



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

N° série

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمّة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar El -OUED

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences

Biologiques

Spécialité: Toxicologie

THEME

Détermination des mycotoxines d'*Aspergillus*: caractérisation et réduction de la toxicité

Présenté Par :

M^{elle} BEN BORDI Intissar

M^{elle} OUBIRI Ferial

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} LOUAFI Hayet

M.A.A, Université d'El Oued.

Examineurs : M^{me} BOUKHARI Dalel

M.A.A, Université d'El Oued.

Promoteur : Mr LAICHE Ammar Touhami

M.C.B, Université d'El Oued

Promotion: Juin/ 2019

DÉDICACES

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour
avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur.*

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents pour
leur encouragement et leur soutien moral.*

À mes belles sœurs Djihad, Karima , Aroua et mes frère

Ahmed Tedjani ; Mohammed Ziad .

Et le chère ; mon neveu Mohammed Racime

*À mes enseignants ainsi qu'à tous les étudiants de ma
promotion.*

À tous mes amies et tous ceux qui j'aime.

Feriel

DÉDICACES

À ma mère et mon père pour leurs sacrifices

À mes sœurs AYA et AHMED ,et AYUOB et

ACHRAF et IHABE

À tout la famille BENBORDI ET ANAD

À tous mes amis (es) sans exception

Intissar

REMERCIEMENTS

En premier lieu nous tenons à remercier ALLAH précieux pour nous avoir aidés à réaliser ce travail. Nous remercions notre promoteur M. LAICHE Ammar Touhami pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercies également les membres du jury d'avoir accepté de jurer ce travail; Mme. LOUFI Hayet en tant que présidente et Mme.

BOUKHARI Dalel en tant qu'examinatrice.

En fin, que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouveront ici l'expression de notre profonde gratitude.

Sommaire

DÉDICACES	i
REMERCIEMENTS	iii
Résumé	
Sommaire	iv
Listes des tableaux.....	vii
Listes des figures	viii
Listes D'abréviations.....	x
Introduction	0
Chapitre I : synthèse bibliographique.....	3
1-Les moisissures.....	4
1.1 - Généralités	4
1.2- Cycle de vie	5
1.3- Conditions de croissance:	6
1.3.1- Eléments nutritifs:	6
1.3.2- Facteurs physicochimiques:.....	6
1.4 - Modes de reproduction	7
2-Aspergillus:.....	8
2.1-Systématique.....	8
2.2- Principales espèces:	9
3 -Les mycotoxines:.....	12
3.1- Généralité sur les mycotoxines :.....	12
3.2- Les principales mycotoxines:	12
a- Les aflatoxines:	13
b- L'ochratoxine A:	13
c- Les fumonisines:	14
d- Les trichothécènes:	15
e- La zéaralénone:	16
3.3-Biosynthèse des mycotoxines :.....	16
3.4-Facteurs influençant la production des mycotoxines.....	17
3.4.1-Champignons toxigènes.....	17

3.4.2-Facteurs environnementaux.....	17
3.4.3-Influence du substrat.....	18
3.4.4-Autres facteurs.....	18
3.5. Effets des mycotoxines:	18
3.6-Normes et aspects Réglementaire des Mycotoxines:	20

Chapitre II: Matériel et Méthodes 21

1- Matériel.....	22
1.1-Matériel de laboratoire	22
1.2- Les Milieux de culture	22
1.3- les bouillons:.....	22
1.4. Matériel végétal :	22
1.5-Souches microbienne :.....	23
2-Méthodes	23
2.1- Isolement des moisissures (Méthodes de dilution) :.....	23
2.2- Mise en évidence des moisissures (méthode directe d'ulster):	24
2.3- Purification de la souche	24
2.4- Identification des souches.....	24
2.4.1- Identification macroscopique	25
2.4.2- Identification microscopique	25
2.4.3- Identification des genres par la technique de scotch	25
2.5- Critères d'identification des moisissures :.....	26
2.6-Activités antimicrobiennes:	26
2.6.1- Préparation des microorganismes d'essai:.....	26
2.6.2- Ensemencement:.....	27
2.7- Fermentation et extraction des toxines:	27
2.8-Méthode de diffusion sur disques :.....	30
2.9-Réductions de la toxicité des souches fongiques isolées.....	31

Chapitre III : Résultats et Discussion 32

1.Isolement :.....	33
1.1 Méthode de dilution:	33
1.2- Méthode d'ulster:.....	33
2- Identification des souches.....	34
3-Détermination de l'activité antimicrobienne :	38

4- Réductions de la toxicité des souches fongiques isolées:..... 42

Conclusion.....	45
Référence bibliographique	
Annexes	

Listes des tableaux

N°	Titre	page
Tableau 01	principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées(GHERRAS S, El HIMER N. 2017).	12
Tableau 02	Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes dela chaîne alimentaire	17
Tableau 03	Effets des principales mycotoxines sur l’homme et mécanismes d’action cellulaires et moléculaires identifiés (GHERRAS et EL2017).	19
Tableau 04	Qualités maximales admissibles d’aflatoxine(HIGHLEY et al., 1994).	20
Tableau 05	Souches tests (les bactéries pathogènes et la levure).	23
Tableau 06	Souche obteneus dans les graines contaminées de blé et d’arachide par la méthode d’ulster Méthode de dilution.	34
Tableau 07	Différents caractères macroscopique des isolats fongiques.	36
Tableau 08	Comparaison des extraits d’acétate d’éthyle et chloroformiques et leurs effets sur chaque de microorganismes pathogènes	41
Tableau 09	résultat du test d’antagonisme des bactéries lactique 1 et2 , sur les souches d'aspergillus	42

Listes des figures

N°	Titre	Page
Figure01	Quelques champignons filamenteux (TOUATI R, AMOR-CHELIHI L.2016).	4
Figure02	Cycle de vie des champignons (Site web, 2019)	5
Figure03	Schéma de la reproduction des moisissures(Site web,2020)	7
Figure04	Principaux caractères morphologiques des Aspergillus (RAPER et FENNELL, 1965).	8
Figure05	Aspect micro et macroscopique d'Aspergillus flavus (TABUC ,2007)	9
Figure06	Aspect micro et macroscopique d'Aspergillus fumigatus (TABUC ,2007)	10
Figure07	Aspect micro et macroscopique d'Aspergillus niger (TABUC ,2007)	10
Figure08	Aspect micro et macroscopique d' Aspergillus ochraceus (Raperet al., 1965)	11
Figure09	Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25 oC d'Aspergillus oryzae (TABUC ,2007).	11
Figure10	Structure de l'aflatoxine B1 et de la stérigmatocystine(GHERRAS S, El HIMER N. 2017)	13
Figure11	Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA) (GHERRASS, El HIMERN 2017)	14
Figure12	Structure de la fumonisine B1 (GHERRAS S, El HIMER N. 2017)	15
Figure13	Structure générale semi développée des trichothécènes (IPCS, 1990).	15
Figure14	Structure chimique de la zéaralène (WILLIE et MOREHOUSE, 1977)	16
Figure15	Biosynthèse des mycotoxines (LEYRAL et VIERLING, 2007)	16
Figure16	L'échantillons utilisés (blé et arachide)	24

Figure17	Isolement des moisissures par la Méthode de dilution	25
Figure18	Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de Scotch	26
Figure19	Préparation des microorganismes d'essai	28
Figure20	Fermentation des champignons et filtration de surnageant.	29
Figure21	L'extraction de mycotoxine par l'acétate d'éthyle et le chloroforme	29
Figure22	Fermentation et extraction des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme	30
Figure23	Technique de diffusion sur disques	31
Figure24	Colonies obtenues dans les graines contaminées d'arachide par la méthode de dilution.	34
Figure25	Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé et d'arachide par la méthode d'ulster	35
Figure26	Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur E. coli	40
Figure27	Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur Klepsilla sp.	41
Figure28	Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur Listeria sp.	41
Figure29	Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur Candida sp	42
Figure30	Quelques zones d'inhibition de différentes bactéries lactiques testés sur les isolats d'Aspergillus.	44
Figure31	Variation de zone d'inhibition entre différentes souches d'Aspergillus et SN B1.	45
Figure32	Variation de zone d'inhibition entre différentes souches d'Aspergillus et SN B2	46

Listes D'abréviations

- **A:** Aspergillus
- **Ac:** acétate d'éthyle-
- **B1:** *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*
- **B2:** *Streptococcus thermophilus*
- **Chl:** chloroforme
- **CYP 450:** cytochromes P450
- **CDA :** CzapekDox Agar
- **DMSO:** dimethylsulfoxyde
- **DON: Trichothécène:** (déoxynyvalénol , toxine T-2 ,diacétoxyscirpénol , nivalénol)
- **FAO:** Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- **K.p:** *klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- **LMR:** limite, maximale de résidus.
- **Lis.inno :** *listeria innocua* CLIP 74915
- **MH :** Muller Hinton
- **M3:** *Candida albicans* IPA 200
- **OMS:** Organisation mondiale de la santé
- **OTA:** Ochratoxine A
- **P:** *Penicillium*-
- **ZEA:** La zéaralénone

Introduction

Introduction

Les moisissures sont des champignons microscopiques qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Plusieurs moisissures, notamment les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, sont connus pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites toxiques : mycotoxines (**CAHAGNIER et al., 1998**).

Ces moisissures sont exploitées pour la production d'enzymes (protéase et pectinase produites par *A. niger*), d'acides organiques (acide citrique et gluconique par des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*), de médicaments (production de pénicilline par *P. chrysogenum*, de céphalosporine par *Cephalosporium acremonium*) (**Perry et al., 2004**).

Environ 22% des antibiotiques identifiés et 40% des enzymes produits industriellement sont élaborés par les champignons filamenteux (**STROHL, 1997**). Outre de ces intérêts bénéfiques, les champignons sont capables de provoquer également d'importants dégâts, notamment dans le domaine agronomique, la contamination fongique des denrées alimentaires, destinées à l'homme ou à l'animal, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes (**PITT et al., 2000**).

Or, la présence indésirable des moisissures modifie l'aspect des produits alimentaires, dû notamment à la production de pigments, comme par exemple un pigment foncé, la mélanine (**BULTER et DAY, 1998**). Le développement de ces champignons sur les aliments peut leur donner des odeurs de moisissures. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée et une baisse du rendement des récoltes.

Les métabolites produits par ces champignons lors de leur croissance sur l'aliment sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Des manifestations dans la qualité organoleptique (en modifiant le goût de la denrée par exemple) mais aussi de graves problèmes sanitaires surgissent, c'est le risque d'intoxication due à la présence de mycotoxines. Mais il faut signaler que la contamination des moisissures sur les aliments ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines.

L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme s'effectue soit par des denrées consommées directement (arachides, pistaches, amandes...); 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) (**REBOUX, 2006**).

Les troubles causées par ces substances se manifestent par des syndromes variés, il peut y avoir un effet spécifique toxique sur un organe bien déterminé, cependant la plupart provoquent des lésions graves d'un seul tissu ou de plusieurs tissus, mais c'est surtout le foie qui est le plus touché. D'autres effets peuvent apparaître tels les gastro-entérites, les hémorragies et les paralysies etc.

Comme la présence des moisissures dans les récoltes est un phénomène naturel, il serait impossible d'éliminer toute trace de mycotoxines des produits alimentaires. Cependant il est possible de minimiser la contamination en prenant des précautions au niveau de l'entreposage et la manutention des récoltes après la moisson et en inspectant rigoureusement les produits avant la mise sur le marché. La réduction des taux des mycotoxines relève à la fois du rôle des agriculteurs, des commerçants et des industriels **(ABDELLAH, 2004)**.

L'objectif de notre travail est la recherche des mycotoxines à partir des genres d'*Aspergillus*, isolés à partir d'arachide et blé contaminés. En effet, le travail s'articule sur :

- L'isolement, la purification et l'identification de souches fongiques productrices des mycotoxines.
- L'extraction des mycotoxines .
- Etudes de l'activité antimicrobienne des souches isolées.
- Réductions de la toxicité des souches fongiques isolées.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

1-Les moisissures

1.1 - Généralités

Les moisissures sont des organismes eucaryotes pluricellulaires capables de se développer sur divers substrats. Elles sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone et dégradent les matières organiques en les transformant en matières minérales qu'elles assimilent par absorption. Les moisissures ont un rôle capital dans le cycle de la matière.

En effet en dégradant les matières organiques, elles participent à la formation de l'humus ; la couche supérieure du sol. Elles sont omniprésentes dans notre environnement (sol, eau, plantes...) et sont véhiculées par l'air, les matières premières, les hommes et les animaux. Il ya environ 99 000 espèces fongiques ont été décrites mais on estime que leur nombre total pourrait atteindre 5 millions (KUPFERSCHMIDT, 2012).

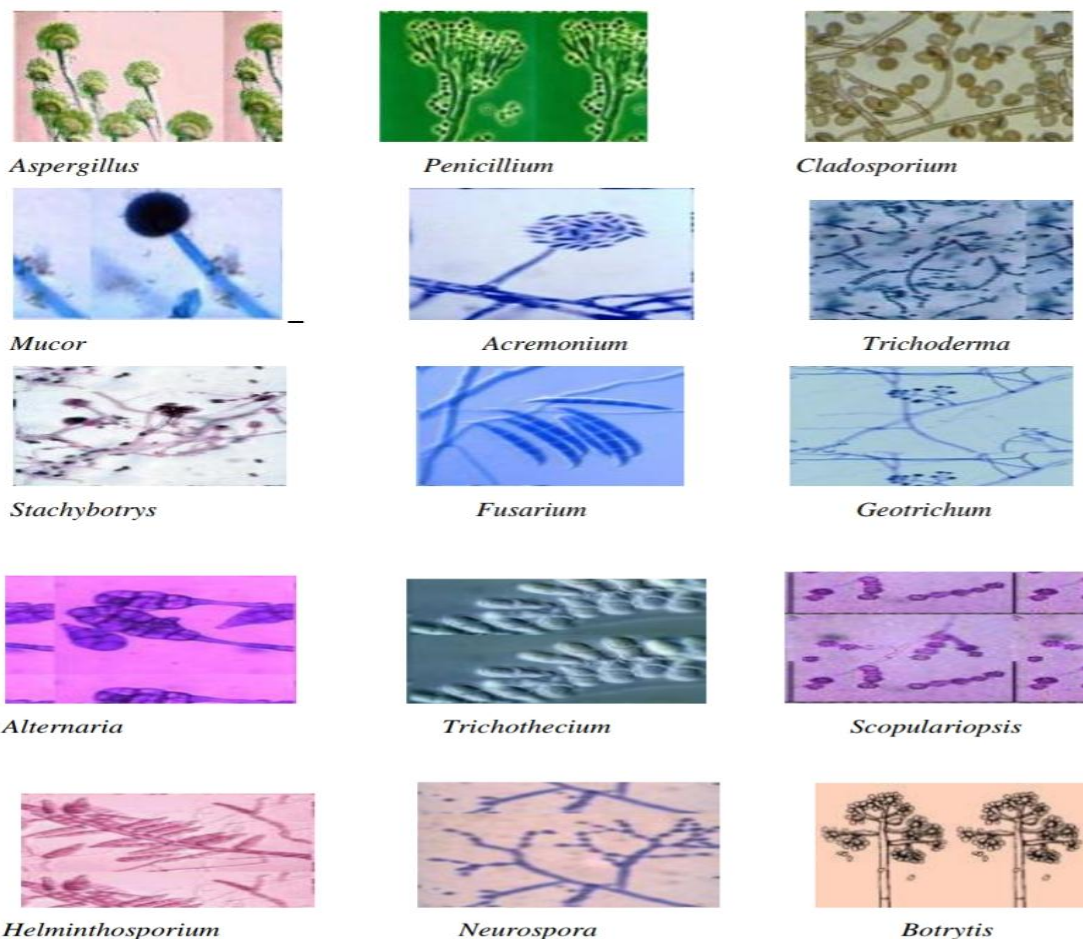


Figure01: Quelques champignons filamenteux (TOUATI R, AMOR-CHELIHI L.2016).

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques et parfois néfastes pour l'homme. Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits

agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (**MEYER et al. ,2004**).

Les moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant où les conditions nécessaires à la croissance décrites précédemment sont réunies (**PATERSON, 2006**).

1.2- Cycle de vie

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes (**Figure2**) : germination, développement, reproduction et dormance/latence. Le cycle de vie des moisissures en milieu intérieur débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenchera par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité de la lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées. Chaque moisissure produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, se présentent très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constante ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique(**TOUATI R, AMOR-CHELIHI L.2016**).

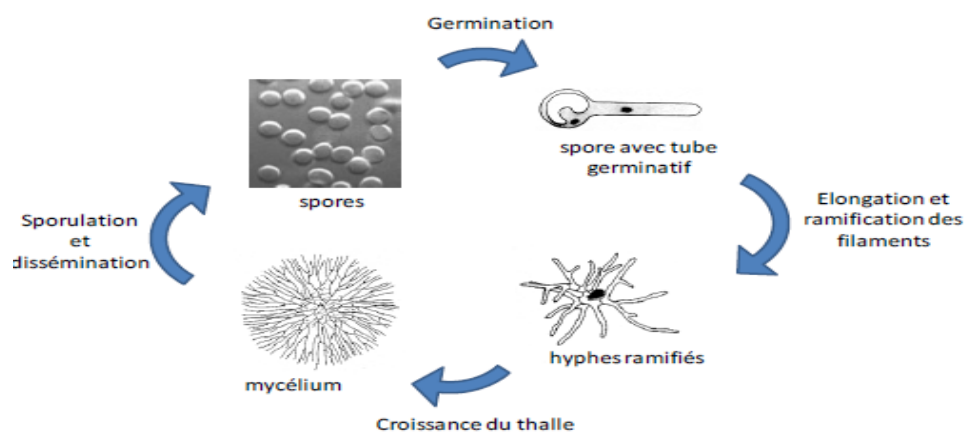


Figure02: Cycle de vie des champignons (Site web, 2019).

1.3- Conditions de croissance:

1.3.1- Éléments nutritifs:

Le Carbone et l'azote sont les éléments nutritifs les plus importants pour les moisissures, avec la présence de quelques ions minéraux (Potassium, Phosphore, Magnésium...) en très faibles quantités (GHERRAS S, EL HIMER N. 2017).

1.3.2- Facteurs physicochimiques:

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous citons successivement quelques paramètres importants.

a-Température:

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (BOURGEOIS, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (BOTTON et al., 1999).

Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température au-dessus de 50°C avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (NICKLIN et al., 2000). D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (DAVET, 1996 ; BOTTON et al., 1999).

b-Humidité:

Elle est optimale entre 0,78 et 0,84 pour *Aspergillus flavus*. C'est le facteur le plus important et commun à toutes les moisissures (MORCEAU., 1974).

c-pH:

Le développement d'un champignon sur un substrat donné est lié à des propriétés inhérentes au champignon telles que la capacité à produire des métabolites (enzyme, pigments, synthèse de toxine). La tolérance au pH est assez grande pH = 2 à 7,5 (MELETIADIS et al., 2001).

d-Oxygène:

La plupart des moisissures sont aérobies et exigent une bonne oxygénation et un taux de CO₂ inférieur ou égal à 10% cependant, certains tolèrent des quantités relativement faibles d'oxygène et peuvent même se développer en anaérobiose (MELETIADIS et al., 2001).

e-Lumière

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (BOTTON *et al.*, 1999).

1.4 - Modes de reproduction

La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction: la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative), et la reproduction sexuée. La reproduction végétative des champignons résultant d'une fragmentation du thalle ou d'une sporulation, représente le plus souvent la principale source de dissémination du parasite lors de la fragmentation du thalle. Les ramifications se séparent les unes des autres à la suite de la dégénérescence de la partie basale d'hyphe dont elles dérivent. Il est rare que l'ensemble du cytoplasme du thalle se transforme en spores lors de la multiplication végétative.

La reproduction sexuée des champignons comporte une plasmogamie (fusion des cytoplasmes de deux gamètes) suivie d'une caryogamie (fusion des noyaux correspondants) et d'une méiose (division réductionnelle). Les types de spores sexuées sont au nombre de quatre : l'oospore, la zygospore, l'ascospore et la basidiospore (STANIER *et al.*, 1966). Le mycélium bien que contenant un cytoplasme mobile, et lui-même incapable de se déplacer à cause de la rigidité de ses parois. On parle aussi communément des moisissures pour désigner les champignons chez lesquels les organes de fructification ont une structure nettement filamenteuse. Elles s'opposent aux champignons comestibles ; dans les corps fructifiant sont charnus (LECLERC *et al.*, 1983).

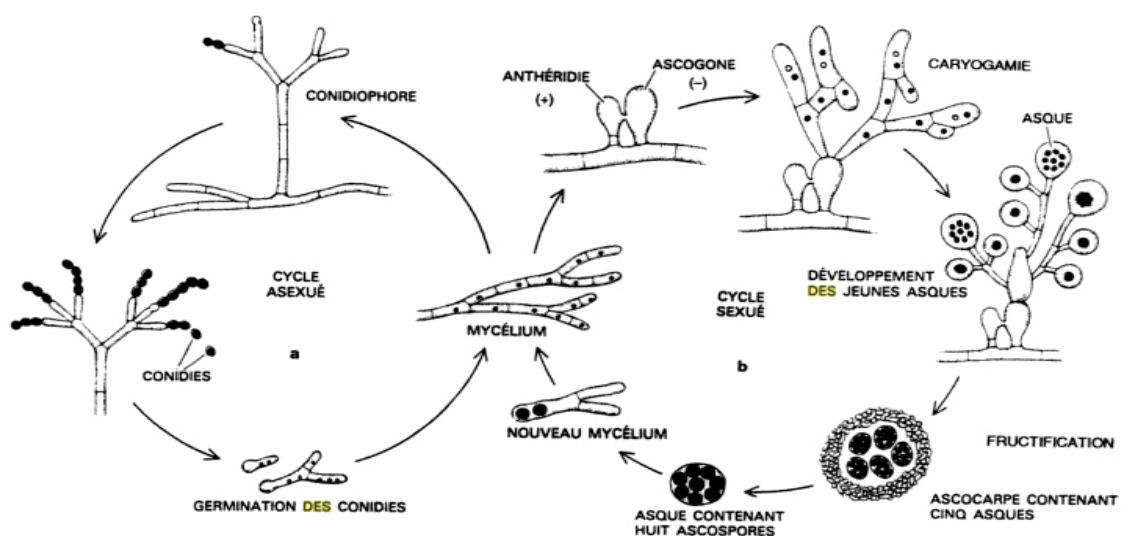


Figure 03: Schéma de la reproduction des moisissures (Site web, 2020).

2-Aspergillus:

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure4) (**Raper et Fennell, 1965**)

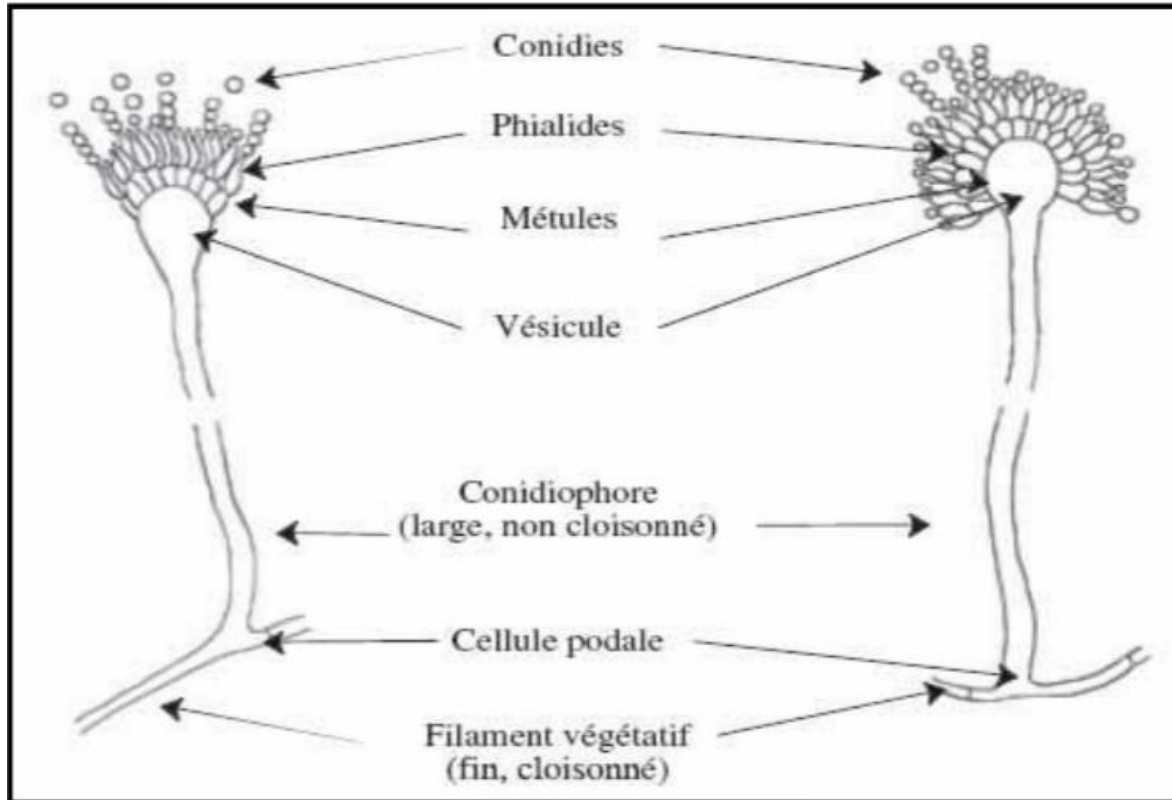


Figure 04 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (RAPER et FENNELL, 1965).

2.1-Systématique

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures, autrement dit des champignons microscopiques filamenteux, qui vivent en saprobiose dans de très nombreux écosystèmes.

les *Aspergillus* appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota* qui regroupe des champignons à mycélium cloisonné (champignons septomycètes) présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores.

Les champignons du genre *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales* qui est caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cléistothèce ou plus rarement gymnothèce, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies (**HIBBETT et al., 2007 ; BENNETT, 2010**).

Plus de 300 espèces appartenant au genre *Aspergillus* ont été décrites. Les critères d'identification sont principalement morphologiques. Cependant, l'application des outils de caractérisation moléculaire a montré que cette identification strictement phénotypique pouvait conduire à des erreurs d'identification et que certains regroupements d'espèces n'avaient pas de fondement (BALAJEE *et al.*, 2006).

Pour tenir compte des résultats de caractérisation moléculaire, des « sous-genres » appelées « sections » ont été créés. Les sections regroupent toutes les espèces morphologiquement semblables mais génétiquement différentes. Les moisissures du genre *Aspergillus* sont actuellement réparties dans 6 sections principales : Usti, Flavi, Nigri, Circumdati, Clavati et Fumigati.

La section Fumigati regroupe 33 espèces (23 du genre *Neosartorya* et 10 du genre *Aspergillus*). Elle inclut *Aspergillus fumigatus* ainsi que *Aspergillus lentulus*, une espèce récemment identifiée grâce à l'analyse de séquences partielles des gènes de la β -tubuline et de la calmoduline (BALAJEE *et al.*, 2005).

Parmi les espèces responsables d'aspergillose chez l'homme et chez les oiseaux, *Aspergillus fumigatus* est la plus communément rencontrée (KUNKLE, 2003). Les espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* ainsi qu'*Aspergillus nidulans* et *Aspergillus terreus* sont incriminées comme agents pathogènes possibles mais dans une moindre mesure en zone tempérée (JONES et OROSZ, 2000).

2.2- Principales espèces:

➤ *Aspergillus flavus* : le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques

(géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés (Figure 5) (TABUC ,2007)

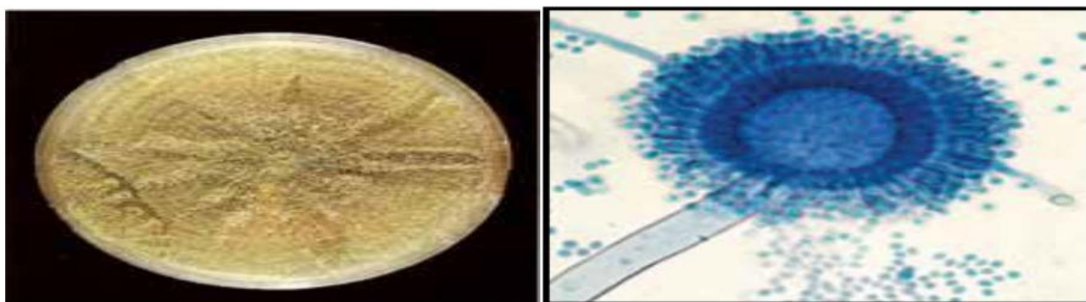


Figure 05 : Aspect micro et macroscopique d'*Aspergillus flavus* (TABUC ,2007).

➤ ***Aspergillus fumigatus*** : on distingue un mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques à 37°C. *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C ; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C (Morin, 1994). *A. fumigatus* forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches (Figure 6).



Figure 06 : Aspect micro et macroscopique d'*Aspergillus fumigatus* (TABUC, 2007).

➤ ***Aspergillus niger*** : ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, *A. niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore (Figure 7) ((TABUC, 2007).

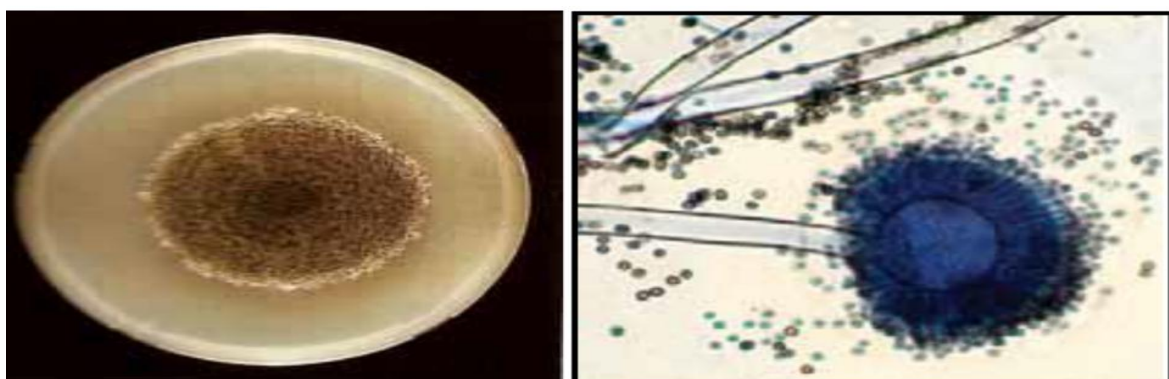


Figure 07 : Aspect micro et macroscopique d'*Aspergillus niger* (TABUC, 2007).

➤ *Aspergillus ochraceus* : ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques à une température de 25 à 30°C. Les colonies d'*A. ochraceus* sont poudreuses ou granuleuses, blanches au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore au jaune pâle (Figure 8) (RAPER *et al.*, 1965).

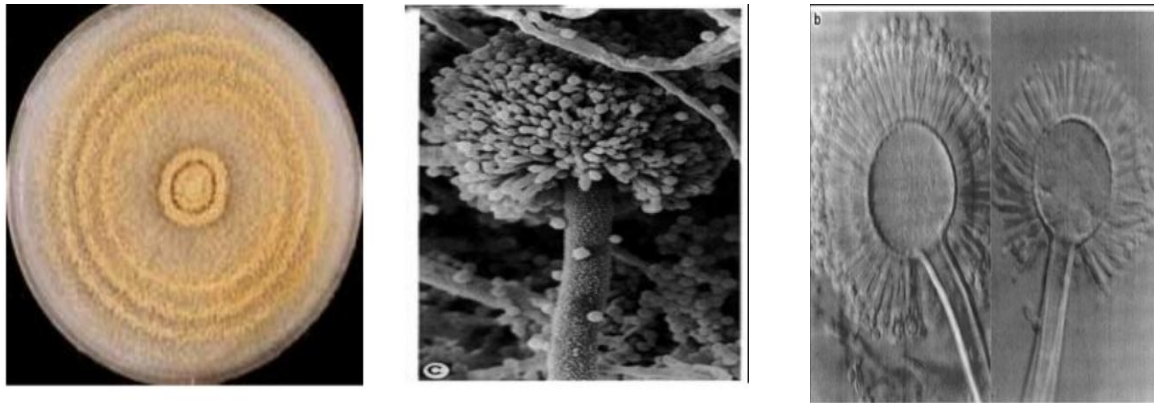


Figure 08: Aspect micro et macroscopique d' *Aspergillus ochraceus* (TABUC ,2007).

➤ *Aspergillus oryzae* : il se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses aumalt et Sabouraud) à 22-25°C. Sur milieu de culture *A. oryzae* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord de couleur blanche, puis jaune, et enfin vert-jaunâtre à vert olive. Le revers peut être incolore ou jaunâtre (Figure 9).

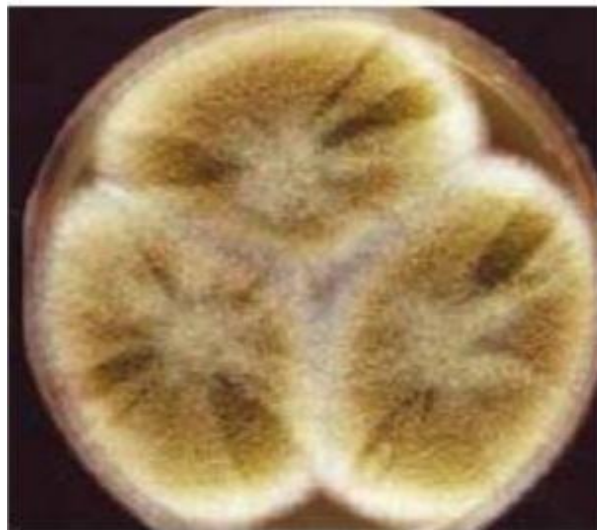


Figure 09: Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25 °C d'*Aspergillus oryzae* (TABUC ,2007).

3 -Les mycotoxines:

3.1- Généralité sur les mycotoxines :

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin toxicum signifiant « poison ». Les mycotoxines sont des molécules capables, à faible concentration, d'induire un effet toxique (ROBOUX *et al.*, 2006).

Ce sont des métabolites secondaires peu volatiles, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. À l'heure actuelle seules certaines espèces de moisissures sont connues comme ayant la capacité de produire des toxines. Leur biosynthèse 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 et la présence d'autres espèces en compétition (HENDEY *et al.*, 1993).

Chaque mycotoxine n'est pas nécessairement spécifique à une moisissure donnée. La gliotoxine, par exemple : peut aussi bien être produite par *Aspergillus fumigatus* que par *Trichoderma viridae*. De même, une moisissure donnée peut produire plusieurs toxines : *Aspergillus fumigatus*, agent étiologique de certaines atteintes pulmonaires, fabrique plus de huit toxines différentes (MAHEUX, 1998).

Tableau 01: principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées (GHERRAS S, EL HIMER N. 2017).

Espèce fongique productrice	Mycotoxine associées
<i>Aspergillus sp.</i>	Gliotoxine , fumagilline , acide helvolique , tryptacidine , fumitremorgines , fumiquinazoline , aflatoxines , ochratoxines , stérigmatocystine .
<i>Alternaria sp.</i>	Alternariol , acide , ténuazonique
<i>Claviceps sp.</i>	Alcaloïde (ergotamine et dérivés)
<i>Fusarium sp.</i>	Trichothécène (déoxynivalénol , toxine T-2 , diacétoxyscirpénol , nivalénol), zéaralénone , fumonisines , fusarine , moniliformine
<i>Penicillium</i>	Ochratoxine A , pénitrem , acide cyclopiazonique , patuline , citrinine

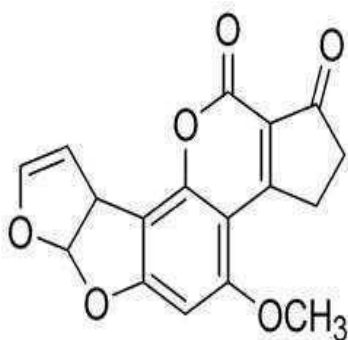
3.2- Les principales mycotoxines:

Les principales mycotoxines peuvent être produites par 5 types de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Compte tenu de leurs propriétés toxiques chez l'homme et l'animal et de leur fréquence de contamination des matières premières et des aliments, les mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone. (Behnas D , Benayache A. 2015).

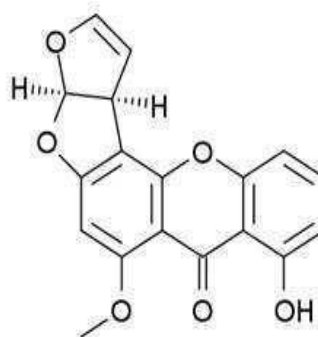
a- Les aflatoxines:

Les aflatoxines sont des toxines produites par *A. flavus* (qui produit aussi de l'aflatrem, de l'acide cyclopiazonique et de l'acide aspergillique) et *A. parasiticus*. Les aflatoxines (B1, B2, G1, G2, M1, M2) (Figure 10) sont reconnues comme étant les plus puissants cancérigènes naturels. L'intoxication aiguë par les aflatoxines se traduit par des symptômes de dépression, anorexie, diarrhée, ictère ou d'anémie, pouvant aller jusqu'à la mort (QUILLIEN, 2002).

Les aflatoxines apparaissent dans les noix (cacahuètes, noix du Brésil ...), les céréales, les poivres séchés et de nombreux autres aliments d'origine végétale. On trouve l'aflatoxine M dans le lait de vaches nourries de fourrage contaminé. Il s'agit en l'occurrence d'aflatoxine B métabolisée (4-hydroxylée) (QUILLIEN, 2002).



Structure de l'aflatoxine B1



Structure de la stérigmatocystine

Figure 10 : Structure de l'aflatoxine B1 et de la stérigmatocystine (GHERRAS S, EL HIMER N. 2017).

b- L'ochratoxine A:

La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important (Figure 11). Cette mycotoxine est produite par différentes espèces de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. viridicatum*...) et d'*Aspergillus* (*A. ochraceus*...).

En effet, la température optimale de production de l'OTA par l'*Aspergillus ochraceus* est de 28 °C, cette production étant fortement réduite à 15°C ou 37°C. Au contraire, *Penicillium viridicatum* se développe et peut produire de l'OTA dans une gamme de températures qui varie de 4 à 30°C.

Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillium*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillus* qui la synthétisent (POHLAND *et al.*, 1992; VARGA *et al.*, 1996).

La toxicité de cette mycotoxine peut varier en fonction de l'espèce, du sexe, de la voie d'administration (**POHLAND et al., 1992**). Chez l'homme, l'OTA est suspecte d'être impliquée dans la néphropathie en démiq uedes Balkans. Elle est classée dans le groupe 2B des molécules cancérigènes chez l'animal est possiblement cancérigènes chez l'homme (**VRABCEVA et al., 2004**).

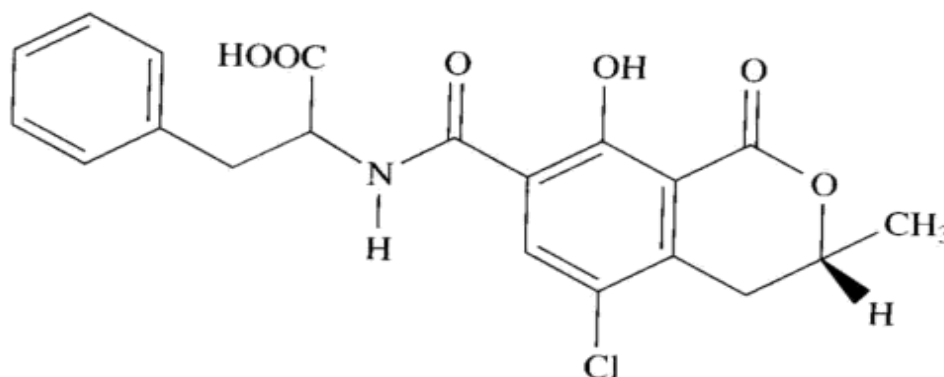


Figure11: Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA) (GHERRASS, El HIMERN 2017).

c- Les fumonisines:

Les fumonisines sont un groupe de mycotoxines caractérisées à la fin des années 80 et produites par *Fusarium verticilloides*, une moisissure présente dans le monde entier et fréquemment retrouvée sur le maïs. Plusieurs souches de *F. verticilloides* isolées d'autres substrats comme le sorgho et l'avoine produisent des quantités importantes de fumonisines (**AYALEW et al., 2006**). Ces toxines peuvent aussi être produites par *F. proliferatum* et *F. nygamai* qui parasite principalement le sorgho et le millet (**NELSON et al., 1992**). On a aussi montré que les fumonisines peuvent être élaborées par *F. oxysporum* et *F. polyphialidicum* ; *A. alternata* sp. *Lycopersi* peut synthétiser aussi des fumonisines (**ABBAS et al., 1997**).

Aujourd'hui la famille des fumonisines comprend 15 molécules différentes. Les fumonisines B1, B2 et B3 (Figure12) sont les plus répandues dans le monde comme des contaminants naturels des céréales. La toxicité des fumonisines est caractérisée par l'apparition de signes cliniques très différents en fonction des espèces (**COLVIN et al., 1993**).

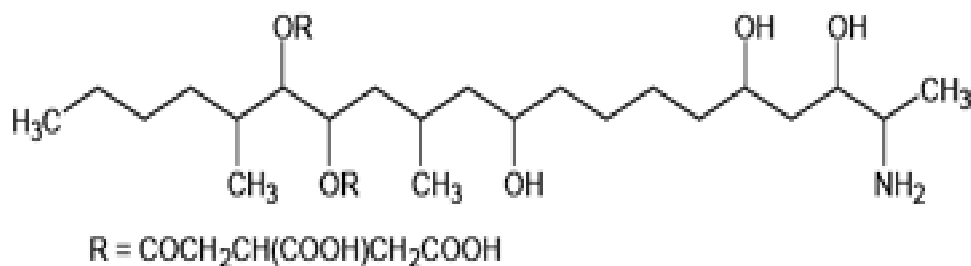


Figure12: Structure de la fumonisine B1 (GHERRAS S, El HIMER N. 2017).

d- Les trichothécènes:

C'est une famille composée d'environ 148 composés, tous produits par de nombreuses espèces fongiques dont celles des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Stachybotrys*. Les mycotoxines les plus étudiées dans ce groupe sont le déoxynivalénol (DON), les toxines T-2 et HT-2 (OMS, 1980).

La toxine DON est une vomitoxine qui contamine les céréales en particulier le blé, l'orge, le maïs, le seigle, l'avoine, et le riz. L'occurrence de la toxine DON est associée principalement avec *F. graminearum* et *F. culmorum*. La DON peut provoquer des effets adverses après administration. L'administration d'une dose aiguë est caractérisée par deux effets toxicologiques à savoir la perte de l'appétit et les vomissements (CREPPY, 2002).

Les toxines T-2 et HT-2 sont deux toxines produites sur les céréales (blé, orge, maïs, riz, avoine...) et les produits à base de céréales. Elles sont produites par de nombreuses espèces de *Fusarium*. La toxine T-2 est un inhibiteur potentiel de la synthèse protéique. Alors que la toxine HT-2 a pour cible le système immunitaire (BOTTALICO, 1998).

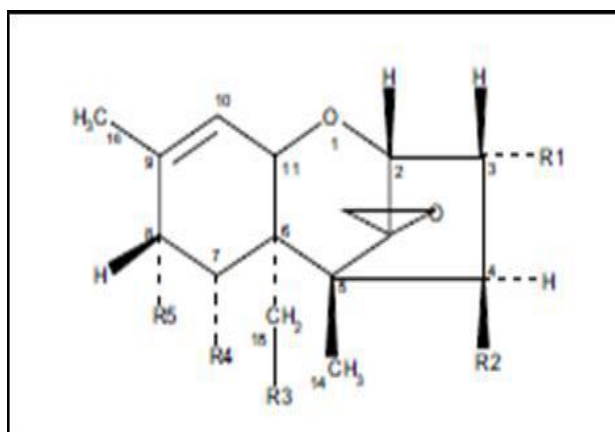


Figure 13 : Structure générale semi développée des trichothécènes (IPCS, 1990).

e- La zéaralénone:

La zéaralénone (ZEA) ou toxine F-2 est produite par les espèces appartenant au genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. culmorum*. Elle peut être également être synthétisée par *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoides* et *F. laterium*. La production de cette mycotoxine est favorisée lorsque les températures sont situées entre 10 et 15°C (ABBAS *et al.*, 1988 ; TABUC, 2007).

La ZEA est une lactone de l'acide résorcyclique sans toxicité intrinsèque mais de par sa similitude avec l'oestrogène (Figure 14). La principale moisissure responsable de la production de cette mycotoxine est *Fusarium graminearum* même si d'autres champignons sont capables de la produire. Sa répartition est mondiale, elle est présente dans l'ensilage, le foin, le maïs ou d'autres céréales (WHITLOW *et al.*, 2001).

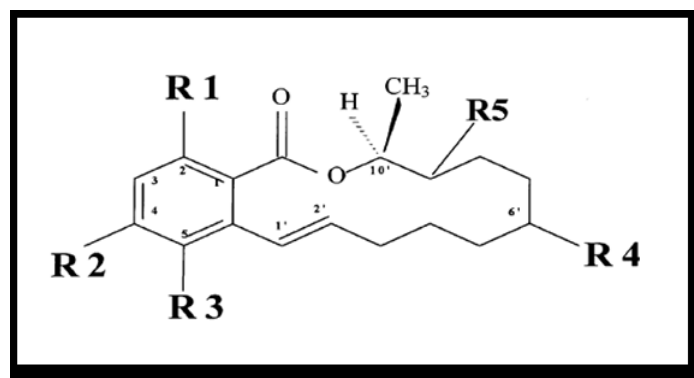


Figure 14: Structure chimique de la zéaralénone (WILLIE et MOREHOUSE, 1977).

3.3-Biosynthèse des mycotoxines :

Les mycotoxines sont produites par nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène. Elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines de ces champignons (CHAPELAND-LECLERC *Fet al.*, 2005).

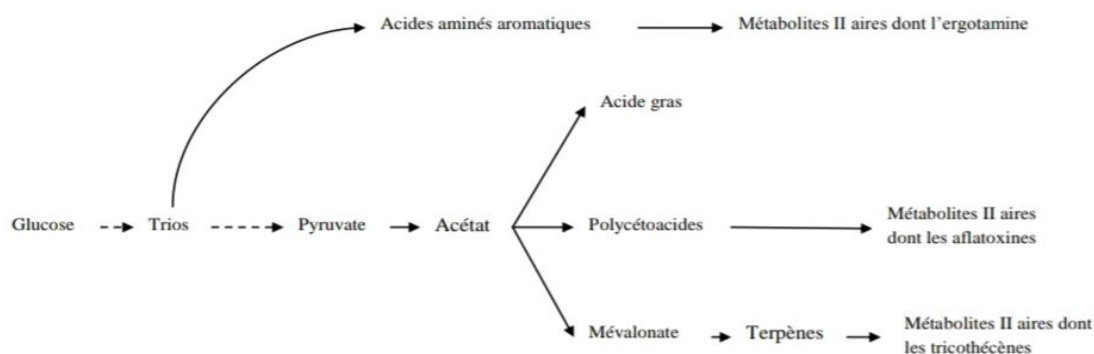


Figure 15: Biosynthèse des mycotoxines (LEYRAL et VIERLING, 2007).

3.4-Facteurs influençant la production des mycotoxines

3.4.1-Champignons toxigènes

Le type et la quantité de mycotoxine dépendent des espèces fongiques qui les produisent (LACEY, 1986). Elles diffèrent dans leur caractère morphologique, génétique et dans leurs places écologique. Les champignons toxigènes peuvent être classés en deux groupes principaux:

1- Les champignons de champs qui contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte, principalement *Fusarium* et *Alternaria* mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des raisins.

2- Les champignons de stockage (par exemple les *Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage (CHRISTENSEN, 1974).

3.4.2-Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux affectant la production de mycotoxine sont d'origine physique, chimique ou biologique (Mitchell *et al.*, 2004). Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante, en effet leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un facteur simple. Le tableau 2 présente quelques facteurs environnementaux qui peuvent influencer la production de mycotoxine à différentes étapes de la production (HESSELTINE, 1976).

Tableau 2: Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire

Facteur	Au champ	A la récolte	Pendant le Stockage
Physique			
- Humidité	+	+	+
Rapidité de séchage	-	+	+
Ré humidification	-	+	+
Humidité relative	+	+	+
- température	+	+	+
- damage mécanique	+	+	+
- mélange de grains	-	+	+
Chimique			
- CO ₂	-	-	+
- O ₂	-	-	+
- nature du substrat	+	-	+
- nutrition minérale	+	-	+
	-	-	+
Biologique			
- stress de plante	+	-	+
- vecteurs invertébrés	+	-	+
- infection fongique	+	-	+

- différences entre les	+	-	+
variétés des plantes	+	-	+
- différences entre	+	-	+
	+	+	+
	+	-	+

+ :Effet ; - Pas d'effet

3.4.3-Influence du substrat

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène. Cependant la nature du substrat peut influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines **(REBOUX, 2006)**.

Il est important de noter que des différences dans cette expression, peuvent être observées au sein d'une même espèce et expliquer les différences de pouvoir toxigène observées entre "souches". En outre, des souches au sein d'une même espèce ne disposent pas toutes du système enzymatique requis pour la production des mycotoxines **(NICHOLSON et al., 2003)**.

Ainsi les progrès de la chémotaxonomie ont permis de démontrer que pour une même espèce les profils des substances produites sont différents si on prélève le champignon sur le substrat naturel ou à partir d'une culture en boîte de Pétri. L'exemple le plus parlant concerne *Penicillium roqueforti*, incapable de produire une toxine sur le fromage de Roquefort, alors qu'*in vitro* il est en mesure de sécréter un métabolite très toxique **(CHAPELAND et al., 2005)**.

3.4.4-Autres facteurs

Des micro-organismes « de concurrence » peuvent affecter la production de mycotoxines sur les produits agricoles. Ils peuvent augmenter ou gêner la formation des mycotoxines en changeant le métabolisme de l'organisme producteur, par la concurrence pour les substrats, en changeant les conditions environnementales les rendant défavorables pour la production de mycotoxine ou en produisant des composés inhibiteurs **(LACEY, 1986)**.

Les interactions avec d'autres microorganismes peuvent également être différentes dans les différentes conditions environnementales **(CAIRNS et al., 2003)**. Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Ils peuvent s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte, les fongicides utilisés, la variété de la plante et les différences géographiques **(LANGSETH et al., 1995)**.

3.5. Effets des mycotoxines:

Les mycotoxines constituent un danger imminent qui tire le signal d'alarme, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, sur

la productivité animale et sur le commerce national et international. La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (KRSKA, 2009).

L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Mais, l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que le foie ou le rein (LECLERC *et al.*, 2005).

Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets carcinogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs. En outre, certaines mycotoxines peuvent altérer des réactions immunitaires et réduire ainsi, la résistance aux infections. Du coup, il est, maintenant, largement considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (PAMEL *et al.*, 2010).

Tableau 03: Effets des principales mycotoxines sur l'homme et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés (GHERRAS et EL2017).

Mycotoxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 et M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduits à l'ADN Péroxydation lipidique Bioactivation par des CYP 450 Conjugaison aux Glutathion- transférases
Ochratoxine A et B	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines Inhibition de la production d'ATP Détoxication par les peptidases
Trichothécènes (A et B)	Hémato toxicité Immunomodulation	Induction de l'apoptose progéniteur Hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse in vitro	Inhibition indirecte d'enzymes
Zéaralénone	Fertilité Reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques Bioactivation par des déshydrogénases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide et altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

3.6-Normes et aspects Réglementaire des Mycotoxines:

Quelques 60 pays ont publié des règlements concernant la contamination des produits alimentaires et des aliments pour animaux par des aflatoxines. Dans les pays industrialisés, les limites maximales admissibles (limite, maximale de résidus ; LMR) sont fixées comme suit : (HIGHLEY *et al.*, 1994).

Tableau 04 : Limites maximales admissibles d'aflatoxine(HIGHLEY *et al.*, 1994).

Marchandise	Quantités maximales Aflatoxines admissibles (ug/Kg)
Alimentation humaine	5 à 30
Aliments pour bébés	5 à 20
Aliments pour bétail laitier, jeune bétail	5 à 20
Aliments pour porcins et volaille	10 à 30
Aliments pour bovins et caprins	20 à 300

Les Mycotoxines sont très résistantes et ne peuvent être réduites ni par la cuisson, ni par d'autres procédés quelconques, ce qui implique que les denrées alimentaires infestées doivent être détruites.

Les limites maximales sont fixées à 8µg/Kg pour l'aflatoxine B1 et 15µg/Kg pour les aflatoxines totales. En ce qui concerne les ochratoxines, les teneurs maximales sont fixées à 5µg/Kg pour les céréales brutes destinées à être triées avant l'utilisation pour l'alimentation humaine et une teneur de 3µg/Kg pour les céréales et leur produits dérivés utilisés. (AGRIOS, 1994).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Le présent travail porte sur l'identification et l'extraction des mycotoxines *Aspergillus* isolés à partir des grains d'arachide et de blé, l'évaluation de leur toxicité et la réduction de cette dernière. Ce travail a été initié et réalisé dans le laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université El-Chahid Hamma Lakhdar d'El-oued.

1- Matériel

1.1-Matériel de laboratoire

- Etuve
- Balance de précision
- Hotte à flux laminaire
- Agitateur va-et-vient
- Autoclave
- Agitateur Vortex
- Microscope
- Evaporateur rotatif
- Broyeur (Waring-blendor)
- Verrerie : boîtes de Pétri, Erlenmeyers, fioles jaugées, béchers, ballons, tubes à essais, pipettes, ampoules à décanter, colonne à verre, micro seringues Hamilton, cuve d'élution.
- Les gants de laboratoire.
- Les bavettes.

1.2- Les Milieux de culture

- ❖ Milieu CDA (CzapekDox Agar)
- ❖ Agar Dextrose Potatoes (PDA)
- ❖ Milieu Sabauroud
- ❖ Gélose Mueller-Hinton
- ❖ Gélose nutritive

1.3- les bouillons:

- ✓ PDA(Potatoes Dextrose Agar acidifié).
- ✓ Bouillon nutritive.

1.4. Matériel végétal :

Les échantillons ont été prélevés à partir de différents vendeurs d'arachides et de blé dans la wilaya d'El-oued, à savoir :

- Un échantillon d'arachide (avec enveloppe, sans enveloppe).
- Un échantillon de blé.



Figure 16: L'échantillons utilisés (arachide avec enveloppe et arachide sans enveloppe et blé)

1.5-Souches microbienne :

Dans la présente études, plusieurs souches microbiennes pathogènes ont été utilisées pour démontrer l'activités antimicrobiennes des souches fongiques isolées à partir de nos échantillons (**tableau 5**).

Tableau 05 : Souches tests (les bactéries pathogènes et la levure).

Nom de souche et Code référence	Abréviation
<i>Candida albicans</i> IPA 200	M3
<i>listeria innocua</i> CLIP 74915	Lis.inno
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	K.p
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8737	E. coli

2-Méthodes

2.1- Isolement des moisissures (Méthodes de dilution) :

De chaque échantillon, 5g d'arachide broyés o sont additionnés à 45 ml d'eau physiologique, Ensuite, 1 ml de cette dernière est ajouté à 9ml d'eau physiologique pour avoir la dilution 10^{-1} . Des boites Pétri contenant les milieux: Sbaureaud., milieu Czapek, sont ensemencées avec 1ml des dilutions et l'incubation dure 5 à 7j à 25 °C et 30 °C.

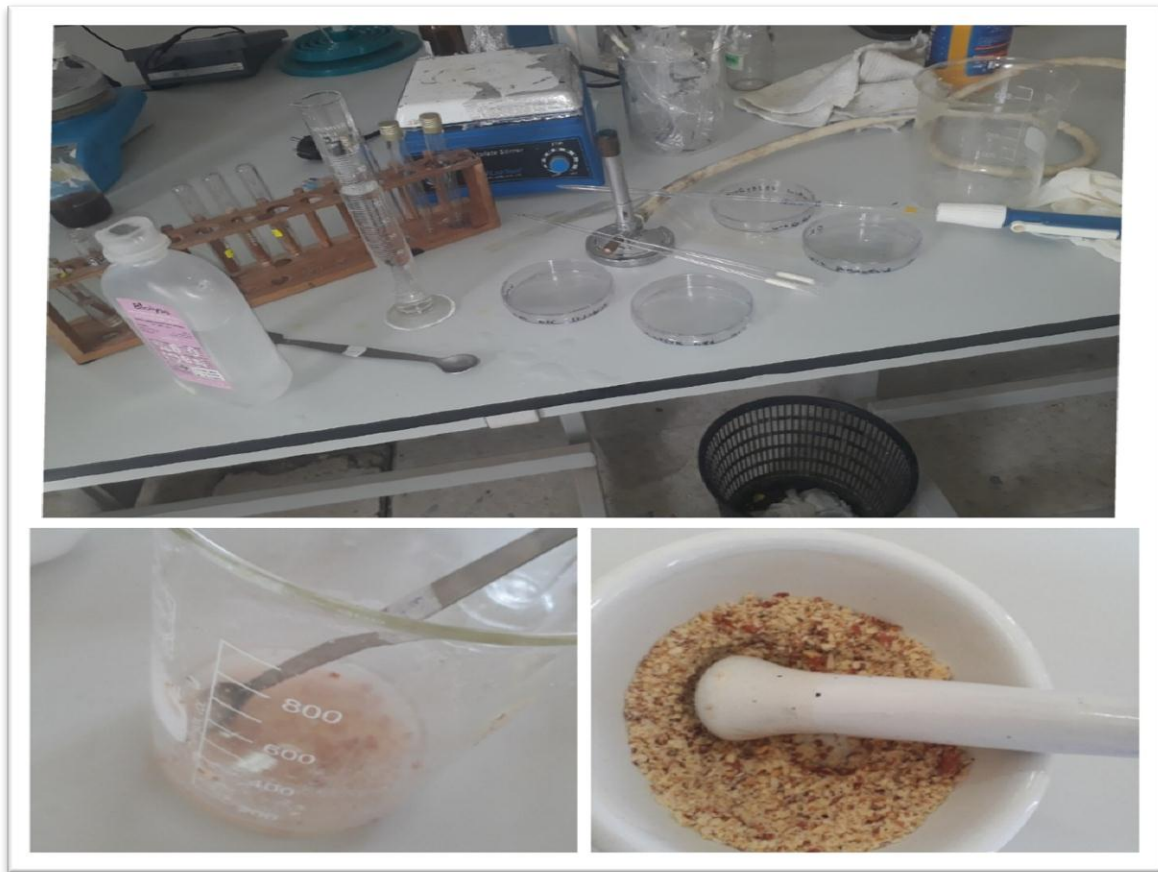


Figure17: Isolement des moisissures par la Méthode de dilution

2.2- Mise en évidence des moisissures (méthode directe d'ulster):

C'est une méthode de mise en évidence de la moisissure de surface et de profondeur des grains étudiée. Tapisser la boîte de pétrie par pda . Afin de créer une atmosphère humide dans la boîte et on met 5 grains d'arachides ou de blé dans la boîte.

L'incubation se fait à 25°C pendant 5 à 7 jours Cette méthode est préconisée dans le cadre de la détermination de la flore de surface d'un aliment pour juger l'efficacité de tel ou tel mode de stockage (LAOUID et NEFTIA, 2007)

Nous avons fermé les boîtes cultivées dès le début de localisation jusqu'à dernière étape par parafilm pour éviter tout risque de contamination.

2.3- Purification de la souche

La purification des souches est effectuée par le repiquage au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention des souches pures (GUIRAUD, 2003).

2.4- Identification des souches

L'identification des moisissures est basée sur les caractères cultureux (observation macroscopique) et l'observation microscopiques ainsi que des propriétés biochimiques (BOTTON *et al.*, 1990).

2.4.1- Identification macroscopique

L'observation macroscopique est réalisée sur la face et le revers de la boîte, en basant sur la détermination de l'aspect des colonies et la forme et la couleur des spores et la vitesse de croissance et le diamètre de la colonie (BOTTON *et al.*, 1990).

2.4.2- Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les méthodes les plus utilisées est méthode de scotch (CHABASSE, 2002).

2.4.3- Identification des genres par la technique de scotch

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch (technique du drapeau) une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (CHABASSE, 2002). A partir des mêmes cultures on prend un autre fragment de scotch et on le recolle sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux goutte de l'eau physiologique. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ à l'aide d'un microscope (GUEZLANE *et al.*, 2011).



Figure 18: Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de Scotch

2.5- Critères d'identification des moisissures :

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères culturels et à la morphologie, rarement à des propriétés biochimiques; elle nécessite souvent l'utilisation des milieux standards favorisant la croissance ou la reproduction et permettant ainsi une expression correcte des caractères à étudier : *Aspergillus*, , en particulier, à savoir :

- ✓ Vitesse de croissance
- ✓ Texture de thalle (veloute, laineux, etc....).
- ✓ Couleur de thalle (pigmentation du mycélium, couleur des conidies).
- ✓ Couleur de revers de la culture et présence d'un pigment diffusible.
- ✓ Odeur.
- ✓ Exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien).

Tous les caractères doivent être notés avec précision en utilisant, la précision du microscope et l'huile d'immersion qui déterminent exactement les dimensions du thalle et le contenu des conidiospores. (BOTTON *et al*, 1990).

2.6-Activités antimicrobiennes:

Pour rechercher l'activité antimicrobienne des *Aspergillus* isolés, on utilise la technique de la double culture.

2.6.1- Préparation des microorganismes d'essai:

Les souches sélectionnées ont été revivifiées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif « Nutrientbroth » à l'aide d'une pipette Pasteur flambée et incubées à 37°C et la levure à 30°C pendant 24 heures avant d'être utilisées dans les tests de l'activité.

A partir de chaque tube de bouillon nutritif mentionnant un trouble, on a ensemencé par stries une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive puis incubées à 37°C pendant 18 heures. Après incubation on a raclé à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis on a déchargé la pipette dans 5 ml d'eau physiologique stérile.

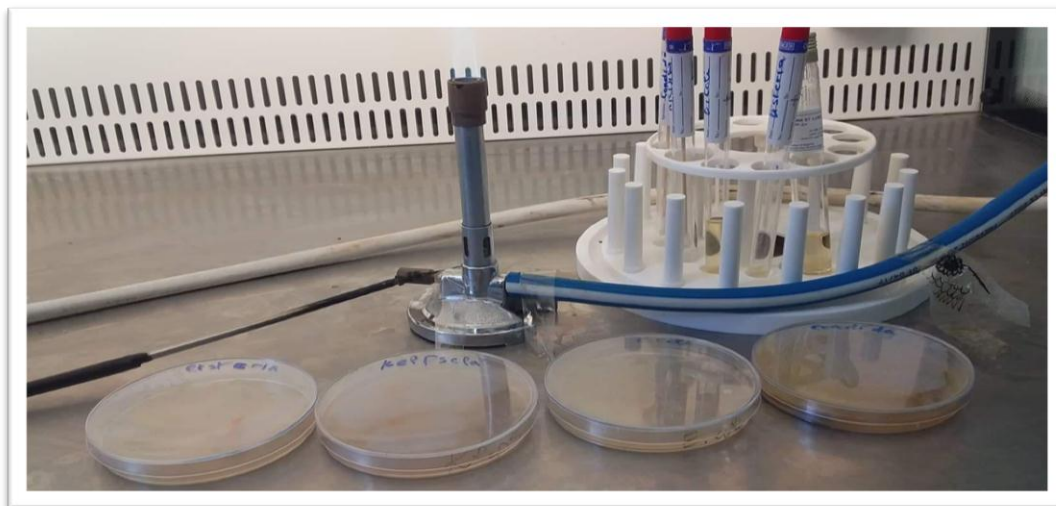


Figure 19 : Préparation des microorganismes d'essai

2.6.2- Ensemencement:

La suspension bactérienne a été ensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton (MH). L'écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis il est essoré on le faire tournant sur la paroi interne de tube afin de le décharger au maximum. Le milieu MH a été frotté sur la totalité de leur surface gélosée de haut en bas, en stries serrés (**BOUGHACHICHE *et al.*, 2005**).

2.7- Fermentation et extraction des toxines:

Les champignons ainsi ayant un résultat positif au dépistage et identifiés, ont été mis à croître sur du PDA a 25°C pendant cinq jours, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 300 ml de PDB (*potato dextrose broth*) et répété deux fois (**XIAOLING *et al.*, 2010**), ils seront après incuber à 25°C pendant trois semaines avec une agitation périodique à 150 tours/minute, après ça le contenu est filtré à travers une gaze stérile pour séparer le mycélium du bouillon de culture (**BARIK *et al.*, 2010; MOHANTA *et al.*, 2008**), ce dernier est centrifugé a 3000 tours/min pendant 10 min, et le surnagent a été récupéré (**MADKI *et al.*, 2010**).

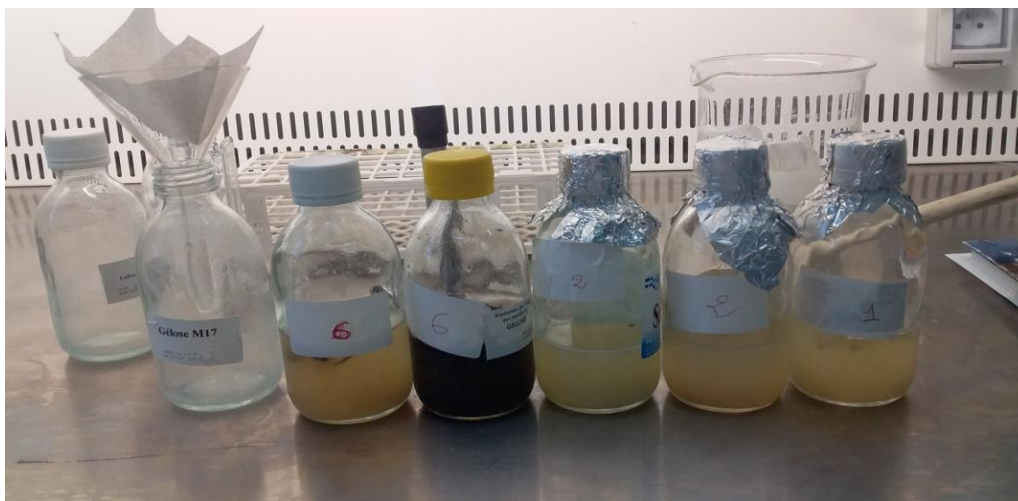


Figure 20: Fermentation des champignons et filtration de surnageant.



Figure 21: L'extraction de mycotoxine par l'acétate d'éthyle et le chloroforme

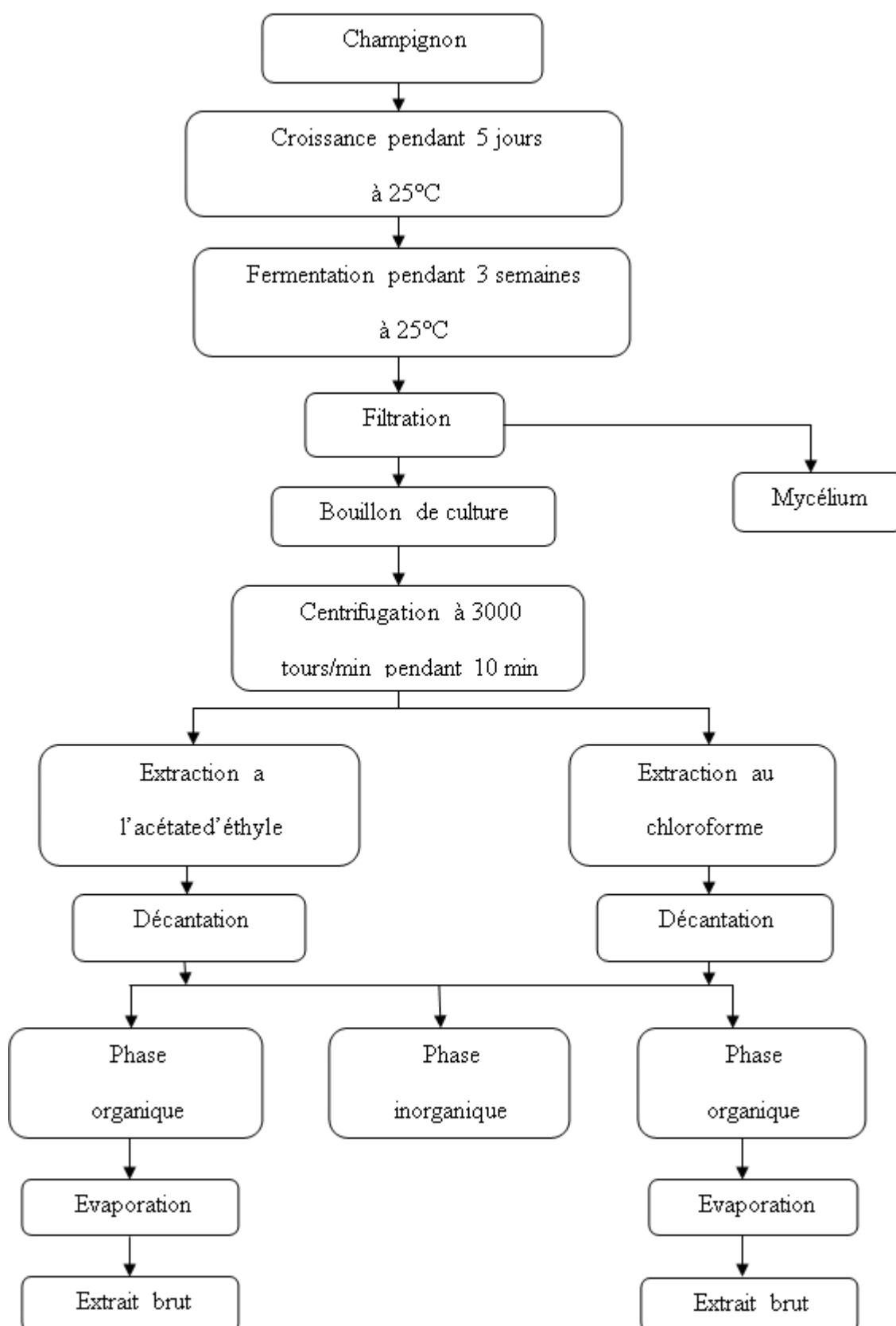


Figure 22: Fermentation et extraction des mycotoxine avec l'acétate d'éthyleet le chloroforme (et al., 2010).

2.8-Méthode de diffusion sur disques :

Afin de déterminer l'activité antimicrobienne des extraits obtenus par l'extraction à l'acétate d'éthyle et le chloroforme. La méthode de diffusion sur disques a été utilisée (**HAZALIN *et al.*, 2009**). Les boîtes contenant d' agar nutritif et du Sabouraud ont été inoculées avec 100 µl de levure respectivement (**MOHANTA *et al.*, 2008**; **YAMAÇ et BILGILI, 2006**).

Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 1mg/ml, 10 µl de chaque extrait ont été déposé à l'aide d'une pipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre) placés à la surface des géloses préalablement inoculés avec les bactéries et les champignons pathogènes, le DMSO a aussi été utilisé en tant que contrôle négatif (**HAZALIN *et al.*, 2009**).

Les boîtes ainsi terminées ont été mise pendant 2 heures à 4°C afin que les métabolites puissent diffuser ensuite elles ont été misent a incuber à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, 30°C pendant 48 heures pour la levure et 72 heures pour les champignons. Le diamètre des zones claires autour des disques révélant l'activité antimicrobienne des extraits ont été mesuré. Et les tests ont été effectués en triplicata (**YAMAÇ et BILGILI, 2006**).

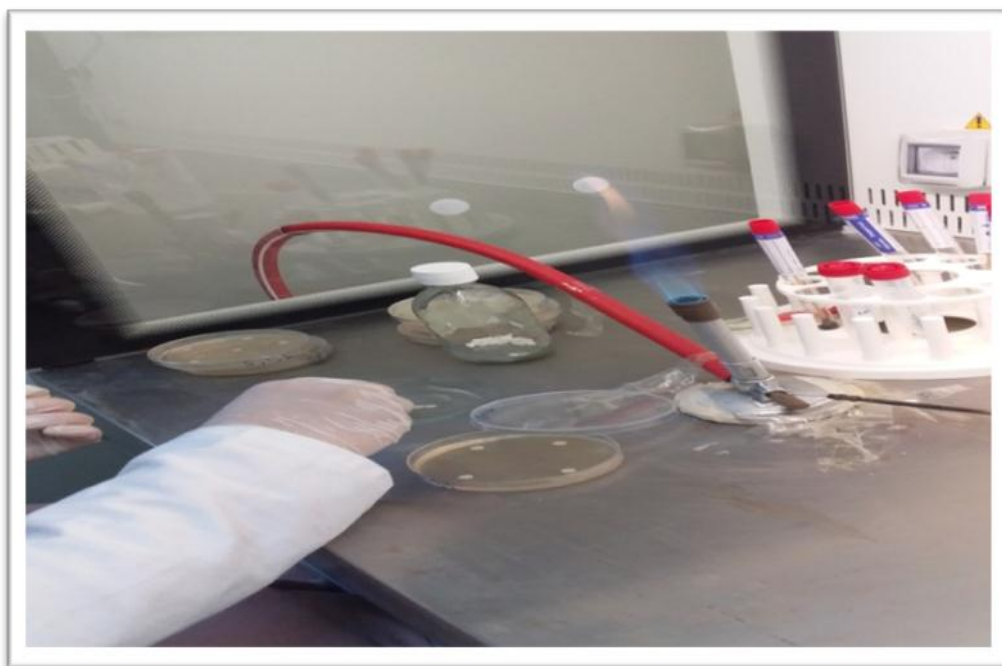


Figure 23 :Technique de diffusion sur disques

2.9-Réductions de la toxicité des souches fongiques isolées

Deux bactéries lactiques, isolées à partir de lait de chamelle, sont testées pour leur pouvoir antifongique suivant la méthode de diffusion par des disques, décrite par **TADESSE et al., (2004)**.

Les souches lactiques utilisées lors de la présente étude sont:

- ✓ Souche 01: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- ✓ Souches 02: *Streptococcus thermophilus*

Elle consiste à déposer des disques vierges imprégnés des surnageant obtenu après centrifugation de bouillon à 4000 tours / min pendant 15 min, à la surface des boîtes de Pétri (Sabouraud) préalablement inoculées par la souche cible. La boîte ainsi préparée est incubée à 37°C pendant 72 heures. L'inhibition se manifeste par la présence de zones claires autour d'un trouble formé par la croissance de souche cible.

Le diamètre de la zone d'inhibition est calculé à partir des bordures de la zone comprenant le diamètre du disque (6mm). L'inhibition est considérée positive lorsque le diamètre de la zone est supérieur à 1mm (**Allouche et al., 2010**).

Chapitre III

Résultats et Discussion

1. Isolement :

1.1 Méthode de dilution:

Une biodiversité fongique est assez importante (moisissure et levure) a été relevée, après effectuée une analyse mycologique de nos échantillons sur milieu czapek. Ceci est illustrée ci dessous dans la **figure 24** (différentes souches fongiques obtenues sur milieu czapek)..

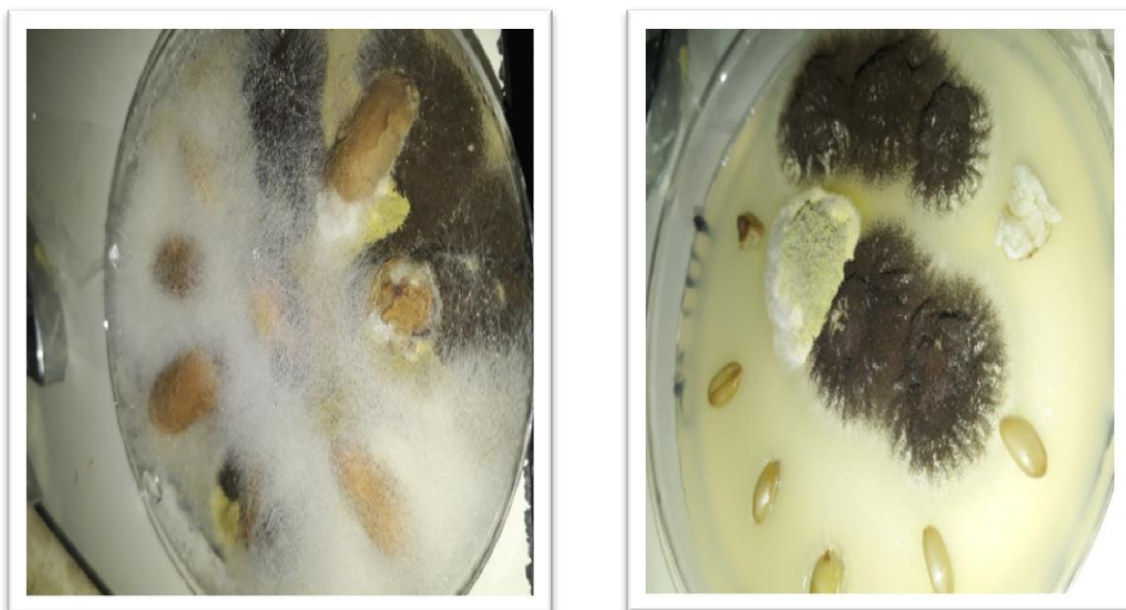


Figure 24: Colonies obtenues dans les graines contaminées d'arachide par la méthode de dilution.

1.2- Méthode d'ulster:

L'isolement des moisissures a été réalisé par la méthode d'ulster ou la méthode directe de **Botton et al., (1990)** qui repose sur le principe de stimulation du développement des moisissures par incubation des grains.

Pour l'identification des genres, nous avons examiné les caractères cultureux et morphologiques (**Bouchet., 2005**). En effet, pour les caractères cultureux nous avons: vitesse de croissance; couleur des colonies; texture du thalle; présence ou absence des mucorale ; couleur et changement de la couleur du milieu; présence ou absence d'odeurs caractéristiques (**figure 24**).



Figures 25 : Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé et d'arachide par la méthode d'ulster

Après l'isolement *d'aspergillus* par la méthode de dilution et méthode d'Ulster, nous obtenus des souche de couleur différente **Tableau 6 :**

Tableau 06: Souche obteneus dans les graines contaminées de blé et d'arachide par la méthode d'ulster Méthode de dilution.

Méthode	Méthode d'ulster		Méthode de dilution
L'échantillon	Blé	Arachide	Arachide
couleur de souche	Vert; noir	Vert; blanc; noir	Blanc; noir

- ✓ **Par la Méthode de dilution:** on a obtenu une seul souche d'aspergillus isolée à partir d'arachide .
- ✓ **Par la Méthode d'ulster:** on a obtenu trois souches d'aspergillus isolées à partir d'arachide et de blé.

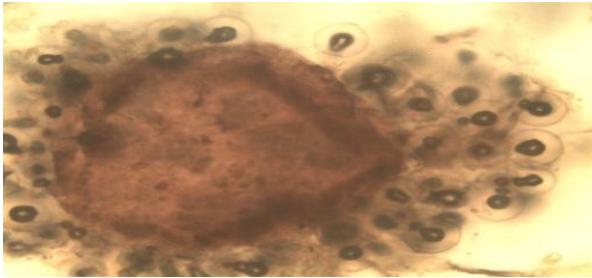
2- Identification des souches

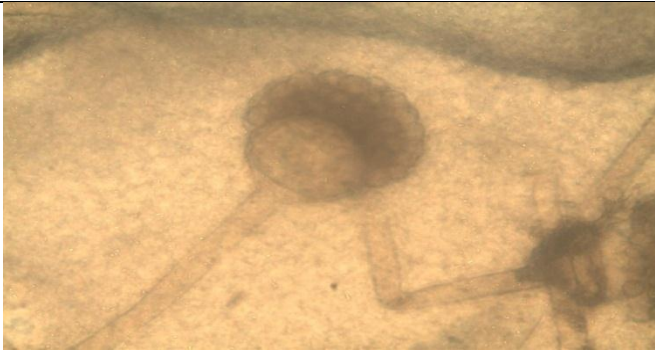
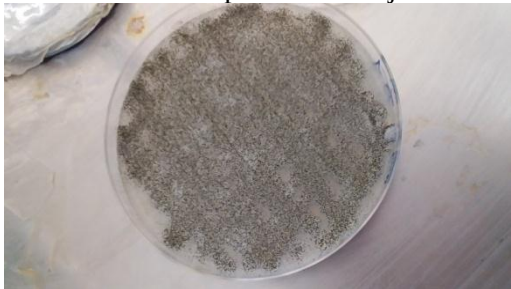
L'identification des trois souches d'aspergillus a été réalisée en tenant compte de leurs caractères macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boites), après une culture de 5 -7 jours sur milieu Sabouraud et PDA, et microscopiques (forme de thalle et des spores). Ceci est rendu possible grâce à la clé d'identification de **BARNETT ET HUNTER (1972)**. Les souches fongiques identifiées sont consignées dans le tableau 7.

D'après les résultats obtenus, on peut dire que nos isolats appartiennent probablement aux espèces suivantes respectivement:

- ❖ Aspergillus sp1: *Aspergillus flavus*
- ❖ Aspergillus sp2: *Aspergillus fumigatus*
- ❖ Aspergillus sp3: *Aspergillus niger*

Tableau 07 : Différents caractères macroscopique des isolats fongiques.

Souches Fongiques	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques	Genres et espèces (Pré-identification)
<i>Aspergillus sp1</i> (S1)	- Colonies de couleur verte, - Texture poudreuse, - Croissance de 5 à 7 jours. 	GX100  - conidiophore: long 1mm hyalin, verruqueux ,avec des aspérités . - vésicule: sphériques. - Phialides: directement insérées sur la vésicule ou portées par des métules. - conidies: globuleuses ,vert pâle, échinulées. - Tête: unisériée ou bisériée	Règne: champignons Division: Deuteromycotina Classe: Hyphomycètes Famille: Moniliaceae Ordre: Moniliales Genre: Aspergillus Espèce: <i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus sp2</i> (S2)	- Colonies bleu vert puis verte foncé. - Croissance rapide de 3 à 5 jours	GX100	Règne: champignons Division: Deuteromycotina Classe: Hyphomycètes Famille: Moniliaceae Ordre: Moniliales Genre: Aspergillus Espèce: <i>Aspergillus fumigatus</i>

			
		-condiophore: court ,lisse et incolore ,avec evasement progressif au sommet -Vésicule: Hémisphérique. -phialides: Directement groupées -Conidies: Globuleuses,échinulées -Tête: Unisériée	
		GX100	
<i>Aspergillus sp3</i> (S3)	- Colonies d'abord blanches puis granuleuses noires . - Croissance rapide de 5 à 7 jours. 	 -Conidiophore: très long lisse hyalin ou brunâtre -Vésicule: globuleuses -Phialides: insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules ,disposé sur tout le pourtour de la vésicule. -Conidies: globuleuses brunes échinulées souvent disposées en chaînes. -Tête: bisériée radiée ,noire à maturité.	Règne: champignons Division: Deuteromycotina Classe: Hyphomycètes Famille: Moniliaceae Ordre: Moniliales Genre: <i>Aspergillus</i> Espèce: <i>Aspergillus niger</i>

3-Détermination de l'activité antimicrobienne :

Après fermentation et extraction à l'aide de l'acétate d'éthyle et le chloroforme, les extraits des trois souches fongiques ont été examinés sur leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disques. Les différents extraits ont montré une activité antimicrobienne plus ou moins considérable, et où les zones d'inhibition allaient de 0 à 13 mm pour les extraits d'acétate d'éthyle, et de 0 à 12 mm pour les extraits chloroformiques. Les diamètres de toutes les zones d'inhibition sont résumés dans le tableau 8 et les figures 26,27,28 et 29; pour les différentes souches pathogènes testées respectivement.

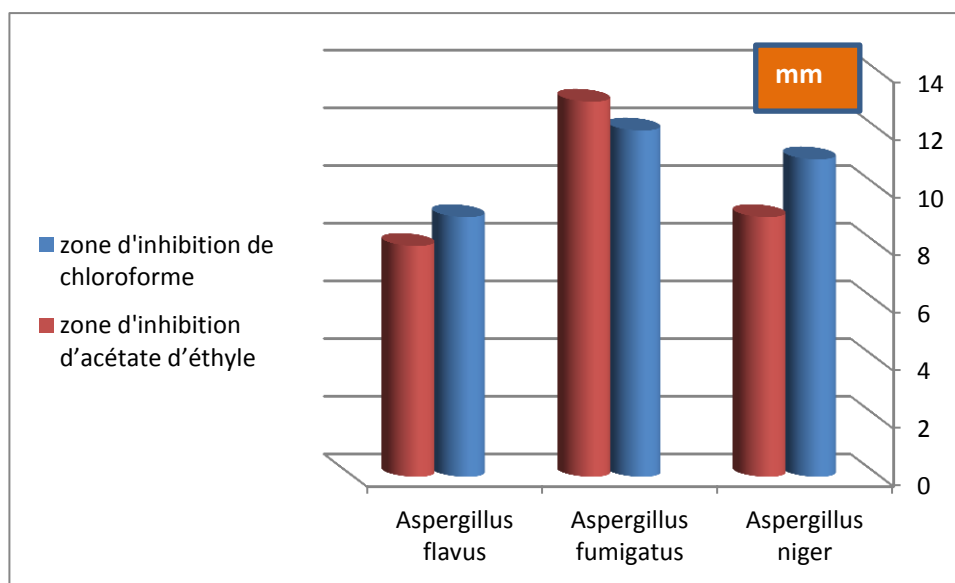


Figure 26: Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur *E. coli*

Pour *E. coli* : l'effet le plus important a été obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle par *Aspergillus fumigatus* dont la zone est de 13 mm, contrairement à faible effet par les extraits d'acétate d'éthyle d' *Aspergillus flavus* dont la zone est de 8 mm.

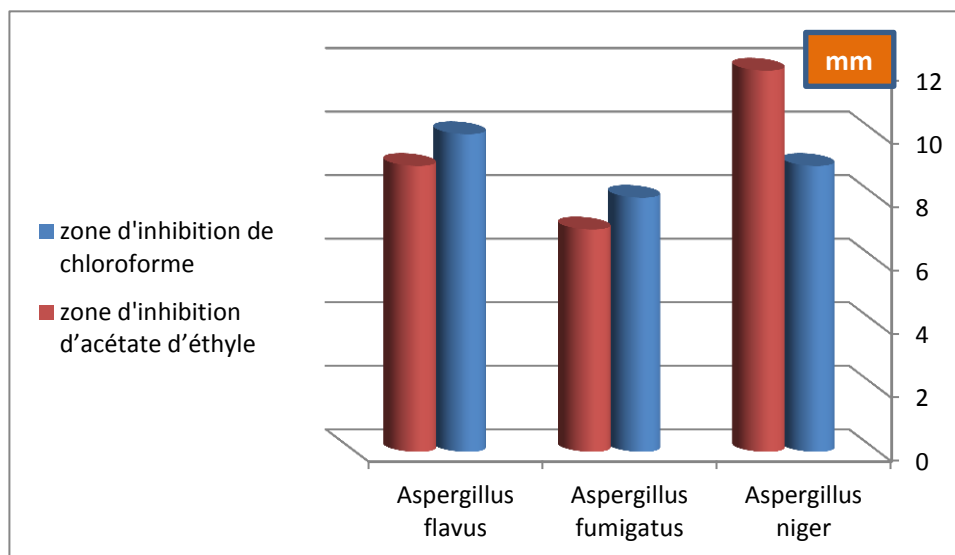


Figure 27: Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur *Klepsilla sp.*

Pour *Klepsilla*: l'effet le plus important a été obtenu par l'extrait d' l'acétate d'éthyle par *Aspergillus niger*, dont la zone est de 12 mm, contrairement à faible effet par les extraits d'acétate d'éthyle *Aspergillus fumigatus* dont la zone été de 7 mm.

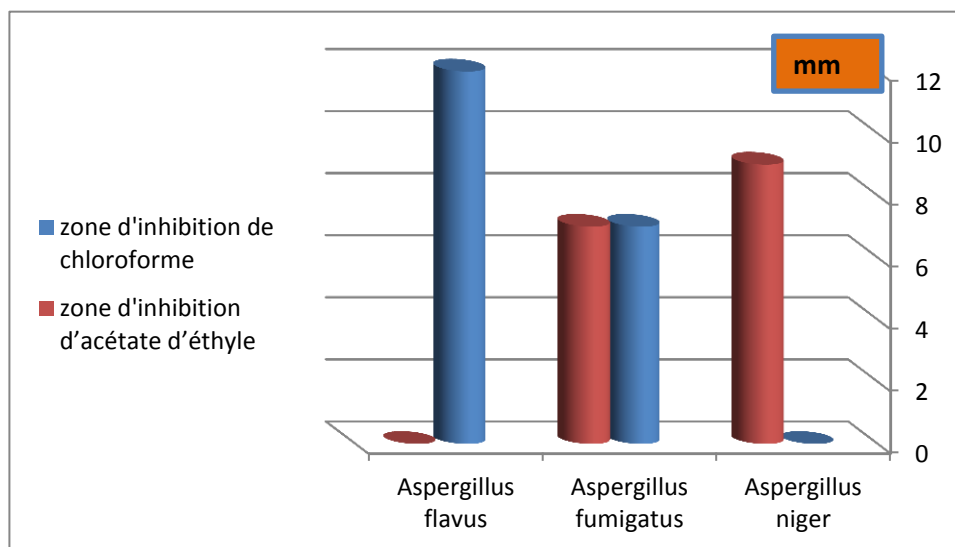


Figure28 : Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur *Listeria sp.*

Pour *Listeria*: l'effet le plus remarquable a été obtenu par l'extraits d'chloroforme par *Aspergillus flavus* dont la zone est de 12 mm, contrairement aucune effet sur les extraits d'acétate d'éthyle par *Aspergillus flavus* et l'extraits de chloroforme par *Aspergillus niger*.

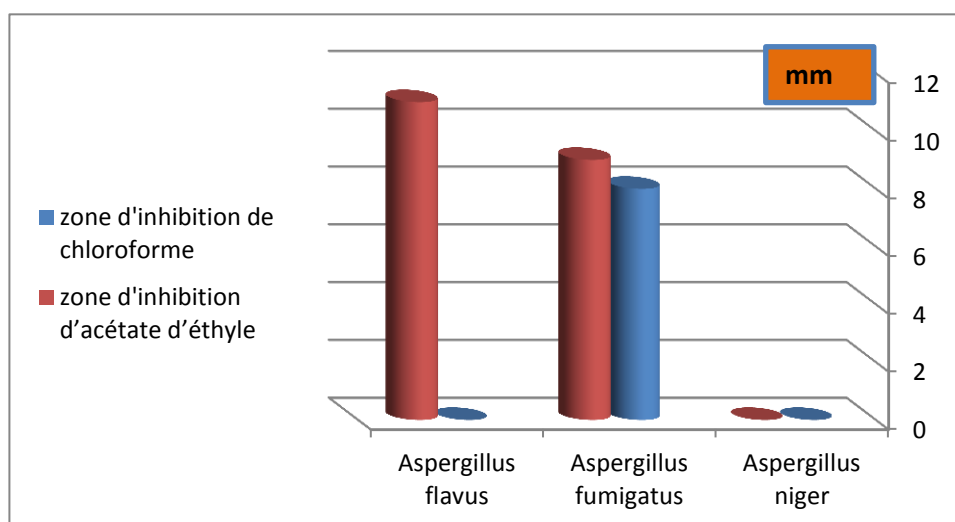


Figure 29 : Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle et le chloroforme sur *Candida sp.*

Pour *Candida*: l'effet le plus grand a été obtenu par l'extraits d'acétate d'éthyle par *Aspergillus flavus* dont la zone été de 12 mm, contrairement aucune effet sur les extraits d'acétate d'éthyle par *Aspergillus niger* et l'extraits de chloroforme par *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*;

D'après le tableau 8; pour les extraits d'acétate d'éthyle, l'effet le plus grand a été obtenu par l'extrait de *E.coli*. par *Aspergillus fumigatus* dont la zone été de 1.3 cm, contrairement à *Candida* par les extraits d'*Aspergillus niger* n'ont eu aucun effet. Pour les extraits chloroformiques, la plus importante zone d'inhibition a été observée chez l'extrait sur *E.coli*, qui a donné une zone d'inhibition de 12 mm contre *listeria* et *Candida* n'ont eu aucune effet sur souche 1 et souche 3. Le genre *Aspergillus* a montré une activité contre plusieurs microorganismes pathogènes par (MADKI *et al.*, 2010; MARIA *et al.*, 2005).

La différence obtenue entre l'effet des extraits d'acétate d'éthyle et chloroformiques, sachant que chaque solvant différent permet d'extraire des composés différents; peut-être expliquée par le fait que les composants bioactifs n'ont pas été bien dissous ou en très petite quantité, donnant peu d'effet aux extraits chloroformiques, et le plus probable c'est que les composants bioactifs ont la polarité qui est le mieux extraite par l'acétate d'éthyle (OGUNDARE *et al.*, 2006).

Tableau 08: Comparaison des extraits d'acétate d'éthyle et chloroformiques et leurs effets sur chaque de microorganismes pathogènes .

grain		Bactéries						Levure	
		<i>E.COLI</i>		<i>KLEPSILA</i>		<i>LISTERIA</i>		<i>CANDIDA</i>	
		Résultat	Diamètre	Résultat	Diamètre	Résultat	Diamètre	Résultat	Diamètre
S1	Chl	+	0.9cm	+	1	+	1.2	-	0
	Ac	+	0.8cm	+	0.9	-	0	+	1.1
S2	Chl	+	1.2cm	+	0.8	+	0.7	+	0.8
	Ac	+	1.3cm	+	0.7	+	0.7	+	0.9
S3	chl	+	1.1cm	+	0.9	-	0	-	0
	Ac	+	0.9cm	+	1.2	+	0.9	-	0

4- Réductions de la toxicité des souches fongiques isolées:

L'action inhibitrice des bactéries lactiques est déterminée par la méthode de la diffusion sur disques. Cette méthode a été réalisée pour la recherche de l'activité anti-*Aspergillus*.

Bactéries Lactiques	Souches d' <i>Aspergillus</i>					
	S1		S2		S3	
SN B1	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)
	+	10mm	-	0	-	mm8
SN B2	+	12mm	+	10mm	-	0

Tableau 09: résultat du test d'antagonisme des bactéries lactique 1 et2 , sur les souches d'*aspergillus*

Les résultats du test d'antagonisme à partir des extraits de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (B1)et *Streptococcus thermophilus* (B2) sont illustrés dans le tableau 9 et la figure 30.

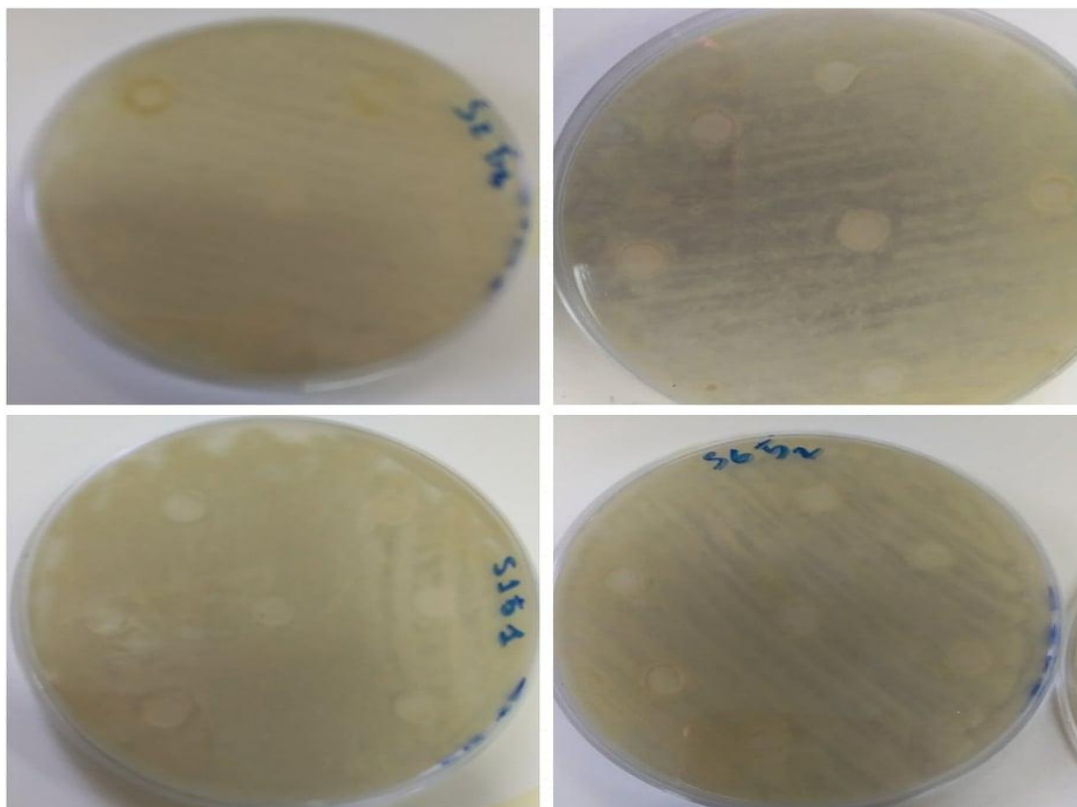


Figure 30: Quelques zones d'inhibition de différentes bactéries lactiques testés sur les isolats d'*Aspergillus*.

Les enjeux de ce travail étaient d'explorer la capacité des souches lactiques à inhiber la croissance de *Fusarium sp.* Ces études sont essentielles pour une meilleure utilisation de ces souches lactiques comme agents de bioprotection. D'après les figures 31 et 32;

Pour la souche *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, l'effet le plus importants a été obtenu sur *Aspergillus flavus* dont la zone été de 10 mm, contrairement, on n'assiste à aucun effet sur l'*aspergillus fumigatus*.

Pour la souches *Streptococcus thermophilus*: l'effet le plus grand a été obtenu sur *Aspergillus flavus* dont la zone été de 13 mm , par contre; sur l'*Aspergillus niger* n'ont eu aucune effet.

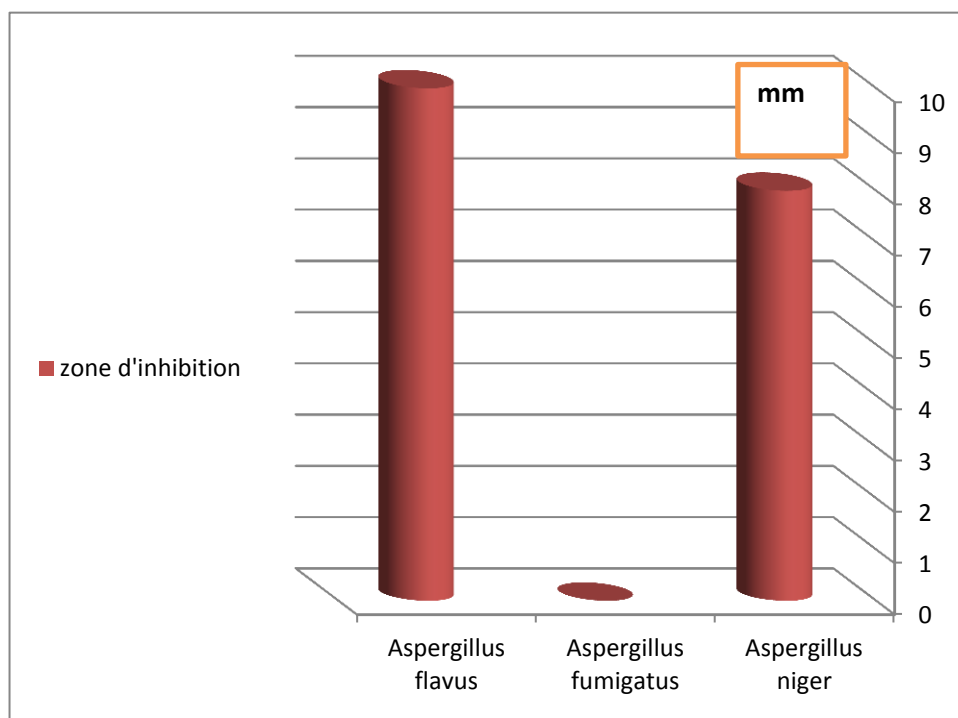


Figure 31: Variation de zone d'inhibition entre différentes souches d'*Aspergillus* et SN B1.

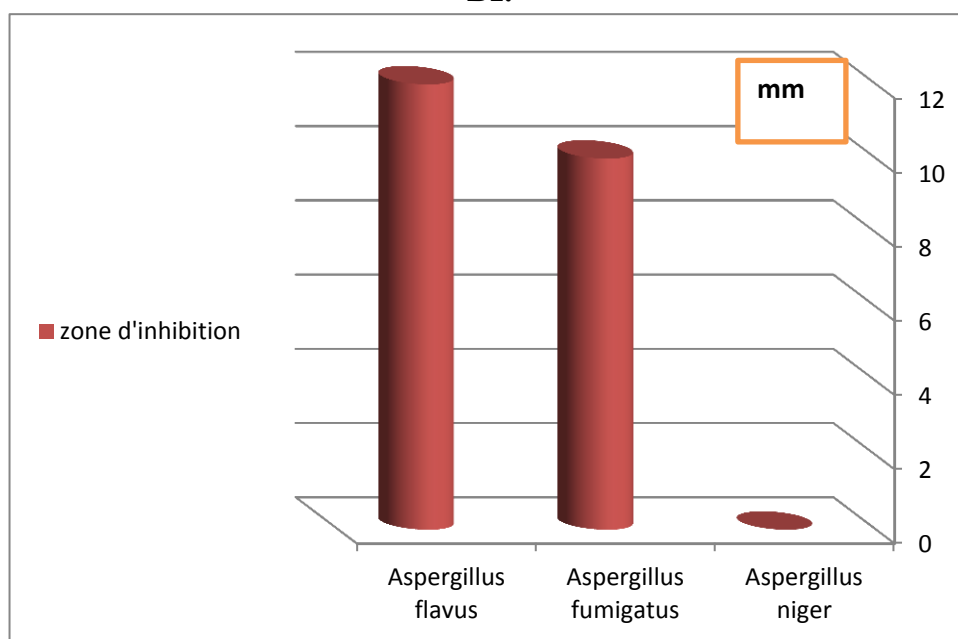


Figure 32 : Variation de zone d'inhibition entre différentes souches d'*Aspergillus* et SN B2.

Les bactéries lactiques présentant des activités anti fongiques ont été également isolées d'autres systèmes biologiques tels que les ensilages (**MAGNUSSON & SCHNÜRER, 2001**), le lait cru et les saucissons (**SCHWENNINGER et al ., 2005**). Les bactéries lactiques sont depuis des décennies utilisées pour réaliser la fermentation des produits et assurer leur conservation, elles ont de ce fait acquis le statut **GRAS (GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE) (DALIE, 2010)**

Les résultats les plus probants sont obtenus lorsque la bactérie est inoculée dans le milieu de culture 48 heures avant l'ensemencement du champignon. **SELON DALIE, (2010)**, une activation importante de la production de toxines associée à une réduction de croissance fongique est observée.

L'observation microscopique des zones de confrontation du champignon avec les bactéries lactiques a montré l'apparition d'un mycélium stérile, qui veut dire qu'il y a une inhibition de la sporulation. Ces résultats sont confirmés par les travaux de : **LAREF et GUESSAS, 2013 ; MUHIALDIN et HASSAN, 2011 et STRÖM, 2005**).

L'activité antifongique en utilisant le surnageant stérile a été aussi observée sur les Espèces *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis* et *Penicillium crustosum* par **NDAGANO (2012)**.

Toutes les bactéries lactiques utilisées dans cette étude (*Lactococcus lactis subsp. Lactis* et *Streptococcus thermophilus*) ont montré une activité antifongique vis-à-vis des différentes souches fongiques utilisées. Ces résultats sont les mêmes que celles de **BIANCHINI (2010)** qui a travaillé sur l'effet des composés antifongiques produits par *Lactobacillus plantarum* sur la croissance d'*Aspergillus spp.*

SELON LIET. (2012) et DALIE et al . (2010), l'inhibition des champignons et des mycotoxines par les bactéries lactiques apparaît comme une stratégie promotrice pour le bio-contrôle des moisissures qui contaminent les aliments et les végétaux.

Conclusion

Conclusion

Les champignons endophytes sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines médicaux, agricoles et industriels.

Le présent travail est une contribution à l'étude mycologique et recherche des souches toxigènes isolées à partir d'arachide et le blé commercialisés dans la ville d'El-Oued, cette étude dévoile la présence d'une grande biodiversité de contaminants fongiques.

Selon les résultats d'identification préliminaire de l'isolat obtenu basé sur l'étude macroscopique et microscopique, par diverses méthodes mycologiques, il semble que la méthode de dilution et la méthode directe d'Ulster permet un isolement plus performant des moisissures d'un point de vue qualitatif et quantitatif où les genres les plus dominants sont : *Aspergillus*, : *A.flavus*, *A.niger*, *A.fumigatus*.

L'effet inhibiteur des mycotoxines d'*Aspergillus* testés sur les bactérie pathogènes par la méthode des puits sur le milieu Muller-Hinton, montre une activité inhibitrice importante. Le test de diffusion sur disques a démontré que tous les extraits avaient une activité inhibitrice sur au minimum un ou plusieurs microorganismes pathogènes. les zones d'inhibitions varient pour les extraits d'acétate d'éthyle entre 0 et 13mm, et entre 0 et 12 mm pour les extraits chloroformique. Les extraits d'acétate d'éthyle avais plus d'effet que les extraits chloroformiques.

Les résultats obtenus montrent que parmi les champignons endophytes étudiés ceux appartenant au genre *Aspergillus*, présentent une activité antibactérienne sur les bactéries pathogènes *E.coli*, *Klebsilla*, *listeria* et une levure pathogène (*Candida albicans*) testées et une activité antifongique.

Les résultats de la méthode de diffusion sur disque de 02 souches de bactéries lactiques (***Lactococcus lactis subsp. Lactis***, ***Streptococcus thermophilus***) , ont montré que les bactéries lactiques utilisées sécrètent des substances bioactives et qui ont un effet anti-*Aspergillus*, avec une valeur de zone d'inhibition assez importantes.

Afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces microorganismes, il serait souhaitable d'effectuer des études complémentaires sur :

- ✓ Elargir l' échantillonnage en augmentant le nombre des variétés infectées par l'aspergillus.
- ✓ Effectuer une identification plus profonde; moléculaire.
- ✓ Caractériser les mycotoxines produit par les souches isolées.

Références bibliographiques

- ❖ **ABBAS, H.K., Smeda, R.J., Duke, S.O., Shier, W.T., 1997.** Fumonisin-Plant interactions, Bulletins of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, 5: 63-73.
- ❖ **AGRIOS G.N., 1994.** Plant pathology. 4^{ème} édition. Academic Press. New York: 60-75.
- ❖ **AYALEW, A., FEHRMANN, H., LEPSCHY, J., BECK, R., ABATE, D., 2006,** Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia, Mycopathologia, 162 1: 57-63.
- ❖ **ZINEDINE, A.M. BETBEDER, M. FAID AND M. BENLEMLIH, L. IDRISSE AND E.E 2004.** Creppy. Ochratoxin A determination in dried fruits and black olives from Morocco Alimentaria 359: 73-76.
- ❖ **BALAJEE, S. A., D. NICKLE, J. VARGA, AND K. A. MARR. 2006.** Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot Cell 5:1705-12.
- ❖ **BALAJEE, S. A., J. L. GRIBSKOV, E. HANLEY, D. NICKLE, AND K. A. MARR. 2005.** *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell 4:625-32. 31.
- ❖ **BARIK B. P., TAYUNG K., JAGADEV P. N. and DUTTA S. K.** Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity . European Journal of Biological Sciences 2010; 2: 8-16.
- ❖ **BEHNAS D , BENAYACHE A. 2015.** Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en microbiologie. Edition Berti:17
- ❖ **BENNETT, J. 2010.** An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.
- ❖ **BOTTALICO, A. 1998 .** *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. J Plant Pathol, 80 2: 85-103.
- ❖ **BOTTON B. ET AL. 1990.** Les moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Paris:18, 34-207.
- ❖ **BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGIER J.J., VAYSSIER Y. & VEAU P. 1999 .** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris: 12-426.

- ❖ **BOTTON. B, BRETON. A, FEVRE. M, GUY. P.H, IARPENT. J.P, SANGLIER. J.J, VAYSSIER. V AND VEAU.P, 1990.** Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Masson:20-191
- ❖ **BOUGHACHICHE.F, REGHIOUA. S, OULMI. L, ZERIZER.H ,KITOUNI.M, BOUDMEMAGH. A, BOULAHROUF. A, 2005:** Isolement d'actinomycetales productrice de substance antimicrobiennes à partir de la SEBKHA DE AIN MLILA. 23: 5-10.
- ❖ **BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA J. 1989.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris: 216-244.
- ❖ **BUTLER, M. J., DAY, A. W. 1998.** Fungal melanins: a review. Can. J. Microbiol., 44,1115-1136.
- ❖ **CAIRNS, V., HOPE, R., MAGAN, N. 2003.** Environmental factors and competing mycoflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. Aspects of Applied Biology, 68: 81-90.
- ❖ **CHABASSE.D, 2002.**Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale: 25-27.
- ❖ **CHAPELAND-LECLERC F, PAPON N, NOËL T, VILLARD J. 2005.** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicooses). Rev Fr Laboratoires;373:61–6.
- ❖ **CHRISTENSEN, C.M. 1974.** Storage of cereal grains and their products, American Association of Cereal Chemists, St.Paul, Minnesota, USA.
- ❖ **COLVIN, B.M., COOLEY, M., BEAVER, R.W., 1993.**Fumonisin intoxicosis in swine: clinical and pathologic findings, J. Vet. Diagn. Invest, 5:232-241.
- ❖ **CREPPY, EE. 2002.**Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. ToxicolLett, 127:19-28.
- ❖ **DALIE DKD. 2010.**Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs.PhDthesis, University of Bordeaux I, France.
- ❖ **DAVET P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris: 52-57.
- ❖ **DEVARAJU. R AND SATISH. S, 2011.** Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. Asian Journal of Experimental Sciences.2: 75-79.
- ❖ **GHERRAS S, EL HIMER N. 2017.** Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Toxicologie industrielle et environnemental :7-20 .

- ❖ **GUEZLANE.B, TBIBEL.N, KAHLOUCHE.B, ATMANI.G.S, 2011.** microbiologie Travaux Pratiques 2ème année TCB et LMD, 4ème édition corrigée.
- ❖ **GUIRAUD P.J. 1998.** Microbiologie alimentaire. Agro-Alimentaire. Edition DUNOD. Paris.
- ❖ **GUY LEYRAL, ELISABETH VIERLING, 2007.** microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires, 4ème éd,-Rueil –Malmaison : Doin ; Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, (Biosciences et techniques : Sciences des aliments).
- ❖ **HAZALIN N. A., RAMASAMY K., LIM S. M., WAHAB I. A., COLE A. L. AND ABDUL MAJEED A. B.2009.** Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine; 9: 46.
- ❖ **HENDEY K.H. & COLE C.E. 1993.** Areviws of mycotoxins in indoor air . J.Toxical.Environ. Health. 38 (2): 183- 198.
- ❖ **HESELTIME, C.W. 1976.** Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In: Mycotoxins and other fungal related food problems (edited by Rodricks, J.V.), Advances in Chemistry Series No. 149., American Chemical Society, Washington DC, USA.
- ❖ **HIBBETT, D. S., M. BINDER, J. F. BISCHOFF, M. BLACKWELL, P. F. CANNON, O. E. ERIKSSON, S. HUHNDORF, T. JAMES, P. M. KIRK, R. LUCKING, H. THORSTEN LUMBSCH, F. LUTZONI, P. B. MATHENY, D. J. MCLAUGHLIN, M. J. 2007.** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res 111:509-47 .
- ❖ **HYGHLY, E., ENRIGHT E.J., BANKS H.J. et CHAMP B.R.,1994.** Stored productprotection. Proceeding of the international working conference on Stored Product Protection.Volume 2. CAB International. Canberra :969-1083.
- ❖ **JONES, M. P., AND S. E. OROSZ. 2000.** Presented at the Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.
- ❖ **KUNKLE, R. A. 2003.** Fungal diseases. In Y. M. Saif (ed.), Diseases of poultry 11th Edition.
- ❖ **KUPFERSCHMIDT, K.2012.** Attack of the Clones." Science 337(6095): 636-638.
- ❖ **LACEY, J. 1986.** Factors affecting mycotoxin production. In: Mycotoxins and phycotoxins (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.

- ❖ **LANGSETH, W., HOIE, R., GULLORD, M. 1995.** The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science*, 45: 63-67.
- ❖ **LAREF N, GUESSAS B, KIHAL M. 2013.** Antifungal compounds production in different temperatures, pH and modified MRS Agar by *Lactobacillus* strains. *Journal of Biological Sciences* 13: 94-99.
- ❖ **LECLERC, F. C., PAPON, N., NOEL, T., VILLARD, J. 2005.** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoles). *Revue Francophone des Laboratoires*. 373:61-66.
- ❖ **LECLERC, H., IZARD, D., OHUSON, M., WATTRE, P. ET JAKUBCZAK. 1983.** *Microbiologie générale*: 26-27.
- ❖ **MADKI M. A., MANZOOR A. S., POWAR P. V. AND PATIL K. S. 2010.** Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2: 848-858.
- ❖ **MAGNUSSON, J., & SCHNURER, J. 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and environmental Microbiology*, 67: 1–5.
- ❖ **MAHEUX L . 1998.** Session on microbial contamination occupational and environmental health services agency , (edn) Health Canada. Canada.
- ❖ **MARIN, S., N. MAGAN, A.J. RAMOS, AND V. SANCHIS. 2004.** Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot.* 67: 1792-1805.
- ❖ **MEYER, A., DEIANA, J. & BERNARD, A. 2004.** *Cours de microbiologie générale*. Doin. France.
- ❖ **MITCHELL, D., PARRA, R., ALDRED, D., MAGAN N. 2004.** Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 439–445.
- ❖ **MOHANTA J., TAYUNG K. and MOHAPATRA U. 2008.** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Simlipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*; 5(2).
- ❖ **MOREAU C. 1974.** Moisissures toxiques dans l'alimentation Paris -Vie Masson et Cie 1974 471p

- ❖ **MUHIALDIN B J, HASSAN Z. 2011.** Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against *Aspergillus oryzae*. *American Journal of Applied Sciences* 8:447-451.
- ❖ **NDAGANO D. 2012.** Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de produits alimentaires fermentés et caractérisation de leurs métabolites inhibiteurs. PhD thesis, University of Liege, Belgium.
- ❖ **NELSON, P.E., PLATTNER, R.D., SHACKELFORD, D.D., DESJARDINS, A.E., 1992 .** Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in Section *Liseola* and by some related species, *Appl. Environ. Microbiol*, 5:986-989.
- ❖ **NICHOLSON, T.P., RUDD, B.A.M., DAWSON, M., LAZARUS, C.M., SIMPSON, T.J., COX, R.J. 2003.** Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. and Biol.*, 8:157-178.
- ❖ **NICKLIN J., GRAEME-COOK K., PAGET T., KILLINGTON R. 2000.** L'essentiel en microbiologie. Edition Berti: 210-216.
- ❖ **OMS. 1980.** Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. publications. De l'OMS. Genève:142.
- ❖ **PAMEL, E. V., VLAEMYNCK, G., HEYNDRIKX, M., HERMAN, L., VERBEKEN, A., DAESELEIRE, E. 2010.** Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an HPLC-MS/MS multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *MycotoxRes*: 1-11.
- ❖ **PATERSON, R. R. M. 2006.** "Fungi and fungal toxins as weapons." *Mycological research* 110(9): 1003-1010.
- ❖ **PITT, J.I. 2000.** Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38, 17-22.
- ❖ **POHLAND, A.E., NESHEIM, S., FRIEDMAN, L. 1992.** Ochratoxin A, a review, *Pure, Appl. Chem.*, 64: 1029-1046.
- ❖ **QUILLIEN, J-F. 2002.** Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA), Paris, France:1-24.
- ❖ **RAPER K.B. & FENNELL . 1965.** The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* 5: 163-176
- ❖ **REBOUX, G. 2006.** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46, 208-212

- ❖ **STANIER, R., DOUDOROFF, M., ADELBERGED, A. 1966.** Microbiologie générale. Deuxième édition Masson et éditeur 120, Boulevard saint germain, paris: 88.
- ❖ **STROHL, W.R. 1997.** Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed) Biotechnology of antibiotics, 2nd edn. Marcel Dekker. New York: 1-47.
- ❖ **STRÖMK. 2005.** Fungal inhibitory lactic acid bacteria-Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. PhD. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. ISSN 1652-6880, ISBN 91-576-7036-6
- ❖ **TABUC K. 2007.** Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de toulouse et de l'université de bucarest en pathologie, mycologie, génétique et nutrition :30-31.
- ❖ **TOUATI R, AMOR-CHELIHI L. 2016.** Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en microbiologie. Edition Berti.: 3-6.
- ❖ **VRABCHEVA, T., PETKOVA-BOCHAROVA, T., GROSSO, F., NIKOLOV, I., CHERNOZEMSKY, I.N., CASTEGNARO, M., DRAGACCI, S. 2004.** Analysis of ochratoxin A in foods. consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study, J Agric Food Chem., 52 (8): 2404-2410.
- ❖ **WHITLOW, W. ETHAGLER, W.M. 2001.** Mycotoxin contamination of feedstuffs – An additional stress factor for dairy cattle. in 25th symposium sur les bovins laitiers.
- ❖ **WILLIE, T.D, ET MOREHOUSE, L.G. 1977.** Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins:538.
- ❖ **XIAOLING C., XIAOLI L., SHINING Z., JUNPING G., SHUIPING W., XIAOMING L., ZHIGANG S. AND YONGCHENG L. 2010.** Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. Journal of Ecology and The Natural Environment: 017-024.
- ❖ **YAMAÇ M. AND BILGILI F. 2006.** Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. Pharmaceutical Biology; 44: 660-667.

Site web

- ❖ www.aspergillus.man.ac.uk, 2019
- ❖ <http://tpeconservation1s2.free.fr/moisissures.html>, 2020
- ❖ http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0097&org=74&c=UK&lang=FR
- ❖ [http://solabia.com/solabia/produits/Diagnostic.nsf/0/31622773AEA7D493C12574B8002CB7DF/\\$file/FT_G%C3%A9lose%20PDA_BK095-BM186_v8.pdf](http://solabia.com/solabia/produits/Diagnostic.nsf/0/31622773AEA7D493C12574B8002CB7DF/$file/FT_G%C3%A9lose%20PDA_BK095-BM186_v8.pdf).

Annexes

Annexes

Milieux de culture

Deux milieux de culture ont été préparés, afin de manifester le maximum des champignons de stockage.

Milieu de Czapek (Isolement d'*Aspergillus*)

- NaNO_3 3,0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- KCl 0,5 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g
- K_2HPO_4 1,0 g
- Saccharose 30,0 g
- Agar 15,0 g

Il est conseillé de compléter ce milieu par 1 ml d'une solution de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g dans 100 ml d'eau.

Milieu Pda (Isolment des champignons)

Pour 1 litre de milieu

- 200 g de pomme de terre
- 15 g sucre
- 20 g agar agar bactériologique
- 1 litre d'eau distillée

Résumé

ملخص

Abstract

Résumé

Aspergillus c'est un genre des champignons capable de synthèse les mycotoxine.

Dans ce travail nous avons étudié la contamination des aliments commercialisés à l'EL- Oued par les mycotoxines. Pour cela, un total d'échantillons, 1échantillons de blé et 1échantillons d'arachide ont été prélever dans différents points de vente la ville d'EL- Oued. Isolement et purification des genres *Aspergillus* dans les arachides et les Blé par deux méthodes : la méthode directe d'Ulster et la méthode classique de dilution Ceci permet de répertorier trois souches: *A.flavus*, *A.niger*, *A.fumigatus* Les extraits obtenus par l'extraction à l'acétate d'éthyle et le chloroforme des 3 souche *Aspergillus* ayant eu un résultat positif au dépistage de l'activité antimicrobienne, les zones d'inhibitions varient pour les extraits d'acétate d'éthyle entre 0 et 13mm, et entre 0 et 12 mm pour les extraits chloroformique.

Réductions de la toxicité des souches *Aspergillus* isolées par bactéries lactiques ayant eu un résultat positif par la méthode de diffusion sur disque, les zones d'inhibitions varient pour les *Lactococcuslactissubsp. Lactis* entre 0 et 10mm, et entre 0 et 12 mm pour *Streptococcus thermophilus*.

Mot clés : *Aspergillus* ,Contamination, Mycotoxines, Bactéries lactiques, Réduction de la toxicite.

ملخص

الرشاشيات جنس من أنواع الفطريات القادرة على تصنيع السموم الفطرية في هذا العمل، درسنا تلوث الأطعمة التي يتم تسويقها في مدينة الوادي بواسطة السموم الفطرية لهذا الغرض ، تم أخذ مجموعة من عينات ، عينة من القمح وعينة من الفول السوداني من اماكن مختلفة في مدينة وادي سوف. عزل وتنقية نوع الرشاشيات في الفول السوداني والقمح بطريقتين: طريقة أولستر المباشرة وطريقة التخفيف الكلاسيكية للسلاطات التي تم تحديدها هي *A. Flavus A.niger A. fumigatus* :

اختبار المستخلصات التي تم الحصول عليها عن طريق الاستخراج باستخدام أسيتات إيثيل وكلوروفورم من الرشاشيات اختلفت نتيجة مناطق التثبيط لمستخلصات أسيتات الإيثيل بين 0 و 13 ملم ، وبين 0 و 12 ملم لمستخلصات الكلوروفورم.

تخفيضات في سمية سلاطات *Aspergillus* المعزولة بواسطة بكتيريا حامض اللبنيك التي لها نتيجة ايجابية عن طريق تقنية نشر القرص ، تختلف مناطق التثبيط بين : 0 و 10 ملم ، وبين 0 و 12 ملم للعقدية المحبة للحرارة (*Streptococcus Lactis*) *Lactococcus lactis sub sp. Lactis* (*thermophilus*).

الكلمات المفتاحية : السموم الفطرية ، الرشاشية ، التلوث ، تخفيض السمية ، بكتيريا حامض اللبنيك.

Abstract

Aspergillus is a genus of fungi capable of synthesizing the mycotoxin In this work, the contamination of EL- Oued foodstuffs with mycotoxins was studied. A total of 1 samples of Wheat, 1samples of peanut were purchased from popular markets of EL- Oued. The mycological study by two methods: From ulster and the dilution method showed a large number of fungal contaminants. After microscopic identification The Identification strains are: *A.flavus* ,*A.niger*, *A.niger*. evaluate the antimicrobial of *Aspergillus* by Ethyl acetate and chloroform extracts obtained Inhibition zones vary between 0 and 13 mm for the ethyl acetate extracts, and from 0 and 13 mm for the chloroform extracts. Reductions in the toxicity of isolated *Aspergillus* strains by lactic acid bacteria having a positive result by the disk diffusion method, the zones of inhibition vary for *Lactococcuslactissubsp. Lactis* between 0 and 10mm, and between 0 and 12 mm for *Streptococcus thermophilus*.

Keywords: Mycotoxin , *Aspergillus*, lactic acid bacteria , Contamination, Reductions in the toxicity.