gluconique produits par des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*) et d'antibiotiques (pénicilline produite par *P. chrysogenum*)

Néanmoins, ils représentent un risque dans le domaine de l'industrie agroalimentaire sous forme de contamination des denrées alimentaires. En effet, elles peuvent être à l'origine d'importantes dégradations des propriétés physicochimiques entraînant une altération de la qualité des denrées alimentaires. Le premier type d'altération de la qualité des aliments concerne la qualité dite «marchande». La prolifération des moisissures, qu'elles soient pathogène ou non, entraîne des modifications défavorables des caractéristiques diététiques et organoleptiques, tels l'aspect, la texture, l'odeur et la saveur des aliments, avec des conséquences économiques importantes dans l'industrie agroalimentaire (**figure 5**).



Figure 5: quelques exemples d'aliments contaminés par des moisissures.

Le deuxième type d'altération de la qualité des aliments concerne la qualité dite «sanitaire». La prolifération des moisissures pathogènes entraîne une diminution de l'innocuité des aliments et représentent un risque pour la santé du consommateur. La production de

métabolites secondaires comme les mycotoxines est responsable d'un taux élevé de toxicité et la présence de ces métabolites représente donc un risque sanitaire majeur pour la santé humaine et animale. Une espèce donnée de champignon microscopique peut générer plusieurs types de mycotoxines, et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces de moisissures. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime qu'environ 25% des céréales produites dans le monde sont contaminées par des mycotoxines. Les mycotoxines sont soit d'origine exogène, on les retrouve alors au sein du substrat de développement de la moisissure. Les mycotoxines les plus répandues sont les aflatoxines produites par des espèces d'*Aspergillus*, les ochratoxines produites par certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, les fumonisines, les trichotécènes et les zéralénones produites par des espèces de *Fusarium*, et la patuline produite par un certain nombre d'espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Paecilomyces*. L'ochratoxine A, considérée comme l'une des mycotoxines les plus nocives pour la santé humaine, est présente essentiellement dans les produits tels que les céréales, le cacao et le café, et c'est la mycotoxine principalement retrouvée dans le raisin, le vin et le jus de raisin.

La patuline, très toxique pour la consommation humaine, est présente au niveau des fruits et notamment dans les pommes et les poires.

I.7.b. Secteur pharmaceutique et médical

Au sein de l'industrie pharmaceutique, certaines moisissures sont utilisées pour la synthèse de médicaments, notamment d'antibiotiques telles la pénicilline (*Penicillium chrysogenum*) ou les céphalosporines (*Cephalosporium acremonium*). Bien que ces composés présentent un intérêt médical majeur, certains champignons filamenteux présentent une source de contamination avec un risque élevé pour la santé humaine. On distingue donc deux types de contamination chez l'homme : alimentaire et infectieuse.

La consommation d'aliments contenant des mycotoxines est responsable d'une intoxication alimentaire appelée mycotoxicose. Il existe deux types de mycotoxicose : la mycotoxicose aiguë (une seule ingestion d'une forte dose) et la mycotoxicose chronique (ingestions répétées de faible dose). Les symptômes observés sont dépendant du type de mycotoxine, de la dose et de la durée d'exposition, ainsi que des caractéristiques de l'individu. Dans le cas par exemple des aflatoxines, principalement produites par les espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, l'intoxication aiguë se traduit par différents symptômes (dépression, anorexie, diarrhée, ictère ou amimie) et peut être fatale. Lors d'une intoxication chronique, ces sont hautement hépatotoxiques, tératogènes, mutagènes et cancérigène. Chez

l'homme, l'aflatoxine B1, composé d'origine naturel, représente l'agent hépato-cancérigène le plus puissant connu actuellement.

Les infections fongiques chez l'homme dues aux champignons filamenteux sont en augmentation depuis ces dernières décennies. La contamination se fait principalement par inhalation de spores en suspension dans l'air, ou plus rarement par ingestion ou encor par inoculation cutanée post traumatique. Elles peuvent être d'origine nosocomiale. Les infections fongiques invasives sont principalement retrouvées chez les patients immunodéprimés et sont associées à un taux de mortalité élevé.

Chez les patients immunodéprimés, il existe différents d'infections fongiques invasives selon les champignons filamenteux. La plus fréquente est l'aspergillose invasive. Cette pathologie est due à l'espèce *Aspergillus*, 80 à 90% des aspergiloses humaines étant dues à l'espèce *Aspergillus fumigatus*. La porte d'entrée est principalement respiratoire et les aspergilloses invasives se rencontrent principalement chez les patients présentant une neutropénie profonde et sous corticothérapie (patients atteints de leucémie ou ayant reçu une allogreffe de moelle osseuse). D'autres champignons filamenteux sont responsables d'infections fongiques invasives. Les champignons de l'ordre des *Mucorales* sont responsables de mucormycoses, notamment chez les patients immunodéprimés, comme les patients atteints d'hémopathies ou encore les diabétiques en acidocétose. Ils peuvent entraîner des atteints rhinocérébrales, cutanées ou viscérales. La contamination se fait essentiellement par voie respiratoire, mais aussi par voie cutanée et digestive. D'autres genres tels *Fusarium* ou *Scedosporium* sont responsables d'infections invasives sévères chez les patients immunodéprimés.

Chez les patients immunocompétents, les contaminations fongiques peuvent se faire par voie cutanée en particulier après souillure tellurique de plaies traumatiques sévères. En effet, de nombreux champignons filamenteux sont présents dans le sol comme par exemple *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Absidia* ou *Rhizomucor*. Ces contaminations fongiques peuvent également se faire par le biais d'une plaie chirurgicale, d'une brûlure ou d'une injection intraveineuse ou sous cutanée. Les contaminations par voie aérienne sont également observées chez les patients immunocompétents. Une aspergillose peut survenir suite à l'inhalation de spore d'*Aspergillus*. L'inhalation des spores fongiques peut être associée à des symptômes allergiques et irritatifs se manifestant cliniquement par des irritations des muqueuses, des rhinites, de l'asthme, voire des pneumopathies d'hypersensibilité. La colonisation des voies respiratoires chez les patients atteints d'affections respiratoires chroniques comme la mucoviscidose peut être observée et être responsable d'aggravations des signes pulmonaires. Enfin, certains champignons filamenteux

peuvent également être responsables d'infections superficielles. Outre les dermatophytes qui sont des champignons kératinophiles responsables de dermatophytes, les moisissures environnementales peuvent être responsables de kératites (*Fusarium*, *Aspergillus*), d'onychomycoses (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Dermatophytes*) ou d'otomycoses (*Aspergillus*).

II- Champignons mycotoxinogènes

II.1-Le genre *Aspergillus*

La plupart des *Aspergillus* sont saprobes. Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou infestés par d'autres champignons. Ils sont aussi présents sur la surface des graines. Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent devenir des parasites. Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embanchement des *Ascomycotina* par leur mode de reproduction sexuée.

Le genre *Aspergillus* comprend environ 185 espèces réparties en 28 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement, notamment dans la poussière et l'air. Certaines espèces peuvent être directement pathogènes à l'homme et l'animal à cause de leur capacité d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses tel que les mycoses pulmonaires. Les *Aspergillus* sont aussi capables de produire des mycotoxines toxiques à l'homme et l'animal. Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être utilisées en industrie pour la production des enzymes et des acides organiques.

La majorité des *Aspergillus* poussent à une température de 22 à 25°C. Les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à une température de 37 à 40°C. Leur croissance est rapide sur les milieux de culture nutritionnels. Ils forment des colonies poudreuses ou granuleuses. La couleur de la colonie permet d'orienter l'identification : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*.

Les Aspergilli sont caractérisés par un appareil végétatif appelé thalle formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, cloisonnés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates.

L'ensemble vésicule, métules, phialides et conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus* (figure 6)

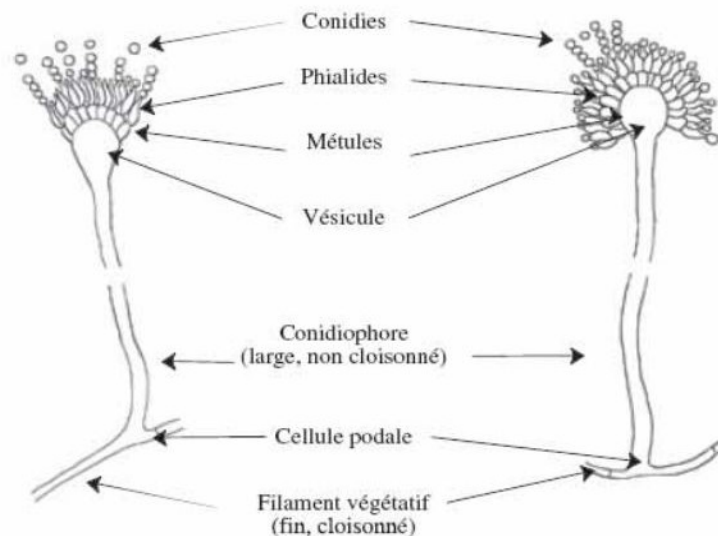


Figure 6 : Aspect microscopique des *Aspergillus* (tête bisériée)

II.1.a- *Aspergillus* section *nigri*

Les champignons classés dans la section *Aspergillus nigri* (les Aspergilli noirs) sont ubiquitaires, saprobes et omniprésents dans les sols à travers le monde, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales. Ils sont capables de se développer à une température comprise entre 6 et 47°C avec une température optimale de 35-37°C. Ils peuvent croître à des valeurs d'activité d'eau (a_w) allant de 0,88 et résistent à des valeurs de pH allant de 1,4 à 9,8. Ils sont donc plus présents dans les pays tempérés chauds du bassin méditerranéen et certaines régions de l'Amérique latine et de l'Afrique du Sud. Dans le monde des champignons, les Aspergilli noirs sont les moisissures les plus impliquées dans la détérioration et la biodégradation des aliments.

La section *Nigri* comprend 6 espèces : *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. niger* et *A. tubingensis*. Les deux dernières espèces sont morphologiquement difficiles à distinguer et sont toutes les deux appelées communément *A. niger* ou *A. niger aggregate*. Ces deux espèces ont été récemment distinguées par leur capacité à produire l'OTA. Cependant, la production de l'OTA par *A. niger* est peu commune et ne dépassant pas 1 à 2% des isolats malgré son incidence importante par rapport à *A. carbonarius*. Des rapports récents

ont confirmé la capacité d' *A. niger aggregates* à produire la Fumonisine B2 et B4 par des souches *A. niger* et *A. awamorii* isolées à partir des raisins .

II.1.b- *Aspergillus* section *flavi*

Les trois espèces *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* appartenant à la section *Aspergillus Flavi* sont capables de produire des aflatoxines (AFs), ils sont étroitement liées et difficiles à distinguer les unes des autres. L'espèce *Aspergillus flavus* produit principalement l'AFB1 et l'AFB2, tandis que *A. parasiticus* produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2). Quelques rares exceptions de sécrétion de l'AFG1 et AFG2 par *A. flavus* ont été décrites

. Enfin, *A. nomius*, une espèce rare proche d'*A. flavus*, est capable de produire les aflatoxines. Les espèces de la section *Flavi* sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 33°C. Pour l'espèce *A. flavus*, la croissance optimale se produit à une température comprise entre 19 et 35°C, alors que la température optimale à la production d'aflatoxine est de 28°C. Ces champignons peuvent se développer à un bas a_w de l'ordre de 0,78 et à un pH allant de 2,1 à 11,2. Ils sont donc présents dans les régions chaudes comme les régions tropicales et sub-tropicales.

Microscopiquement, il est impossible de distinguer les différentes espèces de la section *Flavi* du fait de la grande similarité entre elles et l'instabilité des caractères morphologiques qui caractérisent chacune d'elles. C'est pour cette raison que la distinction se base parfois sur la nature des aflatoxines produites. Certaines souches d'*A. flavus* sont également connues par leur capacité à produire l'acide cyclopiazonique (CPA).

Les espèces appartenant à la section *Flavi* contaminent divers aliments. Les aflatoxines sont généralement détectées dans les aliments des régions chaudes et humides. Elles ont été détectées dans les céréales, les noix, les graines oléagineuses, les fruits secs, les figues et le lait .

II.2- Le genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* est saprobe mais il peut devenir parasite en présence d'humidité au cours du stockage. Les *Penicillium* sont ubiquistes et polyphages pouvant dégrader plusieurs substrats. Ils sont largement présents dans le sol et contaminent plusieurs substrats notamment les céréales, les arachides et les produits laitiers. En termes d'incidence, les *Penicillium* sont beaucoup moins abondants que les *Fusarium* et les *Aspergillus*. Ces espèces produisent un certain nombre de mycotoxines telles que la patuline, la citrinine, l'acide pénicillique et la roquefortine C. Le genre *Penicillium* comprend 227 espèces dont la structure est composée de thalle, des pénicilles et des spores. Les espèces télomorphes appartiennent aux Ascomycètes. Les

Penicillium se développent dans les milieux humides. Ils ont besoin d'une activité hydrique plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*. Ils croissent à des températures modérées de l'ordre de 20 à 27°C. Ce sont des contaminants fréquents des régions tempérées

Après quelques jours d'incubation, la sporulation confère aux colonies leur teinte ce qui permet d'orienter l'identification. On distingue, à titre d'exemples, des colonies de couleur vert-gris (*P. citrinum*, *P. cyclopium*), vert-jaune (*P. chrysogenum*), vert sombre (*P. roqueforti*), blanche (*P. camemberti*).

En microscopie, les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle est formé d'un mycélium septé et hyalin. Il porte des conidophores simples ou ramifiés.

Les phialides sont disposés en verticilles à l'extrémité des conidophores. Les phialides (cellules conidogènes) peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une ou plusieurs rangées de métules (*Penicillium* biverticillé, triverticillé...) (**figure 7**). Les phialides donnent naissance à des conidies qui sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres. Les caractères des pénicilles servent à la distinction des groupes et des espèces.

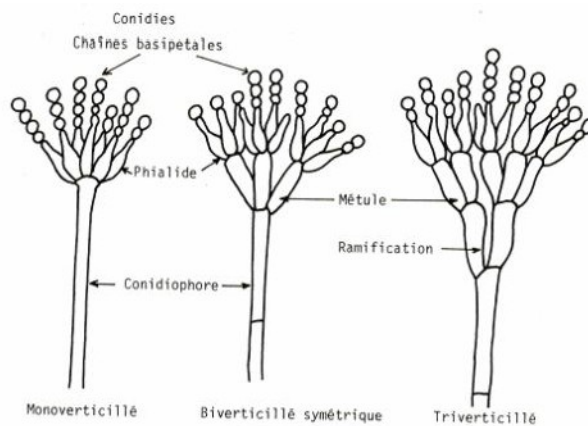


Figure 7 : Aspect microscopique des *Penicillium*

II.2.a- *Penicillium verrucosum*

C'est un deutéromycète, de la classe des hyphomycètes capable de produire l'ochratoxine A. *Penicillium verrucosum* est une espèce ubiquiste qui se développe sur de nombreux substrats notamment les céréales des zones géographiques à température modérée. Cette espèce est donc le principale producteur d'OTA dans le climat tempéré. Elle pousse entre 0 et 30°C à une température optimale de 20°C. Le pH optimal pour sa croissance se situe entre 6 et 7 et elle est capable de proliférer à une activité hydrique de 0,80 a_w. Outre les céréales, *P. verrucosum* peut aussi proliférer dans un environnement complètement différent tel que les aliments riches en NaCl comme les fromages ou des olives.

Cela montre l'aptitude de *P. verrucosum* de s'adapter à différents environnements. Cette espèce est aussi connue pour sa capacité à produire la citrinine au détriment de l'OTA

4.2.b- *Penicillium citrinum*

Penicillium citrinum est le principal producteur de CIT. Cette espèce est fréquemment détectée dans les céréales tels que le riz, le blé, l'orge, le maïs, les grains broyés et la farine. *P. citrinum* est une espèce xérophile.

L'activité hydrique minimale permettant la germination est 0,82 a_w dans un milieu à base de glycérol. La température optimale pour la croissance et la production de citrinine par *P. citrinum* est 30°C.

II.3- Le genre *Fusarium*

Ce genre inclut des champignons anamorphes. Quelques espèces, connues par la forme parfaite ou téléomorphe, appartiennent à la classe des Ascomycètes (les genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Le genre *Fusarium* comprend 40 espèces largement répandues. Il renferme des espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des fusarioses chez de nombreuses plantes. Il regroupe aussi des espèces saprobes capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents.

La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont responsables d'intoxication chez les êtres humains et les animaux d'élevage. La température optimale à la croissance des *Fusarium* est comprise entre 22 et 37°C. Ils forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable selon les espèces.

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence des macroconidies fusiformes et cloisonnées. Les phialides présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides). Les phialides produisent deux types de conidies (figure 8).

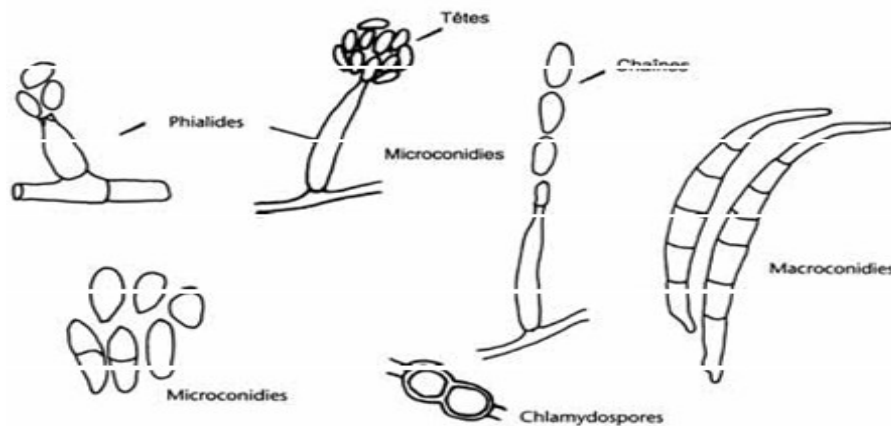


Figure 8 : Aspect microscopiques des conidies des *Fusarium*

II.3.a- *Fusarium graminearum* (forme parfaite : *Gibberella zeae*)

Fusarium graminearum Schwabe (forme téléomorphe: *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) est un agent pathogène souvent présent dans les céréales ce qui provoque d'importantes pertes économiques résultant de la baisse de rendement, de la maladie de fonte de semis et de la contamination des semences avec des toxines tels que le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV) et la zéaralénone (ZEN). Ce champignon forme des colonies floconneuses, de couleur rose grisâtre ou rouge à pourpre. Les microconidies sont absentes et les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées.

Le temps chaud et pluvieux au cours de la floraison favorise la contamination des épis de céréales par les *Fusarium* notamment *Fusarium graminearum* entraînant la fusariose (FHB) en Europe. La gamme de température favorable à la croissance de cette espèce est comprise entre 15 et 30°C, avec une température optimale de 25°C

II.3.b- *Fusarium* section *liseola*

La section *Fusarium liseola* comporte plusieurs espèces : *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* et *F. pseudonygamai* qui sont fréquemment rencontrées dans les céréales. L'espèce *F. verticillioides* infecte les plantes à toutes les étapes de développement. Elle infecte les racines, les tiges et les graines et provoque des pertes économiques énormes.

En effet, *F. verticillioides* est le principal producteur de fumonisines. Cependant, l'invasion des céréales par *F. verticillioides* n'est pas limitée aux champs, car ce champignon peut produire les fumonisines dans les grains de stockage. Sa forme téléomorphe est appelée *Gibberella moniliformis*, qui appartient au complexe *Gibberella fujikuroi*.

II.3.c- Complexe *Fusarium incarnatum-equiseti*

Le complexe *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) représente un groupe de 30 espèces morphologiquement similaires mais phylogénétiquement distinctes, réparties uniformément en 2 sous-groupes désignés *incarnatum* et *equiseti*. *Fusarium incarnatum* est extrêmement répandu dans les régions tropicales et subtropicales, mais aussi trouvé dans le bassin méditerranéen et, occasionnellement, dans les régions tempérées. La variabilité morphologique entre les espèces appartenant au sous-groupe *Incarnatum* pose quelques problèmes taxonomiques de la nomenclature. *Fusarium incarnatum* est synonyme de *F. semitectum* et *F. pallidoroseum*. Bien que le nom *F. semitectum* a été utilisé dans la littérature plus que toute autre espèce au sein du sous-groupe *incarnatum*, les études ont révélé que ce nom a été mal appliqué, car il est devenu plus tard un synonyme de *Colletotrichum musae*. Traditionnellement, *F. semitectum* est connu par sa capacité à produire la moniliformine, les trichothécènes et la zéaralénone. *Fusarium equiseti* est un champignon cosmopolite rencontré dans toutes les régions caractérisées par un climat frais jusqu'aux zones chaudes et arides.

III- Les mycotoxines

III-1. Historique des mycotoxines

La plus ancienne mycotoxicose historiquement reconnue est L'ergotisme également dénommé «feu sacré» dont l'agent causal est *Claviceps purpurea* qui a sévi du Moyen-Age au XVIII^e siècle en Europe occidentale et en Europe centrale

En 1960 au Royaume-Uni, plus de 100 000 dindons sont morts en quelques mois, du fait d'une maladie dénommée la «maladie de la dinde» liée à une contamination de farine d'arachides importée du Brésil .Des chercheurs ont réussi à reproduire la maladie en administrant la même alimentation à des oiseaux. Il a été confirmé que la maladie était d'origine fongique et que le champignon producteur de la toxine était *l'Aspergillus flavus*, d'où le nom attribué à la toxine, à savoir aflatoxine.

Depuis la découverte des aflatoxines, la liste des moisissures considérées comme étant aptes à produire des toxines ne cesse de s'allonger. À savoir l'identification des fumonisines en 1988, quoique la mycotoxicose qu'elles provoquent chez les équidés soit connue depuis le début du siècle.

III-2. Définition et origines des mycotoxines:

En se développant dans ou sur les denrées alimentaires, les champignons toxigènes produisent plusieurs métabolites secondaires hautement toxiques appelées couramment mycotoxines. Ces métabolites persistent tout au long de la chaîne alimentaire du fait de leur résistance aux traitements physiques et chimiques.

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. 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. 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.

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. 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. D'une façon générale, les mycotoxines pénètrent dans le corps par la consommation d'aliments contaminés. 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. 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

L'exposition aux mycotoxines se traduit par des pathologies et des perturbations métaboliques appelées mycotoxicoses. 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. Ces effets sont divers et extrêmement variables d'une mycotoxine à une autre ; on distingue les mycotoxines à effet mutagène, cancérigène, tératogène, immunodépressive, néphrotoxique, hépatotoxique et œstrogène.

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 et se traduisant 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 etc....

Tableau 1:Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines.

| | |
|--|--|
| Mycotoxines | Moisissure |
| Aflatoxine B1,B2,G1,et G2 | <i>Aspergillus parasiticus,A .flavus</i> |
| Ochratoxines A, B,C | <i>A.ochraceus, A.carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum, P.nordicum</i> |
| Zéralénone | <i>Fusarium roseum, Fusarium sp</i> |
| Déoxynivalénol(DON),Nivalenol, Fusarenone Toxine T2 ,Diacetoxyscirpenol | <i>F.tricinatum, Fusarium sp</i> |
| Fumonisines | <i>F .moniliforme,F.proliferatum,Fusariumsp</i> |
| Citrinine | <i>P.citrinum, Manascus ruber</i> |
| Patuline | <i>P.patulum,Byssochlamys nivea</i> |
| Acide pénicillique | <i>A.ochraceus,P.cyclopium,P.puberulum</i> |
| Moniliformine | <i>F.proliferatum,F.subglutinans</i> |
| Acide cyclopiazonique | <i>A.flavus</i> |

III-2. 1- Aflatoxines

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difurano-coumarine. Ces substances sont produites par des espèces d’*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*.

Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent : la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l’immunosuppression Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 (**figure 9**). 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).

L’AFM1 est un dérivé monohydroxylé de l’AFB1 produit par les cytochromes P-450 au cours du métabolisme hépatique et secrété dans le lait. L’AFM1 est cancérigène pour l’être humain et elle est classée par l’IARC dans le groupe 1.

Les Aflatoxines sont des coumarines bisfuraniques. contiennent 18 composés structurellement proche, seules (AFB1, AFB2, AFG1, AF1G2) sont des contaminants les plus virile et les plus redoutés en alimentation humaine et animale.

La structure coumarines bisfuraniques se lie à :

- ✚ pentones (Aflatoxines B).
- ✚ des lactoses hexatomiques (Aflatoxine G).

Alors, toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur les noyaux (**Leyral et Vierling, 2007**).

III 2. 1.1. Propriétés physicochimiques:

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle ; leurs nom vient d'une de leurs propriétés intéressante : l'émission d'une fluorescence par excitation en UV à 365 nm, la lumière émise est bleue pour les AFB et verte (green en anglais) pour les aflatoxines AFG., et permettent leur détection et leur dosage par la chromatographie sur couche mince (CCM).

Ils sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330g/mol), hydrosolubles dans les solvant organiques peu polaire (chloroforme (CHCL3), alcool méthylique (CH3OH), Acétone)

Très stables à la chaleur Stables à la chaleur (250 °C), au froid, à la lyophilisation
L'aflatoxine B1 est la plus abondant et la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité :
AF B1 > AF M1 > AFG1 > AF B2 > AF G2 (Voir tableau N°2, Figure 9)

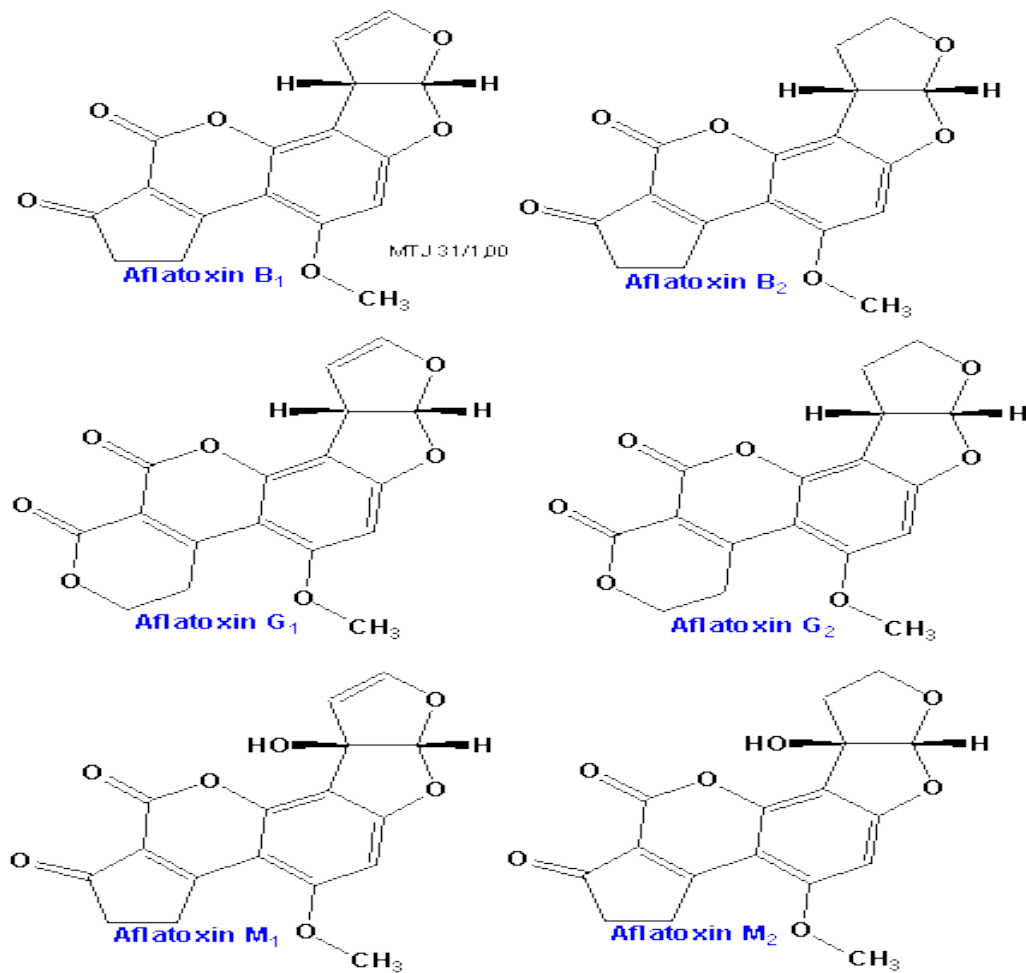


Figure 9 : Structure des principales aflatoxines : B1, B2, G1, G2 et M1

Tableau N°2 . Propriétés physiques des aflatoxines

| Aflatoxine | Formule moléculaire | Masse moléculaire | Point de fusion |
|------------|--|-------------------|-----------------|
| B1 | C ₁₇ H ₁₂ O ₆ | 312 | 268-269 |
| B2 | C ₁₇ H ₁₄ O ₆ | 314 | 286-289 |
| G1 | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 244-246 |
| G2 | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 237-240 |
| M1 | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 299 |
| M2 | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 293 |
| B2A | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 240 |
| G2A | C ₁₇ H ₁₄ O ₈ | 346 | 190 |

III 2. 1.2. Métabolisme des aflatoxines:

Les Aflatoxines pénétrant dans l'organisme par voie orale et trachéale. Leur absorption rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle dans la partie duodénale. L'AFB1 rejoint le foie par la veine porte. La distribution à partir du plasma dans les hépatocytes est réalisée par la diffusion passive à travers les membranes.

L'AFB1 est le plus étudié vu sa toxicité, car elle provoque une hépatotoxicité, elle est tératogène, et immunotoxique d'une part et d'autre part il peut se transformer en autre aflatoxine B2, P1, Q1, M1. Pour être toxique ou mutagène, l'AFB1 doit être métabolisée.

Le métabolisme d'aflatoxine B1 (AFB1) se fait au niveau du foie à travers le système enzymatique Cytochromes P450, elle peut prendre plusieurs voies soit, elle se transformera en autre aflatoxine comme décrit précédemment, ou fabrique un substrat appelé (AFBO)

L'AFBO peut prendre plusieurs voies (voir figure 10). L'AFBO peut s'adhérer avec les grandes molécules se trouvant dans la cellule ex: protéines (enzymes, hormone) ou bien se coller à l'ADN formant ADN adduit surtout en position N7-Guanine ce qui conduit à des changements génétiques et le cancer, un de ses changements conduit au cancer et provoque le gène au code 249 chez l'homme.

Des études ont montré la transformation de G (Guanine) et T (Thymine) au niveau de la troisième nucléotide du code, et qui le rend un spot chaud (hotspot). Cette transformation est observée chez beaucoup de malades souffrant du cancer de foie et qui sont exposés à des niveaux élevés d'aflatoxine.

L'AFBO peut s'adhérer aussi avec l'ARN est influencé la fabrication des enzymes et protéines. L'enzyme Glutathion-S-transférase (GST) favorise la fixation du AFBO et leur excrétion à travers les reins, c'est pour ça ils injectent les animaux exposés à des niveaux élevés d'aflatoxine par l'enzyme (GST).

Les chercheurs ont observé que les souris résistent au cancer due à la toxicité par les aflatoxines, car, elles sont dotées d'enzymes GST 3 à 5 fois plus grande que chez les autres animaux, comme elles possèdent des composés Dithiolation ex: oltipraz et les Anti-oxydants (ex BHA, BHT) formant des substances contre le cancer provoqué par les aflatoxines.

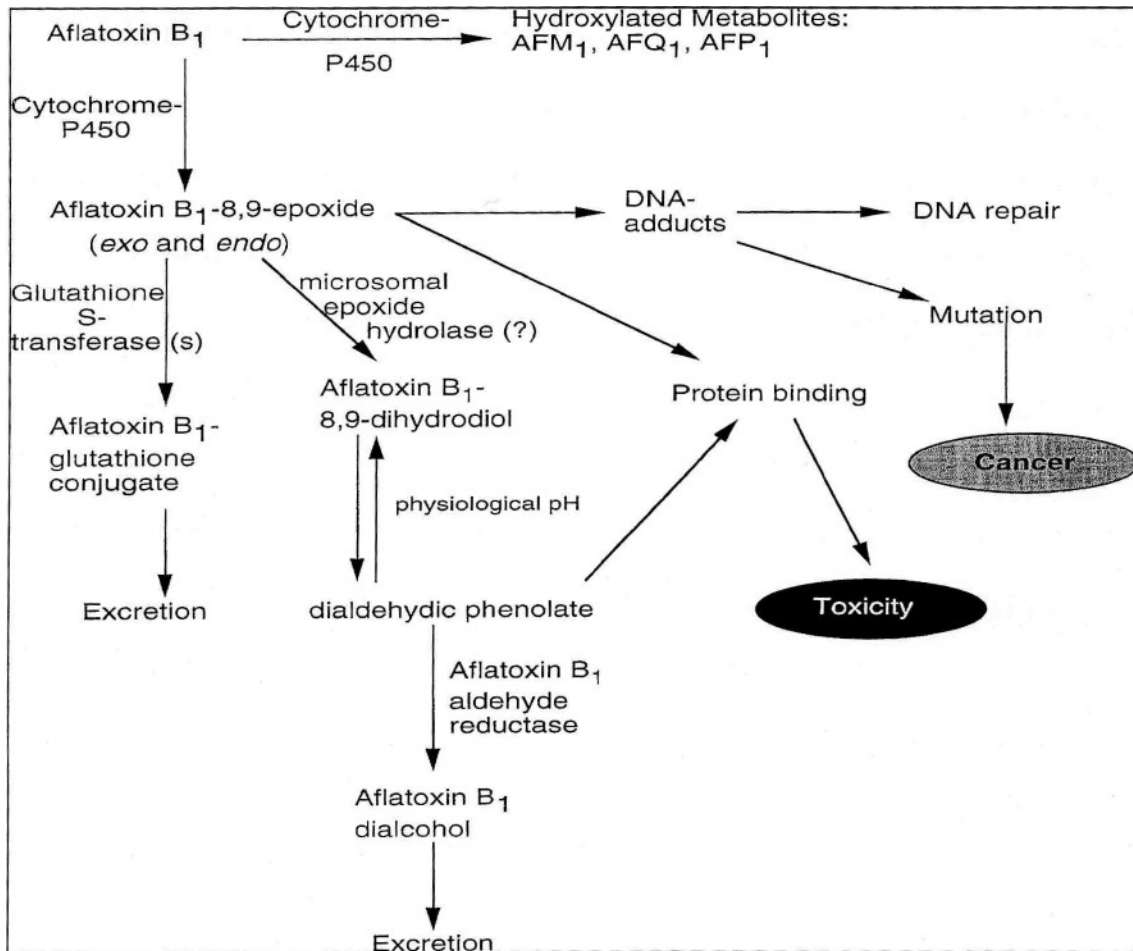


Figure 10: Les voies de biotransformation de l'aflatoxine B1(Shirley et al .,2005)

III 1. 2- Ochratoxine A

L'ochratoxine A est un dérivé de phénylalanine produit par des espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* . (figure 11). L'OTA est connue par ses propriétés néphrotoxiques, cancérigènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées. En effet, l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un composé cancérigène pour l'Homme. Après consommation d'aliments contaminés, l'OTA est fréquemment détectée dans le sang humain. 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. Par conséquent, l'OTA est la mycotoxine la plus détectée dans le sang humain dans le monde.

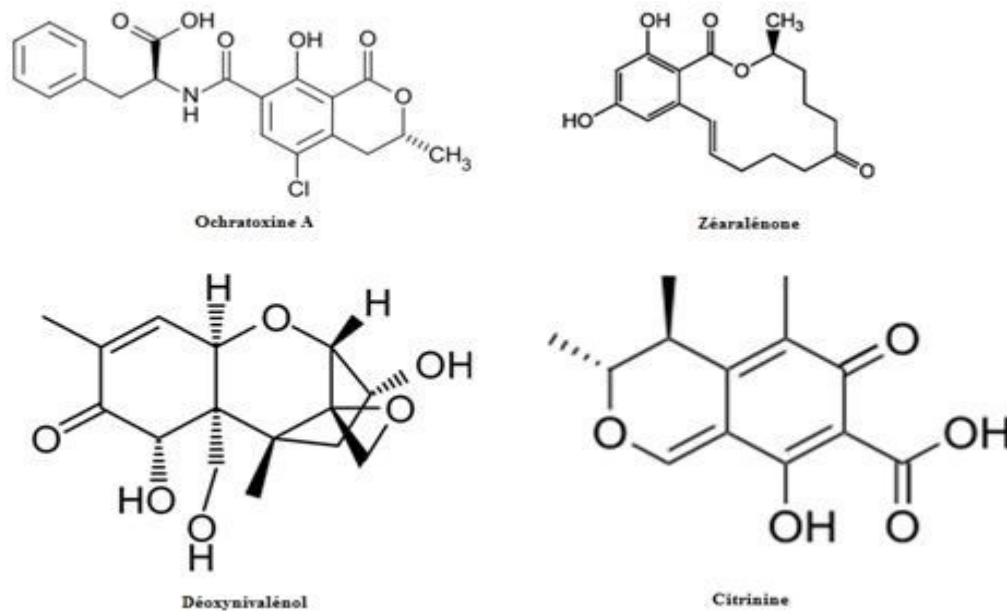


Figure 11 : Structures de l'ochratoxine A, la zéaralénone, le déoxynivalénol et la citrinine

Cette toxine a été impliquée dans une pathologie humaine mortelle de la région des « Balkans » au sud-est de l'Europe caractérisée par des tumeurs des voies urinaires. Dans les pays du Nord d'Afrique, plusieurs auteurs ont mentionné une incidence élevée des néphropathies interstitielles chroniques liées à la consommation des aliments contaminés par l'OTA.

III 1.3- Zéaralénone

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine de structure œstrogénique non-stéroïde produite par des espèces du genre *Fusarium* tel que *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (**figure 11**). La zéaralénone se lie compétitivement aux récepteurs d'œstrogène et elle est par conséquent connue par ses effets œstrogéniques incluant : l'infertilité, diminution du taux de la testostérone sérique et du nombre des spermatozoïdes, réduction du taux de grossesse et des changements des taux de progestérone

. ZEN est également considérée cancérigène et classée par l'IARC dans le groupe 3. Elle est aussi responsable de complications hépatotoxiques et hématotoxiques .

III 1.4- Trichothécènes

Les trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par des espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis* et *Trichoderma*. Toutes les trichothécènes ont en commun un 12, 13-époxytrichothécène et un acide olifénique avec une variété de substituants. Les trichothécènes sont classées en 4 groupes A, B, C et D selon leur structure chimique. Elles provoquent principalement une nécrose et une hémorragie pendant les

processus de régénération du sang dans la moelle osseuse et la rate et des changements des organes reproducteurs. Les signes de pathologie sont : la perte de poids, la perte d'appétit, les vomissements, la diarrhée, l'avortement et la mort. L'immunosuppression peut être très importante chez les animaux intoxiqués par les trichothécènes.

Le Déoxynivalenol est la mycotoxine la plus abondante des trichothécènes du groupe B, qui sont des époxy-sesquiterpénoïdes (**figure 11**). Cette toxine appelée aussi vomitoxine, est principalement produite par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*. Son accumulation dans l'organisme humain ou animal peut engendrer des effets secondaires sur la santé après une administration aiguë ou chronique, y compris des effets tératogènes, neurotoxiques, embryotoxiques et immunosuppressives.

III 1.5- Citrinine

La citrinine (CIT) est produite principalement par *Penicillium citrinum* mais aussi par *Penicillium expansum* et *Penicillium verrucosum* et quelques espèces du genre *Aspergillus* et *Monascus*. (**figure 12**). La CIT est toxique pour l'Homme et l'animal. Plusieurs études ont montré que la CIT est cytotoxique, génotoxique, mutagène, immunotoxique et tératogène. La toxicité de cette mycotoxine est due à sa propriété néphrotoxique.

La Citrinine (CIT) a été décrite en 1931 comme pouvant être utilisée comme un antibiotique, mais finalement rejetée à cause de sa toxicité. La CIT est un métabolite secondaire toxique, tout d'abord isolé de *P. citrinum*. Elle est aussi produite par d'autres espèces de *Penicillium*, d'*Aspergillus* et de *Monascus*.

La contamination par la CIT est observée dans divers aliments à base de céréales (maïs, blé, orge, riz, fruits, produits de céréales...)

La Citrinine [C₁₃H₁₄O₅ : acide 4,6-dihydro- 8-hydroxy- 3,4,5- tri méthyle- 6-oxo -3H-2-benzopyran- 7 carboxylique] est un composé acide jaune- citron dont l'absorption son spectre varie entre à 250 nm et 333 nm (dans le méthanol). Son point de fusion est à 172°C. Elle est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans des solutions d'hydroxyde de sodium, carbonate de sodium, ou acétate de sodium ; dans le méthanol, l'acétonitrile, l'éthanol et la plupart des solvants organiques polaires.

Elle peut former les complexes 'chélate', être dégradée en solution acide ou alcaline ou par la chaleur. C'est une méthide de quinone avec deux ponts hydrogènes intra-moléculaire. La CIT cristallisée sous deux formes tautomeriques *p*-quinone et *o*-quinone (Figure 12). Dans le méthanol ou un mélange de méthanol / chlorure de méthylène, la CIT subit un réaction d'addition nucléophile.

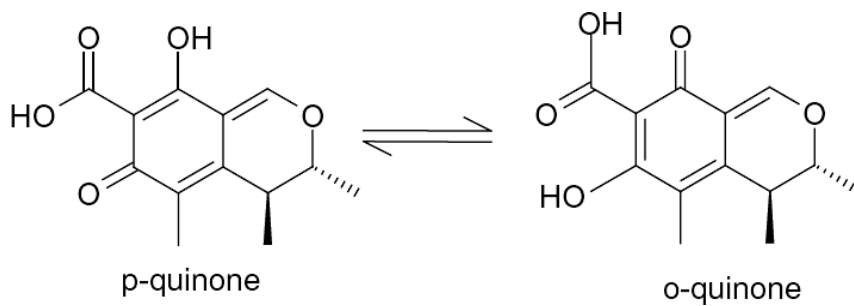


Figure 12 : Les structures isomériques de la CIT.

III 1.6- Fumonisines

Les fumonisines sont synthétisées principalement par plusieurs espèces du genre *Fusarium* y compris *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatu*. Plusieurs fumonisines sont isolées et caractérisées mais FB1, FB2 et FB3 sont les plus fréquemment détectées dans les produits alimentaires (figure 13). La FB1 est un diester d'acide propane-1,2,3- tricarboxylique

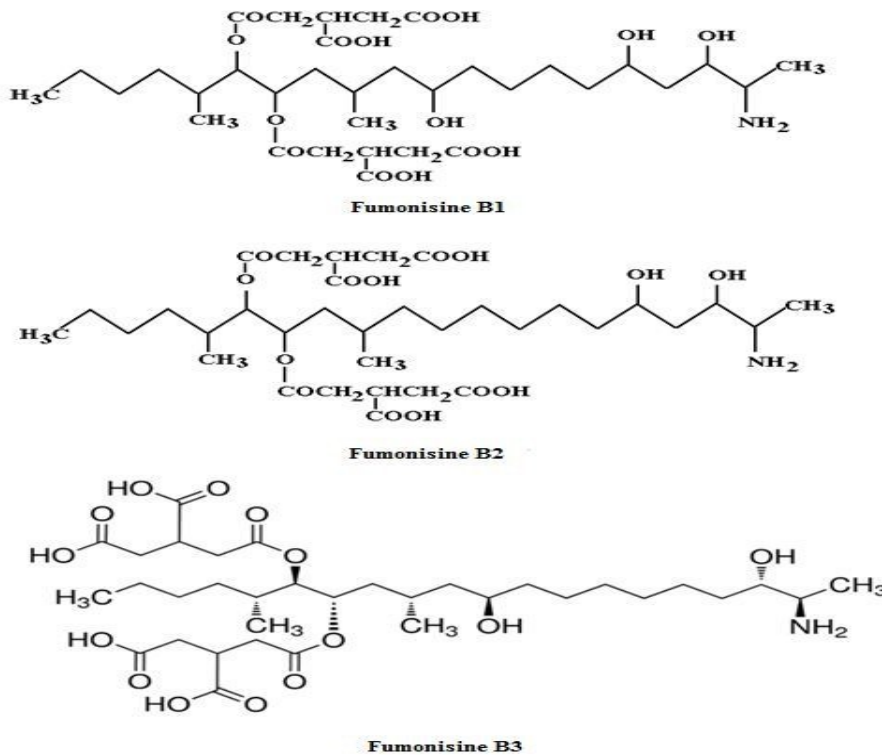


Figure 13 : Structure des fumonisines B1, B2 et B3

Les fumonisines sont des cancérigènes probables et elles sont classées parmi le groupe 2B selon l'IARC et l'OMS. L'incidence du cancer d'œsophage dans certains pays est liée à la contamination du maïs par les fumonisines. Ces substances ont été prouvées responsables de la promotion du cancer du foie chez plusieurs espèces animales.

III-2- Biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires, qui ne jouent pas de rôle évident dans le métabolisme du microorganisme. Ce sont probablement un moyen de défense pour les champignons contre les parasites ou contre les autres micro-organismes en concurrence dans le même environnement. Ces composés non essentiels au métabolisme basique des moisissures sont produits après la phase active de croissance ou certains cycles ralentissent et provoquent une accumulation de certaines molécules en amont. Pour éviter toute accumulation néfaste, ces molécules seront utilisées pour la production des métabolites secondaires. Des enzymes de spécificité différente catalysent les réactions de biosynthèse.

Contrairement au métabolisme primaire, qui est fondamentalement le même pour tous les êtres vivants, le métabolisme secondaire dépend de l'espèce considérée, et très souvent de la souche. La nature des métabolites secondaires, très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales.

Les mycotoxines peuvent être élaborées par différentes voies métaboliques, la principale étant celle des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxines, patulines, zéaralénone), ceratines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, roquefortine, etc.), et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacitoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol.) (Voir Tableau 3) (figure 14).

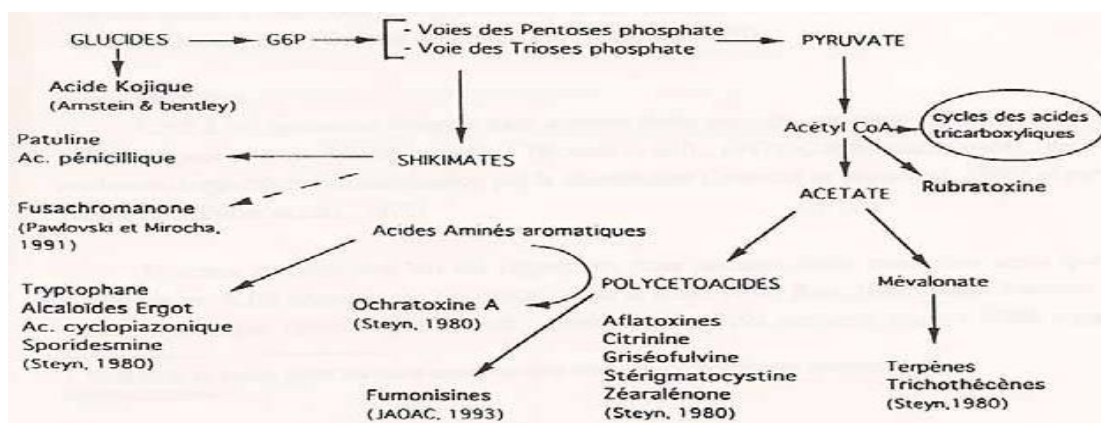


Figure 14 : Voies de biosynthèse des mycotoxines.

III.3. Propriétés physico-chimique:

Les mycotoxines sont peu solubles dans l'eau, volatils, difficilement dégradables par les organismes vivants et sont très stables à l'acidité et à la chaleur. Elles peuvent résister à de hautes températures (jusqu'à 180°C) et à plusieurs processus de fabrication, tels le broyage et la cuisson. Un certain nombre de ces molécules sont fluorescentes sous lumière U.V. (aflatoxines B1, B2 et G1, G2, ochratoxine A, zéaralénone,...). Cette caractéristique est importante dans l'élaboration des méthodes de détection et de dosage. Elles sont des substances actives biologiquement et ont des effets sur l'homme, l'animale, les plantes et les microorganismes.

La plupart des mycotoxines peuvent présenter une diversité structurale importante et leur structure chimique est souvent complexe ce qui explique leurs effets biologiques différents : cancérigène, mutagène, tératogène, oestrogénique, neurotoxique, ou immunosuppresseur.

IV. Les mycotoxines dans les céréales et dans la chaîne alimentaire:

Les céréales sont les principaux vecteurs de mycotoxines car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Ce sont dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides que la croissance des champignons toxigènes est la plus favorisée. Généralement environ 55 millions de tonnes de céréales sont perdues chaque année dans le monde. Les céréales sont souvent contaminées par des mycotoxines produites par des moisissures du genre *Apergillus* ou *Penicillium* (Tableau N°4).

L'entrée des mycotoxines peut être directement à travers la contamination des aliments d'origines animale et d'origine végétale. Parmi ces produits: les céréales, les fruits et légumes secs, le café et le cacao, le lait, les œufs, les viandes, les abats peuvent être contaminés à travers de l'alimentation animale, soit indirectement par des produits dérivés (par ex: farine de céréales) à partir desquels sont élaborés des aliments finis (par ex: produits issus de la panification, de la biscuiterie, céréales pour petit-déjeuner). Il existe cinq mycotoxines, ou groupes de mycotoxines qui apparaissent assez souvent dans la nourriture: déoxynivalénol/nivalénol; zéaralénone; ochratoxines; fumonisines; et aflatoxines. La Food and Agriculture Organisation (FAO) de l'ONU a rapporté en 1985 que 25 % des récoltes des céréales dans le monde sont affectées par des mycotoxines.

Tableau N4: Moisissures rencontrées dans les céréales.

| Mycotoxines | Moisissures | Substrats |
|--------------------|--|-------------------------|
| Aflatoxines | <i>Aspergillus parasiticus, Aspergillus flavus</i> | Arachide, maïs, sorgho |
| Ochratoxines | <i>Aspergillus ochraceus</i> | Maïs, orge |
| Zéaralénone | <i>Fusarium</i> | Maïs, blé, sorgho |
| Trichothécènes | <i>Fusarium</i> | Maïs, orge, blé, avoine |
| Fumonisines | <i>Fusarium moniliforme, F proliferatum et F sp.</i> | Maïs, orge, blé, avoine |

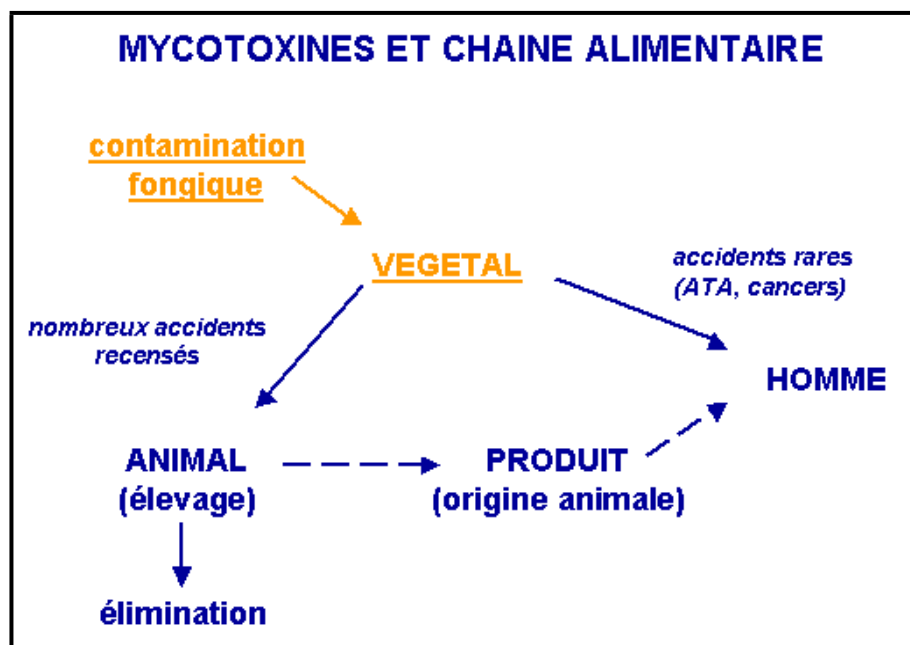


Figure 15 : Mycotoxines et chaînes alimentaires.

VI.1.Effet des mycotoxines sur la santé:

Les mycotoxines identifiées depuis plus de 40 ans comme des contaminants fréquemment rencontrés dans les produits alimentaires

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatils, élaborés par diverses moisissures. Elles sont responsables de mycotoxicoses pouvant être graves. Les voies de contamination humaine ou animale possibles sont l’ingestion, l’inhalation, le contact cutané et l’allaitement. Les intoxications aiguës sont cependant rares en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. L’intoxication chronique est souvent à craindre en raison d’un effet cumulatif des doses. Il y aurait, selon les auteurs, jusqu’à 400 mycotoxines répertoriées. Parmi les mycotoxines identifiées, les mieux connues sont les familles

des aflatoxines et des trichotécènes. Leur toxicité aiguë par absorption digestive a été documentée à la suite d'épidémies humaines et animales, et par expérimentation animale (Tableau N°5)

Des effets hépatotoxiques, neurotoxiques, mutagènes, tératogènes et cancérigènes des différentes mycotoxines ont été prouvés chez l'animal par voie digestive.

Tableau 5:Principales manifestations cliniques des mycotoxicoses.

| <i>Localisation</i> | <i>Symptômes</i> | <i>Mycotoxines</i> |
|---------------------|--|------------------------------|
| Vasculaire | Hémorragie | Aflatoxines, satratoxine |
| Digestive | Diarrhée, hémorragie intestinale, nécrose du foie | Aflatoxines |
| Respiratoire | Œdème pulmonaire, fièvre, asthénie, dyspnée (ODTS), hémorragie | Fumonisine, satratoxine |
| Nerveuse | Frisson, manque de coordination, coma | Tremorgene, ergot alcaloïdes |
| Cutanée | Irritation, nécrose | T2-toxine, satratoxine |
| Urinaire | Atteinte rénale | Ochratoxine A, citrinine |
| Génitale | Stérilité | Zéalenone, T2-toxine |

V. La Mycotoxinogènes:

La mycotoxinogénèse, c'est-à-dire les conditions de synthèse et d'excrétion des mycotoxines, est un phénomène d'une grande complexité. mais les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique. Les conditions

optimales de la toxinogénèse dépendent d'une combinaison de facteurs conduisant à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée alimentaire.

La biosynthèse des mycotoxines est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence d'autres micro-organismes en compétition. Nous pouvons distinguer les facteurs intrinsèques qui sont liée à la souche fongique elle-même et les facteurs extrinsèques qui sont constitués par l'ensemble des conditions écologiques.

V.1- Facteurs intrinsèques de la mycotoxinogénèse

Les mycotoxines sont essentiellement élaborées par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Alternaria*. La dissémination des mycotoxines dépend du potentiel infectieux des moisissures (intensité de sporulation, longévité des spores).

Un aliment moisiss n'est pas forcément contaminé par les mycotoxines car les champignons ne sont pas tous toxigènes. Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet, une même molécule peut-être produite par plusieurs espèces fongiques appartenant à des genres différents. Par exemple, l'ochratoxine A (OTA) est produite par *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus carbonarius*. Parmi les espèces réputées toxigènes, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité à produire les mycotoxines, De même, une espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines comme par exemple *Aspergillus flavus* qui peut produire entre autre les aflatoxines, l'acide cyclopiazonique et l'aspertoxine. Cependant, certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques : aflatoxines (*A. flavus* et *A. parasiticus*), sporidesmines (*Pithomyces chartarum*). La toxinogénèse d'un champignon ainsi que la quantité produite dépendent de la souche (polymorphisme génétique) et du stade de développement de la mycète.

V.2- Facteurs extrinsèques de la mycotoxinogénèse

Les facteurs extrinsèques ou environnementaux affectant la production de mycotoxines sont d'origine chimique, physique, physico-chimique ou biologique. Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante et leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un facteur simple.

Facteurs physiques, physico-chimiques et chimiques affectant la production des mycotoxines

V.2.1- Activité de l'eau

L'activité de l'eau nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique. Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une a_w de 0,80 ; par contre, la production d'OTA n'est possible que lorsque l' a_w est supérieure ou égale à 0,85. La formation des aflatoxines par *Aspergillus flavus* nécessite une valeur d' a_w comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance du microorganisme peut avoir lieu à des valeurs d' a_w plus basses.

V.2.2- Le pH

Comme pour l' a_w , la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. En effet, la production de fumonisine B1 est maximale à un pH compris entre 3,7 et 4,2.

V.2.3- Présence d'oxygène

Généralement, la production de mycotoxines est plus sensible à la variation de la composition de l'air que la croissance fongique. La réduction de la pression partielle en oxygène jusqu'à moins de 1% et l'accroissement des concentrations de CO₂ empêchent l'élaboration des mycotoxines. Par contre, *F. roseum*, dans une atmosphère confinée, peut encore élaborer de la zéaralénone. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse.

V.2.4- Température

La température optimale pour l'élaboration des mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais, le plus souvent, légèrement inférieure. C'est le cas des aflatoxines élaborées par *Aspergillus flavus*.

En étudiant l'effet d'une large gamme de température (2-52°C), des chercheurs ont constaté que la production d'aflatoxines est maximale à 24°C. Ces auteurs ont démontré que la sécrétion des aflatoxines n'est pas liée au taux de croissance d'*A. flavus* et n'est pas détectée à des températures inférieures à 18°C ou supérieures à 35°C. Une production optimale d'aflatoxines a été signalée à une gamme de température allant de 20 à 35°C pour des isolats d'*A. flavus* et *A. parasiticus* cultivés sur différents substrats tels que le coton, les arachides décortiquées et le riz. La température optimale pour la production d'OTA par *A. ochraceus* est comprise entre 25 et 30°C. Parfois, l'apparition des mycotoxines dans des conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses par rapport à celles favorisant une croissance optimale de l'espèce fongique. La température optimale pour la

croissance de *Fusarium graminearum* et *Fusarium roseum* est de 25°C, mais la synthèse de la zéaralénone peut avoir lieu à 15°C. La température optimale pour la production de fumonisine B1 dans le maïs est 30°C pour *F. moniliforme* et 15°C pour *F. proliferatum*.

Dans certains cas, l'apparition des mycotoxines dans les conditions naturelles est favorisée à des températures basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1 à 4°C pour les trichothécènes par *F. tricinctum*. La température peut aussi influencer la proportion de toxines produites par une souche susceptible de synthétiser plusieurs molécules. Par exemple, *Fusarium graminearum* peut produire préférentiellement de la zéaralénone à 25°C, alors que c'est le déoxynivalenol qui sera majoritairement produit à 28°C. Dans le cas des Aspergilli noirs, la production de l'OTA se produit dans un large intervalle de température ce qui explique la présence de cette mycotoxine chez les vignobles à tous les stades de développement de la plante.

En effet, la température optimale pour la production d'une mycotoxine donnée par une espèce fongique quelconque dépend des caractéristiques de la souche et des propriétés du substrat. Avec les changements climatiques que le monde a connus pendant ces dernières années, l'apparition des aflatoxines dans les régions où leur incidence était rare peut devenir plus fréquente.:

A titre d'exemple, de récentes apparitions d'aflatoxines dans les aliments ont été signalées dans certaines régions de l'Europe en raison de la période de sécheresse prolongée.

V.2.5- Corrélation entre a_w , teneur en eau et humidité relative : la courbe isotherme de sorption- désorption

Lorsqu'un produit est placé dans une atmosphère gazeuse contenant de la vapeur d'eau, des échanges se produisent entre les deux phases en présence :

- transferts de chaleur, qui tendent à équilibrer les températures entre les deux phases.
- transferts de masse (molécules d'eau) qui tendent à équilibrer les pressions de vapeur d'eau entre les deux phases.
- Lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint, les températures et les pressions sont égales dans les deux phases, les molécules d'eau étant quantitativement distribuées entre :
- d'une part, les phase solides, où l'on peut définir les teneurs en eau et les activités de l'eau,

et d'autre part, la phase vapeur où l'on peut mesurer la pression partielle de vapeur d'eau (p), ou encore l'humidité relative (HR) qui est le rapport de la pression p à la pression saturante p' de l'eau pure à la même température (T) :

$$HR = (p/p')_T \times 100$$

Dans les conditions d'équilibre, et en admettant que l'eau est un gaz parfait, on montre qu' a_w peut être numériquement identifiée au rapport de pression partielles de vapeur d'eau

$$a_w = p/p' = HR \% / 100$$

C'est grâce à cette équivalence que l'on peut mesurer l' a_w en mesurant l'HR de l'air en équilibre avec le produit (pour insister sur la notion d'équilibre, on parle parfois d'HRE-Humidité Relative d'Equilibre) ; autrement, et sauf cas très particulier, l' a_w est inaccessible directement à la mesure.

A température constante, il existe donc pour un produit pur en équilibre thermodynamique avec l'atmosphère, une relation univoque entre la teneur en eau du produit d'une part, et l' a_w de ce produit ou l'HR de l'atmosphère d'autre part. Dans toutes les discussions sur l'état de l'eau et son rôle en technologie, on admet généralement:

- qu'il y a équilibre thermodynamique entre les phases, et par conséquent, que l'équivalence ci-dessus est vraie que l'on peut, dès lors, utiliser indifféremment l'un ou l'autre terme ; toutefois, il est fondamental de comprendre que l'équivalence n'est vraie
- que s'il y a un équilibre thermodynamique entre le produit et l'atmosphère ; s'il n'y a pas d'équilibre (produit en cours de séchage par exemple), cette égalité n'a plus aucun sens.

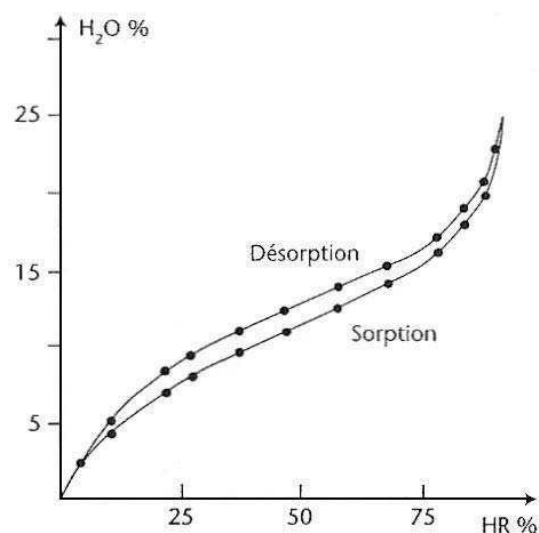


Figure 16 : Courbes isothermes de sorption d'une céréale à 20°C.

V-3- Composition du substrat

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (surtout les glucides, principale source de carbone chez les moisissures) peut influencer la production des mycotoxines. La présence de quelques substances dans les aliments, comme le saccharose et les acides aminés, stimule la croissance fongique ainsi que l'élaboration des mycotoxines. La contamination d'une denrée alimentaire par les moisissures dépend de la nature du substrat en particulier de la nature des glucides disponibles. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production des mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production.

V.4- Facteurs biologiques affectant la production des mycotoxines : interactions microbiennes

La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs. Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite est réduite quand une souche d'*Aspergillus flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*Aspergillus parasiticus*, et ce, même si la souche d'*Aspergillus parasiticus* est une souche non toxigène. De même, la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est inhibée par la présence d'*Aspergillus niger*

L'expérimentalement a démontré que la culture simultanée d'*Aspergillus parasiticus* et d'*Aspergillus flavus* ne modifie pas la production d'aflatoxines par ce dernier, alors que la présence d'espèces de *Penicillium* diminue la production de cette mycotoxine.

La présence de *Fusarium verticillioides* sur les épis protège le maïs d'une contamination ultérieure avec *Aspergillus flavus* et réduit la quantité d'aflatoxine produite. La connaissance de la physiologie des moisissures et des facteurs influant l'accumulation des mycotoxines dans les aliments implique le développement des stratégies de prévention, de décontamination et la conception des modèles de prédiction de la croissance fongique et la production des mycotoxines.

VI.Prévention et détoxification:

VI.1. Prévention:

Les mycotoxines posent un problème important universel de santé publique, pour l'agriculture, et les sciences économiques. Pour pouvoir lutter contre les moisissures et les mycotoxines, il faut savoir à quel moment elles se développent. Ainsi, il est possible de définir six moments privilégiés au cours de l'élaboration d'un produit: lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation, de l'alimentation des animaux et enfin lors de la consommation par l'être humain.

On appelle stratégie de prévention au sens strict tout ce qui contribue à empêcher la formation de mycotoxine sur les céréales sur pied (avant la récolte) ou stockées (après la récolte). Différentes stratégies de prévention sont actuellement appliquées ou à l'étude. Voici quelques une des techniques actuellement utilisées:

VI.1.1. Le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA):

Assurer à la récolte sur pied de bonnes conditions écologiques (irrigation suffisante, apport de minéraux...) et éviter les conditions écologiques favorables à l'infection fongique éviter les résidus de plants intoxiqués afin d'empêcher le risque de contamination à la récolte suivante ou aux autres plants.

Respecter la rotation des cultures pour réduire le -transfert de moisissures d'une année sur l'autre; il faut récolter des grains arrivés à maturité.

Le matériel de récolte doit être propre, on évitant l'incorporation de terre lors de la récolte qui apporte des contaminants avec elle.

VI.1.2. Le respect des bonnes pratiques de stockage(BPS):

Au cours du stockage les lieux de stockage doit être: frais, propre, secs, aérés et la température contrôlée. Eviter les points d'échauffement lors du transport et du stockage industriel des grains et effectuer une pré-tri (balistique par exemple) avant le séchage et l'entreposage, pour retirer les contaminants superficiels apportés par les débris de végétaux et la terre.

Ainsi il convient d'appliquer les bonnes pratiques d'hygiène(BPH) pour assurer la sécurité sanitaire des aliments et du consommateur.

Les moyens de lutte pour chaque période définie sont consignés dans le **tableau 6** suivant et ne sont pas exhaustifs. La contamination fongique, son développement et la production de

toxine peuvent se produire aux champs ou lors du stockage ou lors des deux périodes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrons exclusivement sur le problème du stockage

Tableau N°6 : Méthodes de lutte contre la contamination

| Période définie | Solutions proposées : |
|---------------------------------|---|
| Au champ | <ul style="list-style-type: none"> - créer des plantes résistantes - limiter le développement par l'emploi de fongicides - arrosage adapté - apport en minéraux |
| À la récolte | <ul style="list-style-type: none"> - veiller à la maturité du grain - inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés - éviter les récoltes par temps humide |
| Au stockage | <ul style="list-style-type: none"> - contrôle périodique - maintenir une bonne température - contrôler l'humidité - détruire les produits contaminés - une bonne aération des silos. |
| À la transformation | <ul style="list-style-type: none"> - contrôle mais, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures. |
| Dans l'alimentation des animaux | <ul style="list-style-type: none"> - tests de contamination, puis décontamination si nécessaire |
| À la consommation | <ul style="list-style-type: none"> - éliminer les aliments contaminés - jouer sur la cuisson |

VI.2. Etablissement d'un plan HACCP

Aujourd'hui les chercheurs tentent à appliquer une nouvelle approche stratégique et globale de lutte contre les mycotoxines: l'application de la méthode HACCP(Hazard Analysis Critical Control Point).

Le système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) est une approche préventive, structurée et systématique qui a pour but le contrôle de la sécurité sanitaire des aliments. Le système HACCP est un élément clé dans la gestion de la qualité qui nécessite une bonne compréhension de la relation cause-effet. Il repose sur l'établissement des systèmes de gestion de qualité tels que les bonnes pratiques de fabrication, les bonnes pratiques d'hygiène, les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de stockage. Les organismes de

réglementations ont reconnu l'utilité de ce concept et il a été incorporé dans les exigences législatives de l'EU (the General Hygiene regulations for managing food safety (Regulation (EC) n° 178/200)). Le concept du HACCP n'est pas une norme et il varie d'un produit alimentaire à un autre. La mise en œuvre d'un système HACCP doit inclure toutes les étapes de production de la ferme jusqu'à l'assiette et impliquer la gestion des risques à toutes ces étapes pour assurer la salubrité de la denrée (Regulation (EC) n° 178/200).

Le Codex Alimentarius (*CAC/RCP 1-1969 Rev 4-2003*) a défini sept principes pour établir un plan HACCP, qui sont :

- Principe 1 : Analyse des risques (identifier les dangers et évaluer les risques qui leurs sont associés à chaque étape de la filière)
- Principe 2 : Détermination des points critiques de contrôle (CCP) (déterminer les étapes où un contrôle doit être appliqué pour éliminer ou minimiser un danger)
- Principe 3 : Fixation des limites critiques pour tous les CCP au-delà desquelles des corrections doivent être appliquées
- Principe 4 : Mise en place d'un système de surveillance pour vérifier que les étapes ne dépassent pas les limites fixées
- Principe 5 : Etablissement d'une procédure de correction lorsque la surveillance des CCP montre une déviation par rapport aux limites critiques fixées
- Principe 6 : Etablissement des procédures de vérification (l'audit par exemple) pour confirmer l'efficacité du plan HACCP
- Principe 7 : Etablissement d'une documentation concernant toutes les procédures relatives à tous ces principes et leur application

Ainsi, l'établissement d'un plan HACCP pour prévenir la contamination des aliments par les mycotoxines nécessite la détermination de la nature des mycotoxines qui peuvent survenir dans l'aliment à produire, définir les conditions qui permettent la production de cette mycotoxine, définir les CCP ou les étapes de production au cours desquelles une surveillance des mycotoxines et des moisissures doit être effectuée (contamination pré ou post-récolte), définir les sources de contamination (air, machines...), fixer les limites critiques surtout pour l'humidité (la teneur en eau de la matière première et du produit à toutes les étapes de la fabrication) et la température, définir les actions correctrices si les limites fixées s'avèrent dépassées (séchage, ventilation, lutte contre les insectes, irradiation aux UV...).

VI.2.Décontamination et détoxification:

La décontamination et détoxification consistent à éliminer les toxines et les produits contaminés. Diverses techniques de décontamination sont utilisées on peut les classer en trois catégories: physique, chimique et biologique.

VI.2.1.Méthodes physiques:

Ces méthodes sont simples, mais demandent beaucoup de temps et de main-d'œuvre; elles consistent à faire par exemple un nettoyage et le tri permettent d'éliminer une part des mycotoxines sans altérer les propriétés nutritives, ni l'aspect des denrées.

VI.2.1.a- Suppression des grains endommagés

Les grains de maïs fissurés ou endommagés mécaniquement contiennent généralement des niveaux de fumonisines environ 10 fois plus que les grains intacts. Le nettoyage de la surface externe des grains et l'élimination des grains endommagés sont des moyens complémentaires pour réduire l'infestation des grains sains par les grains contaminés. La suppression des grains endommagés a permis de diminuer le taux de DON et de ZEN dans le maïs et le blé. Une diminution de 60% de FB1

VI.2.1.b- Lavage

Le lavage des grains avec l'eau de robinet sous pression peut réduire la teneur en mycotoxines. Ce traitement peut être appliqué pour les aliments destinés à la consommation humaine et animale. Par ailleurs, le coût de séchage des grains après lavage limite l'application de cette technique.

VI.2.1.c - Décorticage des grains

La suppression de la partie externe du noyau réduit de 34% les niveaux du DON et du ZEN. L'efficacité du procédé du décorticage dépend de la pénétration des moisissures dans les grains.

VI.2.1.d- Traitement thermique

La plupart des mycotoxines sont thermostables. Cependant, plusieurs études ont montré que la concentration de quelques mycotoxines peut diminuer sous l'effet de la chaleur.

Le contenu en FB1 suit une cinétique de décomposition du premier degré en fonction de l'augmentation de température. Le taux de détoxification de la FB1 et FB2 dépasse les 70% dans la farine de maïs après un chauffage à 190°C pendant 60 min, alors qu'il atteint 100% lors d'un chauffage de 220°C pendant 25 min.

Le processus de destruction des fumonisines au cours de la fabrication des corn flakes à partir du maïs contaminé par addition directe ou par culture du *Fusarium proliferatum* dans les grains a été étudié. Les études ont montré que 35% et 53% de la FB1 ont été perdus

respectivement à la fin du processus. En outre, le contenu en ZEN dans le maïs contaminé artificiellement est réduit de 66 à 83% après extrusion à des températures allant de 120 à 160°C, tandis que des réductions plus faibles ont été observées dans le cas du DON et de moniliformine. Cependant, la disparition des fumonisines et de ZEN après cuisson des aliments est un phénomène qui est encore non expliqué. La diminution observée de ces mycotoxines peut être due à une interaction avec la matrice alimentaire entraînant des difficultés de l'analyse des toxines. La liaison des mycotoxines aux protéines et aux sucres peut réduire leur biodisponibilité dans le tractus gastro-intestinal et expliquer l'inactivation partielle de leur toxicité potentielle.

VI.2.1.e. L'irradiation

L'irradiation Gamma a été testée pour réduire la contamination des grains ou des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale par les spores ou pour dégrader les mycotoxines déjà produites dans les aliments. L'irradiation Gamma à 5 kGray inhibe la croissance des *Fusarium* spp. et la formation des mycotoxines dans les grains. L'irradiation par faisceau d'électrons de l'orge contaminé par du *Fusarium* réduit l'infection fongique à des doses supérieures à 4 kGray.

Des chercheurs ont montré que l'irradiation UV n'a aucun effet sur la fusaproliférine, une mycotoxine produite par des espèces phytopathogènes de *Fusarium*. Ainsi, l'irradiation par UV peut être utilisée pour éliminer les spores des moisissures et non pas pour éliminer les mycotoxines des aliments contaminés.

VI.2.2.Méthodes chimiques:

Elles consistent à ajouter Une variété d'agents chimiques tels que les acides, les bases (ammoniaque, soude), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, ozone), des agents réducteurs (bisulfites), des agents chlorés (hypochlorite de sodium), du formaldéhyde sont utilisés pour dégrader ou biotransformer les mycotoxines et plus particulièrement les aflatoxines.

VI.2.3. Méthodes biologique:

Les méthodes physiques et chimiques développées pour prévenir l'envahissement par les champignons ou la réduction des mycotoxines sont parfois peu efficaces et limitées à

cause de plusieurs obstacles tels que le coût onéreux de ces méthodes et la dégradation ou l'inactivation partielle des mycotoxines. En outre, certaines moisissures ont acquis une résistance aux traitements chimiques et certains agents de conservation. Ainsi, certains *Penicillium* peuvent se développer en présence de potassium de sorbate, alors que d'autres champignons possèdent la capacité de dégrader le sorbate. Par conséquent, la biopréservation ou le contrôle d'un organisme par un autre a reçu beaucoup d'attention au cours des dernières années.

La décontamination biologique consiste à ajouter des microorganismes ayant le potentiel de dégradation des mycotoxines par exemple des souches de bactéries lactiques, propionibactéries et de bifidobactéries car, elles possèdent des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines. Flavobacterium aurantiacum peut fixer l'AFBI et la rendre inactive. Des microorganismes peuvent également métaboliser les mycotoxines (*Corynebacterium rubrum*)- ou les bioconvertir (*Rhizopus, Aspergillus Eurotium*)

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. 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 ect

Toutefois, 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

VI.2. Détection des mycotoxines:

Il existe variété de méthodes pour la détection des mycotoxines, en les classes sous trois catégories: méthodes physicochimiques, immunologiques, biologique.

VI.2.1. Lachromatographie sur couche mince (CCM):

Elle permet de séparer les toxines, à l'aide d'une phase liquide (généralement un mélange de solvants organiques pouvant également comprendre une fraction de solution aqueuse) migrant sur une phase solide apolaire ou polaire fixée sur une plaque de verre. Selon les interactions de la mycotoxine entre la phase solide et la phase liquide, la mycotoxine migre plus ou moins loin dans la phase solide et se trouve séparée des autres composants.

En fin de migration, la lecture de la plaque peut s'effectuer à l'aide d'une lampe UV pour les mycotoxines naturellement fluorescentes ou après dérivation avec un réactif chimique permettant d'obtenir des dérivés mycotoxines colorés ou fluorescents.

VI.2.2. La chromatographie à haute performance(HPLC):

Cette technique, plus sophistiquée que la CCM, permet de séparer efficacement les mycotoxines. Elle utilise une phase mobile (mélanges de solvants) migrant à travers une phase solide granuleuse polaire ou apolaire placée dans une colonne. La détection des mycotoxines est réalisée dans l'ultraviolet ou en fluorescence ou encore en spectrométrie de masse. La CLHP requiert l'acquisition d'instruments onéreux (pompes, détecteurs) et peut être automatisée (injecteur automatique), facilitant ainsi l'analyse successive de plusieurs échantillons sans la présence de l'opérateur.

Au cours des dernières années, on a vu apparaître des méthodes d'analyse basées sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, ou basées uniquement sur la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Il s'agit de méthodes extrêmement sélectives et suffisamment sensibles pour détecter la présence de mycotoxines à des concentrations très faibles. Ces méthodes permettent aussi de quantifier simultanément plusieurs métabolites. En effet, le développement des techniques d'analyse de la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse a donné lieu à une avancée décisive dans l'étude des mycotoxines au cours de ces dernières années. Les coûts de ces techniques sont en baisse et plusieurs laboratoires offrent désormais une large gamme de tests. Ces méthodes semblent s'imposer comme des techniques de choix pour l'analyse quantitative de la majorité des mycotoxines, mais non comme des techniques de choix en matière de détection.

L'analyse des mycotoxines dans les aliments : Étant donné que l'analyse des mycotoxines dans les aliments est une méthode de diagnostic imparfaite due souvent à un échantillon non représentatif, on peut difficilement se faire une idée précise des taux de toxines ingérées et de leurs conséquences sur la santé et la production des bovins laitiers. Ainsi, il pourrait s'avérer plus pertinent de doser les mycotoxines à partir de fluides biologiques des animaux afin d'obtenir un meilleur diagnostic des mycotoxicoses.

Dans le cadre d'expériences récentes, des chercheurs ont tenté d'établir un lien entre l'exposition des vaches laitières à des aliments contaminés à ZON en la mesurant dans les urines. Les auteurs ont suggéré que la surveillance des concentrations de ZON urinaires

VI.2.3.Méthodes immunochimiques:

C'est la méthode la plus fréquemment utilisée puisque des kits sont disponibles et qu'elle est simple et rapide. Ces techniques sont avantageuses lorsque l'objectif ne consiste qu'à conclure en la présence ou en l'absence de contamination, sans besoin de quantification précise. Il s'agit d'un test rapide qui requiert un délai de 3 à 24 heures. Les délais d'attente pour l'obtention des résultats sont ainsi beaucoup plus courts que ceux qui sont associés à la chromatographie. Contrairement aux méthodes chromatographiques, les kits ELISA engendrent des difficultés d'analyse imputables à la complexité des structures chimiques et à la diversité des mycotoxines contenues dans un lot. Cela est dû au fait que des réactions croisées peuvent se produire, et les molécules chimiquement proches de la mycotoxine recherchée peuvent alors être dosées en même temps que celle-ci.

Par exemple, les impuretés présentes dans l'urine pourraient réduire la capacité des anticorps à fixer les antigènes et engendrer à ce moment-là une surestimation des résultats. D'autre part, les kits ne dosent qu'une mycotoxine à la fois et ne facilitent pas l'évaluation d'une multi contamination. Ils sont essentiellement limités à des aliments de composition relativement homogène, ce qui exclut des produits tels que la moulée ou le fromage, à cause des interférences présentes suscitant des limitations de la méthode. Ils utilisent des enzymes fragiles qui appellent à des conditions de conservation rigoureuses, en particulier la température de conservation. Les anticorps mis au point par les fabricants garantissent rarement une bonne spécificité pour une mycotoxine donnée compte tenu de la possibilité d'obtenir des faux-positifs et des faux-négatifs.

La capacité de prédiction varie selon le fabricant et le type de mycotoxines. L'exemple de la Corée en dit long sur le sujet. En effet, sur les 249 échantillons d'aliments analysés par ELISA dans le but de détecter la présence d'AFB1, 27 échantillons avaient été qualifiés de positifs. Quantifiés une deuxième fois par HPLC, il s'est avéré que sur ces 27 échantillons, seul l'un d'entre eux contenait 11 ppb d'AFB1 tandis que pour les autres, les mesures étaient inférieures au seuil de détection. Il est évident que les résultats obtenus avec la méthode ELISA étaient de faux positifs, probablement du fait d'une éventuelle contamination par des mycotoxines autres que l'AFB1. En conclusion, il semblerait que la méthode ELISA soit nécessaire pour la détection rapide des mycotoxines, mais qu'il faille renforcer l'analyse par des méthodes analytiques telles que les méthodes séparatives chromatographiques.

VI.2.4.Méthodes biologiques:

Ce sont les méthodes qui utilisent les propriétés antibiotiques de la majorité des mycotoxines à l'égard de *Bacillus.Thurinensis*, *Bacillus subtilis* et *Saccharomyces .Cervisiae* et autres .

VI.3. Contamination des céréales et leurs dérivés par les mycotoxines

Les céréales représentent la source d'alimentation la plus importante dans le monde, soit par consommation humaine directe, soit indirectement par leur utilisation dans l'alimentation du bétail. Les dernières prévisions de la FAO ont indiqué que la production céréalière mondiale a augmenté en 2011 de 3,3% par rapport à 2010 pour atteindre 2313 millions de tonnes (FAO, 2011).

Dans les pays de l'union européenne, la production totale des céréales a été estimée à 283 et 272 millions de tonnes respectivement pendant 2011 et 2012 Bien évidemment, cette production élevée doit être conforme aux normes de sécurité des aliments destinés à l'Homme et l'animal vue l'impact économique et sanitaire de ce type d'aliments. Les céréales sont probablement la source la plus importante d'apport en mycotoxines. Certains chercheurs ont indiqué qu'environ 25% des céréales consommées dans le monde sont contaminées par les mycotoxines. Le blé est souvent contaminé par le DON et la zéaralénone, alors que le maïs est principalement contaminé par le DON puis les fumonisines. Des teneurs élevées d'aflatoxines peuvent se retrouver dans le sorgho

Dans les pays de l'Afrique du Nord, les céréales telles que le blé, l'orge, le sorgho, le maïs ainsi que leurs dérivés représentent un aliment de base pour la population. De grandes quantités de blé sont utilisées sous forme de couscous, pâtes, frik, pain, des aliments qui caractérisent la gastronomie de ces pays. En outre, les céréales contribuent à environ 12% de la production en Tunisie et les ménages tunisiens consacrent environ 25% de leurs dépenses alimentaires pour ce type de produits. Il faut signaler que de grandes quantités de céréales commercialisées en Tunisie sont importées et on connaît peu sur leur contamination éventuelle par les mycotoxines. Le blé dur est la céréale la plus cultivée en Tunisie couvrant environ 700 000 ha chaque année, principalement localisés au nord du pays . La Tunisie, comme tous les autres pays de l'Afrique du Nord, est entourée par la mer Méditerranée. Son climat humide et chaud favorise l'envahissement des céréales par les moisissures et leur contamination par les mycotoxines. Des chercheurs Tunisien ont montré que 83% des échantillons de blé cultivé en Tunisie sont contaminés par des teneurs élevées en DON supérieures à la limite autorisée par la commission européenne (1750 µg/kg) (European Commission, 2006).

VI.4.Régulation et législation des mycotoxines dans le monde

Comme les mycotoxines ne peuvent jamais être complètement éliminées des aliments, de nombreux pays ont défini des teneurs maximales, dans les denrées alimentaires, qui ne sont pas susceptibles de provoquer des problèmes de santé et qui sont raisonnablement possibles à atteindre en suivant les bonnes pratiques de culture, de fabrication et de stockage.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'élaboration des réglementations concernant les mycotoxines, y compris la disponibilité des données toxicologiques, la disponibilité des données de l'incidence des mycotoxines dans les différents produits, la législation dans d'autres pays avec lesquels des échanges commerciaux existent pour assurer une alimentation suffisante et les caractéristiques socio-économiques des peuples du monde .

Les législations européennes et les normes du *Codex Alimentarius* ne sont pas forcément identiques. Dans le cas des mycotoxines, la législation européenne est souvent plus sévère que les normes du codex. La réglementation et les recommandations de l'EU liées au contrôle des céréales sont résumées dans le **tableau 7**.

Tableau N° 7 : Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord

| Mycotoxines | Denrées alimentaires | Maroc | Tunisie | Algérie | Egypte |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------|
| AFB1 | Farine de blé | 3 | | | |
| | Céréales | 10 | 2 | 10 | 5 |
| | Maïs | | | | 10 |
| | arachides, pistaches, noix et amandes | | | | 5 |
| Aflatoxines B1, B2, G1 et G2 | arachides et graines oléagineuses | | | | 10 |
| | Céréales sauf maïs | | | | |
| G2 | maïs | | | | 20 |
| Aflatoxine M1 | arachides et graines | | | | 10 |

| | | | |
|-----------------------|--------------------------|------|------|
| | oléagineuses | | 0,5 |
| | Lait destiné aux adultes | | |
| | Lait destiné aux enfants | 0,03 | |
| Ochratoxine A | Céréales | 30 | |
| | Café | | 5 |
| Zéaralénone | Céréales | 200 | 1000 |
| Déoxynivalenol | Blé et farine de blé | | 700 |
| | Orge et farine d'orge | | 1000 |

VII. Impacts économiques des mycotoxines

Les retombées économiques engendrées par une contamination aux mycotoxines semblent être fortement négatives puisqu'elles se soldent par une dégradation de la qualité des produits agricoles et par des effets négatifs sur la santé de l'animal et sa productivité. Pourtant, peu de travaux ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact financier de ce type de contamination.

VII.1 Impact économique sur les cultures

Il est très difficile d'évaluer avec exactitude la perte économique causée par les moisissures en agriculture. D'après la FAO, 25 % des récoltes seraient contaminées par des mycotoxines chaque année, ce qui représenterait une perte d'environ 5 milliards de dollars si l'on tient compte des dommages causés à la fois aux cultures et aux élevages. Aux États-Unis, la FDA a estimé à 392 millions de dollars la perte totale engendrée par les aflatoxines, le DON et les fumonisines .il a été indiqué que le retrait du marché des aliments contaminés par les mycotoxines coûtait 342 millions de dollars annuellement aux États-Unis. Pour le maïs à lui seul, les coûts annuels des contaminations imputables aux aflatoxines, à la fumonisine B1 et au DON sont respectivement évalués à 163, 40 et 2 millions de dollars. De leur côté, ont estimé qu'aux États-Unis, les pertes associées au DON s'élevaient à 655 millions de dollars par année, la majorité de ces pertes étant attribuables au blé. VII.2 Impact économique sur la santé et la reproduction des animaux

Dans les pays d'Amérique du Nord, les conséquences économiques des mycotoxines sur la santé et la reproduction des animaux sont estimées à des milliards de dollars par année. Aux États-Unis, les pertes au niveau de la production animale sont estimées à 8,4 millions de dollars ; sachant que dans ce calcul figurent le nombre d'animaux malades à la suite de l'ingestion de mycotoxines, le coût du traitement ainsi que la valeur marchande de chaque animal. Les pertes causées par le DON se

traduiraient quant à elles par une baisse de la consommation d'aliments et des performances de croissance, de même que par une altération des fonctions immunitaires et de reproduction. De leur côté, les pertes provoquées par la ZON sont essentiellement liées à l'infertilité des animaux et, posant, à la diminution du nombre d'élevages, bien que cet aspect soit difficile à quantifier.

Références Bibliographique

- Balzer, A., Tardieu, D., Bailly, J.D., Guerre, P. 2004.** The trichothecenes: the nature of toxins, natural occurrence in foods and feeds and ways of combating their occurrence. *Revue de Médecine Vétérinaire* 155, 299-314.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson, Paris*
- Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F., Villard J., 2005 .**Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson. 2 ème édition. 191 p.
- Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., J.M. Frémy, Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D. & Roquebert, M.F. (1998)** Moisissures des aliments peu hydrates.*Lavoisier Tec&Doc, France.*
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2002.** Les moisissures à intérêt médical. Cahier de formation N° 25. Bioforma 230 bd raspail 75014 Paris.
- Commission of the European Communities (CEC). 2006.** Commission Recommendation No 2006/576 of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union, L 229, 7-9.

- Commission of the European Communities (CEC). 2006.** Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 364, 5-24.
- Commission of the European Communities (CEC). 2007.** 1126/2007 of 28 September 2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Journal L* 255, 14-17.
- Commission of the European Communities (CEC). 2010.** Commission Regulation No 165/2010 of February 26 amending regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union L* 50, 8-10.
- D'Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C. 1997.** Mycotoxins; *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004.** Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. *FAO Food and Nutrition paper*, Vol. 81. FAO, Rome, Italy.
- Gelderblom, W.C., Marasas, W.F., Vleggaar, R., Thiel, P.G., Cawood, M.E. 1992.** Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia* 117, 11-16.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 1993.** Evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. In 'Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents'. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC monographs, Vol 56 Lyon, France*, 359-362.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 1999.** Monographs on the overall evaluations of carcinogenicity to humans. *IARC monographs, Vols. 1-73 Lyon, France*, 1-36.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 2002.** Monograph on the Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *Summary of Data Reported and Evaluation, Vol. 82 Lyon, France*, 171-175.
- Keller, S.E., Sullivan, T.M., Chirtel, S. 1997.** Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Industrial Microbiology, Biotechnology*. 19, 305-309.
- Kiffer, E., M. Morelet. 1997.** Les deutéromycètes. Institut National de la Recherche Agronomique.
- Morin O. 1994.** *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. 1983.** *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. editor
- Olsen, M., Jonsson, N., Magan, N., Banks, J., Fanelli, C., Rizzo, A., Haikar, A., Dobson, A., Frisvad, J., Holmes, S., Olkku, J., Persson, S.J., Börjesson, T. 2003.** Prevention of ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.

Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S. 2004. Microbiologie. Dunod. France.

Pfohl-Leszkowicz, A. 2001. Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. Tec & Doc, 3-14.

Pitt J.I. 1988. Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London.

Pitt, J. I., Hocking, A.D. 1997. Fungi and food spoilage (2nd ed.). London: Blackie Academic and Professional.

Raper K., Fennell D.J. 1965. The genus *Aspergillus*", Williams and Wilkins editors, Baltimore.

Reboux, G. 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 46(3):208-212.

WHO. 1990. Environmental health criteria 105 selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot, trichothecenes. *International Programme on Chemical Safety (IPCS) Geneva, World Health Organization.* 71-154.

WHO-IARC. 1993. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B1 and B2 and fusarin C. *Lyon France: IARC.*