

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Institut National Agronomique El Harrach - Alger
المعهد الوطني للعلوم الفلاحية- الحراش- الجزائر

Thèse
Présentée par

BOUNAR Rekia

En vue de l'Obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques
Option : Phytopathologie et Amélioration Génétiques de la Résistance des Plantes aux Maladies

THEME

*Recherche sur l'état sanitaire des semences de
céréales et de légumineuses alimentaires :
Mise en évidence des mycotoxines et leur
effet sur la germination*

Devant le jury composé de :

| | | | |
|----------------------|--------------------------------|------------|----------------|
| Président : | M ^r . BELLAL M. | Professeur | INA El Harrach |
| Directeur de thèse : | M ^r . BOUZNAD Z. | Professeur | INA El Harrach |
| Examineurs : | M ^r . LAROUS L. | Professeur | UFA Sétif |
| | M ^r . GUERMOUCHE M. | Professeur | U.S.T.H.B. |
| | M ^r . KEDAD A. | Docteur | INA El Harrach |

Année Universitaire 2008 / 2009

SOMMAIRE

| | Pages |
|--|-------|
| Liste des abréviations | 1 |
| Liste des tableaux | 2 |
| Liste des figures | 3 |
| INTRODUCTION | 5 |
| I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES | 8 |
| A. Mycoflore | 8 |
| 1. Généralités sur les champignons toxigènes portés par les semences..... | 10 |
| 2. Importance des champignons phytopathogènes transmis par les semences..... | 11 |
| 3. Conditions de développement de la mycoflore portée par les semences..... | 12 |
| 3.1. Facteurs physico-chimiques..... | 12 |
| 3.2. Facteurs biologiques..... | 13 |
| B. Mycotoxines | 13 |
| 1. Présentation des principales mycotoxines des grains..... | 14 |
| 2. Origines et principaux mécanismes d'élaboration des mycotoxines..... | 15 |
| 3. Facteurs de production des mycotoxines..... | 15 |
| 4. Mycotoxines et mycotoxicoses..... | 16 |
| 4.1. Mode d'action des mycotoxines..... | 16 |
| 4.2. Effets néfastes des mycotoxines sur la santé des consommateurs..... | 16 |
| 5. Aflatoxines..... | 17 |
| 5.1. Structure et propriétés physico-chimiques..... | 18 |
| 5.2. Les voies de biosynthèse des aflatoxines..... | 19 |
| 5.3. Métabolisation et élimination des aflatoxines..... | 19 |
| 6. Principales méthodes de détection des mycotoxines dans les grains..... | 20 |
| 6.1. Méthodes biologiques | 20 |
| 6.2. Méthodes immunologiques..... | 21 |
| 6.3. Méthodes physico-chimiques..... | 21 |
| 7. Prévention et procédés de décontamination..... | 21 |
| 8. Législation..... | 23 |
| II. Matériel et méthodes | 25 |
| 2.1. Matériel végétal..... | 25 |
| 2.2. Matériel bactériologique | 26 |
| 2.3. Méthodes d'analyse sanitaire des semences..... | 26 |
| 2.3.1. Contrôle de la viabilité des graines | 26 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.1. Contrôle de la viabilité des graines | 26 |
| 2.3.2. Détermination de la teneur en eau des échantillons..... | 27 |
| 2.3.3. Isolement et purification de la mycoflore totale associée aux semences | 27 |
| 2.3.4. Identification de la mycoflore associée aux semences..... | 28 |
| 2.3.5. Description des caractères morphologiques et microscopiques des espèces toxigènes..... | 29 |
| 2.4. Effet de la mycoflore sur la faculté germinative des grains..... | 29 |
| 2.5. Techniques analytiques pour la recherche des aflatoxines dans les grains..... | 30 |
| 2.6. Test d'activité biologique des filtrats de culture..... | 30 |
| 2.7. Méthodes physiques de séparation et d'analyse des aflatoxines..... | 38 |
| 2.8. Test des aflatoxines comme herbicide naturel..... | 45 |
| III. Résultats et interprétations | |
| 3.1. Contrôle de la viabilité et détermination du taux d'humidité des échantillons | 48 |
| 3.2. Evaluation de la mycoflore totale..... | 49 |
| 3.3. Recensement de la mycoflore interne des lots analysés de céréales et de légumineuses..... | 60 |
| 3.4. Distribution de la contamination fongique dans les différentes parties de la graine..... | 60 |
| 3.5. Description des <i>Aspergillus flavus</i> et <i>parasiticus</i> sur différents milieux de culture..... | 67 |
| 3.6. Description des <i>Aspergillus flavus</i> et <i>parasiticus</i> selon la méthode de Pitt et Hocking..... | 70 |
| 3.7. Effet de la mycoflore sur la germination des grains..... | 71 |
| 3.8. Résultats de la fluorescence jaune verdâtre (BGYF) au niveau des grains d'arachides..... | 79 |
| 3.9. Test biologique de production d'aflatoxine..... | 79 |
| 3.9.1. Mise en évidence des espèces aflatoxinogènes..... | 79 |
| 3.9.2. Test d'activité biologique des filtrats de culture..... | 82 |
| a) Effet des filtrats de culture sur la croissance bactérienne..... | 82 |
| b) Effet de filtrat de culture sur la germination des grains de quelques plantes..... | 83 |
| 3.10. Production de métabolites secondaires excrétés dans le milieu YES liquide..... | 84 |
| 3.11. Production de métabolites secondaires élaborés dans le milieu YES solide..... | 86 |
| 3.12. Métabolites secondaires détectés dans les grains d'arachides..... | 89 |
| 3.13. Confirmation de l'identité d'aflatoxine..... | 91 |
| 3.14. Détection et dosage des aflatoxines par HPLC..... | 94 |
| 3.15. Effet herbicide de l'aflatoxine..... | 97 |
| Discussion..... | 100 |
| Conclusion et perspectives..... | 106 |
| Références bibliographiques..... | 109 |
| Annexes..... | 122 |

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

A.F : Aspergillus flavus

A.P. : Aspergillus parasiticus

AFB1 : Aflatoxine B1

AFB2 : Aflatoxine B2

AFG1 : Aflatoxine G1

AFG2 : Aflatoxine G2

AFNOR : Association Française de Normalisation

AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

ARN : Acide ribonucléique

ATA : Aleucie Toxique Alimentaire

Aw : Activité de l'eau (Activity of water)

BGYF : Bright greenish yellow fluorescence

(Fluorescence jaune verdâtre)

°C : degré Celsius

Cacqe : Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage

CAST : Council for Agricultural Science and Technology

CCM : Chromatographie sur couches minces

CG : Chromatographie en phase gazeuse

cm : centimètre

CNCC : Centre National de Contrôle des Céréales

CPA : Acide cyclopiazonique

CO₂ : Gaz carbonique

CYA : Czapek Yeast Extract Agar

DON : Déoxynivalénol

Eliza : Enzyme – Linked immuno Sorbent Assay

(Dosage immunoenzymatique en sorption)

FAO : Food and Agricultural Organization of the United Nations

(Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

Fig. : Figure

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point

(Système de contrôle et d'analyse des risques des points critiques pour leur maîtrise)

HPLC: High performance liquid chromatography

(Chromatographie liquide haute performance)

INPV : Institut National de la Protection des Végétaux

ITGC : Institut Technique des Grandes cultures

INA : Institut National Agronomique

MEA : Malt Extract Agar

min : minute

ml : millilitre

µg : Microgramme (10⁻⁶)

Nacl : Chlorure de sodium

ng : nanogramme (10⁻⁹)

O₂ : Oxygène

OTA : Ochratoxine A

PCR : Polymerase chain reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

Rf : Rapport frontal

tab : Tableau

Kg : Kilogramme

TFA : Acide trifluoroacétique

UE : Union Européenne

UV : Ultraviolet

V : Volume

YES : Yeast Extract Agar

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Principales mycotoxines et leurs producteurs..... | 14 |
| Tableau 2 : Troubles induits par les principales mycotoxines des grains..... | 17 |
| Tableau 3 : Liste des lots de céréales analysés..... | 25 |
| Tableau 4 : Liste des lots des légumineuses collectés..... | 26 |
| Tableau 5 : Viabilité des grains et taux d'humidité chez les différents lots des céréales..... | 49 |
| Tableau 6 : Viabilité des grains et taux d'humidité chez les différents lots des légumineuses..... | 50 |
| Tableau 7 : Mycoflore pathogène chez les céréales..... | 52 |
| Tableau 8 : Mycoflore pathogène chez les légumineuses..... | 53 |
| Tableau 9 : Mycoflore intermédiaire (pathogènes secondaires et saprophytes) chez les céréales..... | 55 |
| Tableau 10 : Mycoflore intermédiaire: (Parasites secondaires et saprophytes) chez les légumineuses..... | 56 |
| Tableau 11 : Mycoflore du stockage chez les céréales..... | 57 |
| Tableau 12 : Mycoflore du stockage chez les légumineuses..... | 58 |
| Tableau 13 : Recensement de la mycoflore interne chez les lots des céréales collectés..... | 61 |
| Tableau 14 : Recensement de la mycoflore interne chez les lots des légumineuses collectés..... | 63 |
| Tableau 15 : Présence des agents fongiques dans toutes les parties de la graine des céréales..... | 65 |
| Tableau 16 : Présence des agents fongiques dans toutes les parties de la graine des légumineuses..... | 66 |
| Tableau 17 : Description d' <i>Aspergillus flavus</i> selon la méthode de Pitt et Hocking..... | 70 |
| Tableau 18 : Description d' <i>Aspergillus parasiticus</i> selon la méthode de Pitt et Hocking..... | 71 |
| Tableau 19 : Taux de contamination totale et de germination chez les céréales..... | 75 |
| Tableau 20 : Taux de contamination totale et de germination chez les légumineuses..... | 77 |
| Tableau 21 : Mesure des diamètres des zones d'inhibition par ordre croissant des souches testées sur <i>Bacillus subtilis</i> | 82 |
| Tableau 22 : Pourcentage des grains inhibés de blé dur et lentille..... | 84 |
| Tableau 23 : Réactions caractéristiques des différents révélateurs chimiques avec les métabolites secondaires des isolats dans le milieu YES liquide..... | 88 |
| Tableau 24 : Réactions caractéristiques des différents révélateurs chimiques avec les métabolites secondaires des souches dans le milieu YES solide | 90 |
| Tableau 25 : Réactions caractéristiques des différents révélateurs chimiques avec les composés d'extraits d'arachides..... | 92 |
| Tableau 26 : Détermination du poids sec du mycélium et concentration de l'AFB1..... | 94 |
| Tableau 27 : Taux en pourcentage des grains inhibés chez la cuscute..... | 98 |

| Liste des figures | Pages |
|--|-------|
| Figure 1 : Principaux caractères morphologiques du genre <i>spergillus</i> | 10 |
| Figure 2 : Stock des grains: Un biotope artificiel..... | 11 |
| Figure 3 : Structure des aflatoxines..... | 18 |
| Figure 4 : Différentes voies d'élimination d'AFB ₁ | 20 |
| Figure 5 : Carte topographique (Mycotoxines dans le monde)..... | 24 |
| Figure 6 : Réglementation en matière des mycotoxines dans le monde..... | 24 |
| Figure 7 : Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines..... | 34 |
| Figure 8 : CCM monodimensionnelle..... | 40 |
| Figure 9 : CCM bidimensionnelle..... | 41 |
| Figure 10 : Cuve de développement..... | 41 |
| Figure 11 : Migration en ccm..... | 42 |
| Figure 12 : Représentation schématique de l'épreuve de confirmation par l'acide trifluoroacétique... | 43 |
| Figure 13 : Schéma de principe de chromatographie en phase liquide (CLHP)..... | 45 |
| Figure 14 : Taux de contamination de céréales par les trois types de champignons..... (<i>Aspergillus, Penicillium et Fusarium</i>) | 59 |
| Figure 15 : Taux de contamination de légumineuses par les trois types de champignons..... (<i>Aspergillus, Penicillium et Fusarium</i>). | 59 |
| Figure 16 : Pourcentage de contamination totale des semences des céréales..... | 62 |
| Figure 17 : Pourcentage de contamination totale des semences des légumineuses..... | 64 |
| Figure 18 : Résultats de l'effet de la mycoflore sur la germination des grains..... | 73/74 |
| Figure 19 : Effet de la mycoflore sur la germination des grains des céréales..... | 76 |
| Figure 20 : Effet de la mycoflore sur la germination des grains des légumineuses..... | 78 |
| Figure 21 : Résultats du test biologique montrant les zones d'inhibition de croissance bactérienne. | 81 |
| Figure 22 : Zones d'inhibitions obtenues à partir de l'extrait de filtrat de culture de la population ₁ | 83 |
| Figure 23 : Effet de filtrat de culture sur la germination des grains..... | 84 |
| Figure 24 : Chromatogrammes pris sous UV montrant les métabolites secondaires excrétés par les souches aflatoxinogènes dans le milieu YES liquide | 86 |
| Figure 25 : Chromatogrammes pris sous UV montrant les métabolites excrétés par les souches aflatoxinogènes dans le milieu YES solide..... | 89 |
| Figure 26 : Chromatogrammes pris sous UV montrant les métabolites dans les grains d'arachides..... | 91 |
| Figure 27 : Résultat de l'épreuve de confirmation par l'acide trifluoroacétique..... | 93 |
| Figure 28 : Résultats de CCM bidimensionnelle..... | 93 |

| | |
|---|-------|
| Figure 29 : Résultats de la purification de AFB1..... | 93 |
| Figure 30 : Séparation des aflatoxines par HPLC des extraits de semence d'arachides..... | 95/96 |
| Figure 31 : Effet de l'aflatoxine sur la germination des grains de cuscute..... | 98 |

Liste des planches

| | |
|---|----|
| Planche I : Principaux genres toxigènes de semences..... | 9 |
| Planche II : Culture des isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> et <i>parasiticus</i> pour la production d'aflatoxine... | 33 |
| Planche III : Technique d'extraction et de purification de la toxine..... | 37 |
| Planche IV : Test biologique de la germination des grains des plantes parasites..... | 47 |
| Planche V : <i>Aspergillus flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur différents milieux de culture..... | 69 |
| Planche VI : Résultats du test de fluorescence jaune – verdâtres (BGYF)..... | 80 |
| Planche VII : Résultats d'inhibition de la germination des grains des plantes parasites..... | 99 |

Liste des annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe I : Les voies de biosynthèse des aflatoxines..... | 122 |
| Annexe II : législation actuelle pour les aflatoxines dans certains pays du monde | 123 |
| Annexe III : Composition des milieux de culture utilisés..... | 124 |
| Annexe IV : Analyse statistique Calcul de r (coefficient de corrélation)..... | 125 |
| Annexe V : Analyse de variance (STATI TCF)..... | 126 |

INTRODUCTION

La production d'une alimentation de qualité pour une population mondiale croissante demeure un défi majeur du 21^{ème} siècle. Face aux faibles performances agricoles et en raison d'une pression démographique forte dans le contexte d'une amélioration relative du pouvoir d'achat des consommateurs, le recours aux importations agricoles et alimentaires devient inévitable.

Les céréales et les légumineuses alimentaires sont des aliments de base de l'alimentation humaine et animale vu leur pouvoir nutritionnel important. Les principales espèces cultivées dans la famille des *poaceae* sont : blé tendre, blé dur, orge, maïs, riz, avoine,...etc.

Les légumineuses viennent après les céréales comme culture alimentaire dans le monde. Elles sont riches en protéines de qualité, et en association avec les céréales, elles forment la base de l'alimentation de milliards de personnes. Les légumes secs qui font partie de la grande famille des *fabaceae* constituent un réservoir de vie et d'énergie, les espèces les plus importantes sont le haricot, la lentille, le pois chiche, la fève, le pois ...etc.

De ce fait, le poids économique de ces productions est considérable et conditionne pour une grande part la compétitivité des filières agro-alimentaires. Si l'aspect quantitatif de ces productions est très important, les aspects qualitatifs et sanitaires ne sont pas moindres compte tenu des exigences des utilisateurs et des consommateurs. Un des critères importants de la qualité sanitaire est la contamination en microorganismes pathogènes et en mycotoxines. La présence de champignons et de toxines dans les aliments est devenue un sujet de préoccupation pour les professionnels de la santé, ainsi que pour le commerce mondial. A cet effet, la sécurité alimentaire a fait l'objet d'intenses efforts internationaux ces dernières années. Les risques pris en compte sont à la fois microbiologiques et toxicologiques.

Quelque soit son origine, la semence est extrêmement vulnérable aux microorganismes et constitue un réservoir de leur métabolites secondaires. L'association étroite entre le pathogène et la semence, le transport des microorganismes pathogènes par les semences infectées, l'accroissement considérable du volume des échanges commerciaux nationaux et internationaux constituent un moyen particulièrement efficace de transmission de nombreuses maladies (Cappelli, 1997) et favorisent la diffusion des organismes pathogènes d'un pays, voire d'un continent à l'autre (Neergaard, 1981). Ce qui contribue à l'aggravation des risques de propagation de ces contaminations (Waterworth, 1993).

Les champignons constituent la cause principale d'altérations diverses. C'est la conséquence de leur grande diversité et de leur remarquable facilité d'adaptation et d'évolution.

Dans ce contexte cette mycoflore envahit de nombreux produits agricoles de base, dont les céréales, les légumineuses et les oléagineux, qui sont un capital important pour les pays en développement

(PED). A l'échelle mondiale la FAO estime que chaque année 5 à 10 % des grains récoltés sont perdus, altérés et même déclassés à cause de leur mauvais état sanitaire et qu'au moins un quart (25%) de cette récolte est contaminée par les mycotoxines, liées à des attaques des champignons pouvant se développer en pré ou en post récolte, notamment pendant le stockage. L'action pernicieuse des champignons affecte toute la chaîne alimentaire, allant de la production à la consommation. Ils sont susceptibles de produire des effets dommageables voire catastrophiques, lorsqu'un ensemble de conditions environnementales ainsi que des techniques incorrectes de lutte, de récolte, de stockage et de transport sont réunies (FAO, 2003). Ils sont incriminés dans l'altération profonde des qualités nutritionnelles, technologiques, organoleptiques et à l'extrême à la destruction pure et simple du grain. Ce qui engendre des pertes qualitatives et quantitatives de récolte, de produits de consommation, et par conséquent une moindre disponibilité de nourriture au niveau mondial.

En plus, les mycotoxines peuvent être transférées des produits d'alimentation animale aux produits alimentaires d'origine animale (lait, viandes, œufs) issus de bétail et volaille consommant des céréales contaminées (Yiannikouris et Jouany, 2002). Les mycotoxines se repartissent parmi les produits de mouture et leurs dérivés (Schollenberger et al., 2002 ; Brera et al., 2006), leur grande stabilité thermique fait qu'elles sont plus résistantes que les champignons les ayant synthétisées.

La structure chimique des mycotoxines est très diversifiée, ce qui explique leurs effets biologiques différents. Elles peuvent générer des risques aussi bien pour le végétal que pour les consommateurs qui s'en nourrissent, qu'il s'agisse, de l'homme ou de l'animal (Richard et Payne, 2003, Trucksess, 2006).

A cet effet, des réglementations actuelles exigent un contrôle selon des normes phytosanitaires bien définies, qui imposent des taux limites de contamination. Au-delà de certains seuils elles font l'objet d'un rejet immédiat des lots contaminés. Il importe alors d'une part de lutter contre les mycotoxines et leurs producteurs aussi bien au champ qu'au stockage, et d'autre part de procéder parallèlement à l'étude de la mycoflore par des techniques traditionnelles (Neergaard ,1979) ou par des méthodes qui s'appuient sur les informations génétiques et la biologie moléculaire (Kumeda et Assao, 2001; DeAguire et al., 2004; Schabereiter-Gurtner et al., 2007; Campa et al ., 2008). Quant aux mycotoxines, les méthodes chromatographiques s'imposent de plus en plus, grâce à la performance de leur séparation et détection (Park et al., 1990)

En raison des conséquences néfastes de la mycoflore et des mycotoxines, considérées comme des contaminants alimentaires les plus significatifs en terme d'impact sur la santé publique, la sécurité alimentaire, la productivité animale et le commerce national et international.

(Krysinska-Traczyk, et al., 2007 ; Pitt, 2000), la croissance des champignons et la production des mycotoxines retiennent de plus en plus l'attention dans le monde entier. En Algérie, bien que les céréales et les légumineuses alimentaires soient les cultures vivrières de première importance pour la population, il n'existe qu'un certain nombre de travaux et projets touchant, les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires en végétation. Quant à l'évaluation de la qualité sanitaire de la semence, entre autre, sa pathologie n'a reçu jusqu'à présent que peu d'intérêt et n'a pas bénéficié de l'attention qu'elle mérite.

Cet état de fait nous a amené à entreprendre une recherche sur la qualité sanitaire des principales semences alimentaires dans notre pays.

Les objectifs de ce présent travail sont donc d'évaluer la qualité phytosanitaire de semences des céréales et des légumineuses alimentaires quant à leur contamination éventuelle en mycoflore et en mycotoxines. Dans une première partie nous allons réaliser une revue bibliographique rappelant succinctement les principaux champignons des semences, leurs métabolites secondaires, les effets néfastes qu'ils peuvent occasionner ainsi que les facteurs qui influencent leur croissance et la production des mycotoxines, rappeler également les principales méthodes de détection et les différents moyens de prévention.

Dans la partie expérimentale, nous allons dans un premier volet faire une analyse de la mycoflore des semences, il s'agit précisément :

- d'isoler, d'identifier puis d'inventorier la mycoflore totale (Mycoflore du champ, intermédiaire et du stockage) présente dans les différents lots collectés,
- de calculer pour chaque agent fongique isolé sa fréquence d'apparition et son abondance,
- d'estimer la valeur des différents lots par la mise en évidence de l'action de la flore fongique portée par la semence sur la faculté germinative des grains.

Le deuxième volet est consacré à une analyse chimique concernant les mycotoxines et plus particulièrement les aflatoxines, pour cela il s'agit :

- d'évaluer le potentiel toxigènes des isolats d'*Aspergillus* du groupe *flavus* isolées de différents lots collectés,
- d'étudier l'effet de filtrat de culture sur la germination des grains,
- de caractériser ces mêmes lots pour leur teneur en mycotoxines,
- de mettre en évidence l'effet de l'aflatoxine comme herbicide naturel.

I- Données

bibliographiques

A. Mycoflore

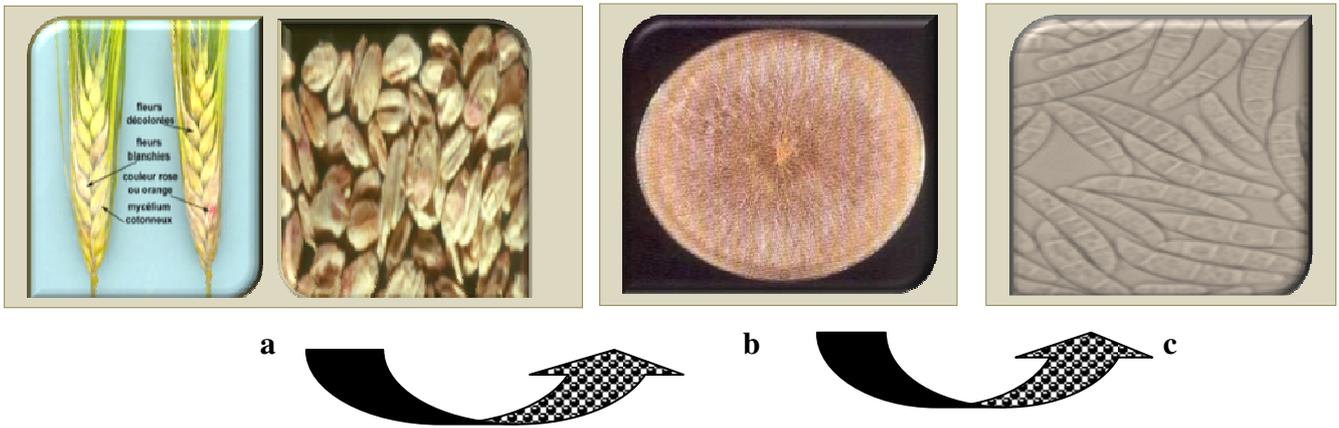
Les champignons sont des contaminants fréquents de nombreux substrats des végétaux et de certains produits d'origine animale. Certains d'entre eux présentent un grand intérêt pour l'Homme en effet, ils contribuent à la biodégradation et au recyclage des matières organiques, d'autres sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie de biotechnologie, notamment pour la fermentation, la production d'enzymes, la production d'acides organiques, et la production d'antimicrobiens. Leur présence peut donc améliorer la qualité organoleptique du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines. Sur 11000 espèces fongiques, environ une centaine est potentiellement toxigène et une cinquantaine peut se rencontrer sur les aliments peu hydratés (Cahagnier, 1998). Du champ au silo les espèces présentes dans les grains évoluent et l'on distingue une flore du champ, puis une flore intermédiaire à laquelle se substitue une flore de stockage. Certaines ne présentent pas des risques sanitaires, les espèces à risque mycotoxinogènes (Planche I) sont principalement les *Fusaria* au champ ainsi que les *Aspergilli* et les *Penicillia* au cours du stockage (AFSSA, 2006).

Le genre *Aspergillus* P.Michelli ex Link appartient au phylum *Ascomycota*, la classe des *Eurotiomycètes*, sous classe des *Eurotiomycetidae*, l'ordre des *Eurotiales* et à la famille des *Trichocomaceae*. Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embranchement des *Ascomycotina* par leur mode de reproduction sexuée

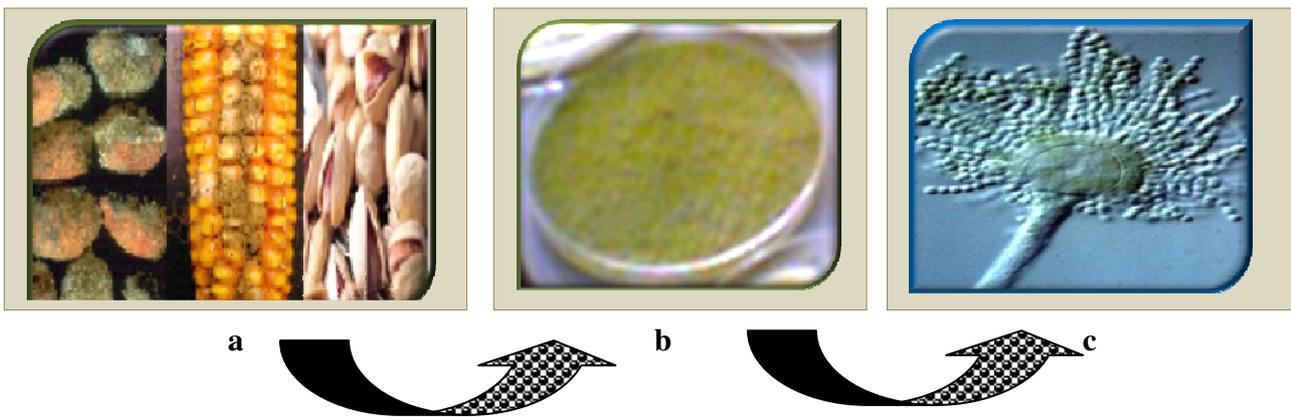
Le stade anamorphe : Il correspond au stade asexué. Le mycélium végétatif est formé d'hyphes septés colorés ou non.

Une cellule hyphale à parois épaisse donne naissance au conidiophore. Celui-ci se termine par une vésicule de forme allongée, elliptique ou globuleuse donnant naissance aux cellules fertiles conidiogènes portant les conidies. La zone fertile de la vésicule s'appelle le stérigmate. Il peut être unisérié : les cellules conidiennes naissent alors directement des phialides ; ou bisérié : présence des métules entre la vésicule et les phialides.

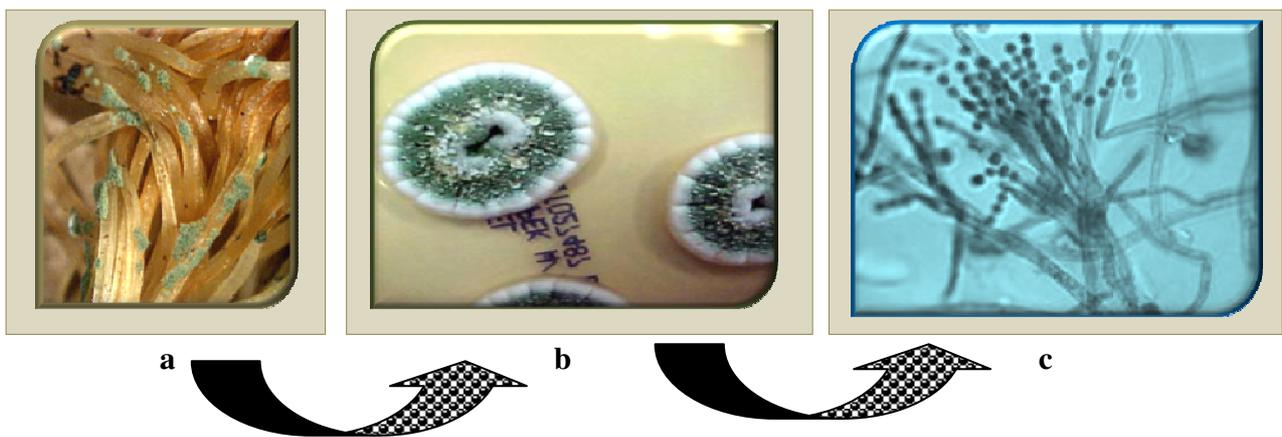
Le stade téléomorphe : Il correspond au stade sexué et se caractérise par la présence de cleistothèces. Ce sont des formations sclérifiées à parois épaisses.



Contamination par le genre *Fusarium*



Contamination par le genre *Aspergillus*



Contamination par le genre *Penicillium*

a : Contamination du végétal **b** : Présentation sur le milieu de culture **c** : Aspect microscopique

Planche I : Principaux genres toxigènes de semences

Références Website

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (fig.1) (Botton et al., 1990). De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines parmi lesquels *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare et *A. nomius* Kurtzman et al., 1987 sont les principaux producteurs des aflatoxines. Les *Aspergilli* ont une large répartition géographique, ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les produits agricoles. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Jarvis et Miller, 2005). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux.

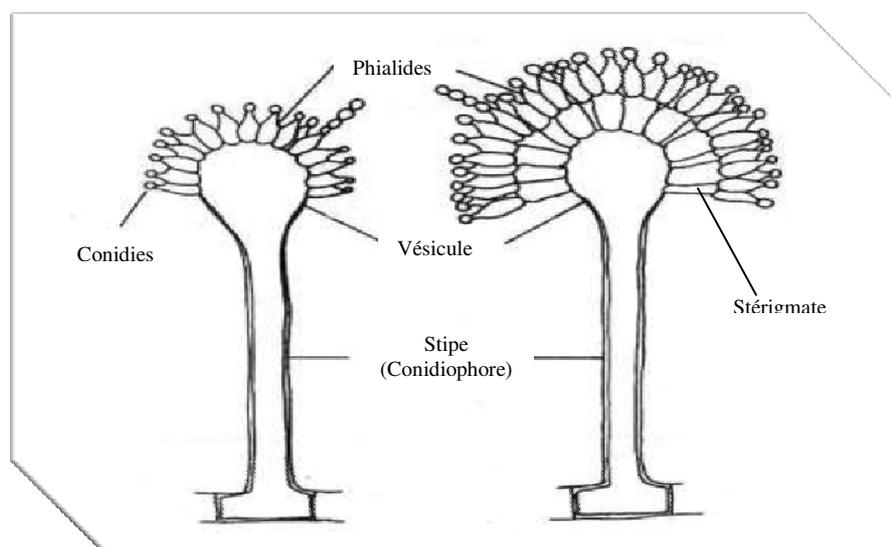


Figure 1: Principaux caractères morphologiques du genre *Aspergillus* Link

(Samson, 1981)

1. Généralités sur les champignons toxigènes portés par les semences

Les champignons toxigènes des semences sont caractérisés par des hyphes qui croissent et constituent le mycélium ou thalles, responsables de la production des enzymes et des mycotoxines (Larpen et Larpen-Gourgand 1997). En effet un stock de semence entreposé dans un silo est un système écologique constitué d'organismes vivants (fig. 2) placé dans un environnement caractérisé par son microclimat. C'est un biotope artificiellement créé par l'homme dont l'équilibre instable peut être détruit par des agressions d'ordre abiotique (facteurs du milieu) et biotique (facteurs biologiques). Castegnaro et Pfohl Leszkowicz (2002) ont classé les champignons toxigènes en quatre groupes suivant le moment auquel ils se développent :

- Pathogènes pour la plante (exemple *Fusarium graminearum* élaborant la zearalénone)
- Champignons poussant et produisant une mycotoxine sur plantes sénescents ou stressés.
(*Fusarium moniliforme* produisant les fumonisines et *Aspergillus flavus*, les aflatoxines)
- Champignons colonisant à l'origine la plante et prédisposant celle-ci à la contamination par les mycotoxines lors de la récolte (*Fusarium* spp produisant les Trichothécènes)
- Champignons existant dans le sol et dans le matériel de putréfaction (*Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum*) élaborant tous deux l'ochratoxine A.

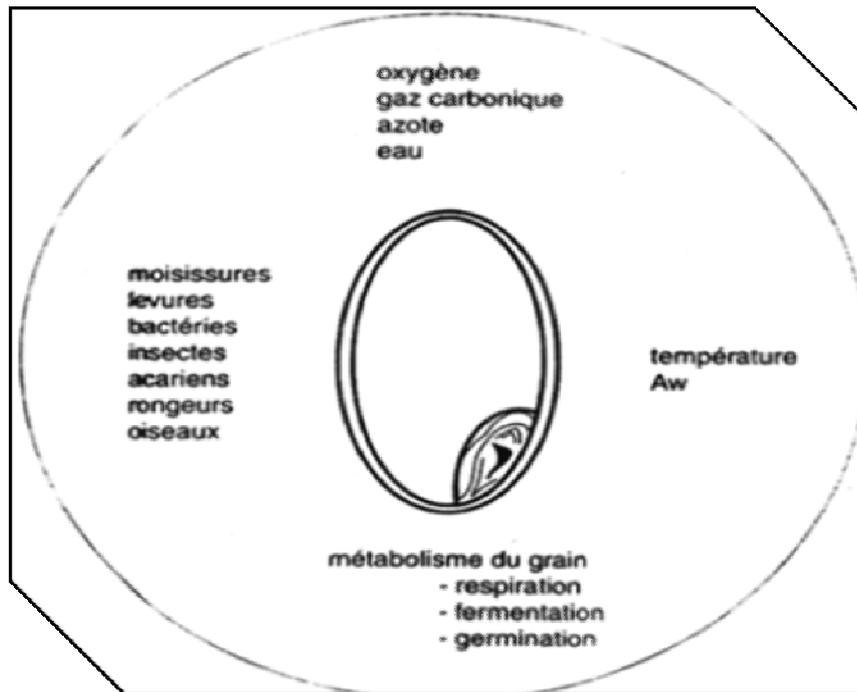


Figure 2 : Stock des grains ; Un biotope artificiel (Feuillet, 2000)

2. Importance des champignons phytopathogènes transmis par semences

Selon Cappelli (1997), l'importance des pathogènes transmis par semences peut - être rapportées à différentes causes :

- Les semences permettent la conservation des pathogènes à travers le temps et l'espace
- Les pathogènes vivent plus longtemps que la semence qui les porte et il y a une transmission prolongée
- Les champignons pathogènes présentent une action directe sur la germination (formation des semences mortes, réduction de la vigueur, attaque en pré émergence et fontes de semis)
- La transmission des champignons par les semences peut entraîner la sélection préférentielle des souches pathogènes comme par exemple, les races physiologiques des champignons

- Avec l'emploi des semences infectées, il y a distribution uniforme dans le champ des foyers d'inoculum primaire qui permettent sa large dissémination dans la culture et / ou l'infection permanente d'un sol
- Introduction du pathogène dans les régions encore indemnes
- Après l'implantation d'un pathogène, il est possible outre, la contamination d'un sol, l'infection des nouveaux hôtes, des mauvaises herbes et la conservation dans les repousses des hôtes infectés.
- Les plantes issues des semences infectées normalement sont colonisées par le pathogène plus uniformément par rapport à celles infectées durant les stades successifs de développement
- Parfois dans un nouveau milieu, se réalisent des conditions plus favorables à la croissance.

3. Conditions de développement de la mycoflore portée par la semence

Comme tout micro-organisme, la croissance fongique est aussi dépendante d'un certain nombre de paramètres. Les conditions environnementales (humidité, température, l'aération, la composition du substrat et les interactions entre les microorganismes) peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser d'autres (CAST. ,2003 ; Mitchell et al., 2004)

3.1. Facteurs physico-chimiques

a) Disponibilité en eau

L'activité d'eau (a_w) correspond à l'état de liberté de l'eau dans le substrat, disponible pour la croissance des microorganismes. C'est ainsi que les champignons capables de se développer à de faibles activité d'eau ($a_w < 80\%$) sont qualifiés de xérophiles (aimant les milieux sec), ceux qualifiés de mésophiles (aimant les milieux moyens) dont les spores germent à une a_w comprise entre 80 et 90 % et enfin les champignons hygrophiles (préfèrent les milieux humides), dont les spores germent à plus de 90 % HR. (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002; Ramirez et al., 2006)

b) La température

La plupart des champignons sont généralement mésophiles, se développent entre 15 et 30°C avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C (Moreau, 1996). Il existe aussi des espèces psychrophiles, comme, par exemple, *Penicillium expansum* ; il peut se développer lentement, à des températures basses, inférieures à 4°C. (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Chez les espèces thermophiles comme *Aspergillus flavus*, la température optimale pour sa croissance est comprise entre 25 et 35° C, mais elle peut se développer bien dans un intervalle plus large (15- 45° C) et parfois jusqu'à 50° C (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Les *Aspergilli* prédominent sous les climats chauds, les *Penicillia* sont capables de se développer sous des climats tempérés et les *Fusaria* sont associés aux climats froids (Giorni et al., 2007, Krysinska-Traczyk et al., 2007).

c) Besoin en oxygène

La plupart des champignons sont réputés aérobies (Pitt et Hocking, 1985) cependant, certains peuvent se contenter de traces d'O₂ d'autres enfin résistent à l'anaérobiose très stricte (Cairns-Fuller et al., 2005).

d) La lumière

Les rayons lumineux n'ont en général pas d'action sur la croissance des champignons, mais peuvent agir sur la sporulation (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997).

e) Nature du substrat

Les microorganismes comme tout être vivant ont besoin d'éléments nutritifs pour vivre. La composition chimique du substrat joue un rôle sélectif d'où, il y a une spécificité d'hôte pour les champignons (Le Bar, 1988)

f) Acidité du milieu

Les champignons se développent à des pH compris entre 3 et 8. Cependant, les milieux acides sont mieux tolérés que les milieux alcalins, où le pH optimum pour le développement des champignons est compris entre 5 et 6,5 (Davet et Rouxel, 1997).

3.2. Facteurs biologiques

La rupture des défenses naturelles des grains par les insectes et les acariens facilite la pénétration de l'inoculum. La présence simultanée d'autres microorganismes provoque une concurrence entre eux d'une part pour le substrat et d'autre part pour l'espace envahi (Lutz et al., 2003).

B. Mycotoxines

Les mycotoxines sont restées négligées jusqu'au début des années 1960, lorsque une terrible épidémie est survenue en Angleterre et qu'en l'espace de quelques mois plus de cent milles dindons sont morts. Un lien fut établi entre tous les cas signalés; la cause de la maladie a été imputée à un facteur toxique présent dans la farine d'arachide brésilienne, utilisée comme source de protéine pour l'alimentation animale. Le facteur toxique semblait être produit par deux champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Sargeant et al., 1961). Le nom d'aflatoxine est donné à cette matière toxique qui actuellement reste l'un des groupes les plus étudiés. Depuis, de nombreuses

autres familles ont été mises en évidence : Ochratoxine, Zearalenone Citrinine, Trichothécènes (vomitoxine, déoxynivalénone, nivalénol, toxineT₂...), Patuline et le dernier grand groupe étant, les Fumonisines (Gelderblom et al., 1988).

» Définition des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques sans rôle évident pour la biologie des champignons, de faible poids moléculaire, élaborées par certaines espèces fongiques à différents stades de leur développement, au niveau de plusieurs produits agricoles bruts ou transformés et sous des conditions environnementales bien spécifiques. Ces substances toxiques sont des exotoxines excrétées dans les substrats, et peuvent provoquer par ingestion des maladies dites mycotoxicoses.

1. Présentation des principales mycotoxines des grains

Plus de trois cent métabolites secondaires sont produits par les microorganismes (Bhatnagar et al., 2002), certains sont toxiques pour les microorganismes et on les appelle des **antibiotiques**, d'autres sont toxiques pour les végétaux et on les appelle des **phytotoxines** et enfin les **mycotoxines** sont toxiques pour les consommateurs (animal et Homme).

Tableau 1: Principales mycotoxines et leurs producteurs

| Principales mycotoxines | Champignons producteurs | Substrats correspondants | Conditions d'apparition |
|---|---|--|-------------------------------------|
| Aflatoxines (B ₁ .B ₂ .G ₁ .G ₂) | <i>Aspergillus flavus</i> <i>A.parasiticus</i> <i>A. nomius</i> | Arachides, maïs, riz, blé, noix, amandes ... | Climats tropicaux et subtropicaux |
| Ochratoxine (A-B-C-D) | <i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i> <i>P. verrucosum</i> | Céréales (maïs, orge...) | Climat frais et tempéré au stockage |
| Zearalenone | Toutes espèces de <i>fusarium</i> | Céréales (maïs, orges, sorgho...) | Mycoflore ubiquiste |
| Trichothécènes (DON-Vomitoxine-Nivalenol-Fusarenone-Toxine 2.) | Toutes espèces de <i>fusarium</i> | Céréales en particulier (maïs, blé, orge, avoine...) | Mycoflore ubiquiste |
| Fumonisines | <i>Fusarium moniliforme</i> <i>F.proliferatum</i> | Céréales en particulier (maïs, blé, orge et avoine...) | Climats tempérés Climats chauds |
| Patuline | <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> . | Céréales, Fruits et dérivés | Climats tempérés |

Bennett et Klich, 2003

Parmi les principales mycotoxines qui apparaissent assez souvent dans les grains et qui présente une importance agro économique et sanitaire, on distingue plusieurs familles. Le tableau 1 donne un

aperçu de quelques mycotoxines, indiquant les espèces qui les génèrent, les denrées infestées et les conditions de leur apparition.

2. Origines et principaux mécanismes d'élaboration des mycotoxines

Les mycotoxines appartiennent à des groupes chimiques très variés, comprenant des polycétoacides (Aflatoxines, Ochratoxine, Patuline, Citrinine, Acide Penicillique, Zearalénone, Stérigmatocystine), des dérivés terpéniques (Fusarenone, déoxynivalenol - toxine-T₂) et des acides aminés (acide aspergillique).

La présence de ces toxines dans un substrat peut être le résultat de trois mécanismes différents:

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

3. Facteurs de production des mycotoxines

Les métabolites secondaires sont très hétérogènes; leur mécanisme de régulation se révèle très complexe et dépend :

- Des facteurs intrinsèques :

La fréquence des souches toxigènes ainsi que le potentiel toxigénique des différentes souches dépendent de l'espèce, voire du génotype de la souche considérée (Yin et al., 2008).

- Des facteurs extrinsèques :

L'activité hydrique nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszkowicz, 2002), alors que la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique (Keller, 1997). Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique (Cairns-Fuller et al., 2005), en effet une augmentation de la teneur en CO₂ et une réduction en O₂ provoquent une chute importante en aflatoxines (Taniwaki et al., 2001).

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais le plus souvent, légèrement inférieure (Pfohl-Leszkowicz, 2002).

La composition qualitative et quantitative du substrat peut influencer la production des mycotoxines (Payne et Hagler, 1983). Les insectes et les acariens prédisposent les grains à la production des mycotoxines (Hell et al., 2000 ; Huber et al., 2007).

4. Mycotoxines et mycotoxicoses

4.1. Mode d'action des mycotoxines

Les sites majeurs du mécanisme d'action des mycotoxines se situent à différents niveaux:

Certaines mycotoxines agissent au niveau moléculaire en provoquant des dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique). Le site préférentiel est au niveau de la guanine et est à l'origine de mutation (Stettler et Sengstag, 2001)

Certaines mycotoxines telles les Trichothécènes interagissent directement avec les enzymes et les coenzymes (Raymond et al., 2003). Le métabolisme des lipides est aussi affectée par certaines mycotoxines (Shen et al., 1994). Dans certains cas, les mycotoxines découplent les phosphorylations oxydatives et inhibent certaines chaînes respiratoires (Aléo et al., 1991).

Cependant, certaines toxines affectent la paroi cellulaire et les membranes et d'autres sont à l'origine de la diminution des défenses immunitaires (Minervin, 2005).

Pour qu'une substance soit considérée comme responsable d'une mycotoxicose chez l'homme, cinq conditions doivent être remplies (Pfohl-Leszkowicz, 1999) :

- Existence de la mycotoxine dans l'alimentation,
- Exposition de l'homme à cette mycotoxine,
- Corrélacion entre l'exposition et l'incidence de la maladie,
- Reproductibilité des symptômes caractéristiques chez les animaux,
- Mode d'action similaire chez l'homme et les animaux.

4.2. Effets néfastes des mycotoxines sur la santé des consommateurs

En épidémiologie, l'analyse indique que 20 à 50 % du cancer humain est dû par voie orale, trachéale et par contact cutané (Strickland et Groopman, 1995, Williams et al., 2004) et en médecine humaine et vétérinaire, trois types de maladies ont été distingués:

- Les mycoses (Kumar et al., 2004).
- Les allergies (Benjamin, 2003)
- Les mycotoxicoses: Chaque mycotoxine possède son propre effet nocif tant sur la santé animale que sur la santé humaine (Hussein & Brasel, 2001). Les symptômes varient selon l'âge, l'espèce, le sexe, le stress, l'effet hormonal et le régime nutritionnel.

Les mycotoxines actuellement considérées comme ayant une importance à l'échelle mondiale, et les maladies qu'elles provoquent sont présentées dans le tableau 2.

Certaines mycotoxines lorsqu'elles sont réunies dans la même ration alimentaire, produisent un effet additif et d'autres produisent un effet synergique qui augmentent la toxicité aiguë et qui aboutit à la

mort après diverses manifestations. En revanche la toxicité chronique se produit à long terme est à l'origine du cancer. Les impacts nocifs de certaines mycotoxines peuvent aussi avoir des conséquences biotoxicologiques cytotoxiques ou encore tératogènes.

Tableau 2: Troubles induits par les principales mycotoxines

| Mycotoxines | Organe cible | Symptômes | Références |
|----------------|---|--|--|
| Aflatoxines | Foie, Système nerveux Système immunitaire | Tumeurs hépatiques ; encéphalopathie Pas de défense de l'organisme | Li et al., 2001; Pfohl-Leszkowicz, 2000; AFSSA, 2006 |
| Ochratoxine | Rein Tube digestif | Néphrotoxique - Carcinome Rénaux - Mutagène | Stoev et al., 2001; Pfohl-Leszkowicz, 2007 Castegnaro et al., 2006 |
| Zearalenone | Appareil reproducteur | Troubles de la reproduction (Inflammation ou atrophie des Organes génitaux, Avortement et stérilité). | AFSSA, 2006 Farnsworth et Trenholm, 1983 Kaliyamurthy et al., 1997 |
| Trichothécènes | Appareil digestif Moelle osseuse | Troubles gastro-intestinales, ATA Dysfonctionnement des plaquettes sanguines | AFSSA, 2006 Wang et al., 1998 |
| Fumonisines | Œsophage, Foie Cœur Squelette osseux | Cancers de l'œsophage et du foie, Troubles cardiovasculaires et retard de croissance | Smith et al., 2000, Gelderblom et al., 2001 ; Marasas et al., 2004 |
| Ptuline | Peau, système, immunitaire, foie Système nerveux | Neurotoxicité, Pas de défense de l'organisme, mycoses de différents organes | AFSSA, 2006 Rosenthal et al., 2000 |

5. Aflatoxine

Le terme Aflatoxine a été donné à l'ensemble des éléments toxiques et ce n'est que par la suite que fut séparée et identifiée chacune des molécules (B₁, B₂, G₁ et G₂) composant ce mélange toxique (Assao et al., 1963). Parmi la vingtaine d'aflatoxines naturelles caractérisées à ce jour, seules quatre d'entre elles (AFB₁, AFB₂, AFG₁ et AFG₂), sont des contaminants primaires, se retrouvant dans les produits agricoles (arachide, maïs, coton, pistache, amandes, grains de céréale, fruits sec etc.) (Vargas et al., 2001; Robens et Cardwell, 2003), à la surface du sol et dans les résidus des végétaux (Accinelli et al., 2008). Récemment elles ont été détectées par Arranze et al. (2006) dans les plantes médicinales et par Trucksess et al. (2002) dans le régime alimentaire des enfants. La section *flavi* (groupe *flavus*) englobe au moins trois espèces: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* (Kurtzman et al., 1987)

D'une manière générale les mâles sont deux fois plus sensibles que les femelles et les sujets jeunes, en particulier les nouveaux nés sont beaucoup plus sensibles que les adultes (Moreau, 1974). L'expression numérique de la toxicité est : **DL50**

La DL50 se traduit par la quantité de substances toxique entraînant la mort de 50 % individus d'un même lot.

5.1. Structure et caractéristiques physico-chimiques

5.1.1. Structure des aflatoxines

Les travaux de Nesbitt et al. (1962) ont abouti à la séparation de deux composés voisins l'un de coloration bleue (B pour Blue) ayant pour formule brute $C_{17}H_{12}O_6$ et un poids moléculaire de **312**, l'autre de coloration verte (G pour Green) ayant pour formule brute $C_{17}H_{12}O_7$ et un poids moléculaire de **328**. Trois différentes structures de l'aflatoxine (fig. 3) sont caractérisées par des structures de coumarine bifurannique (Cahagnier, 1998) auxquelles sont accolées des pentanones pour la série B, remplacés par des lactones pour la série G, alors que la série M possède un groupement hydroxyle. Les aflatoxines G diffèrent des B par l'addition d'une fonction lactone supplémentaire, introduisant un nouvel atome d'O₂. Les aflatoxines de type 1 (B₁, G₁, M₁..) diffèrent du type 2 (B₂, G₂, M₂..) par la présence d'une double liaison qui permet la formation d'un époxyde extrêmement toxique (Cahagnier, 1998 ; Bennett et Klich, 2003).

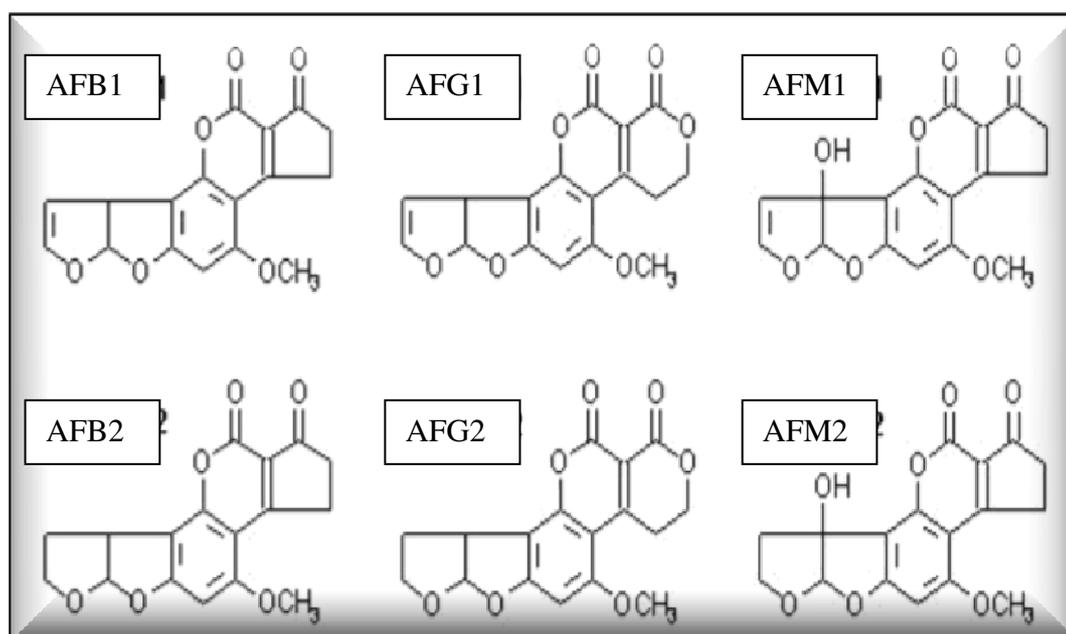


Figure 3 : Structure des aflatoxines (Dutton, 1985)

5.1.2. Propriétés physico-chimiques des aflatoxines

Les aflatoxines se présentent sous forme d'une poudre cristalline incolore ou blanchâtre à jaune pâle. A l'état naturel, elles sont liées aux protéines du milieu où elles ont été synthétisées, ce qui leur assure une longue rémanence au cours du stockage.

Selon Pfohl-Leszkowicz (1999), les aflatoxines ont plusieurs caractères communs :

- Solubilité : Toutes les aflatoxines sont solubles dans les solvants organiques polaires et insolubles dans les solvants non polaires
- Stabilité : Les aflatoxines sont instables sous lumière UV, en présence d'O₂, à des pH extrêmes pH ≤ 3 ou ≥ 10 et en présence d'oxydants.
- Réactivité : Le cycle lactone est hydrolysable en milieu alcalin.
- Thermorésistance: Les aflatoxines sont thermostables, et ne se dégradent qu'à une température supérieure à 100°C.
- Spectrométrie d'absorption : L'intense fluorescence des aflatoxines qu'elles émettent sous lumière UV est mise à profit pour leur détection et leur dosage.

5.2. Les voies de biosynthèse des aflatoxines

La production des métabolites secondaires est liée au développement des champignons toxigènes au niveau de certains produits agricoles et prend de l'importance à la fin de la croissance du champignon (Calvo et al., 2002).

Les voies de biosynthèse d'aflatoxine ont été clarifiées par incorporation de précurseurs radioactifs (¹⁴C) (Bennett et Christensen, 1983), utilisation de mutants (Woloshuk et al., 1989) ainsi que par des inhibiteurs du métabolisme (Tominaga et al., 2006). Plus de 27 enzymes sont impliquées dans la biosynthèse d'aflatoxine (Cary et al., 2006), c'est un processus multi-enzymatique (Sakuno et al., 2003), contrôlé par plusieurs gènes (Wen et al., 2005) et la majorité de ces gènes sont organisés en cluster (Yu et al., 2004) . La biosynthèse des aflatoxines débute par la conversion de malonyl-CoA en un polycétone noranthrone (annexe II) par deux acides gras synthases (Fas-1 et Fas-2) et une PKS (PksA). La conversion de la noranthrone en acide norsolorinique (NOR), le premier intermédiaire stable, est probablement assurée par la monooxygénase CypA et la déhydrogénase NorB (Bhatnagar, 2003).

Le NOR peut être ensuite transformé en averantine (AVN) par déhydrogénase Nor-1 ou NorA. Quelques étapes de conversion de AVR en versicolorine B (VERB) ne sont pas encore établies. Cette conversion est probablement catalysée par les enzymes CypX, MoxY et AvfA. La versicolorine A est transformée en demethylsterigmatocystine (DMST) par une ketoreductase Ver1 et une cytochrome P450 monooxygénase Ver A. L'étape finale est la conversion d'O-methyl-sterigmatocystine (OMST) ou dihydro-O-methylsterigmatocystine (DHOMST) en aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ en présence de l'enzyme NADPH-dépendant monooxygénase OrdA.

5.3. Métabolisation et élimination des aflatoxines

Pour être toxiques ou mutagène, l'aflatoxine doit être métabolisée (fig. 4), ceci est réalisé par l'intervention des cytochromes hépatiques et pulmonaires

Les aflatoxines ingérées peuvent être éliminées sous forme diverses:

- Par voie biliaire (Wong et Hsieh, 1980)
- Par voie urinaire: par déméthylation sous forme d'aflatoxine P₁ et par hydroxylation sous forme d'aflatoxine Q₁ (Egner, 2006)
- Par voie lactée: sous forme de dérivés hydroxylés d'AFM₁ et AFM₂ également toxique.

Une partie d'AFB₁ est éliminée par voie fécale (Chelule et al., 2000) et même par l'air exhalé par les poumons.

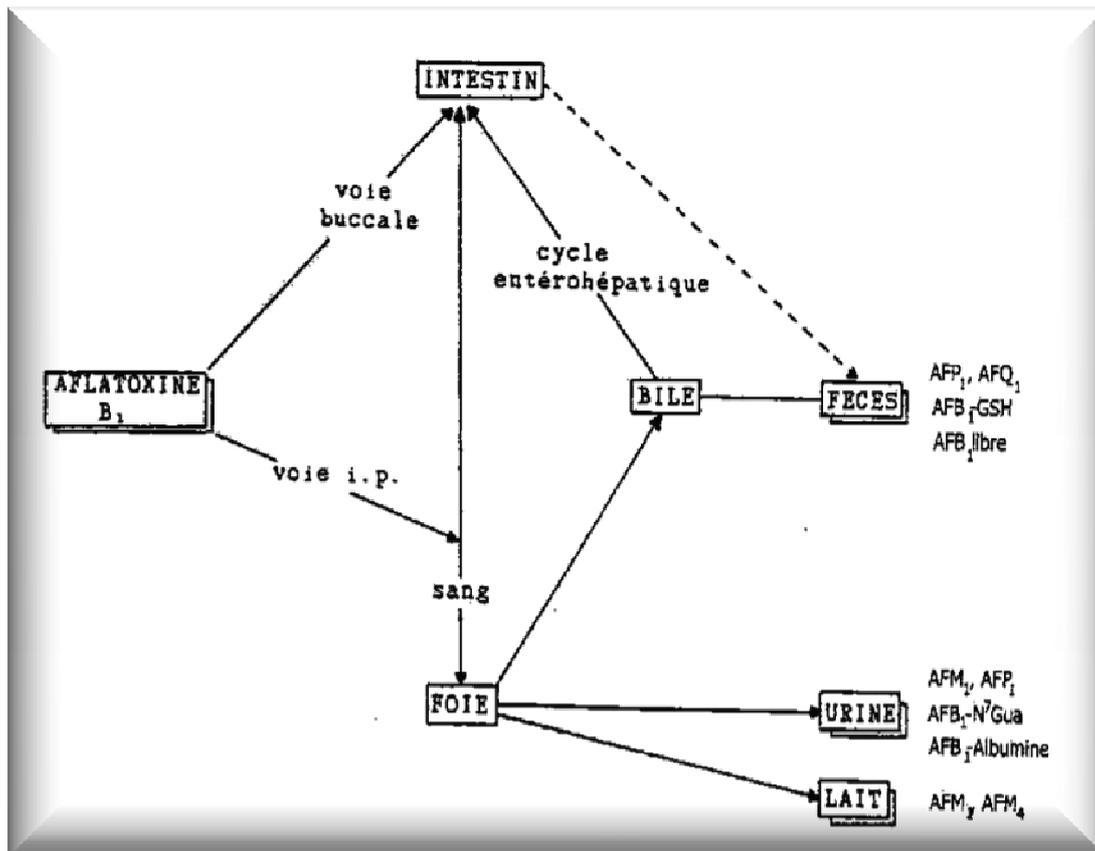


Figure 4 : Différentes voies d'élimination d'AFB1

6. Principales méthodes de détection des mycotoxines dans les grains

Les mycotoxines se trouvent généralement à l'état de traces dans les matières premières céréalières, et leur mise en évidence est délicate. Pour les détecter, les identifier et les quantifier, il existe un ensemble de méthodes allant de bioessais aux techniques très élaborées en passant par des techniques physico chimiques (Cahagnier, 1998)

6.1. Méthodes biologiques:

Les méthodes biologiques se sont révélées utiles pour le dépistage des mycotoxines pendant la période de découverte des aflatoxines. Plusieurs tests ont été effectués, sur caneton, sur embryon de

poulet, sur les bactéries, et les végétaux (Moreau, 1974). Cependant elles sont de plus en plus supplantées par les méthodes immunologiques et physico-chimiques.

6.2. Méthodes immunologiques

Actuellement les tests immunologiques sont commercialisés sous forme de kits d'application. Ce sont des tests rapides dans la détection des mycotoxines (Gathumbie et al., 2003).

Trois types de tests immunologiques sont employés (Arbault et Daussant, 2005)

- Les tests RIA (radioimmunoassay)
- Les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)
- Les tests (IAC) (immunoaffinity column assay)

6.3. Méthodes physico-chimiques :

L'analyse des mycotoxines est essentiellement basée sur des dosages physico-chimiques permettant une séparation chromatographique en HPLC, CG et CCM.

- La chromatographie sur couche mince (CCM) constitue la méthode de base, qui permet une séparation efficace des produits, leur identification et leur quantification avec précision (Frayssinet et Frémy, 1991)
- La Chromatographie en phase gazeuse (CG), est une technique qui utilise des gaz comme phase mobile pour la séparation des composés. Son application est limitée à certaines mycotoxines et notamment les trichothécènes (Arbault et Daussant, 2005). La GC couplée à la spectrométrie de masse facilite l'identification de la mycotoxine recherchée.
- Chromatographie liquide haute performance (CLHP) constitue une méthode de référence, permettant la quantification et l'identification des contaminants présents à des teneurs très faibles. A l'heure actuelle, l'HPLC, couplée à la spectrométrie de masse s'impose comme technique de choix pour l'analyse quantitative de la majorité des mycotoxines (Xie et al., 1997).

7. La prévention et les procédés de décontamination

La Prévention et la lutte contre les champignons et leurs mycotoxines s'effectuent à trois niveaux :

➤ Au champ :

La prévention au champ se résume à l'utilisation raisonnée d'insecticides et des fongicides (Hell et al., 2000), ainsi qu'au respect de la rotation des cultures, les dates de semis et le développement de variétés résistantes (Luo et al., 2005; Garcia et Heredia, 2006) . Igawa et al. (2007) considèrent que l'utilisation des plantes transgéniques est le meilleur moyen de lutte contre les mycotoxines.

➤ **A la récolte :**

Le respect des dates de récolte est recommandé de préférence par temps sec, les grains doivent être suffisamment murs et ne pas être endommagés au cours de la récolte et des pratiques culturales.

➤ **Au stockage :**

Le maintien des lieux de stockage frais, secs et aérés où l'humidité, l'oxygène et la température doivent être contrôlés régulièrement en utilisant des systèmes de ventilation. Proctor (1995) trouve que l'application des méthodes de lutte intégrées est efficace pour prévenir le développement d'insectes et d'acariens.

Un pré tri avant stockage doit être effectué car les graines cassées sont beaucoup plus sujettes aux mycotoxines que les graines intactes (Broggi et al., 2002).

Les procédés les plus efficaces de détoxification des mycotoxines se résument selon Grinstein et al. (1997) en:

- **Méthodes biologiques :**

Certaines souches des bactéries et levures possédant des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines et les rendre inactives (Yan et al., 2004; Palumbo et al., 2006).

Certains microorganismes sont capables de métaboliser les mycotoxines ou les bioconvertir en composés plus ou moins toxiques (Nakazato et al., 1990).

- **Méthodes physiques :**

Cela consiste à une détoxification, soit par désactivation thermique, soit par irradiation (Green, 2004).

- **Méthodes chimiques :**

De nombreuses études ont confirmé que Les méthodes de détoxification efficaces sont les procédés d'ammonisation. Néanmoins l'utilisation judicieuse des acides organiques (Singh et al., 2000), des composés phénoliques (Samapundo et al., 2007), des insecticides (Draughon et al., 1983), des herbicides (Bean et Southall, 1983), des huiles essentielles et d'autres constituants des plantes (Al-Jabre et al., 2003 ; Mahoney et al., 2004) constituent également un moyen efficace de décontamination.

De ce fait l'utilisation de système intégré de contrôle (HACCP : Hazard Analysis and Critical Point) pourrait être une bonne stratégie de lutte basée sur la prévention, le contrôle à tous les stades de production du champ jusqu' au consommateur (FAO, 2003).

8. Législation

Conscients du fait que les mycotoxines peuvent avoir des effets graves, en particulier celles qui sont carcinogènes, tant au plan sanitaire et nutritionnel que sur les échanges commerciaux nationaux et internationaux, de nombreux pays (fig. 5) ont promulgué une législation relative aux mycotoxines dans les aliments afin de préserver la santé du consommateur et les intérêts économiques du pays.

Des publications récentes notamment au Kenya (Probst et al., 2007), Thaïlande (Ehrlich, 2007), en Australie (Pitt et Hocking, 2006), en Inde (Toteja et al., 2006), au Japon (Takahashi et al., 2004), au Texas (Betran et Isakeit, 2004), en Turquie (Dihara et Dilek, 2002) etc. font preuve de la conscience du monde entier aux problèmes des mycotoxines. La figure 6 illustre le pourcentage de la population protégée par des réglementations sur les mycotoxines en 2003, en Amérique, en Europe, en Afrique et en Asie.

L'établissement des limites réglementaires est différent d'un pays à l'autre. Dans l'UE le niveau maximum de l' AFB_1 est de $2 \mu\text{g}$ d'aflatoxine B_1 / kg et de $4 \mu\text{g}$ pour le total d'aflatoxines (Van Egmond et Jonker, 2004), en France la réglementation concerne uniquement l' AFB_1 , dont la teneur maximale pour l'alimentation des adultes est de 5 ppb et pour l'alimentation des enfants ainsi que pour les produits à "risques" (arachides) elle est de 1 ppb alors qu'aux Etats-Unis ils tiennent compte de la somme des AF ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) en fixant la limite à 10 ppb. L'annexe 1 récapitule la législation actuelle pour les aflatoxines dans certains pays du monde.

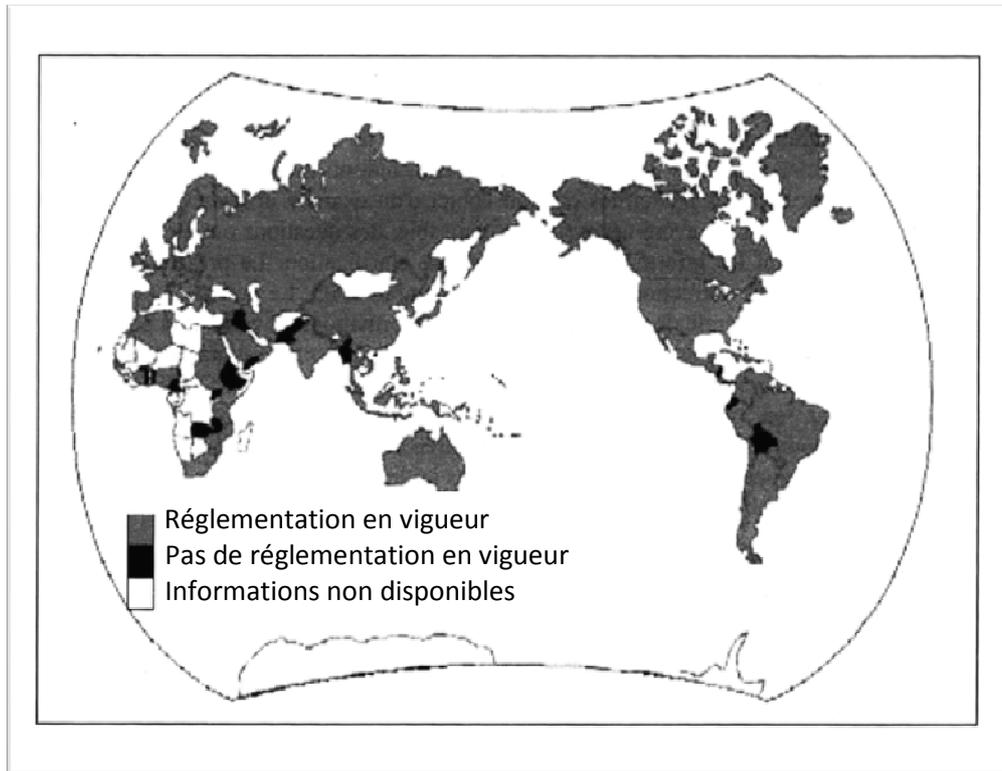


Figure 5 : Carte topographique (Mycotoxines dans le monde)
(FAO, 2004)

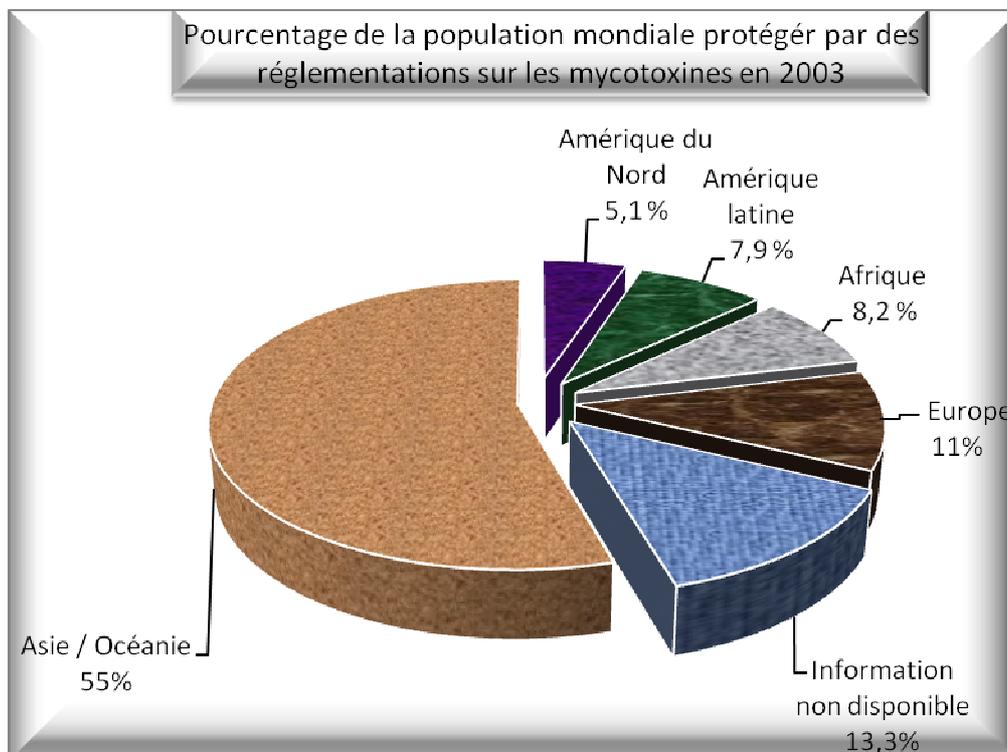


Figure 6 : Réglementation en matière des mycotoxines dans le monde
(FAO, 2004)

II. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Trente six échantillons de semence diverse (céréales et légumineuses alimentaires), produites localement, ont été collectés et analysés du point de vue teneur en eau, mycoflore et présence de mycotoxines.

Les deux tableaux 3 et 4 ainsi que la figure 7 nous renseignent sur les différentes variétés, leur provenance et leur durée de stockage.

Tableau 3 : Liste des lots de céréales analysés

| Semences | Code | Variétés | Provenance | Durée de stockage |
|---|-----------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|
| Blé dur <i>Triticum durum</i> | Bd ₁ | Waha | ITGC (Alger) | 5 mois |
| | Bd ₂ | GTA | ITGC (Alger) | 5 mois |
| | Bd ₃ | MBB (M ^{ed} Ben Bachir) | ITGC (d'El-khroub) | 6 mois |
| | Bd ₄ | Sahel | ITGC (d'El-khroub) | 6 mois |
| | Bd ₅ | Vitron1 | Oued-Smar | 5 mois |
| | Bd ₆ | Vitron2 | ITGC (Setif) | 8 mois |
| Blé Tendre <i>Triticum aestivum</i> | Bt ₁ | Zidane | ITGC (Alger) | 5 mois |
| | Bt ₂ | Mimmouni | ITGC (Alger) | 5 mois |
| | Bt ₃ | ARZ | ITGC (d'El-khroub) | 6 mois |
| | Bt ₄ | HD1220 | ITGC (d'El-khroub) | 6 mois |
| | Bt ₅ | Anza | Oued-Smar | 5 mois |
| Orge <i>Hordeum Vulgare</i> | O _{1b} | Barberousse | ITGC (Alger) | 5 mois |
| | O _{2r} | Rihane | ITGC (Alger) | 5 mois |
| | O _{3j} | Jaidor | ITGC (d'El-khroub) | 6 mois |
| | O _{4t} | Tichdrett | ITGC (d'El-khroub) | 6 mois |
| | O _{5s} | Saida ₁ | Oued-Smar | 5 mois |
| | O _{6s} | Saida ₂ | ITGC (Setif) | 8 mois |

Tableau 4 : Liste des lots des légumineuses analysés

| Semences | Code | Variétés | Provenance | Durée de stockage |
|--|------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|
| Fève <i>Vicia Faba</i> | F ₁ N | New-Mammoth | ITGC (El-khroub) | 6 mois |
| | F ₂ A | Aguadulce | ITGC (El-khroub) | 6 mois |
| | F ₃ S | Sidi-Moussa | Agriculteur (jijel) | 6 mois |
| | FS ₄ | Sidi-aich | Oued-Smar | 5 mois |
| | F ₅ G | Giza 402 | Oued-Smar | 5 mois |
| | F ₆ G | Giza 429 | Oued-Smar | 5 mois |
| Pois chiche <i>Cicer arietinum</i> | P ₁ I | ILC3279 | ITGC (El-khroub) | 6 mois |
| | P ₂ R | X88TH | ITGC (El-khroub) | 6 mois |
| | P ₃ F | Flip 97.56 | ITGC (Setif) | 8 mois |
| | P ₄ I | ILC3279 | ITGC (Setif) | 8 mois |
| | P ₅ F | Flip 84.109 | Oued-Smar | 5 mois |
| | P ₆ F | Flip 80.177 | Oued-Smar | 5 mois |
| Arachides <i>Arachis hypogaea</i> | P ₁ | Population ₁ | ITCMI (Staouali) | 5 mois |
| | P ₂ | Population ₂ | | 5 mois |
| | P ₃ | Population ₃ | | 5 mois |
| | P ₄ | Population ₄ | | 5 mois |
| | P ₅ | Population ₅ | | 5 mois |
| | P ₆ | Population ₆ | | 5 mois |
| | P ₇ | Population ₇ | | 5 mois |

2.2. Matériel bactériologique

Nous avons utilisé pour le test biologique le *Bacillus subtilis* ; c'est une bactérie très sensible aux mycotoxines, utilisée généralement pour repérer les souches toxigènes (Moreau, 1974). Ceci est révélé par l'inhibition de la croissance de la bactérie et qui se traduit par l'apparition des zones d'inhibition.

La composition des milieux de culture utilisés est présentée en annexe 3.

2.3. Méthodes d'analyse sanitaire de la semence :

2.3.1. Contrôle de la viabilité des graines.

Une centaine de graines préalablement désinfectés est répartie dans dix boîtes de Pétri, tapissées de deux feuilles de papier filtre déjà stérilisées et humidifiées avec de l'eau distillée stérile.

Les boîtes sont placées sur des paillasses aux conditions du laboratoire pendant une semaine.

Les grains ayant montré un développement de l'hypocotyle sont les semences viables.

2.3.2. Détermination de la teneur en eau des échantillons

Avant l'analyse sanitaire de la semence, la teneur en eau est déterminée pour chaque échantillon. Elle est réalisée selon la technique décrite par Miller et al. (1980) sur la différence de poids avant et après séchage du produit. Celle-ci consiste à mettre à l'étuve des grains de chaque échantillon à une température de 130 - 133°C pendant 17 à 38 heures jusqu'à la stabilisation du poids. La perte de poids observée est équivalente à la quantité d'eau présente dans les grains qui, en pourcentage, est calculée selon la méthode normalisée par Afnor (1989) comme suit :

$$X \% = (m_0 - m_1 / m_0) \times 100$$

X % : teneur en eau en pourcentage

m_0 : poids de la prise d'essai avant étuvage (en gramme)

m_1 : poids de la prise d'essai après étuvage (en gramme)

2.3.3. Isolement et purification de la mycoflore totale associée aux semences

a) Mycoflore externe

La méthode d'Ulster rapportée par Rapilly (1968) a été utilisée au cours de ces tests.

L'analyse a porté sur 100 grains pris au hasard de chaque variété, les grains non désinfectés sont déposés sur un milieu nutritif Malt Agar (MA) à raison de 10 grains par boîte pour les céréales et 5 grains par boîte pour les légumineuses. Pour inhiber le développement des bactéries un antibiotique (Gentamycine) est ajouté au milieu de culture. Les boîtes sont ensuite incubées sous un éclairage alterné lumière / obscurité 12 / 12 heures et à une température de 22°C pendant sept jours.

b) Mycoflore interne

Parallèlement à la détermination de la mycoflore externe, nous avons analysé la mycoflore interne; les grains sont désinfectés superficiellement par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium titrée à 2 % pendant 5 minutes, puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile, séchés entre 2 papiers buvard stériles et déposés aseptiquement sur milieu Malt agar

Les boîtes sont incubées dans les mêmes conditions que précédemment. Les colonies développées sont purifiées par un repiquage aseptique sur des milieux sélectifs afin de faciliter leur identification.

c) Mycoflore embryonnaire

‣ Cas des céréales

Pour vérifier la présence des champignons au niveau de l'embryon, nous avons utilisé la technique d'extraction des embryons après macération des grains dans une solution de soude caustique (Neergaard, 1979). A cet effet, un échantillon de 20 g de grains est trempé dans une solution de soude à 10 % pendant 16 heures, les embryons sont ensuite récupérés à l'eau tiède au moyen d'une série de quatre tamis superposés (1.5, 2, 3 et 4 mm de diamètre de mailles). Les embryons recueillis sont éclaircis au lactophénol chaud pendant une heure, colorés au bleu coton pendant deux heures puis écrasés entre lame et lamelle avant d'être observés au microscope à un objectif à fort grossissement.

‣ Cas des légumineuses

Une centaine de graines de chaque échantillon sont mis à gonfler pendant quelques heures dans l'eau stérile afin de faciliter la séparation des différentes parties de la graine (Abdel-Rehim, 1997). Les embryons récupérés sont désinfectés, séchés aseptiquement et placés en boîtes de Pétri contenant le milieu Malt gélosé à raison de 10 embryons par boîte dans les mêmes conditions d'incubation que précédemment.

2.3.4. Identification de la mycoflore associée aux semences

a) Identification des genres

Les colonies développées sont purifiées par un repiquage aseptique sur le milieu PDA afin de faciliter leur identification. Pour les espèces non identifiées, nous les avons repiqués sur différents milieux de culture sélectifs. Les champignons isolés et purifiés sont ainsi identifiés sur la base des caractéristiques morphologiques et microscopiques à l'aide des différentes clés de détermination (Jolly, 1964 ; Toussoun et Nelson, 1968 ; Smith, 1969 ; Booth, 71 ; Barnett et Hunter, 1972 ; Booth, 77 ; Domsch et al., 1980 ; Guiraud et Gualzy, 1980 ; Nelson et Toussoun 1983 ; Klich et Pitt, 1988 ; Singh et al., 1991 ; Champion, 1997 ; Cahagnier, 1998 ; Pitt et Hocking, 1999)

b) Identification des espèces

Elle repose sur l'appréciation de nombreuses caractéristiques morphologiques sur plusieurs milieux de culture spécifiques et sur de nombreux critères microscopiques (Singh et al., 1991).

La méthode de Pitt et Hocking (1985), est recommandée pour l'identification des champignons toxigènes des aliments peu hydratés (*Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*). Cela consiste à cultiver les espèces sur trois milieux différents MEA, G25N et CYA et à les incuber à différentes températures (5°C, 25°C et 37°C). L'observation et les notations sont faites sept jours après.

c) Confirmation de l'identité des espèces d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*

Pour confirmer la présence d'*Aspergillus flavus*, nous avons cultivé les isolats sur le milieu spécifique AFPA recommandé par Pitt et al. (1983). En effet l'acide aspergillique ou acide noaspergillique produit uniquement par les deux espèces, réagit avec le citrate d'ammonium ferreux en formant un complexe de couleur jaune – orange à orange qui colore l'envers de la culture et ceci après incubation à 30°C pendant 42 à 48 heures.

Vu la similitude des deux *Aspergillus (flavus et parasiticus)*, nous avons utilisé la méthode de Botton et al. (1990), qui permet de différencier les deux espèces. L'observation au microscope est réalisée en déposant une goutte de P. methoxybenzaldehyde, sur une lame contenant une suspension de spores d'*Aspergillus*, en laissant agir le colorant; les spores d'*Aspergillus parasiticus* doivent révéler une coloration rose.

d) Calcul de la fréquence et de l'abondance des espèces fongiques

La fréquence : nous renseigne sur le nombre de fois la présence d'un champignon dans les lots de semence analysés. Elle est calculée par le rapport

$$\text{Nombre de lots présentant le champignon} / \text{Nombre total de lots analysés}$$

L'Abondance : est déterminée par le nombre total des individus de chaque espèce dans l'échantillon total.

2.3.5. Description des caractères morphologiques et microscopiques des espèces toxigènes

Les champignons isolés des différents lots de semences analysés sont identifiés selon plusieurs critères d'ordre morphologiques et microscopiques :

- **Critères cultureux :** En tenant compte de l'aspect, couleur et diamètre de la colonie, de leur revers et présence des exsudats etc ...)
- **Critères morphologiques :** présence ou absence des spores, en tenant compte de leur forme, leur structure et leur taille, aspect de mycélium etc...

2.4. Effet de la mycoflore sur la faculté germinative des grains

La faculté germinative exprime l'aptitude des semences à donner une plantule normalement constituée. Les essais en terrines permettent de tester de manière précise, le pouvoir germinatif ainsi que l'effet des champignons transmis par la semence sur la germination des grains.

2.4.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental retenu est en randomisation totale. Une centaine de grains de chaque échantillon préalablement débarrassée des impuretés sont mis à germer dans un substrat contenant en proportions égales 1/3 terre, 1/3 terreau et 1/3 sable. Ce substrat est stérilisé à deux reprises à 120°C pendant deux heures, puis il est réparti dans des terrines préalablement désinfectées à l'hypochlorite de sodium. Les semences sont semées à 2 cm de profondeur dans le substrat à raison de 4 répétitions de 25 graines par terrine pour les céréales et de 5 répétitions de 20 graines par terrine pour les légumineuses. Les terrines déposées dans une serre en verre, sont régulièrement arrosées.

2.4.2. Analyse statistique

L'action des champignons portés par la semence sur le pouvoir germinatif des grains est analysée par le calcul de r (coefficient de corrélation) de chaque lot de semences (Annexe 4) qui permet d'évaluer l'incidence et la nature de la relation entre les deux paramètres (contamination et germination).

2.5. Techniques analytiques pour la recherche de l'aflatoxine dans les grains

2.5.1. Méthode de fluorescence jaune - verdâtre (BGYF)

La BGYF est utilisée surtout pour détecter certaines mycotoxines qui émettent des substances fluorescentes dans le substrat ou dans le milieu de culture telle que l'aflatoxine. C'est un test rapide qualitatif pour détecter la présence de l'aflatoxine dans les grains (Shotwell et Hesseltine, 1981). La technique consiste à mouliner grossièrement une portion des grains, car la fluorescence peut se trouver sous leurs enveloppes (Shotwell et al., 1974). Sur un plateau noir, les grains concassés sont étalés sous forme d'une monocouche puis observés sous UV aux longueurs d'ondes 254 et 365 nm dans une chambre noire

2.5.2. Test biologique de la production d'inhibiteurs de croissance bactérienne :

Le test d'activité biologique des différents isolats d'*Aspergillus flavus* et d'*A. parasiticus* obtenus consiste à tester le pouvoir toxigène des isolats capables d'inhiber la croissance bactérienne. Au total, 37 isolats d'*Aspergillus* de groupe *flavus* isolées de différents lots de graines, sont cultivés sur milieu YES à 25°C pendant sept jours.

La bactérie test (*Bacillus subtilis*) réactivée et purifiée, est ensemencée dans un bouillon nutritif à 37° C pendant 18 heures.

Pour s'assurer de sa pureté, nous avons étalé 0,1 ml de la suspension bactérienne sur un milieu nutritif gélosé puis, les boîtes de Pétri sont incubées à 37° C pendant 24 heures.

Pour préparer la suspension bactérienne, un tube à essai contenant 3 ml du bouillon nutritif est inoculé par une colonie pure de la bactérie test et incubé à 37° C pendant 16 heures.

Un explantat de 5 mm de diamètre prélevé de la périphérie de la colonie de chaque souche âgée de sept jours est déposé au centre de la boîte de Pétri contenant un milieu gélosé nutritif sur lequel est étalé 0,1 ml de la suspension bactérienne diluée à 10^{-4} ; deux répétitions d'explantat sont réalisées.

Les boîtes sont ainsi pré incubées à 4° C pendant 24 heures puis à 37° C pendant 48 heures, comme recommandé par Mazza (1982). Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètre (mm) et comparés à l'échelle proposée par Mazza (1983) qui se présente comme suit.

$5 \leq d \leq 14$ zone d'inhibition faible

$14 \leq d \leq 20$ zones d'inhibition moyenne

$d \geq 20$ zone d'inhibition importante

d : diamètre de la zone d'inhibition.

2.5.3. Mise en culture des isolats d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* pour la production d'aflatoxine

a) Culture sur milieu solide:

C'est une technique très économique pour la mise en évidence des mycotoxines secrétées par les souches toxigènes.

Toutes les souches toxigènes sont cultivées aseptiquement sur milieu solide YES à 28°C pendant sept jours à l'abri de la lumière (planche II), pour être analysées directement par chromatographie sur couches minces (Filtenberg et al., 1983 ; Frisvad et Filtenborg, 1984)

b) Culture en milieu liquide

D'après le test biologique sur les bactéries, 28 isolats ont été sélectionnées pour leur pouvoir aflatoxinogène (16 souches d'*Aspergillus parasiticus* et 12 souches d'*Aspergillus flavus*), dont le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 14 mm.

Plusieurs Erlèns de 250 ml (2 répétitions pour chaque souche) contenant chacun 50 ml du milieu de base YES stérile, sont inoculés aseptiquement par un explantat de 3 mm de diamètre, prélevé d'une colonie pure de chaque souche âgée de sept (07) jours et ayant poussée à 25°C sur un milieu nutritif gélosé PSA (Mansimango et al., 1977). Les Erlèns hermétiquement fermés, sont incubés à 28° C

pendant 12 jours, en agitation continue (planche II); celle-ci permet une diffusion plus rapide d'oxygène dans le milieu de culture (Shaw, 1981).

Davis et al. (1966) considèrent que le milieu YES, est le meilleur milieu pour la sécrétion de l'aflatoxine par les *Aspergillus* aflatoxinogènes.

2.5.4. Méthode chimique d'extraction et de purification de l'aflatoxine

Les méthodes actuelles de détection et de dosage des mycotoxines utilisent toutes le même schéma d'analyse consistant en une extraction, suivie d'une purification de l'extrait (fig. 7). La détection est effectuée après fractionnement des aflatoxines par chromatographie sur couche mince et observation sous lumière UV

a) Principe d'extraction

L'extraction est la première étape d'analyse chimique qui permet de séparer les composés intéressants (mycotoxines), de l'ensemble des constituants de la matrice.

L'extraction est obtenue par élution à l'aide d'un solvant organique approprié. Pour récupérer la quantité maximale de mycotoxines, l'opération doit être répétée 2 à 3 fois avec renouvellement du solvant d'extraction.

b) Principe de purification

La purification est la deuxième étape d'analyse chimique. Dans tout extrait aqueux, la présence fréquente des protéines, des lipides et autres substances risquent de gêner la détection finale, d'où la nécessité d'une épuration de l'extrait avant la concentration. Le choix de la technique d'épuration dépendra de la méthode employée, à savoir technique d'épuration en colonne, technique d'extraction liquide - liquide ou technique des précipitations simultanées des impuretés.

c) Technique d'extraction à partir du milieu de culture solide

La technique retenue est celle de Filtenberg et al (1983), qui consiste à :

- prélever un explantat de 4 mm de diamètre du centre de la colonie d'*Aspergillus flavus* ou *parasiticus* cultivé sur milieu YES solide et ensuite le placer directement et d'une manière aseptique sur la plaque de silice.
- mouiller le disque de mycélium avec une goutte de mélange chloroforme / méthanol : (2 / 1), en appuyant légèrement sur l'explantat jusqu'à la diffusion du liquide dans le gel de silice; le diamètre du spot ne doit pas dépasser 0,6 cm.
- laisser les spots sécher pour être développés dans le système TEF, Toluène / acétate d'éthyle / acide formique : 5 / 4 / 1 (v / v / v).

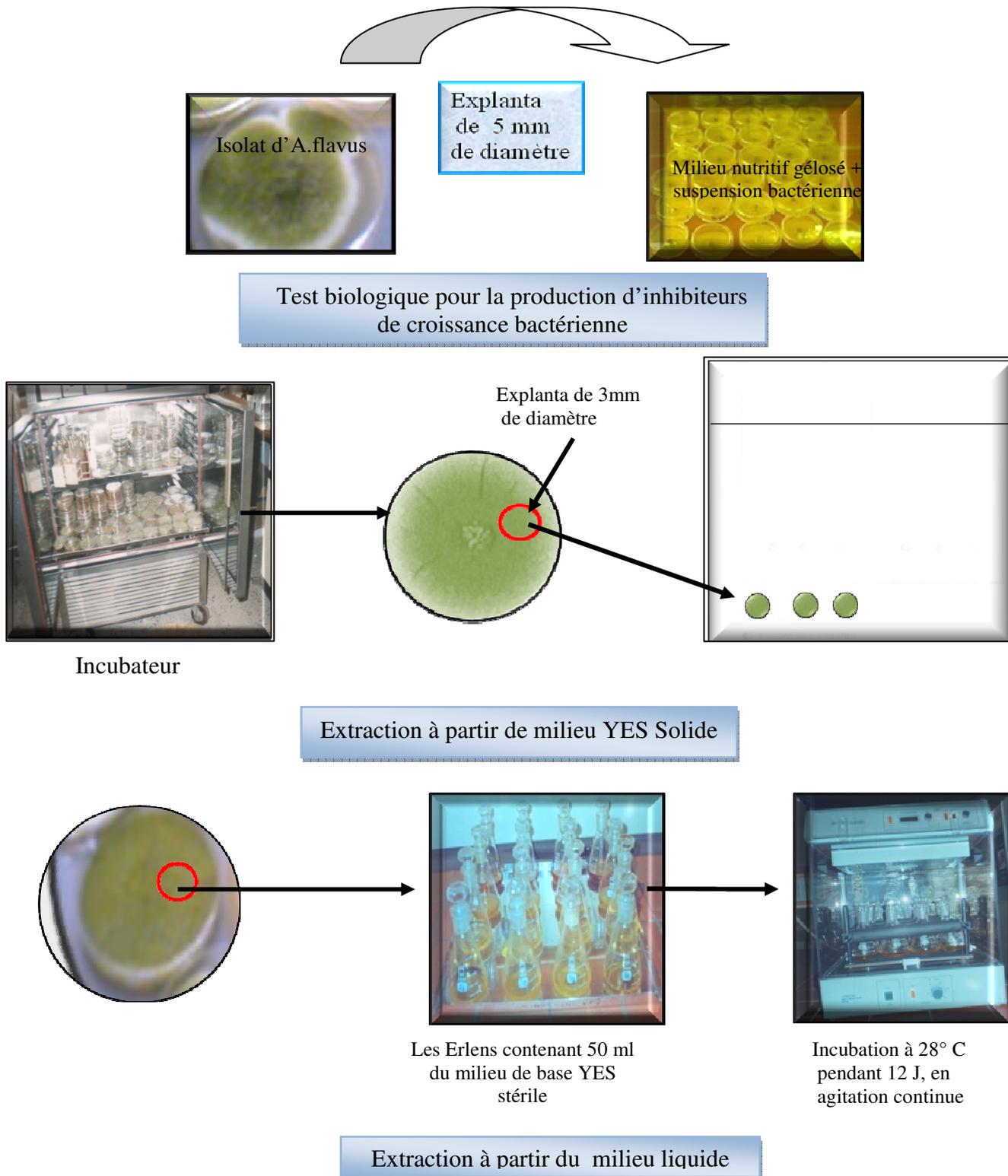


Planche II : Culture des isolats d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* pour la production d'aflatoxine

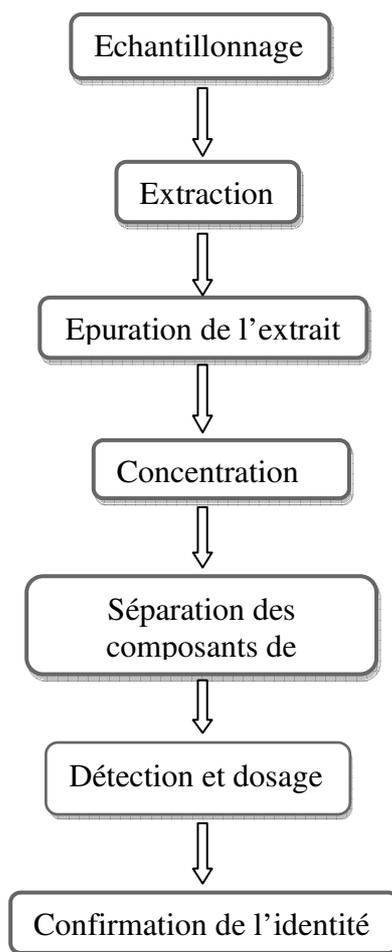


Figure 7 : Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines
(FAO, 1992)

d) Technique d'extraction et de purification à partir du milieu de culture liquide

Après une période d'incubation, le milieu de culture est filtré à travers le papier Wathman n°1, puis le mycélium récupéré est rincé plusieurs fois à l'eau distillée stérile et séché à 75°C pendant 24 heures (Payne et Hagler, 1983). Ensuite le poids sec du mycélium de chaque souche est déterminé à l'aide d'une balance de précision, puis le filtrat récupéré est soumis à une extraction chloroformique. Le même volume (50 ml) du chloroforme est ajouté au filtrat de culture de chaque isolat, puis soumis à une agitation pendant 10 mn (Davis et al., 1987).

Cette dernière étape est suivie d'une décantation pour séparer les deux phases. La phase chloroformique est récupérée tandis que l'autre phase est soumise à une deuxième extraction avec 25 ml de chloroforme. Les deux fractions chloroformiques sont ensuite réunies et déshydratées en les passant à travers le papier Wathman n° 42, préalablement saupoudré avec le sulfate de sodium

anhydre (Na_2SO_4). Le filtrat obtenu est concentré sous vide à l'aide de l'évaporateur rotatif jusqu'à sec, à une température ne dépassant pas 40°C . Le résidu est récupéré par rinçage des parois du ballon avec 1 ml du chloroforme et ensuite conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière, jusqu'à son utilisation.

e) Technique d'extraction et de purification à partir de la semence

- Préparation de l'échantillon,

Environ 1 kg de l'échantillon à analyser est broyé en poudre à l'aide d'un Blender jar, de façon à ce qu'il passe en totalité au travers d'un tamis à maille de 1 mm.

- Cas de la semence (blé – orge – fève - pois chiche)

↳ Extraction

Un échantillon de 50 g de grains moulu et homogénéisé est introduit dans une fiole conique de 500 ml, auquel est ajouté 250 ml de méthanol et eau : 60 / 40 (v / v), la suspension obtenue est mélangée et agitée pendant 30 mn à l'aide d'un appareil à secouer (agitateur vibreur) , puis laissée reposer .Une fois le mélange sédimenté, il est filtré sur le papier filtre plissé, le filtrat repassé à travers le papier Wathman N°1 ; 125 ml du filtrat sont collectés pour être purifiés (planche III).

↳ Purification

Pour obtenir une bonne détection de la toxine, les échantillons doivent être soigneusement purifiés. Deux modes de purifications successives sont recommandées

■ Une première purification par partition : elle consiste à introduire 125 ml de filtrat dans une ampoule à décantation auxquels sont ajoutés 30 ml de la solution de chlorure de sodium saturée et 50 ml d'hexane. Après une agitation vigoureuse, et décantation (planche III), les étapes suivantes sont réalisées:

- Recueillir la phase aqueuse dans un bécher et éliminer l'hexane.
- Remettre la phase aqueuse dans une ampoule propre à décantation et ajouter 50 ml de chloroforme.
- Agiter, décanter et recueillir la phase chloroformique, à laquelle sont ajoutés 5 g de carbonate de cuivre pour la disséquer.
- Laisser sédimenter après une forte agitation et recueillir le chloroforme
- Répéter l'opération une seconde fois avec 25 ml du même solvant

- Rassembler les deux fractions chloroformique, les déshydrater en les passant à travers le papier Wathman N°42 saupoudré avec le Na_2SO_4 , puis les concentrer au rotavapeur muni d'un bain d'eau distillée, thermostaté à 40°C
- Dissoudre le résidu dans 2 ml de chloroforme et passer à la deuxième purification.

■ Une deuxième purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, celle-ci est préparée de la façon suivante.

- Transvaser 10 g de silice dans une colonne de verre de 2 cm de diamètre et de 40 cm de longueur préalablement remplie aux deux tiers par du chloroforme, remuer doucement afin d'éliminer les bulles d'air.
- Laisser la silice se déposer pendant environ 15 mn puis ajouter avec précaution une couche de sulfate de sodium.
- Introduire au sommet de la colonne l'extrait redissout dans quelques ml de chloroforme, ainsi que le chloroforme de rinçage.
- Laver la colonne avec 150 ml d'hexane, puis par 150 ml d'éther diéthylique en surveillant le débit, qui doit être entre 8 et 12 ml / mn. Par la suite les aflatoxines sont élués par 150 ml d'une solution de chloroforme **et** méthanol : 97 / 3 (v / v).
- Après évaporation de l'éluat et reconstitution dans 1ml du chloroforme, les extraits purifiés sont conservés au réfrigérateur et à l'abri de la lumière pour une estimation qualitative et quantitative.

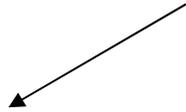
Matériel et méthodes



Blender jar
Broyage



Sédimentation 30 mn



Filtration



Décantation



Agitateur- vibreur



Décantation

Déshydratation



Evaporateur-rotatif
(Concentration)

Planche III : Technique d'extraction et de purification de la toxine

- Cas des arachides

Pour les grains d'arachides nous avons opté pour la méthode de Williams (1984). Cent grammes d'arachides sont mis dans un Blender jar auxquels sont ajoutés 500 ml de méthanol et d'eau : 55 / 45 (v / v), 200 ml d'hexane et 4 g de chlorure de sodium; le mélange est agité à l'aide d'un agitateur vibreur pendant quelques minutes à grande vitesse, le tout est mis à sédimenter pendant 30 mn.

De la solution aqueuse de méthanol, 25 ml sont recueillis et placés, dans une ampoule à décantation de 125 ml auquel sont ajoutés 25 ml de chloroforme. Après une forte agitation et décantation, la couche chloroformique est recueillie. Une seconde extraction est nécessaire avec 25 ml de chloroforme joint à la première fraction pour être desséchée sur Na₂SO₄.

Les deux fractions sont évaporées à sec et le résidu est récupéré dans 1 ml de chloroforme.

La seconde purification est réalisée selon les mêmes étapes que précédemment.

2.6. Test d'activité biologique des filtrats de culture

2.6.1. Effet des filtrats de culture sur la croissance de *Bacillus subtilis*

Après avoir réactivé la bactérie et étalé la suspension bactérienne sur des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé nutritif, des disques de papier Whatman stériles de 5 mm de diamètre sont placés au centre de chaque boîte. Sur chaque disque sont déposés 20 µl de filtrat de chaque souche supposée contenant l'aflatoxine dissoute dans une petite quantité de chloroforme.

Le disque témoin est imbibé avec 20 µl de mélange (chloroforme + eau), ensuite les boîtes sont mises à incuber à 4°C puis à 37°C pendant 18 heures.

Les extraits obtenus des semences analysées, subissent les mêmes tests

2.6.2. Effet des filtrats de culture sur la germination des grains

Seules deux variétés de semences ont été testées, à savoir une céréale blé dur (*Triticum durum*) et une légumineuse lentille (*Lens culinaris*), avec deux concentrations issues de la souche N°18 supposée la plus aflatoxinogène. L'aflatoxine dissoute dans une petite quantité de chloroforme, est diluée avec de l'eau stérile. Le témoin est constitué par l'eau stérile sans toxine mais avec la même quantité de chloroforme dans laquelle est dissoute la toxine.

Une centaine de grains de chaque variété sont d'abord désinfectés à l'hypochlorite de sodium à 2 % puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile pour être soumis à l'imbibition. Les boîtes de Pétri sont tapissées avec deux disques de papier Whatman stérile, préalablement humidifié avec 10 ml de chaque concentration, dans lesquelles les grains sont repartis à raison de 25 graines par boîte et 4 répétitions. Après 24 heures d'imbibition les grains sont transférés dans d'autres boîtes

similaires contenant les mêmes solutions et les mêmes concentrations, les boîtes sont incubées à l'obscurité et sont imbibées en cas de nécessité.

Les notations sont faites après une semaine et le taux d'inhibition de la germination des grains est calculé comme suit $\text{Grains inhibés (\%)} = \frac{N^{\text{bre}} \text{ de grains germés (Témoin - Traités)}}{\text{Témoin}} \times 100$ (Haider et al., 1986)

2.7. Méthodes physiques de séparation et d'analyse de l'aflatoxine

2.7.1. Chromatographie sur couches minces

a) Principe

La chromatographie sur couches minces est une méthode physique qui permet, de tester la pureté des composés et de séparer les constituants d'un échantillon entre deux phases selon leur différence d'affinité pour l'une ou l'autre phase .

La phase mobile (phase liquide) est un solvant ou un mélange de solvants choisi en considérant les propriétés de l'échantillon à analyser, alors que la phase solide est généralement un adsorbant (gel de silice) maintenu sur une chromatoplaque, soit en verre soit en plastique rigide ou en métal.

b) Technique

➤ Préparation des plaques de CCM pour une analyse préliminaire

Les quantités indiquées ci- dessous conviennent pour préparer cinq (05) chromatoplaques en verre de 20 x 20 cm. Dans une fiole conique sont mis 30 g de gel de silice G - HR 60, auxquels est ajoutée la quantité d'eau recommandée par le fabricant (environ 60 ml). Le mélange est agité vigoureusement pendant 1 minute, puis la suspension est versée dans l'étaleur pour enduire immédiatement les plaques préalablement nettoyées de façon à obtenir une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur.

Les plaques sont séchées à l'air libre pendant 10 à 15 minutes, ensuite sont activées en les maintenant durant une heure dans l'étuve à 110°C. (Singh et al., 1991)

➤ Chromatographie sur couche mince monodimensionnelle

Celle-ci est réalisée sur des plaques de CCM prêtes à l'emploi comportant déjà une couche de 0,25 mm de gel de silice (POLYGRAM SIL G). Après les avoir réactivées dans une étuve à 110 pendant 2 mn ensuite les avoir refroidies (Gorst - Allman et al., 1979), les plaques sont spottées immédiatement. Le dépôt se fait linéairement et de façon ponctuelle à l'aide d'une micropipette.

Celle-ci doit être placée perpendiculairement et prudemment sur la plaque préalablement activée; les taches des solutions sont déposées à 1,5 cm du bord inférieur et à des intervalles de 1,5 cm. La

taille des taches doit être réduite, uniforme et ne dépassant pas les 0,5 cm de diamètre ; la distance de migration est de 15 cm (Randerath, 1971) (fig. 9). De chaque échantillon, 20 microlitres d'extrait sont déposés sur la ligne de dépôt et 5 microlitres de chaque étalon d'aflatoxine (B1 - B2 - G1 et G2) sont déposés en superposition sur le même point. Un séchage au sèche-cheveu est nécessaire entre chaque dépôt

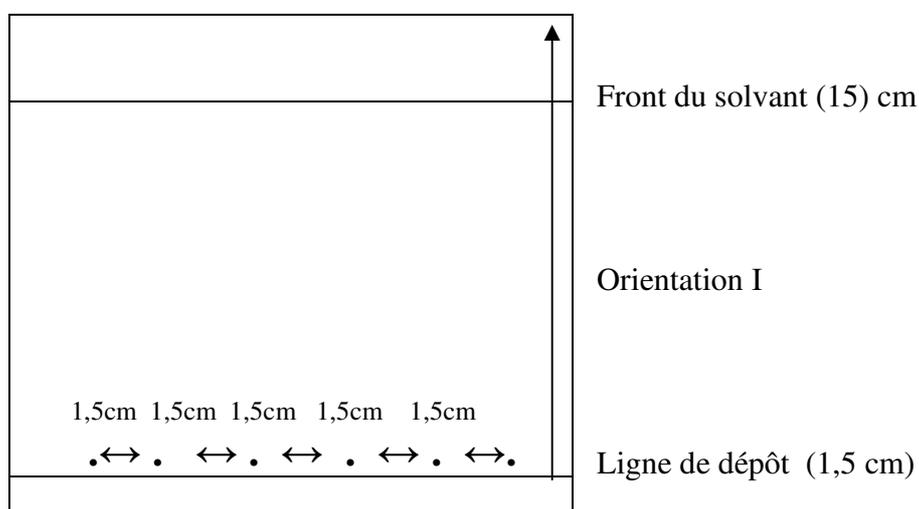


Figure 8 : CCM monodimensionnelle

► Chromatographie sur couche mince bidimensionnelle

Dans ce cas, l'extrait d'échantillon est déposé à un angle de la plaque et deux opérations de développement sont effectuées successivement et parallèlement aux deux cotés de la plaque avec deux solvants différents. Dans un premier temps il y a lieu de tracer sur la plaque de CCM, deux lignes droites parallèles aux deux cotés contigus à 6 cm de chaque bord, pour limiter la migration du solvant. Ensuite à l'aide d'une micropipette sont déposés sur cette plaque :

- Au point **A** : 20 microlitres de l'extrait de l'échantillon
- Aux points **B** et **C** : 5 microlitres de la solution étalon.

Avant de les développer, les spots sont séchés à l'abri de la lumière (Fig. 9)

2.7.2. Développement des chromatogrammes

a) Principe

Les constituants de l'échantillon sont élués par la phase mobile qui migre par capillarité vers le haut de la plaque; ils peuvent alors être identifiés par comparaison à l'élution simultanée du témoin.

Les différents constituants de l'extrait ne sont pas séparés par la même vitesse sur le trajet de migration du solvant le long de la chromatoplaque.

b) Mode opératoire

Les chromatoplaques sont placées dans la cuve en vapeur de solvant, en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt ponctuel et le solvant (fig. 10)

Pour la CCM monodimensionnelle, les chromatogrammes sont développés à une distance de migration de 15 cm à l'abri de la lumière et à température ambiante, dans le système TEF:

Toluène / Acétate d'éthyle / Acide formique : 6 / 3 / 1 / (v / v / v).

Pour la CCM bidimensionnelle, les plaques sont développées selon la première orientation dans le système TEF, Toluène / Acétate d'éthyle / Acide formique : 6 / 3 / 1 / (v / v / v), et après séchage on fait subir à la plaque une rotation à un angle de 90°C pour être développée selon la deuxième orientation avec un mélange de chloroforme et d'acétone : 9 / 1 (v / v).

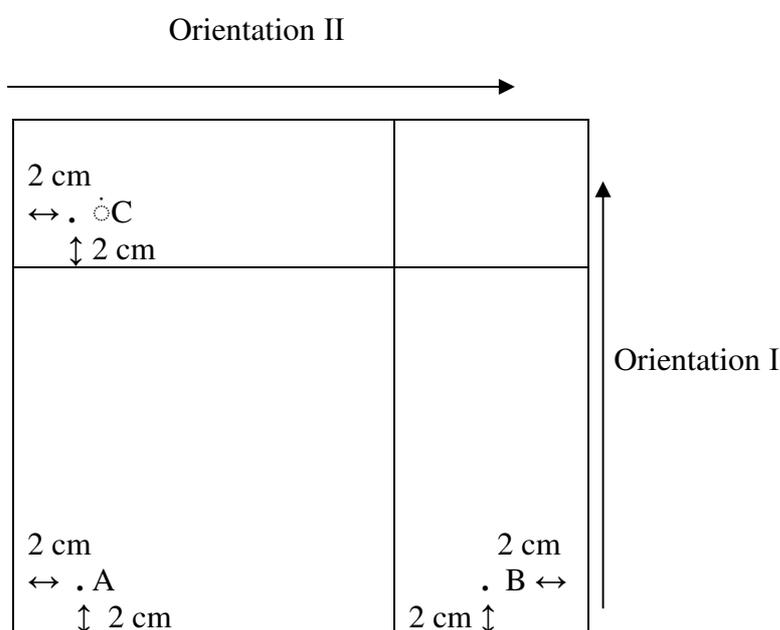


Figure 9 : CCM bidimensionnelle

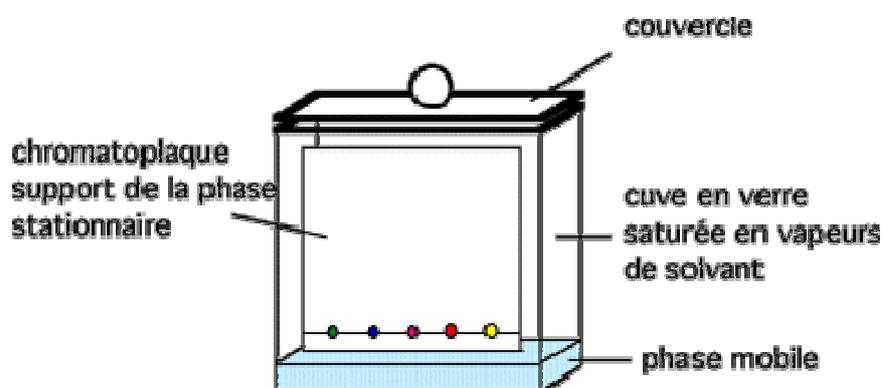


Figure 10 : Cuve de développement

Une fois la migration achevée, les plaques sont retirées des cuves, séchées à l'abri de la lumière puis examinées aux visibles et sous UV à 254 et 365 nm.

2.7.3. Révélation des chromatogrammes

a) Principe

Le principe de la révélation repose généralement d'une part sur la fluorescence des mycotoxines sous UV considérée dans un produit, ainsi que sur les réactions avec les différents révélateurs chimiques suite à la formation de complexe coloré et d'autre part sur la comparaison des rapports frontaux (Rf) des spots des extraits avec ceux des standards.

b) Technique de révélation

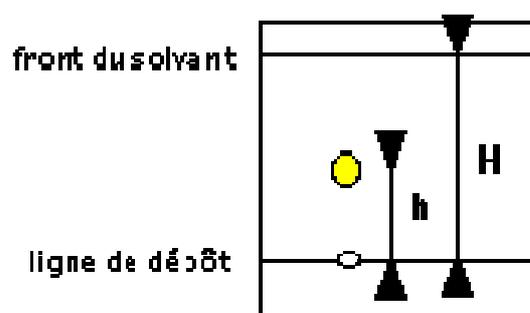
Cela consiste à pulvériser les plaques avec les solutions révélatrices, telle que :

l'acide sulfurique (H₂SO₄) à 50 %, l'acide trifluoroacétique (TFA), le p. Anis aldéhyde.

Le chlorure d'aluminium (AlCl₃) est utilisé spécialement pour détecter la stérigmatocystine.

Les changements de couleur au visible, les fluorescences émises par les différentes taches sous UV aux longueurs d'ondes 254 et 365 nm ainsi que leur rapport frontaux sont soigneusement relevés avant et après leur traitement par les solutions révélatrices, puis comparés à ceux des standards ou à ceux des références bibliographiques (Scott et al., 1972 ; Patterson, 1986; Haddidane et al., 1989).

Le rapport frontal est la distance parcourue par la mycotoxine recherchée sur la distance parcourue par la phase mobile (fig. 11)



Calcul de rapport frontal : $R_f = h / H$

Figure 11: Migration sur couches minces

2.7.4. Confirmation de l'identité de l'aflatoxine

a) Méthode d'utilisation de l'acide trifluoroacétique

La technique de révélation par l'acide trifluoroacétique s'effectue selon les opérations citées ci après

- Diviser une chromatoplaque de CCM en deux parties égales.
- Recouvrir l'une des deux parties avec la plaque en verre (fig. 12).

Sur la partie non couverte, déposer deux gouttes de 20 microlitres de l'extrait de l'échantillon en deux points et déposer quelques gouttes de 5 microlitres de l'aflatoxine B₁ servant d'étalon respectivement sur l'une de ces taches d'échantillon et en un autre endroit. Surimposer 1 microlitre d'acide trifluoroacétique sur chacune des trois taches et laisser réagir pendant 10 mn.

- Découvrir la deuxième partie de la plaque et répéter l'opération décrite plus haut, ne pas ajouter l'acide trifluoroacétique.

Une fois développée dans le solvant d'élution constitué par du chloroforme - acétone : 9 / 1 (v / v), la chromatoplaque est examinée sous lumière UV.

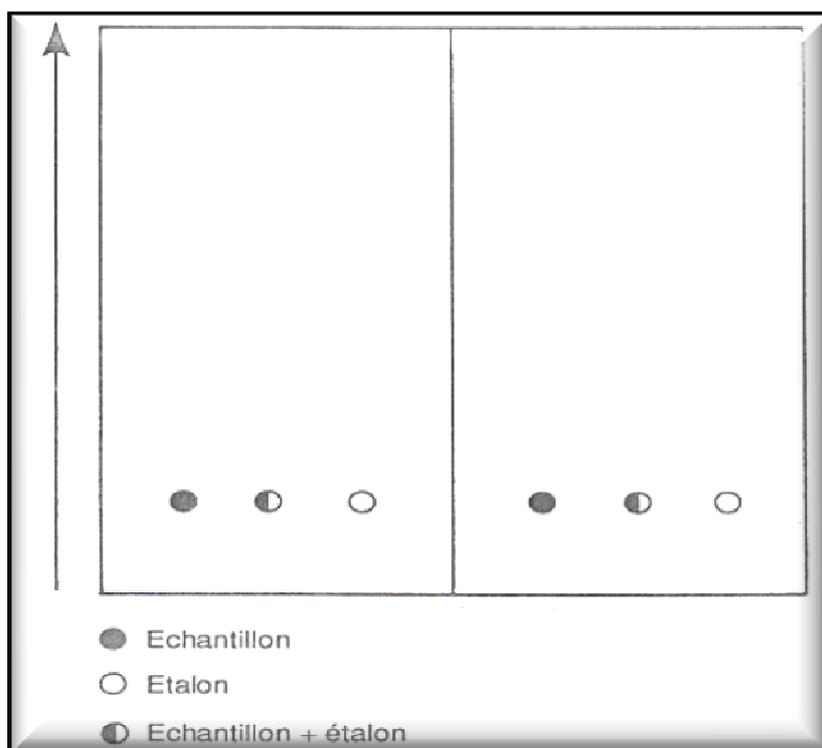


Figure 12 : Représentation schématique de l'épreuve de confirmation par l'acide trifluoroacétique (FAO, 1992)

b) Récupération de l'aflatoxine à partir du gel de silice

Les spots correspondant à l'aflatoxine B₁, obtenus des filtrats de culture des 28 souches, sont localisés, grattés et récupérés dans le chloroforme, dont la quantité correspond à deux fois le volume de la silice. Chaque spot est solubilisé séparément dans le chloroforme avec forte agitation. Le chloroforme est ensuite séparé de la silice par centrifugation à 3000 tours / mn pendant 10

minutes. Le surnageant est concentré et le résidu contenant l'aflatoxine est récupéré soigneusement dans 1 ml de chloroforme et conservé au froid.

L'aflatoxine ainsi purifiée est soumise aux deux tests biologiques, celui de la croissance bactérienne et l'autre sur la germination des grains.

Pour la détermination quantitative, le spot fluorescent ainsi élué dans le chloroforme est soumis à une analyse spectrophotométrique après étalonnage.

2.7.5. Dosage des aflatoxines par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les extraits des échantillons d'arachides qui contiennent de l'aflatoxine une fois purifiés par CCM sont quantifiés par chromatographie liquide haute performance dont le système se présente comme suit :

a) Appareillage

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par:

- Un réservoir de solvants étanche pour éviter toute modification de composition de la phase mobile par évaporation ou par dissolution
- Une pompe JASCO PU – 980 (intelligent hplc pump) qui a pour rôle de provoquer dans la colonne un écoulement de la phase mobile
- Une colonne HPLC de type Nova pack C¹⁸ de dimensions (15 * 0,40cm) d'origine Waters
- Un dégazeur d'origine Water (IN-LINE degasser) qui sert à dégazer la phase mobile afin d'empêcher la libération de gaz au niveau du détecteur.
- Un injecteur Rhéodyne 7725, muni d'une boucle de 20 µl
- Un détecteur à fluorescence d'origine Waters 474 (Scanning fluorescence detector) couplé à un ordinateur digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM³²

b) Principe

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) utilise comme support des particules de faible diamètre placées dans une fine colonne ; la pression nécessaire à l'élution est donc élevée.

Le principe est fondé sur la propulsion à l'aide d'une pompe très puissante de la phase mobile vers la phase stationnaire solide granuleuse polaire ou apolaire. Ces deux phases jouent un rôle actif dans le mécanisme d'adsorption du soluté et d'élution (désorption) ou de partage.

c) Technique d'analyse

L'extrait de l'échantillon à analyser est injecté à l'aide d'une seringue dans une boucle de volume de 20 µl, entraîné par la phase mobile où il se dilue.

La phase mobile est composée d'un mélange de trois solvants d'éluion méthanol / acétonitrile / eau 17 / 17 / 70 (v / v / v) pour un débit de 1ml / mn.

Au cours de la traversée de la colonne, les constituants de l'extrait (Mycotoxines et autres) séparés en bandes, sont inégalement retenus par la phase stationnaire. Ce phénomène s'appelle «rétention», ce qui signifie que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement sont inégales. Ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres au sein de la phase mobile. La fluorescence des aflatoxines est enregistrée par le détecteur fluorométrique, dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement réglées à 360 et 440 nm, placé à la sortie de la colonne et son signal est enregistré en fonction du temps.

La figure 13 illustre le schéma général du système chromatographique

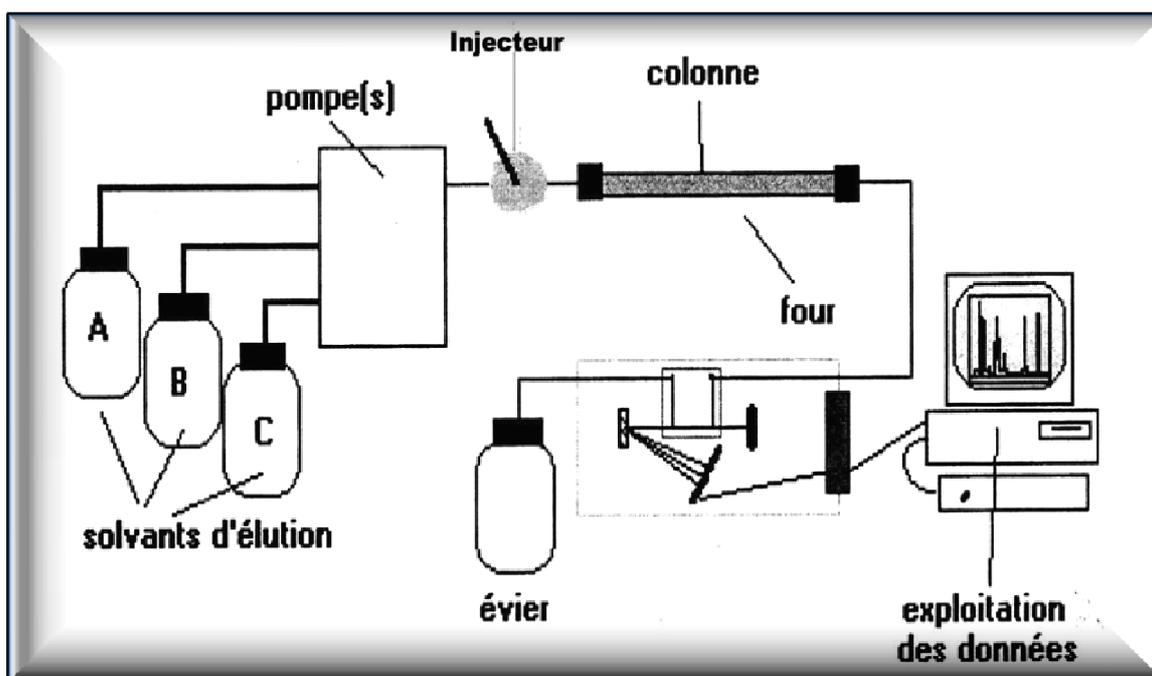


Figure 13 : Schéma de principe de chromatographie en phase liquide (HPLC)

2.8. Test de l'aflatoxine comme herbicide naturel

2.8.1. Procédure de désinfection des grains de plantes parasites

Les grains d'orobanche et de cuscute sont désinfectés séparément pendant 10 mn dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% additionnée de quelques gouttes de Tween 80 à 0,5 %.

Les grains sont ensuite rincés à l'eau distillée stérile et séchés aseptiquement.

Zonno et Vurro (1999; 2002) recommandent un pré conditionnement pour les grains d'orobanche.

A cet effet, les grains désinfectés sont repartis sur des petits disques de papier filtre stérile environ 25 grains par disque.

Ces disques sont placés dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre préalablement imbibé à l'eau distillée stérile, puis les boîtes de Pétri sont enveloppées par du parafilm et incubées à l'obscurité à 25°C pendant 3 semaines (planche IV)

2.8.2. Collecte des exsudats racinaires de la plante hôte

Pour la production des exsudats racinaires qui sont strictement nécessaires à la germination des grains d'orobanche, une centaine de grains de la plante hôte (fève) pré-germés sont semés dans

des terrines contenant du sable et terreau stérile et sont régulièrement arrosés. Vingt jours après le semis, les plantules obtenues sont retirées et le système racinaire est soigneusement rincé à l'eau stérile.

Les plantules sont placées dans des gros tubes en verre et le système racinaire est complètement immergé dans l'eau stérile, les tubes sont enveloppés dans du papier aluminium pour assurer l'obscurité nécessaire au développement des racines.

Les tubes sont ensuite déposés dans un phytotron à 22°C pendant sept jours. Les solutions obtenues sont utilisées pour stimuler la germination des grains d'orobanche (Planche IV)

2.8.3. Test biologique pour la germination des grains de plantes parasites

Les grains désinfectés, sont placés sur des petits disques de papier filtre de 25 grains environ par disque dans des boîtes de Pétri préalablement tapissées du papier Wathman humecté par quelques millilitres (environ 2 à 4 ml) de la solution test.

Les boîtes sont ensuite enveloppées par du parafilm et incubées à 25°C à l'obscurité pendant 7 jours.

La solution test est constituée par le liquide contenant les exsudats racinaires et l'aflatoxine dissoute dans 0,5 ml de chloroforme. Deux concentrations sont préparées 50 % et 100 %

La solution test sans toxine mais, avec la même quantité de chloroforme dans laquelle est dissoute la toxine a servi de témoin. Les notations sont effectuées soigneusement afin de déterminer le pourcentage des grains inhibés.



Procédure de stérilisation



Collecte des exsudats



Système racinaire bien développé



- a** Graines d'orobanche
 - b** Graines de cuscute
- } désinfectés prêts à l'analyse

Planche IV : Test biologique pour la germination des grains des plantes parasites

III – Résultats et interprétation

La teneur en eau, le contrôle de la viabilité et le poids des sous échantillons sont déterminés dès leur arrivée au laboratoire. Les sous échantillons destinés au test de la mycoflore sont mis dans des sacs en papier stérile et hermétiquement fermés pour garder la mycoflore originale et par conséquent apprécier leur degré de contamination. Les sous échantillons destinés aux analyses des mycotoxines sont gardés en chambre froide à 4°C, à l'obscurité jusqu'à leur utilisation.

3.1. Contrôle de la viabilité des grains et détermination du taux d'humidité des échantillons.

La viabilité des semences collectées est évaluée par la méthode de germination des grains. D'après les résultats obtenus (tab. 5 et 6), nous constatons que la majorité des grains sont viables et que les taux de germination sur papier buvard ont toujours été très élevés, se situant entre 95 et 100 % chez toutes les variétés des céréales ainsi que chez la fève et le pois chiche. Chez les arachides, il est moins élevé, se situant entre 68 et 89 %.

La teneur en eau de la semence est considérée comme l'un des facteurs critiques conditionnant non seulement le démarrage de la manifestation microbiologique, en influençant l'invasion des grains par les champignons mais, de plus, elle affecte la production des mycotoxines. Pour cela, la détermination de la teneur en eau est d'une très grande importance dans l'analyse phytosanitaire de la semence. Les deux tableaux 5 et 6 nous renseignent sur les taux d'humidité en pourcentage trouvés dans les différents lots étudiés de céréales et de légumineuses.

Parmi toutes les variétés de céréales analysées (tab.5), le plus faible taux d'humidité qui est de 11,51% est enregistré chez l'orge, plus particulièrement chez la variété Barberousse (O₁B) provenant de l'ITGC d'Alger, alors que le taux le plus élevé est enregistré chez le blé dur, variété GTA (Bd₂) qui est de 14,87 % provenant également de l'ITGC d'Alger. Chez les céréales, seules les variétés GTA et Mimouni présentent respectivement des taux d'humidité relativement importants 14,87 et 14,48%.

Chez légumineuses (tab. 6), nous avons remarqué que les échantillons d'arachides ont une teneur en humidité beaucoup plus élevée que ceux de la fève et de pois chiche. Leur taux varie de 18,81 % chez la population 5 (P₅) à 22,28 % chez la population 4 (P₄). Pour la fève, le taux oscille entre 12,32 et 14,42 % où la variété Gisa 429 provenant de Oued Smar a montré le taux le plus élevé, tandis que la variété Sidi Moussa provenant de Jijel est caractérisée par le taux le plus faible.

Nous constatons également chez le pois chiche que le taux d'humidité des lots analysés est compris entre 12,43 % chez Flip 80.177 provenant de Oued Smar et 14,76 % chez la variété ILC3279 provenant de l'ITGC d' El Khroub.

Tableau 5 : Viabilité des grains et taux d'humidité chez les différents lots des céréales

| Semences | Variétés | Code | Viabilité (%) | Humidité (%) |
|---|---------------------|-----------------|---------------|--------------|
| Blé dur <i>Triticum durum</i> | Waha | Bd ₁ | 96 | 12,83 |
| | GTA | Bd ₂ | 99 | 14,87 |
| | MBB | Bd ₃ | 100 | 12,77 |
| | Sahel | Bd ₄ | 100 | 12,92 |
| | Vitron ₁ | Bd ₅ | 98 | 13,36 |
| | Vitron ₂ | Bd ₆ | 95 | 13,23 |
| Blé Tendre <i>Triticum aestivum</i> | Zidane | Bt ₁ | 98 | 13,87 |
| | Mimmouni | Bt ₂ | 97 | 14,48 |
| | Arz | Bt ₃ | 100 | 13,31 |
| | HD1220 | Bt ₄ | 99 | 12,69 |
| | Anza | Bt ₅ | 96 | 11,93 |
| Orge <i>Hordeum Vulgare</i> | Barberousse | Ob ₁ | 100 | 11,51 |
| | Rihane | Or ₂ | 100 | 13,80 |
| | Jaidor | Oj ₃ | 98 | 13,66 |
| | Tichdrett | Ot ₄ | 97 | 13,68 |
| | Saida ₁ | Os ₅ | 100 | 12,29 |
| | Saida ₂ | Os ₆ | 96 | 13,86 |

3.2. Evaluation de la mycoflore totale :

La recherche de la mycoflore totale concerne l'ensemble des champignons présents au niveau des semences. A cet effet les isollements sont effectués sur des semences entières désinfectés et non désinfectés, et sur l'analyse des embryons. Différentes techniques standardisées à l'échelle internationale pour le contrôle des semences ont été utilisées.

Nous avons identifié les différents champignons isolés en se basant sur la description précise des

Tableau 6 : Viabilité des grains et taux d'humidité chez les différents lots des légumineuses

| Semences | Variétés | Code | Viabilité (%) | Humidité (%) |
|--|-------------------------|------------------|---------------|--------------|
| Fève <i>Vicia Faba</i> | New-Mammoth | F ₁ N | 96 | 14,16 |
| | Aguadulce | F ₂ A | 98 | 13,89 |
| | Sidi-Moussa | F ₃ S | 96 | 12,32 |
| | Sidi-Aich | F ₄ S | 99 | 13,22 |
| | Giza 402 | F ₅ G | 95 | 13,89 |
| | Giza 429 | F ₆ G | 97 | 14,42 |
| Pois chiche <i>Cicer-arietinum</i> | ILC 3279 _(c) | P ₁ I | 99 | 14,76 |
| | X88TH | P ₂ X | 100 | 13,63 |
| | Flip 97.56 | P ₃ F | 96 | 12,89 |
| | ILC 3279 _(s) | P ₄ I | 95 | 13,64 |
| | Flip 84.109 | P ₅ F | 100 | 12,89 |
| | Flip 80.177 | P ₆ F | 96 | 12,43 |
| Arachides <i>Arachis hypogaea</i> | Population ₁ | P ₁ | 77 | 20,53 |
| | Population ₂ | P ₂ | 89 | 19,73 |
| | Population ₃ | P ₃ | 86 | 20,26 |
| | Population ₄ | P ₄ | 84 | 22,28 |
| | Population ₅ | P ₅ | 80 | 18,81 |
| | Population ₆ | P ₆ | 73 | 20,14 |
| | Population ₇ | P ₇ | 68 | 21,09 |

caractères cultureux et microscopiques, avec l'utilisation des différentes clés de détermination.

Les agents fongiques isolés et identifiés englobent une flore pathogène du champ, une flore du stockage et des champignons intermédiaires. Pour chacune de ces catégories nous avons calculé la fréquence et l'abondance de chaque espèce isolée.

3.2.1. Mycoflore pathogène

Chez les céréales, la fréquence des espèces pathogènes (Tab.7) est variable d'un lot à l'autre, allant de 0,16 à 0,66 ; de 0, 2 à 0,6 et de 0,33 à 0,5 respectivement chez le blé dur, le blé tendre et l'orge. L'agent pathogène le plus abondant est le genre *Fusarium* dont nous avons identifié quatre espèces à savoir *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Microdochium nivale* et *Fusarium moniliforme*, alors que l'espèce la plus abondante de tous les pathogènes isolés est *Bipolaris sorokiana* (*Helminthosporium sativum*), suivi par ordre décroissant par le *Phoma sp.* *Fusarium culmorum*, et *F. graminearum*, *Microdochium nivale*, *Fusarium moniliforme* et enfin à un degré moindre *Botrytis cinerea*. Tandis que la fréquence de la mycoflore pathogène des légumineuses varie entre 0,16 - 0,5 chez la fève et le pois chiche et entre 0,14 - 0,42 chez les arachides (Tab. 8)

L'espèce la plus abondante au niveau de tous les lots de légumineuses analysées est le *Phoma sp.* suivi par ordre décroissant de *Phomopsis sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophoma sp.*, *Fusarium sp.* ,

Fusarium solani, *Fusarium oxysporum* f.sp *fabae* et *Fusarium oxysporum* f.sp *arachides*, *Botrytis fabae* et *Colletotrichum sp.*

La contamination maximale en *Fusarium* est observée au niveau des céréales chez la variété (Vitron₁) provenant de Oued Smar et chez les légumineuses, elle est observée chez la variété (Aguadulce) provenant de l'ITGC d'el Khroub. L'espèce *Fusarium moniliforme* est présente chez quelques variétés de blé dur et blé tendre mais absente chez toutes les variétés de l'orge. Nous notons la présence en faible fréquence d'une espèce de *fusarium* qui n'a pas pu être déterminée chez toutes les semences des légumineuses testées à savoir fève, pois chiche et arachide. Le *Microdochium nivale* se trouve associé à une seule variété de blé dur (Vitron1) et à deux variétés d'orge (Barberousse et Tichdrett), quant au *Fusarium moniliforme*, cette espèce se trouve associée à deux variétés de blé dur (GTA, Vitron1) et également à deux variétés de blé tendre (Arz, Anza).

Pour les légumineuses, le *Fusarium solani* est présent chez deux variétés de fève à savoir (Aguadulce, Giza 429) et chez une seule variété de pois chiche (ILC 3279_(s)). *Botrytis cinerea* se montre rare chez les céréales et absent chez les légumineuses, alors que *Botrytis fabae* est présent sur deux variétés de fève (Sidi-Aich et Giza 429). Le *fusarium oxysporum* f.sp *fabae* et *Fusarium oxysporum* f.sp *arachides* se trouvent respectivement associés à trois variétés de fève (New-Mammouth, Aguadulce, Sidi-Aich) et à deux populations d'arachides (Population₄, Population₆). D'après ces résultats, nous pouvons déduire que le pathogène le moins abondant et le moins fréquent est *Botrytis cinerea* chez les céréales isolé, de la variété Waha et chez les légumineuses c'est le *Colletotrichum* isolé des deux variétés de fève New-Mammouth et Sidi-Aich.

Tableau 7 : Mycoflore pathogène chez les céréales

| Semences | BLE DUR | | | | | | | | BLE TENDRE | | | | | | | | ORGE | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----|---------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-----|---|
| | Bd ₁ | Bd ₂ | Bd ₃ | Bd ₄ | Bd ₅ | Bd ₆ | FR | AB | Bt ₁ | Bt ₂ | Bt ₃ | Bt ₄ | Bt ₅ | FR | AB | O ₁ B | O ₂ R | O ₃ T | O ₄ J | O ₅ S | O ₆ S | FR | AB | |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 3 | — | — | — | — | — | 0,16 | 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | — | 2 | — | — | 1,5 | — | 0,33 | 3,5 | — | — | 1,5 | — | 2 | 0,4 | 3,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Microdochium nivale</i> | — | — | — | — | 3,5 | — | 0,16 | 3,5 | — | — | — | — | — | — | — | 1,5 | — | — | 2 | — | — | 0,33 | 3,5 | |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 1,5 | — | — | 2,5 | — | — | 0,33 | 4 | — | — | 1,5 | 3 | — | 0,4 | 4,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Fusarium Graminearum</i> | 3 | 0,5 | — | — | 0,5 | 0,5 | 0,66 | 4,5 | 2 | 0,5 | — | — | — | 0,6 | 2,5 | — | — | 2,5 | — | 0,5 | — | 0,33 | 3 | |
| <i>Bipolaris sorokiana</i> | 4 | 1,5 | — | — | 0,5 | 4 | 0,66 | 10 | 0,5 | — | — | 2 | 2 | 0,6 | 4,5 | 2 | — | — | 2,5 | — | 2,5 | 0,5 | 7 | |
| <i>Phoma sp</i> | — | 2 | — | 2,5 | — | 3,5 | 0,5 | 8 | — | 3 | — | — | — | 0,2 | 3 | — | 1,5 | — | 3,5 | — | 1 | 0,5 | 6 | |

FR: Fréquence AB: Abondance

Tableau 8 : Mycoflore pathogène chez les légumineuses

| Semences | FEVE | | | | | | | | POIS CHICHE | | | | | | | | ARACHIDES | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-----|-----------|-----|----|-----|----|-----|-----|------|------|-----|
| | F ₁ N | F ₂ A | F ₃ S | F ₄ S | F ₅ G | F ₆ G | FR | AB | P ₁ I | P ₂ X | P ₃ F | P ₄ I | P ₅ F | P ₆ F | FR | AB | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | FR | AB | |
| <i>Botrytis fabae</i> | — | — | — | 1,5 | — | 2 | 0,33 | 3,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Colletotrichum sp</i> | 1,5 | — | — | 0,5 | — | — | 0,33 | 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>F. oxysporum f.sp.arachides</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2,5 | — | 1,5 | — | 0,28 | 4 | |
| <i>F.Oxysporum f.sp.fabae</i> | 2 | 0,5 | — | 3,5 | — | — | 0,5 | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>fusarium sp</i> | — | 2,5 | — | — | — | 0,5 | 0,33 | 3 | 1,5 | 0,5 | 1,5 | — | 0,5 | — | 0,5 | 3,5 | 0,5 | — | — | — | — | — | 1 | — | 0,28 | 1,5 |
| <i>Fusarium Solani</i> | — | 2 | — | — | — | 1 | 0,33 | 3 | — | — | — | 2 | — | — | 0,16 | 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Macrophoma sp</i> | — | — | — | 3 | — | — | 0,16 | 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2,5 | — | 0,5 | — | — | — | 0,28 | 3 | |
| <i>Phoma sp</i> | — | 1,5 | — | — | — | 2,5 | 0,33 | 4 | — | 1,5 | — | 1,5 | 2 | — | 0,5 | 5 | — | — | — | — | — | — | 2,5 | — | 0,14 | 2,5 |
| <i>Phomopsis sp</i> | 1,5 | — | — | — | — | — | 0,16 | 1,5 | — | 3 | — | — | — | 2,5 | 0,33 | 5,5 | — | 2,5 | — | — | — | — | — | — | 0,14 | 2,5 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 2 | — | — | — | 1,5 | — | 0,33 | 3,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | 1 | — | 1,5 | — | 0,42 | 4,5 | |

FR: Fréquence AB: Abondance

3.2.2. Mycoflore intermédiaire

Tous les microorganismes, qu'ils soient ou non capables de produire des mycotoxines ont une importance déterminante, au moins sur le plan commercial.

Cette catégorie de flore fongique n'a pas d'incidence sur le rendement des grains mais, sa présence est indésirable car elle est susceptible de déprécier la qualité de la semence.

Les différents champignons isolés sont très variables aussi bien au niveau des céréales qu'au niveau des légumineuses (tab. 9 et 10). Plusieurs genres sont signalés: *Absidia*, *Acremoniella*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, et *Ulocladium*.

Hormis les arachides, les *Alternaria spp* constituent le genre le plus abondant et le plus fréquent chez toutes les semences testées. Nous avons pu identifier trois espèces d'*Alternaria* : *A. alternata* qui est associé avec toutes les semences analysées, *A. tenuissima* associé avec toutes les semences de céréales (blé dur, blé tendre et orge) et uniquement avec une seule semence de légumineuses qui est la fève, alors qu'*A. consortiale* est présent seulement chez quelques variétés de fève et de pois chiche. Les arachides sont contaminées par une seule espèce d'*Alternaria* qui est *A. alternata*.

Les fréquences sont également variables et oscillent entre 0,16 et 1 chez le blé dur et l'orge et entre 0,2 et 1 chez le blé tendre, alors qu'elles oscillent entre 0,16 et 0,83 chez la fève et le pois chiche et entre 0,14 et 1 chez les arachides. Chez ces derniers, le *Rhizopus* est le plus fréquent et le plus abondant suivi par *Monilia sp*, *Trichoderma viride*, *Athelia rolfsii* et *Torula sacchari*.

3.2.3. Mycoflore de stockage

L'analyse de la mycoflore de stockage a permis d'identifier 17 espèces appartenant aux deux principaux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

Les espèces d'*Aspergillus* identifiées chez les céréales sont : *Aspergillus candidus*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A.niger*, *A.repens*, *A. terreus* et *A. versicolor*. Les espèces du genre *Penicillium* identifiées, sont au nombre de 6 espèces à savoir: *Penicillium purpurogenum*, *P. expansum*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. veridicatum* et une espèce indéterminée.

Chez les légumineuses, les espèces identifiées sont : *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A.terreus*, *Penicillium brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. frequentans* et *P. purpurogenum*.

La fréquence de la mycoflore de stockage oscille entre 0,33 et 0,83 ; 0,2 et 0,6 ; 0,16 et 0,66 respectivement chez le blé dur, le blé tendre et l'orge. Elle oscille entre 0,16 et 0,83 ; 0,16 et 0,66; 0,14 et 1 respectivement chez la fève, le pois chiche et l'arachide. Chez ces derniers, l'espèce la plus abondante et la plus fréquente est l'*Aspergillus flavus*

Tableau 9 : Mycoflore intermédiaire (Parasites secondaires et saprophytes) chez les céréales

| Semences | BLE DUR | | | | | | | | BLE TENDRE | | | | | | | | ORGE | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-------|--|
| | Bd ₁ | Bd ₂ | Bd ₃ | Bd ₄ | Bd ₅ | Bd ₆ | FR | AB | Bt ₁ | Bt ₂ | Bt ₃ | Bt ₄ | Bt ₅ | FR | AB | O ₁ B | O ₂ R | O ₃ J | O ₄ T | O ₅ S | O ₆ S | FR | AB | |
| Champignons | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Absidia sp.</i> | — | 2,5 | — | — | 2,5 | — | 0,33 | 5 | — | 4 | — | 2,5 | — | 0,4 | 6,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Acremonia atra</i> | — | — | 3 | 1,5 | — | 3,5 | 0,5 | 8 | — | — | 2,5 | — | — | 0,2 | 2,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Alternaria aternata</i> | 36,5 | 38 | 46 | 48 | 26 | 42 | 1 | 236,5 | 35 | 29,5 | 44,5 | 29 | 26 | 1 | 164 | 38,5 | 29 | 29,5 | 18,5 | 30,5 | 38,5 | 1 | 184,5 | |
| <i>A.tenuissima.</i> | — | 9,5 | 7,5 | — | 17 | 5 | 0,66 | 39 | 8 | 16 | — | 5,5 | — | 0,6 | 29,5 | — | 5 | 3,5 | — | 4 | 0,5 | 0,66 | 13 | |
| <i>Alternaria sp.</i> | — | — | — | — | 6,5 | — | 0,16 | 6,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3 | — | — | 0,16 | 3 | |
| <i>Cheatomium sp</i> | — | 0,5 | — | — | — | 2,5 | 0,33 | 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | 2,5 | — | 0,5 | — | — | 0,33 | 3 | |
| <i>Cladosporium Cladosporioides.</i> | 4 | — | — | 3,5 | 5 | 2,5 | 0,66 | 15 | 3 | 4,5 | — | 5,5 | — | 0,6 | 13 | 3 | 3,5 | — | — | — | — | 0,5 | 10,5 | |
| <i>Cladosporium.sp</i> | — | 0,5 | — | 5,5 | — | — | 0,33 | 6 | 5 | — | 3,5 | 1 | 2,5 | 0,8 | 12 | — | — | 2,5 | — | — | — | 0,16 | 2,5 | |
| <i>Curvularia sp.</i> | — | — | 2,5 | — | — | — | 0,16 | 2,5 | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | 1,5 | 2,5 | — | — | 0,5 | 6 | |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | — | 3,5 | — | 2,5 | — | — | 0,33 | 6 | — | 3 | — | 3 | — | 0,4 | 6 | 2,5 | — | 2,5 | — | — | 3 | 0,5 | 8 | |
| <i>Mucor sp</i> | — | 3 | — | — | 2,5 | — | 0,33 | 5,5 | — | 4 | — | 0,5 | — | 0,4 | 4,5 | — | 3,5 | — | 0,5 | — | — | 0,33 | 4 | |
| <i>Nigrospora sp</i> | — | — | — | 2,5 | — | 4 | 0,33 | 6,5 | — | 3,5 | 1,5 | — | 2,5 | 0,6 | 7,5 | — | 3,5 | — | 4,5 | — | 1,5 | 0,5 | 9,5 | |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> | 6,5 | 8 | — | 2 | 4,5 | — | 0,66 | 21 | 8,5 | 2,5 | — | 4 | 6,5 | 0,8 | 21,5 | 5 | 6 | — | 4,5 | — | 1,5 | 0,66 | 17 | |
| <i>Stemphylium botryosum.</i> | 1,5 | — | 5 | 3 | — | 3,5 | 0,66 | 13 | — | 5 | 2,5 | — | 3,5 | 0,6 | 11 | — | 4,5 | — | 1,5 | — | 2 | 0,5 | 8 | |
| <i>Trichothecium sp</i> | — | — | 3 | — | — | — | 0,16 | 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,5 | — | — | 1,5 | — | 0,33 | 2 | |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | — | — | 4,5 | — | 4,5 | — | 0,33 | 9 | 4 | — | — | 1,5 | — | 0,4 | 5,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Ulocladium sp.</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3,5 | — | 2,5 | — | 0,4 | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | |

Tableau10 : Mycoflore intermédiaire (Parasites secondaires et saprophytes) chez les légumineuses

| Semences | FEVE | | | | | | | | POIS CHICHE | | | | | | | | ARACHIDES | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|------|---|
| | F ₁ N | F ₂ A | F ₃ S | F ₄ S | F ₅ G | F ₆ G | FR | AB | P ₁ I | P ₂ X | P ₃ F | P ₄ I | P ₅ F | P ₆ F | FR | AB | AP ₁ | AP ₂ | AP ₃ | AP ₄ | AP ₅ | AP ₆ | AP ₇ | FR | AB | |
| Champignons | — | — | — | — | 2 | — | 0,16 | 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Levure</i> | — | — | — | — | 2 | — | 0,16 | 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Alternaria alternata</i> | 5 | 4 | 8 | — | 6,5 | 4 | 0,83 | 27,5 | 6 | 9 | — | 6,5 | 4,5 | 3 | 0,83 | 29 | — | — | 3 | 3,5 | — | 3 | — | 0,42 | 9,5 | |
| <i>A. Tenuissima</i> | — | 2,5 | — | 3 | — | 2 | 0,5 | 7,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>A. Consortiale</i> | 2,5 | — | — | — | 3 | — | 0,33 | 5,5 | — | 2,5 | — | 2,5 | — | — | 0,33 | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Athelia rolfsii</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 4,5 | — | — | 2,5 | — | — | 0,28 | 7 | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | — | 4,5 | 3 | 2,5 | — | 4,5 | 0,66 | 14,5 | — | — | — | — | 2,5 | 1,5 | 0,33 | 4 | 2 | — | — | — | 3,5 | — | — | 0,28 | 5,5 | |
| <i>Monilia sp.</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 10 | — | — | 6,5 | — | 0,28 | 16,5 | |
| <i>Mucor sp</i> | 4 | — | — | 3,5 | — | 1,5 | 0,5 | 9 | 2,5 | — | 2 | — | 0,5 | — | 0,5 | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Rhisopus sp</i> | 4 | 6 | — | 4,5 | 5,5 | 1 | 0,83 | 21 | 1,5 | 2,5 | 2 | 3 | — | 2,5 | 0,83 | 11,5 | 4 | 5 | 6 | 5 | 2 | 5 | 8 | 1 | 40 | |
| <i>Stemphylium botryosum</i> | — | 1,5 | 2,5 | — | 3 | 1,5 | 0,66 | 8,5 | 1,5 | 3 | — | 4,5 | — | 1,5 | 0,66 | 10,5 | — | 4 | — | 0,5 | — | — | — | 0,28 | 4,5 | |
| <i>Torula saccharii</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3 | — | 2,5 | — | — | — | 0,28 | 5,5 | |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | — | 3 | — | — | 3,5 | — | 0,33 | 6,5 | — | 4 | — | — | 5,5 | — | 0,33 | 9,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Trichoderma viride</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 4,5 | 3 | 1 | — | 3,5 | — | — | 0,57 | 13 | |
| <i>Ulocladium sp</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2,5 | — | — | — | — | 0,16 | 2,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| Champignon non identifié | — | 2 | 2,5 | 1,5 | — | — | 0,5 | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | — | 0,14 | 2 | |

Tableau 11 : Mycoflore du stockage chez les céréales

| Semences Champignons | BLE DUR | | | | | | | | BLE TEDRE | | | | | | | | ORGE | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-----|---|
| | Bd ₁ | Bd ₂ | Bd ₃ | Bd ₄ | Bd ₅ | Bd ₆ | FR | AB | Bt ₁ | Bt ₂ | Bt ₃ | Bt ₄ | Bt ₅ | FR | AB | O ₁ B | O ₂ R | O ₃ j | O ₄ t | O ₅ S | O ₆ S | FR | AB | |
| <i>Aspergillus Candidus</i> | 1,5 | — | 2 | — | — | — | 0,33 | 3,5 | — | 2,5 | — | — | 3,5 | 0,4 | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>A. Niger</i> | 3,5 | 6 | — | 4 | 4,5 | 3 | 0,83 | 21 | 2,5 | — | 4 | 0,5 | — | 0,6 | 7 | 4 | — | 6,5 | 4 | — | 1,5 | 0,66 | 16 | |
| <i>A. Flavus</i> | — | 1,5 | — | — | — | — | 0,5 | 1,5 | — | 0,5 | — | — | — | 0,2 | 0,5 | — | — | — | — | — | 2,5 | 0,16 | 2,5 | |
| <i>A. Glaucus</i> | 2,5 | 5 | — | 2 | 0,5 | — | 0,66 | 10 | 3 | — | 2 | — | 3,5 | 0,6 | 8,5 | 2 | — | 3,5 | — | 3 | 2,5 | 0,66 | 11 | |
| <i>A. Terreus</i> | — | 2,5 | 1,5 | — | — | 3 | 0,5 | 7 | — | — | — | 4 | 3,5 | 0,4 | 7,5 | 1,5 | 3 | — | — | 0,5 | — | 0,5 | 5 | |
| <i>A. Versicolor</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 4,5 | — | 0,2 | 4,5 | — | 0,5 | — | — | 3 | — | 0,33 | 3,5 | |
| <i>A. Repens</i> | — | — | 3 | — | — | 3,5 | 0,33 | 6,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | 0,5 | 3 | 0,5 | 5,5 | |
| <i>Penicillium sp.</i> | 1,5 | — | 3 | — | — | 1 | 0,5 | 5,5 | — | 2 | 1,5 | — | 2,5 | 0,6 | 6 | 3 | 3,5 | — | 4,5 | 2 | — | 0,66 | 13 | |
| <i>P. Purpurogenum</i> | — | 4 | 2 | — | 2,5 | — | 0,5 | 8,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | 3,5 | — | 2 | — | — | 0,33 | 5,5 | |
| <i>P. Veridicatum</i> | 2 | — | — | 4 | 2,5 | 2 | 0,66 | 10,5 | 2,5 | — | — | 4 | — | 0,4 | 6,5 | 2,5 | — | 0,5 | — | 1,5 | 3 | 0,66 | 7,5 | |
| <i>P. Expansum</i> | 3,5 | — | 3,5 | — | — | — | 0,33 | 7 | — | 4 | — | 2 | 2,5 | 0,6 | 8,5 | — | 3 | — | 1,5 | — | 3,5 | 0,5 | 8 | |
| <i>P. citrinum</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1,5 | — | — | 0,2 | 1,5 | 1,5 | 2 | 5 | — | 6,5 | — | 0,66 | 15 | |
| <i>P. Crysogenum</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | 1,5 | — | — | 3,5 | — | 0,4 | 5 | 0,5 | — | 2,5 | — | — | — | 0,33 | 3 | |

FR : Fréquence AB : Abondance

Tableau 12 : Mycoflore du stockage chez les légumineuses

| Variétés | FEVE | | | | | | | | POIS CHICHE | | | | | | | | ARACHIDES | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|------|
| | F ₁ N | F ₂ A | F ₃ S | F ₄ S | F ₅ G | F ₆ G | FR | AB | P ₁ I | P ₂ X | P ₃ F | P ₄ I | P ₅ F | P ₆ F | FR | AB | P ₁ | P ₂ | P ₃ | P ₄ | P ₅ | P ₆ | P ₇ | FR | AB |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 0,5 | — | 0,5 | 1,5 | — | — | 0,5 | 2,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | 5 | 3,5 | 2,5 | 6,5 | 2,5 | 4 | 8,5 | 1 | 32,5 |
| <i>A. parasiticus</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3 | — | — | 5,5 | 2 | 1 | 3 | 0,71 | 14,5 |
| <i>A. Niger</i> | 3 | 3,5 | — | — | 3,5 | 0,5 | 0,66 | 9,5 | 2 | — | — | 3,5 | — | 2,5 | 0,5 | 6 | 3 | 3,5 | 6 | 4 | 6,5 | 5,5 | 4,5 | 1 | 30 |
| <i>A. terreus</i> | — | — | — | 1,5 | — | — | 0,16 | 1,5 | — | — | — | — | — | 1,5 | 0,16 | 1,5 | — | 3,5 | — | — | 1,5 | 3,5 | — | 0,42 | 8,5 |
| <i>A. Ochraceus</i> | — | — | 3 | — | — | 2,5 | 0,33 | 5,5 | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | 1,5 | — | 2,5 | — | 0,42 | 6 |
| <i>A. Candidus</i> | — | 2,5 | — | 2 | 2,5 | — | 0,5 | 7 | — | 1,5 | — | — | — | 2 | 0,33 | 3,5 | — | — | — | 3 | 2,5 | — | — | 0,28 | 5,5 |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> | — | — | 2,5 | 3,5 | — | 0,5 | 0,5 | 6,5 | — | — | — | 1,5 | — | 2 | 0,33 | 3,5 | 2,5 | — | — | — | — | 2 | — | 0,28 | 4,5 |
| <i>P. citrinum</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2,5 | — | 0,16 | 2,5 | 0,5 | — | 2 | — | 1 | — | — | 0,42 | 3,5 |
| <i>P.expansum</i> | — | — | — | — | 2,5 | — | 0,16 | 2,5 | 2 | 3,5 | — | — | — | — | 0,33 | 5,5 | — | 3 | 4 | 2,5 | 2 | — | — | 0,57 | 11,5 |
| <i>P.oxysporum</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3,5 | — | — | — | — | 0,14 | 3,5 |
| <i>P. Frequentans</i> | 3 | — | 2 | 4 | — | — | 0,5 | 9 | — | — | — | 2,5 | — | — | 0,16 | 2,5 | — | — | 2 | — | — | — | — | 0,14 | 2 |
| <i>P.Purpurogenum</i> | 2 | 3,5 | — | — | — | — | 0,33 | 5,5 | 3 | — | — | 3 | 1 | 1,5 | 0,66 | 8,5 | 1,5 | 2 | 1,5 | — | 3 | — | — | 0,57 | 8 |

FR : Fréquence AB : Abondance

Globalement, les résultats obtenus indiquent que les taux de contamination des principaux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* varie d'une semence à l'autre.

Chez les arachides, le genre *Aspergillus* a dominé la mycoflore alors que le genre *Penicillium* est plus abondant chez les variétés de l'orge et enfin le *Fusarium* montre une dominance relative chez le blé dur (fig. 14 et 15)

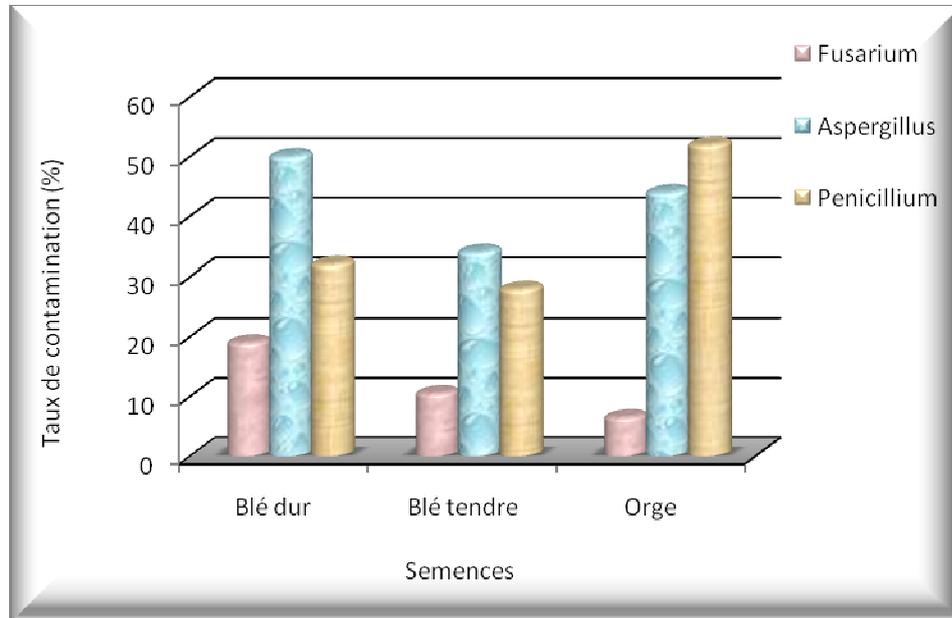


Figure 14: Taux de contamination de céréales par les trois types de champignons (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*)

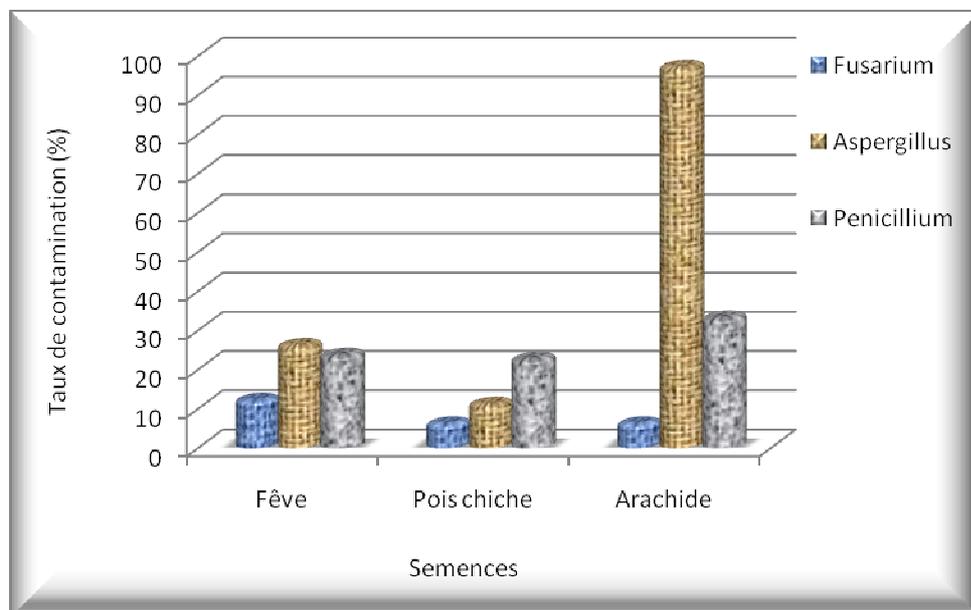


Figure 15 : Taux de contamination de légumineuses par les trois types de champignons (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*)

3.3. Recensement de la mycoflore interne chez les lots analysés de céréales et de légumineuses

Les résultats de l'analyse sanitaire de quelques variétés de céréales et de légumineuses alimentaires ont révélé la présence au niveau interne d'une mycoflore abondante et diversifiée dans les différents lots analysés.

Les taux de contaminations sont présentés dans les tableaux 13 et 14. Nous constatons respectivement chez les céréales et les légumineuses que 50 à 81 % et 8 à 38 % des grains de chaque lot, étaient contaminés par des agents fongiques appartenant à plusieurs genres et espèces.

Les taux de contamination sont variables d'un lot à l'autre, allant de 71 à 85 %, 59 à 79 % et de 50 à 73 % respectivement chez le blé dur, le blé tendre et l'orge (fig. 15). Ces taux sont de 22 à 37 %, 8 à 34 % et 27 à 41 % respectivement chez la fève, le pois chiche et l'arachide (fig.16).

Les variétés MBB, Jaidor, Saida₁, Sidi-Moussa, ILC3279_(c), Population 3, Population 5, Population 7 ne présentent aucune contamination par les agents pathogènes et seule la variété Flip 97.56 est indemne de champignons de stockage.

Parmi tous les échantillons analysés, nous constatons que la variété Flip 97.56 est la moins contaminée (8 %) provenant de l'ITGC de Sétif, alors que la plus contaminée est la variété GTA (85 %) provenant de l'ITGC d'Alger. Nous constatons toujours d'après les mêmes tableaux, que les semences de céréales, sont celles qui hébergent le plus grand nombre d'espèces comparées aux légumineuses.

3.4. Distribution de la contamination fongique dans les différentes parties de la graine:

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que la plupart des champignons transmis par les semences se trouvent presque toujours au moins dans le péricarpe et les téguments. Mais nous avons pu déceler certains organismes au niveau de l'endosperme, des cotylédons et même dans les embryons.

L'examen des embryons a montré que l'agent du charbon nu est absent de tous les lots de semences analysées. Nous avons constaté qu'environ 3 % des embryons chez le blé dur sont contaminés par *Alternaria* et qu'environ 0,5 % chez l'orge sont contaminés par le *Penicillium* (Tab.15). En revanche aucun agent fongique n'a été détecté dans les embryons de toutes les variétés analysées du blé tendre. Alors que l'examen des embryons chez les légumineuses a révélé l'absence d'agent fongique dans les embryons de la fève et de pois chiche, et la présence d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* chez quelques embryons d'arachides (tab.16).

Tableau 13 : Recensement de la mycoflore interne des lots de céréales analysés.

| Semences | Variétés | MP% | MI% | MS% | MT% | GC% |
|-------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Blé dur | Waha | 13 | 43 | 15 | 71 | 67 |
| | GTA | 7 | 77 | 19 | 85 | 81 |
| | MBB | - | 68 | 14 | 82 | 79 |
| | Sahel | 4 | 63 | 10 | 77 | 77 |
| | Vitron ₁ | 7 | 67 | 8 | 82 | 80 |
| | Vitron ₂ | 3 | 56 | 16 | 75 | 75 |
| Blé tendre | Zidane | 2 | 61 | 11 | 74 | 71 |
| | Mimmouni | 3 | 58 | 10 | 79 | 77 |
| | HD1220 | 5 | 54 | 9 | 68 | 68 |
| | Arz | 7 | 45 | 18 | 70 | 68 |
| | Anza | 3 | 41 | 15 | 59 | 59 |
| Orge | Barberousse | 3 | 47 | 13 | 63 | 62 |
| | Rihane | 2 | 55 | 16 | 73 | 73 |
| | Jaidor | - | 46 | 18 | 64 | 63 |
| | Tichdrett | 4 | 34 | 12 | 50 | 50 |
| | Saida1 | - | 42 | 14 | 56 | 56 |
| | Saida2 | 4 | 45 | 17 | 66 | 63 |

MP: Mycoflore pathogène

MI : Mycoflore intermédiaire

MS : Mycoflore de stockage

MT : Mycoflore totale

GC : Nombre de grains contaminés

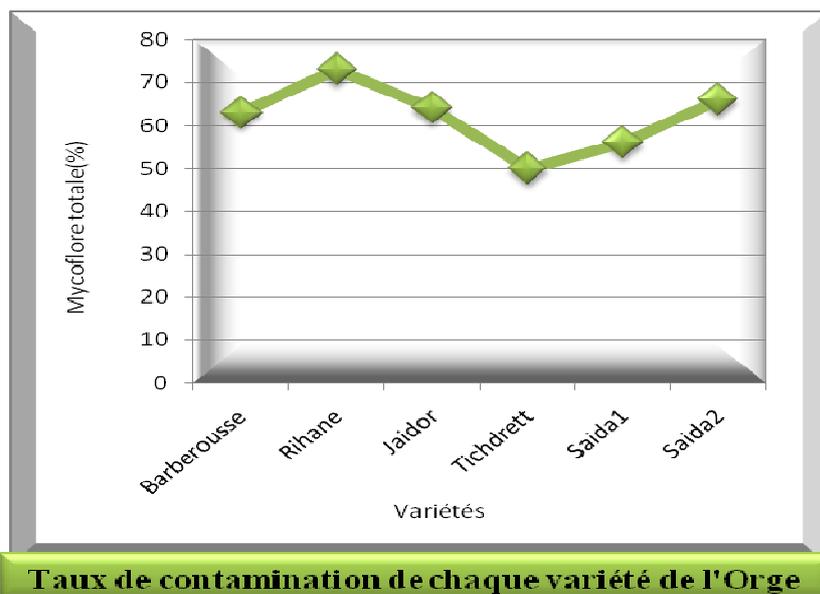
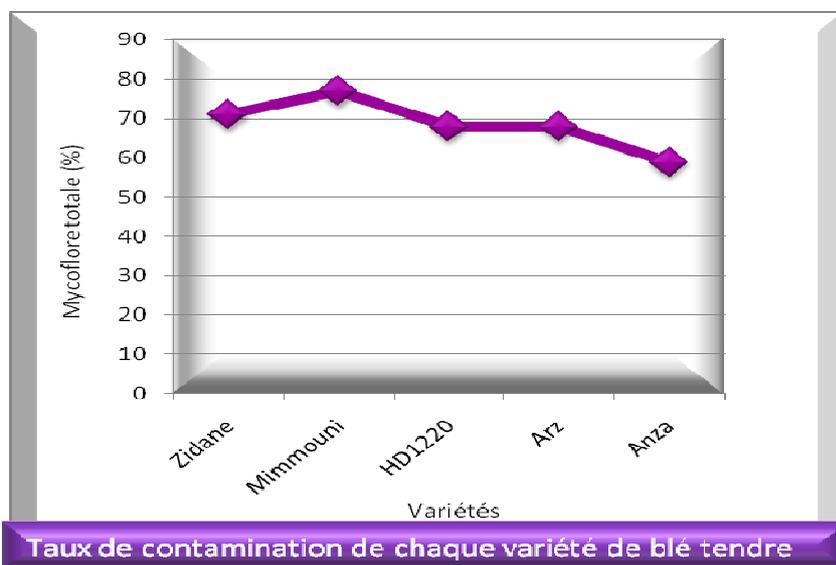
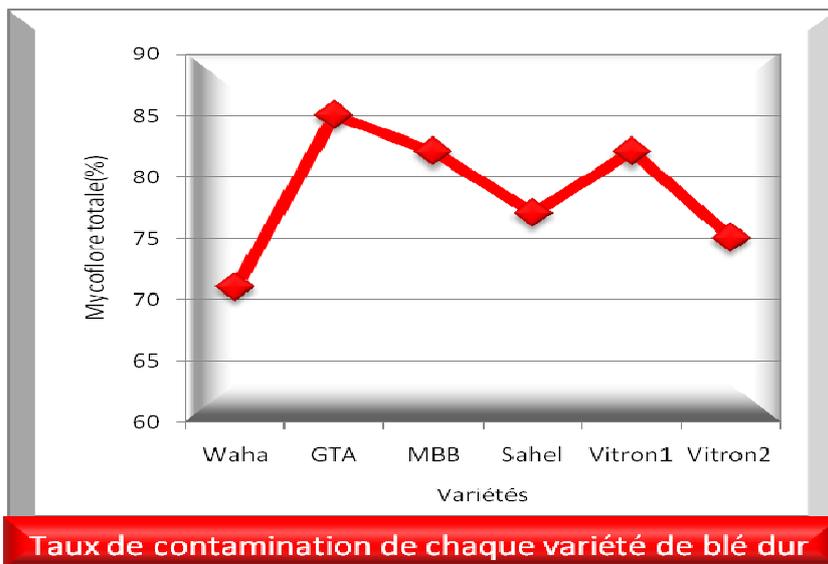


Figure 16: Pourcentage total de contamination des semences de céréales

Tableau 14 : Recensement de la mycoflore interne des lots de légumineuses analysés.

| Semences | Variétés | MP% | MI% | MS% | MT% | GC% |
|--------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Fève | N-Mammouth | 6 | 16 | 8 | 30 | 27 |
| | Aguadulce | 7 | 21 | 9 | 37 | 37 |
| | Sidi-Moussa | - | 15 | 7 | 22 | 22 |
| | Sidi-Aich | 6 | 20 | 11 | 37 | 34 |
| | Giza 402 | 3 | 23 | 7 | 33 | 30 |
| | Giza 429 | 5 | 17 | 3 | 25 | 24 |
| Pois chiche | ILC 3279 | - | 9 | 17 | 17 | 17 |
| | X88TH | 8 | 22 | 34 | 34 | 31 |
| | FLIP 97.56 | 2 | 6 | - | 8 | 8 |
| | ILC 3279 | 5 | 13 | 9 | 27 | 27 |
| | FLIP 84.109 | 2 | 12 | 6 | 20 | 18 |
| | FLIP 80.177 | 4 | 7 | 8 | 19 | 19 |
| Arachides | Population 1 | 3 | 15 | 19 | 37 | 36 |
| | Population 2 | 6 | 17 | 15 | 38 | 33 |
| | Population 3 | - | 14 | 20 | 34 | 34 |
| | Population 4 | 5 | 12 | 24 | 41 | 38 |
| | Population 5 | - | 9 | 21 | 30 | 30 |
| | Population 6 | 3 | 17 | 19 | 39 | 37 |
| | Population 7 | - | 9 | 18 | 27 | 25 |

MP: Mycoflore pathogène

MI : Mycoflore intermédiaire

MS : Mycoflore de stockage

MT : Mycoflore totale

GC : Nombre de grains contaminés

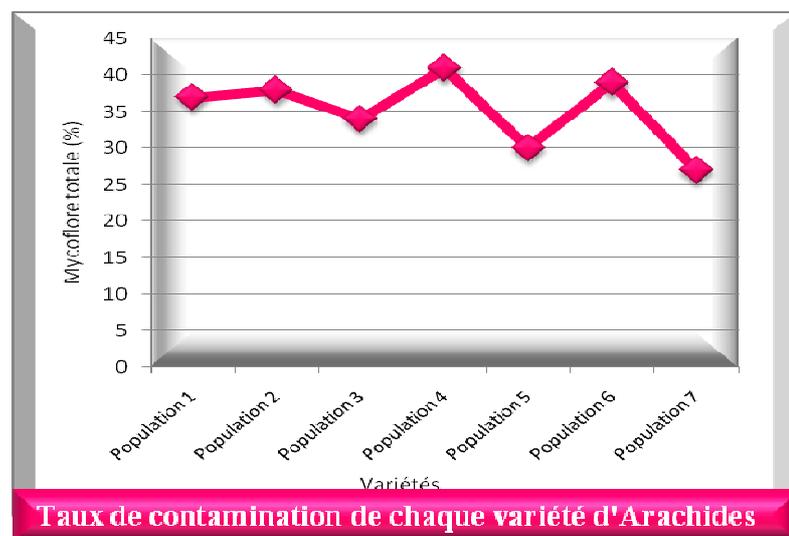
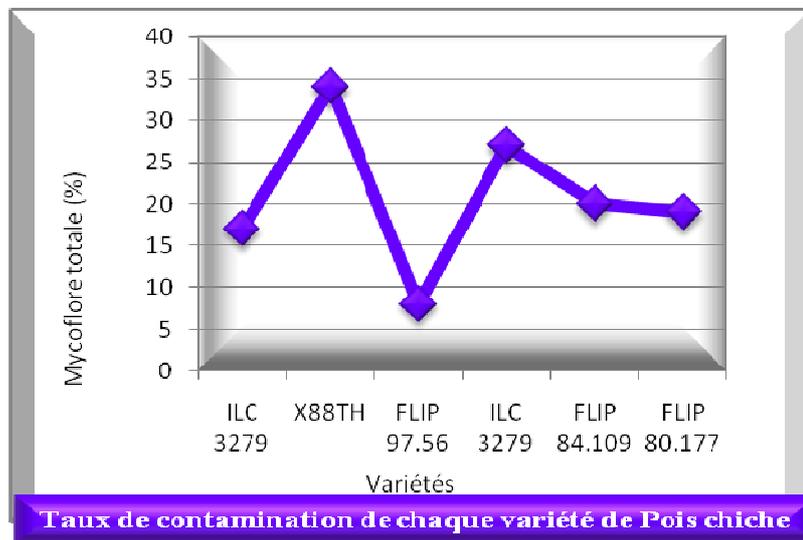
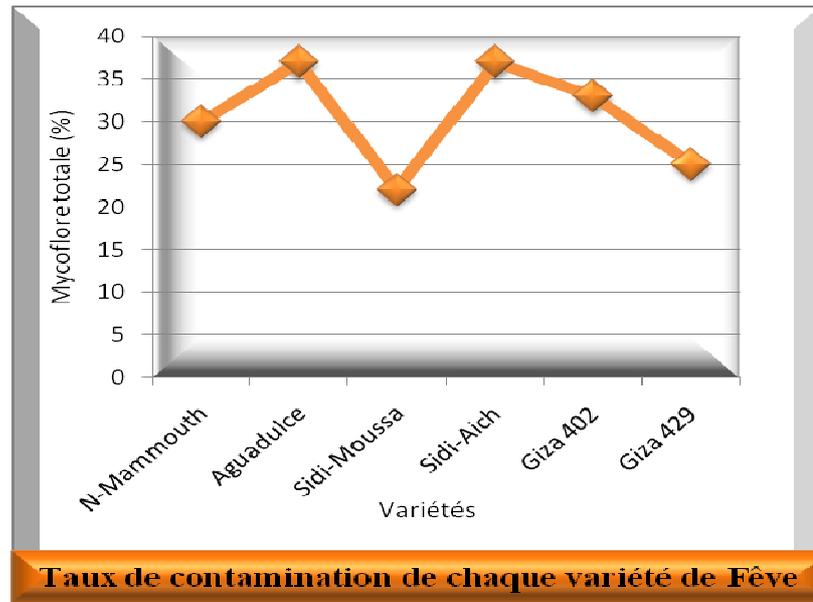


Figure 17: Pourcentage total de contamination des semences des légumineuses

Tableau 15 : Présence des agents fongiques dans toutes les parties de la graine des céréales

| Semences | Blé dur | | | Blé tendre | | | Orge | | |
|------------------------------|-----------|------------|---------|------------|------------|---------|-----------|------------|---------|
| | péricarpe | Endosperme | Embryon | péricarpe | Endosperme | Embryon | péricarpe | Endosperme | Embryon |
| Champignons | | | | | | | | | |
| <i>Absidia sp</i> | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>Acremoniella sp</i> | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>Alternaria sp</i> | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| <i>Aspergillus sp</i> | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| <i>Botrytis sp</i> | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cheatomium sp</i> | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>Cladosporium sp</i> | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| <i>Curvularia sp</i> | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>Epicoccum sp</i> | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>Fusarium sp</i> | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| <i>Mucor sp</i> | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>Nigrospora sp</i> | + | - | - | + | + | - | + | - | - |
| <i>Phoma sp</i> | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>Penicillium sp</i> | + | + | - | + | - | - | + | + | + |
| <i>Rhizopus sp</i> | + | + | - | - | + | - | + | + | - |
| <i>Stemphylium sp</i> | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>Trichothécium sp</i> | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>Trichoderma, sp</i> | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>Ulocladium sp</i> | - | - | - | + | - | - | - | - | - |

Tableau 16 : Présence des agents fongiques dans toutes les parties de la graine des légumineuses

| Semences | Fève | | | Poischiche | | | Arachides | | |
|--------------------|-----------|------------|---------|------------|------------|---------|-----------|------------|---------|
| | Téguments | Cotylédons | Embryon | Téguments | Cotylédons | Embryon | Gousses | Cotylédons | Embryon |
| Champignons | | | | | | | | | |
| Athelia sp | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Alternaria sp | + | + | - | - | - | - | + | + | - |
| Aspergillus sp | + | + | - | + | + | - | + | + | + |
| Botrytis sp | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Colletotrichum sp | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cladosporium sp | + | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Eurotium sp | - | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Levure sp | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Fusarium sp | + | - | - | + | + | - | + | - | - |
| Monilia sp | - | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Macrophoma sp | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Mucor sp | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| Phoma sp | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Phomopsis sp | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Penicillium sp | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| Rhizoctonia sp | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Rhizopus sp | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Stemphylium sp | + | - | - | - | + | - | + | - | - |
| Trichoderma, sp | + | - | - | - | + | - | + | + | - |
| Torula sp | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Ulocladium sp | - | - | - | + | - | - | - | - | - |

3.5. Description d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sur différents milieux de culture :

Parmi les espèces importantes du genre *Aspergillus* identifiées, nous avons *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* dont leur comportement est décrit sur plusieurs milieux de culture (Planche V)

- *Aspergillus flavus* Link

- **Sur milieu Czapek**

La croissance des colonies est plus ou moins rapide, atteint un diamètre de 5 à 6 cm au 7^{ème} jour d'incubation ; ces colonies d'aspect granuleux dont le mycélium tapisse la boîte, présentent souvent des rainures jaunes au début et deviennent jaunes verdâtres à vert foncé avec l'âge. Le revers est incolore avec absence d'exsudats et de pigments solubles. Chez certains isolats, nous avons noté la présence de sclérotés, de couleur brunâtre avec un reflet noir.

- **Sur milieu PSA (Potato sucrose agar)**

Le diamètre de la colonie est compris entre 5,5 et 6, 5 cm dont l'aspect du mycélium est granuleux et devient par la suite poudreux, avec au centre une touffe de mycélium aérien et laineux.

L'envers est blanc- jaunâtre à jaune pâle qui s'estompe au fur et à mesure qu'on s'éloigne du centre; il n'y a aucun exsudat et aucun changement de couleur du milieu.

- **Sur milieu YES (Yeast extract sucrose agar)**

La croissance du mycélium est rapide, la colonie envahit toute la surface du milieu au 5^{ème} jour, qui est d'aspect granuleux avec des flocons de mycélium cotonneux au centre; la couleur du mycélium est alternée entre le vert - jaunâtre et le vert. On note la présence d'un halo blanc de 2 mm d'épaisseur qui entoure le thalle et disparaît dès le 7^{ème} jour avec présence d'exsudat.

Le revers est légèrement jaunâtre, d'aspect plissé et devient jaune- orangeâtre à partir du centre.

- **Sur milieu AFPA (*Aspergillus flavus et parasiticus* agar)**

A 30°C le diamètre atteint 2 à 3 cm, la croissance est plus ou moins lente, avec la présence au centre d'une touffe de mycélium aérien de couleur beige foncé à marron –jaunâtre; la surface est plane, de couleur blanc pâle, l'envers est orange dès le 2^{ème} jour d'incubation.

Les caractères microscopiques montrent un conidiophore long, hyalin et rugueux, la rugosité est notée près des vésicules ; celles –ci sont sphériques à légèrement allongées.

Les têtes sont typiquement rayonnées, globulaires, chez certains isolats, la tête est unisériée, comportant une seule rangée de phialides, chez d'autres elle est bisériée.

Les phialides sont incolores, les spores sont globuleuses et lisses, mais chez certains isolats, elles sont légèrement rugueuses.

- *Aspergillus parasiticus* Speare

- **Sur milieu Czapek**

Les colonies présentent une croissance rapide au départ, avec un diamètre atteignant 4 à 5 cm montrant un aspect granuleux bien distinct ; le centre des colonies est surmonté d'une touffe de mycélium aérien de couleur vert-jaunâtre à marron-jaunâtre.

La croissance en zonation des cultures est de couleur alternée entre le vert-jaunâtre et le vert. Le revers de la culture est jaune pâle à rosâtre avec un centre plus ou moins foncé. Il y a absence d'exsudat et de pigment soluble

- **Sur milieu PSA (Potato sucrose agar)**

Le diamètre de la colonie est de 6 cm, d'aspect laineux, de couleur vert foncé et devient marron – verdâtre avec l'âge ; la colonie montre la présence d'un halo blanchâtre laineux de 4 cm d'épaisseur. Le centre est plus ou moins dense de couleur marron-jaunâtre à vert –olive avec absence d'exsudat et aucun changement de couleur du milieu de culture; le revers de la colonie est beige – grisâtre.

- **Sur milieu YES (Yeast extract sucrose agar)**

Le mycélium tapisse la surface de la boîte, à partir du 7^{ème} jour d'incubation ; à une température de 25°C la colonie est de couleur vert à vert foncé .L'aspect cultural est généralement farineux et la surface de la colonie est parsemée de petits flocons de mycélium de couleur vert foncé à marron au centre; sans présence d'exsudat. Le revers plissé est de couleur jaune - orangeâtre.

- **Sur milieu AFPA (*Aspergillus flavus et parasiticus* agar)**

Les colonies présentent le même comportement que celui décrit pour *Aspergillus flavus*

Les caractères microscopiques montrent un conidiophore lisse, court avec la présence d'une seule rangée de phialides, hyalines à colorées en vert, rayonnantes et disposées tout autour de la vésicule. Les conidies sont plus grosses que celles d'*Aspergillus flavus*, épineuses et de couleur marron.

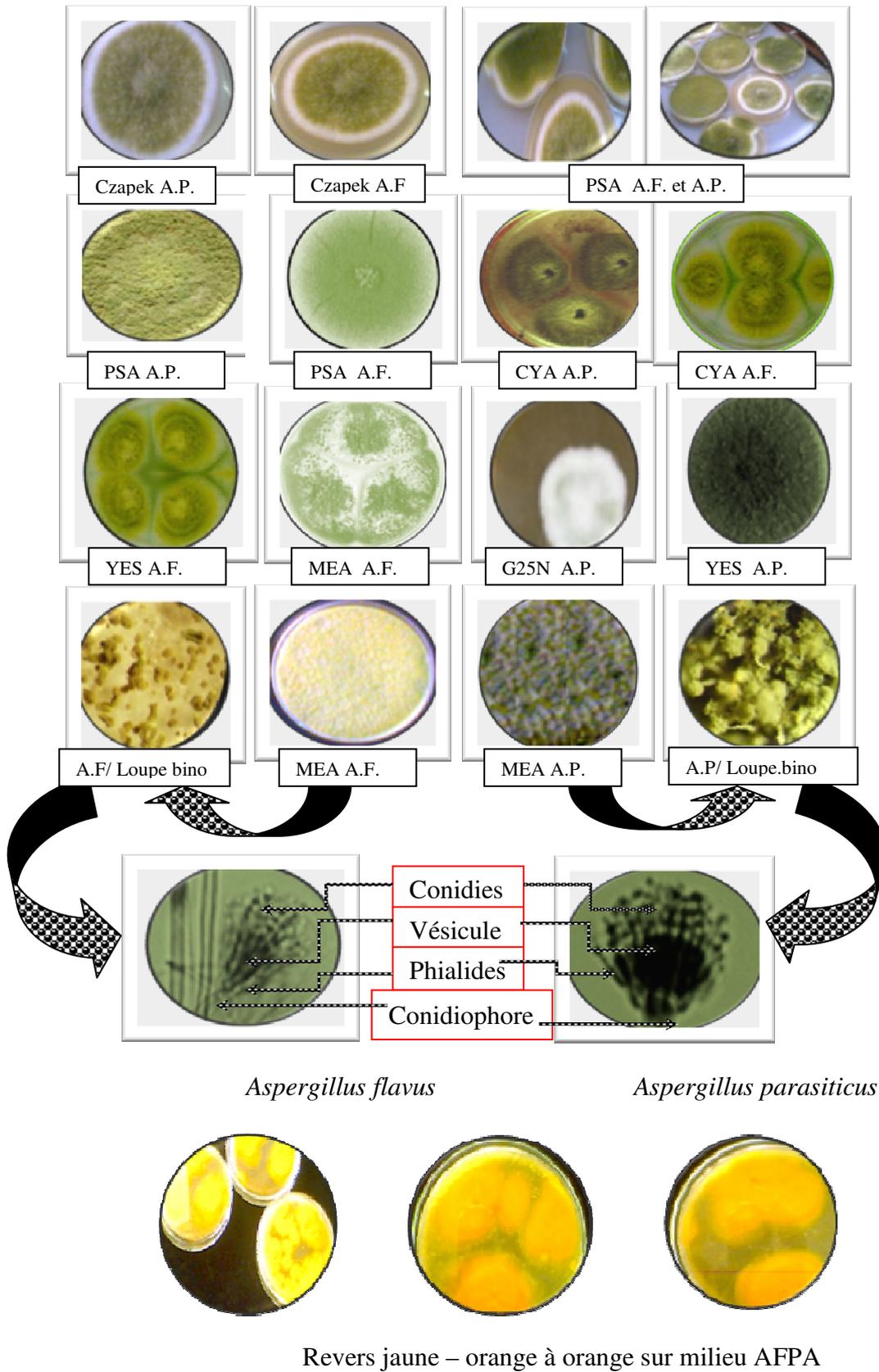


Planche V : *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sur différents milieux de culture

3.6. Description d'*Aspergillus flavus et parasiticus* selon la méthode de Pitt et Hocking, 1985

Les tableaux 17 et 18 présentent les résultats décrivant le diamètre de la colonie et les caractères cultureux dans les trois milieux de culture (MEA, G25N et CYA) à différentes températures (5°C, 25°C et 37°C)

Tableau 17 : Description d'*Aspergillus flavus* selon la méthode de Pitt et Hocking, 1985

| Milieu de culture | T° d'incubation | Diamètre de la colonie (cm) | Caractères cultureux |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|---|
| MEA | 25° | 5 – 7,5 | L'aspect est granuleux, vert à vert-jaunâtre dont la croissance rapide est rayonnante; le centre est vert puis la couleur s'alterne entre le vert et le jaune pâle à blanc. |
| | 5° | – | Pas de croissance |
| | 37° | 5 – 7 | La culture est d'aspect granuleux à poudreux, présentant des touffes à la surface, de couleur marron jaunâtre. Le centre est bombé, dont la croissance est rapide et le mycélium envahit la boîte en peu de jours. |
| CYA | 25° | 5 – 8 | Le mycélium surmontant la surface des colonies est cotonneux, parsemé de petits points noirs (les sclérotés), présence d'un halo blanchâtre de 2cm d'épaisseur. Le centre de la colonie est d'aspect laineux et de couleur vert olive. L'envers de la colonie est blanc – jaunâtre et devient marron clair avec l'âge |
| | 5° | – | Pas de croissance |
| | 37° | 7 – 9 | La croissance est rapide à texture cotonneuse; le centre est floconneux, de couleur vert foncé à brun. Le revers est beige et devient jaune orangéâtre avec l'âge. |
| G25N | 25° | 2 – 3,5 | La croissance est lente, d'aspect laineux plus ou moins granuleux, avec présence d'une touffe de mycélium au centre, de couleur blanc opaque devenant vert jaunâtre à vert . La sporulation est faible et l'envers est blanc jaunâtre |
| | 5° | – | Pas de croissance |
| | 37° | 2 - 3 | La croissance est lente, d'aspect laineux à velouteux, de couleur vert foncé à marron jaunâtre au centre. L'envers est beige jaunâtre |

Tableau 18 : Description d'*Aspergillus parasiticus* selon la méthode de Pitt et Hocking, 1985

| Milieu de culture | T° d'incubation | Diamètre de la colonie (cm) | Caractères cultureux |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|---|
| MEA | 25° | 4 - 6 | L'aspect de la culture est granuleux à laineux, vert à vert foncé avec une croissance plus ou moins rapide. En vieillissant, le mycélium aérien devient marron et plus foncé au centre |
| | 5° | – | Pas de croissance |
| | 37° | 4 - 6,5 | La croissance est plus ou moins rapide qu'à 25°C, la couleur de la colonie est vert foncée. Présence du mycélium aérien en touffe de couleur marron-jaunâtre |
| CYA | 25° | 4 - 7 | L'aspect est duveteux, dense parfois granuleux de couleur vert foncé à vert olive. Il y a apparition de quelques gouttelettes d'exsudats vers le 6 ^{ème} jour. L'envers de la colonie est jaune à rosâtre et devient légèrement orangeâtre avec l'âge. |
| | 5° | – | Pas de croissance |
| | 37° | 5 - 7 | La croissance est plus ou moins rapide, d'aspect granuleux et de couleur vert foncé; le centre est floconneux de couleur brun jaunâtre. L'envers est beige orangeâtre. |
| G25N | 25° | 1,5 - 3 | Même descriptions qu' <i>Aspergillus flavus</i> , sauf que la couleur de la colonie est vert foncé. |
| | 5° | – | Pas de croissance |
| | 37° | 2 - 3 | Même description qu' <i>Aspergillus flavus</i> |

3.7. Effet de la mycoflore sur la germination des grains

La figure 18 (a et b) montre l'effet de la mycoflore sur la germination des grains semés dans des terrines et placés dans une serre.

L'analyse de la corrélation entre le taux de contamination et le taux de germination ne nous permet pas d'interpréter de façon causale la relation entre ces deux paramètres. Cela est dû aux caractères aléatoires des variables représentant la contamination et la germination. Ces variables aléatoires non contrôlées, ont été néanmoins analysées sur une autre dimension que la dimension de causalité.

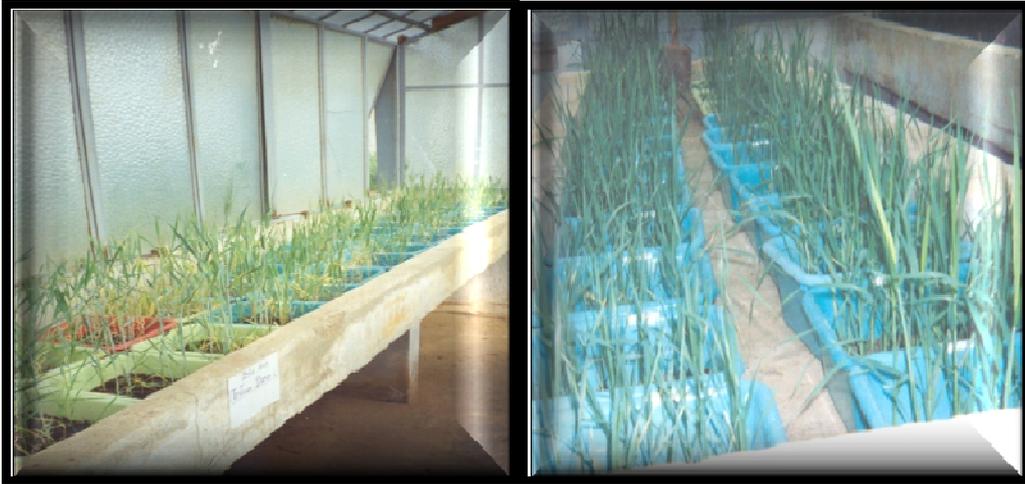
Ce qui nous a permis de calculer le coefficient de corrélation de chaque espèce et de conclure selon les cas présents à une interprétation d'observation.

En effet chez les céréales blé dur, blé tendre et l'orge (tab. 19 et fig. 19), les taux de contamination les moins élevés sont enregistrés respectivement chez les variétés MBB (Mohamed Ben Bachir), ARZ et Barberousse. Par contre les taux de germination les plus élevés sont enregistrés chez les variétés Sahel, Zidane et Tichdrett.

Les mêmes constatations sont faites chez les légumineuses comme la fève, le pois chiche et les arachides (tab. 20 et fig. 20). Nous remarquons également que les variétés les moins contaminées sont Sidi Moussa, Flip 80.177 et la population 2 (arachides), mais ces variétés ne présentent pas les taux de germination les plus élevés. Ces derniers sont enregistrés chez d'autres variétés comme Sidi Aïch, ILC3279_(s) et la population 5 pour les grains qui ont les taux les plus élevés de contamination.

Chez le blé dur et l'orge les variétés les plus contaminées sont respectivement Vitron₁ et Rihane mais les taux de germination les plus bas sont enregistrés respectivement chez les variétés Vitron₂ et Saida₁. Par contre chez le blé tendre, la variété Anza est la plus contaminée et présente dans ce cas le taux de germination le plus faible. Les mêmes résultats ont été obtenus chez les légumineuses, comme les variétés Gisa 402 et ILC3279_(c) qui sont les plus contaminées, mais les taux de germination les plus bas sont enregistrés chez Gisa 429 et Flip 80.177.

Notons que cette dernière variété présente le taux de contamination le plus faible. Chez les arachides, la population 7 est la plus contaminée et présente le taux de germination le plus faible.



Blé dur (*Triticum durum*)



Blé tendre (*Triticum aestivum*)



Orge (*Hordeum vulgare*)

a) Grains de céréales germés



Pois chiche (*Cicer arietinum*)



Fève (*Vicia fabae*)



Arachides (*Arachis hypogaea*)

b) Grains de légumineuses germés

Figure 18 (a et b) : Résultats de l'effet de la mycoflore sur la germination des grains

Tableau 19 : Taux de contamination totale et de germination chez les céréales

| Semences | Variétés | Contamination (%) | Germination (%) |
|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------|
| Blé dur | Waha | 75 | 92 |
| | GTA | 82 | 89 |
| | Mohamed Ben Bachir | 71 | 82 |
| | Sahel | 77 | 100 |
| | Vitron ₁ | 85 | 76 |
| | Vitron ₂ | 82 | 80 |
| Blé tendre | Zidane | 70 | 94 |
| | Mimouni | 74 | 83 |
| | HD1220 | 68 | 80 |
| | Arz | 57 | 89 |
| | Anza | 79 | 76 |
| Orge | Barberousse | 50 | 85 |
| | Rihane | 73 | 90 |
| | Jaidor | 60 | 88 |
| | Tichrett | 66 | 95 |
| | Saida ₁ | 56 | 80 |
| | Saida ₂ | 64 | 82 |

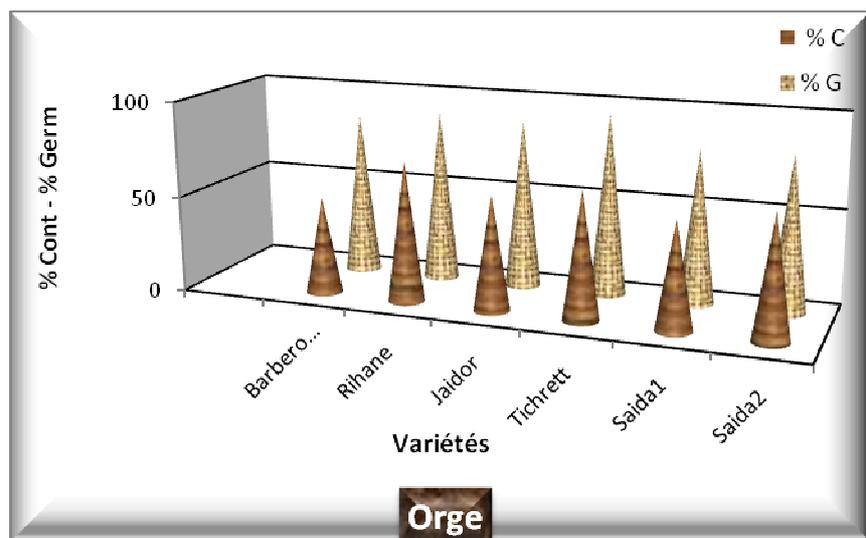
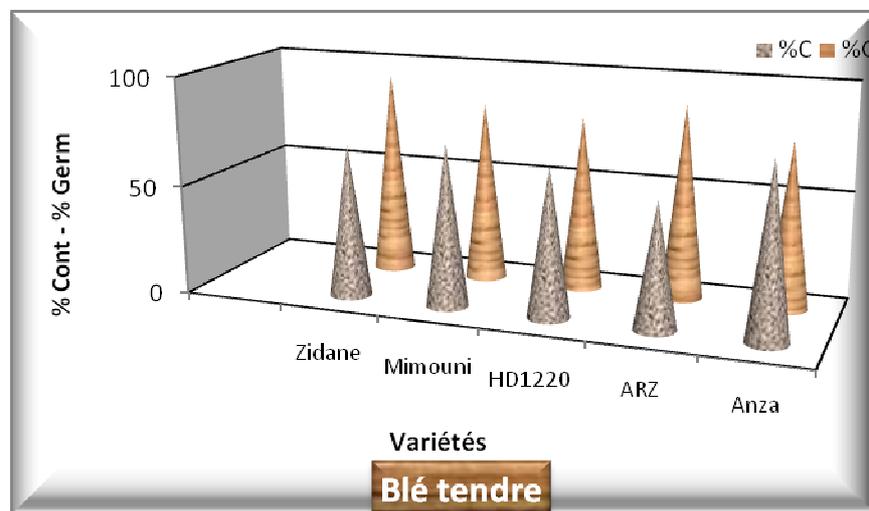
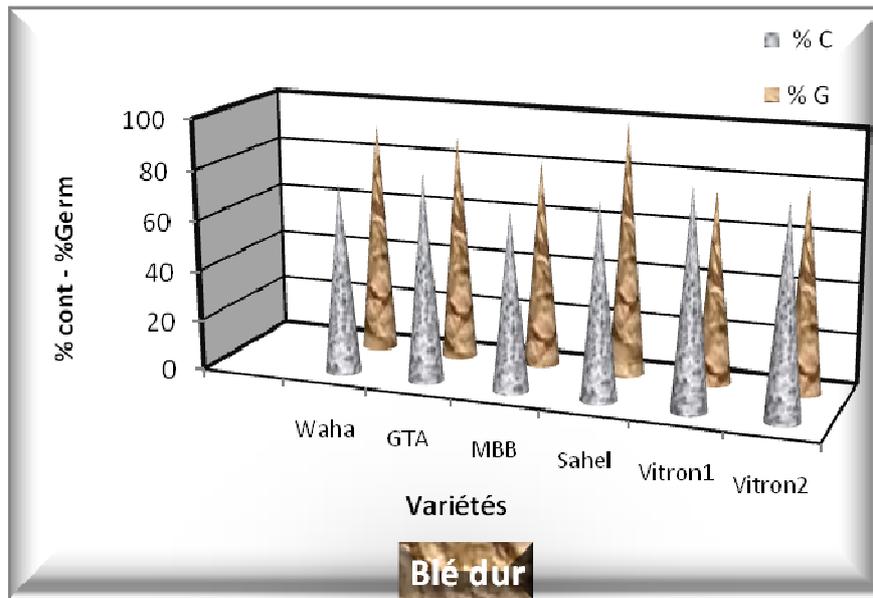


Figure 19 : Effet de la mycoflore sur la germination des grains des céréales

Tableau 20 : Taux de contamination totale et de germination chez les légumineuses

| Semences | Variétés | Contamination (%) | Germination (%) |
|------------|--------------|-------------------|-----------------|
| Fève | New-Mammoth | 30 | 85 |
| | Aguadulce | 33 | 86 |
| | Sidi-moussa | 25 | 89 |
| | Sidi-aich | 30 | 90 |
| | Gisa 402 | 37 | 76 |
| | Gisa 429 | 40 | 81 |
| Poischiche | Ilc 3279 (c) | 34 | 82 |
| | X88TH | 22 | 79 |
| | Flip 97.56 | 19 | 72 |
| | Ilc3279 (s) | 27 | 84 |
| | Flip 84.109 | 17 | 78 |
| | Flip 80.177 | 8 | 63 |
| Arachides | Population 1 | 37 | 61 |
| | Population 2 | 27 | 56 |
| | Population 3 | 34 | 60 |
| | Population 4 | 39 | 54 |
| | Population 5 | 30 | 67 |
| | Population 6 | 29 | 51 |
| | Population 7 | 41 | 49 |

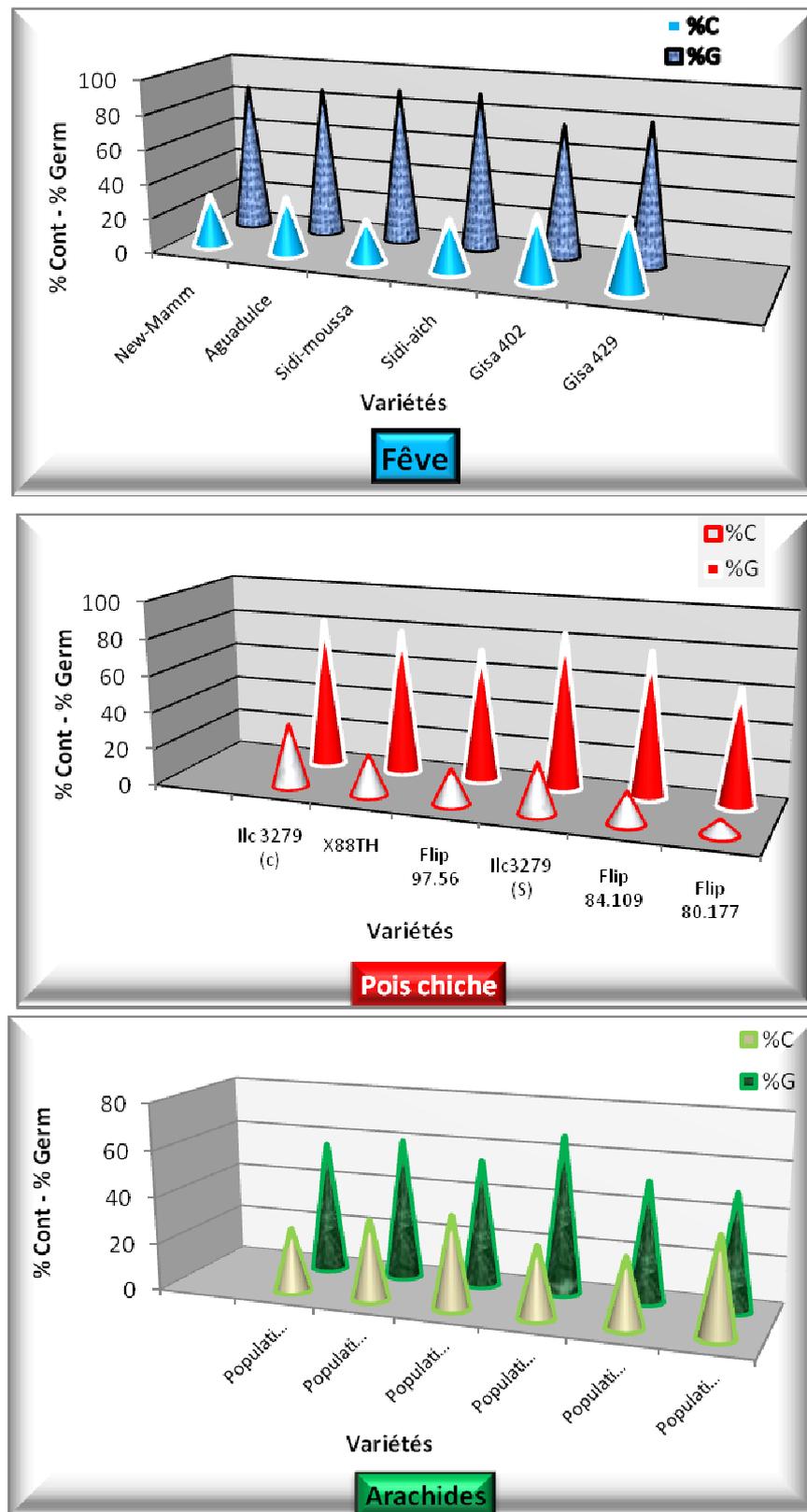


Figure 20 : Effet de la mycoflore sur la germination des grains des légumineuses

3.8. Résultats du test de fluorescence jaune-verdâtre (BGYF)

L'observation sous rayonnement ultraviolet des lots de semences collectées et concassées, a montré l'absence de la fluorescence jaune-verdâtre (BGYF) dans la plupart des échantillons testés. Cependant parmi les sept populations d'arachides analysées, des taches fluorescentes ont été observées sous UV (365 nm) dans les grains de la population 4 (P₄) (planche VI)

3.9. Test biologique de production de l'aflatoxine

3.9.1. Mise en évidence des espèces aflatoxinogènes.

L'activité biologique des *Aspergillus* spp aflatoxinogènes sur l'inhibition de la croissance bactérienne, a révélé que presque tous les isolats obtenus, ont manifesté un effet inhibiteur sur la croissance de *Bacillus subtilis*, mais à des degrés différents selon l'isolat (fig. 21).

Près de 75 % des isolats des *Aspergillus* aflatoxinogènes de tous lots confondus et pratiquement 100 % des isolats obtenus des lots des arachides, ont montré un effet inhibiteur sur la croissance de *Bacillus subtilis*, qui est très sensible aux mycotoxines.

En se basant sur l'échelle de Mazza (1983), nous avons classé nos isolats en trois catégories selon leur degré aflatoxinogène. Ainsi les neuf isolats numérotés 4, 5, 7, 10, 14, 17, 20, 22 et 25 présentent des zones d'inhibition, dont les diamètres sont inférieurs à 14 mm et un pouvoir toxigène faible (tab.21). Les dix isolats 1, 2, 8, 23, 26, 28, 30, 33, 35 et 37 ont montré un diamètre compris entre 14 et 20 mm, dont leur pouvoir toxigène est moyen. Le reste des isolats soit environ dix huit numérotés 3, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 24, 27, 29, 31, 32, 34 et 36 ont un diamètre supérieur à 20 mm, soit un degré d'inhibition relativement important.

Il ressort un total de 28 isolats ont été sélectionnés comme aflatoxinogènes, ayant des zones d'inhibition d'un diamètre supérieur à 14 mm, dont 16 isolats appartiennent aux espèces d'*Aspergillus parasiticus* obtenus à partir d'arachides et 21 isolats appartiennent aux espèces d'*Aspergillus flavus*. Neuf (9) isolats parmi les 37 ont été éliminés vu leur pouvoir toxigène assez faible. Nous avons également remarqué que l'isolat 18 était le plus toxigène, présentant le plus grand diamètre d'inhibition; le plus petit diamètre était représenté par la souche 25, la moins toxigène.

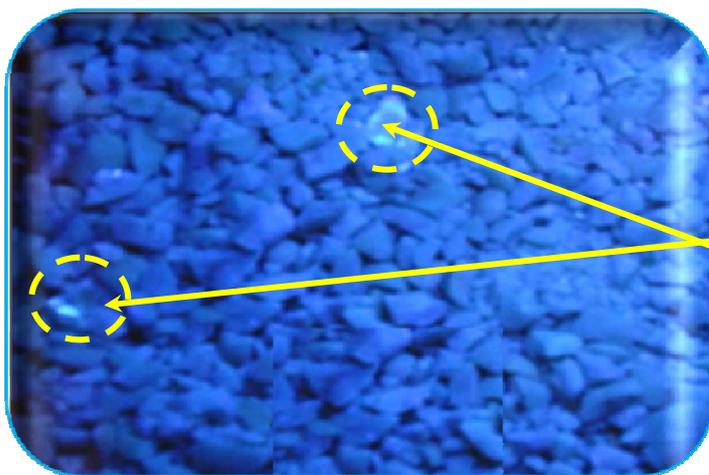
Les isolats qui n'ont manifesté aucune zone d'inhibition sont des isolats non aflatoxinogènes



Grains d'arachides concassés et étalés sur un Plateau noir



Chambre noire munie de deux lampes de lumière ultra-violette dans laquelle on introduit le plateau noir contenant les grains concassés



Fluorescence bien nette sous UV au niveau des grains de la population 4

Planche VI : Résultats du test de Fluorescence jaune – verdâtres (BGYF)

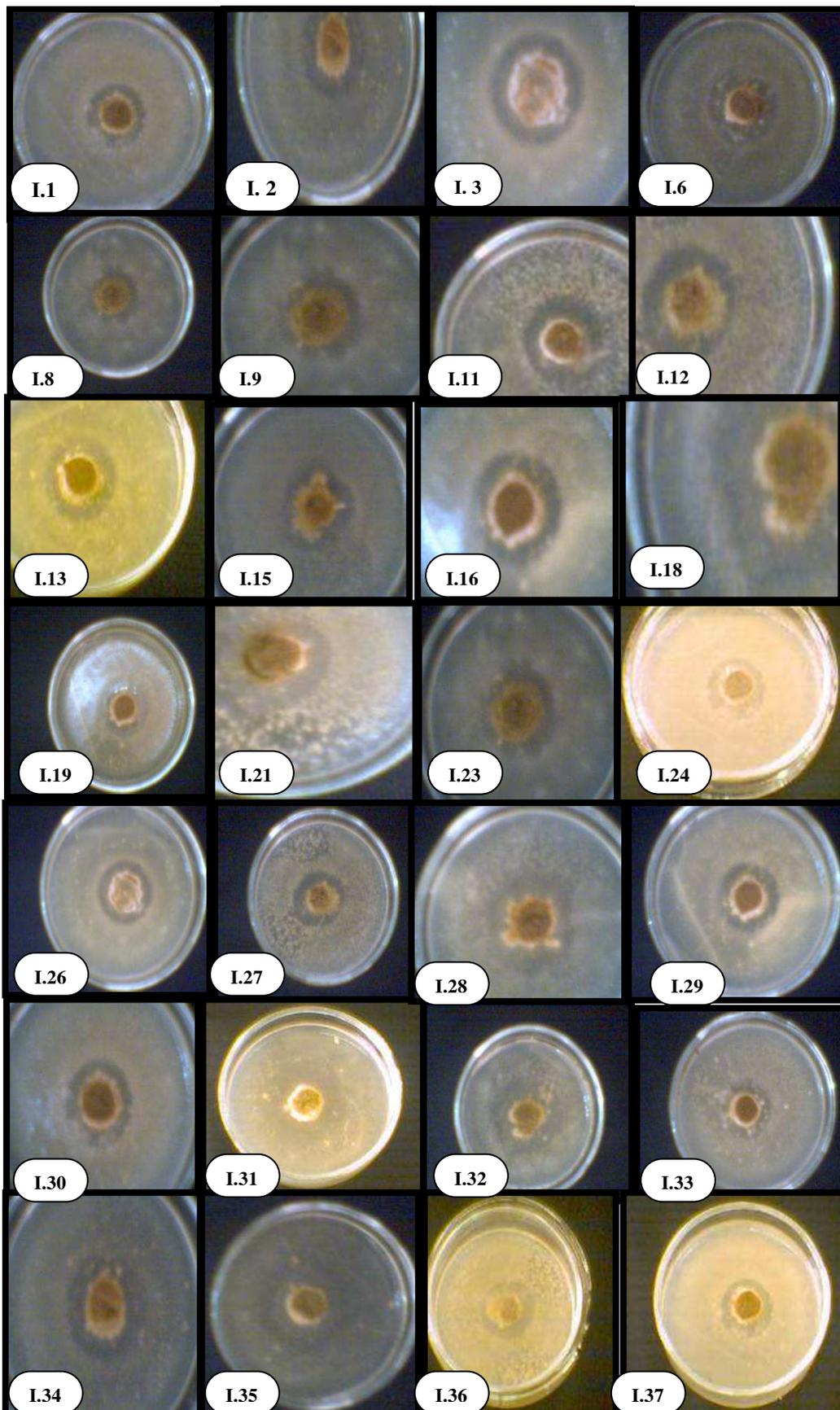


Figure 21: Résultats du test biologique montrant les zones d'inhibition de croissance de la bactérie test.

I : Isolat

Tableau 21 : Mesure des diamètres des zones d'inhibition par ordre croissant des souches testées sur *Bacillus subtilis*.

| N° de la souche | Nature de la souche | Diamètre (mm) | N° de la souche | Nature de la souche | Diamètre (mm) |
|-----------------|---------------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------|
| 25 | F | 5 | 9 | P | 20,50 |
| 4 | F | 5,5 | 15 | P | 21 |
| 20 | F | 8,75 | 13 | P | 21,75 |
| 7 | F | 9 | 24 | F | 22,5 |
| 14 | F | 9 | 27 | P | 23 |
| 5 | F | 10 | 31 | P | 23 |
| 10 | F | 10,75 | 11 | F | 23,75 |
| 17 | F | 11,25 | 29 | P | 24 |
| 22 | F | 12 | 32 | F | 24,5 |
| 33 | F | 14,75 | 6 | F | 25 |
| 8 | F | 16,5 | 36 | P | 25,75 |
| 1 | F | 17 | 19 | P | 26,25 |
| 35 | F | 17,5 | 21 | F | 26,5 |
| 26 | F | 18 | 34 | F | 27 |
| 37 | P | 18 | 16 | P | 27,5 |
| 23 | P | 18,5 | 3 | P | 28,5 |
| 30 | F | 19 | 12 | P | 29,5 |
| 2 | P | 19,5 | 18 | P | 30,5 |
| 28 | P | 19,75 | — | — | — |

3.9. 2. Test d'activité biologique des filtrats de culture

a) Effet des filtrats de culture sur la croissance bactérienne

L'effet des filtrats de culture des 28 isolats sélectionnés comme aflatoxinogènes, ont montré une action inhibitrice de la croissance de *Bacillus subtilis*. Les diamètres des zones d'inhibition sont également variables. Le plus grand diamètre est obtenu avec l'isolat 18, ce qui coïncide avec le résultat du test d'activité biologique en milieu solide.

Ces résultats sont pratiquement comparables, puisque les isolats qui ont inhibés la croissance bactérienne sur le milieu solide l'ont manifesté aussi avec le milieu liquide

Aucune zone d'inhibition n'a été obtenue avec le témoin.

Quant aux extraits obtenus à partir des échantillons de semences, seul l'extrait de semences d'arachides et plus précisément l'extrait obtenu de la population 1 a montré un effet inhibiteur sur la croissance de la bactérie test.

Les diamètres des zones d'inhibition enregistrés varient de 10,10 mm chez la population2 à 15, 59 mm chez la population 1, ce qui signifie la présence d'inhibiteurs de croissance bactérienne dans ces extraits (Fig. 22). Aucune zone d'inhibition n'a été obtenue avec le témoin



Figure 22 : Zones d'inhibition obtenues à partir de l'extrait de filtrat de culture de la population 1

a : Zone d'inhibition

b) Effet du filtrat de culture sur la germination des grains de quelques plantes:

L'extrait brut du filtrat de culture de l'isolat 18, le plus aflatoxinogène a montré également une action sur la germination des grains de blé et de lentille. L'inhibition de la germination des grains traités était significative et le pourcentage est proportionnel aux deux concentrations préparées. (Tab. 22 , fig. 23 et annexe 4)

Tableau 22 : Pourcentage d'inhibition des grains de blé dur et de lentille

| | | Blé dur | | Lentille | |
|---------------|------------|---------|-------|----------|-------|
| Concentration | Répétition | 50% | 100% | 50% | 100% |
| | R1 | 26,5 | 58 | 29 | 60 |
| | R2 | 39 | 62,7 | 44,5 | 54,5 |
| | R3 | 34 | 52 | 38,88 | 71 |
| | R4 | 32 | 60,86 | 39 | 58 ,5 |

R : Répétition

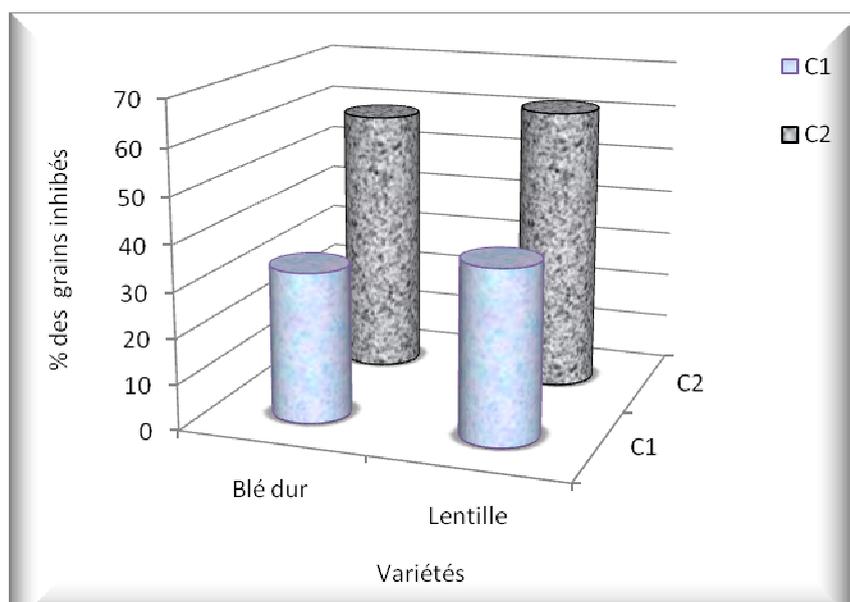


Figure 23 : Effet du filtrat de culture sur la germination des grains

3.10. Production de métabolites secondaires excrétés dans le milieu YES liquide.

Les extraits de filtrat de culture des 28 isolats d'*Aspergillus* sélectionnés comme aflatoxinogènes ont été soumis à une séparation par chromatographie sur couches minces dans le système de

développement TEF (Toluène / acétate d'éthyle / acide Formique). L'interprétation a été réalisée visuellement et sous rayonnement ultraviolet (Fig. 24).

Plusieurs spots ont été détectés au visible et sous UV, avant et après la révélation chimique, correspondant à des métabolites produits dans le milieu YES liquide par les isolats étudiés

Ainsi quatre taches ont attiré notre attention, dont les deux numérotées 4 et 5 (tab. 23) et de rapport frontaux respectivement 0,24 et 0,27 émettent une fluorescence bleu-verdâtre sous UV. Les deux autres taches numérotées 6 et 7 dans le même tableau de rapports frontaux 0,31 et 0,40 émettent une fluorescence bleu-violette sous UV.

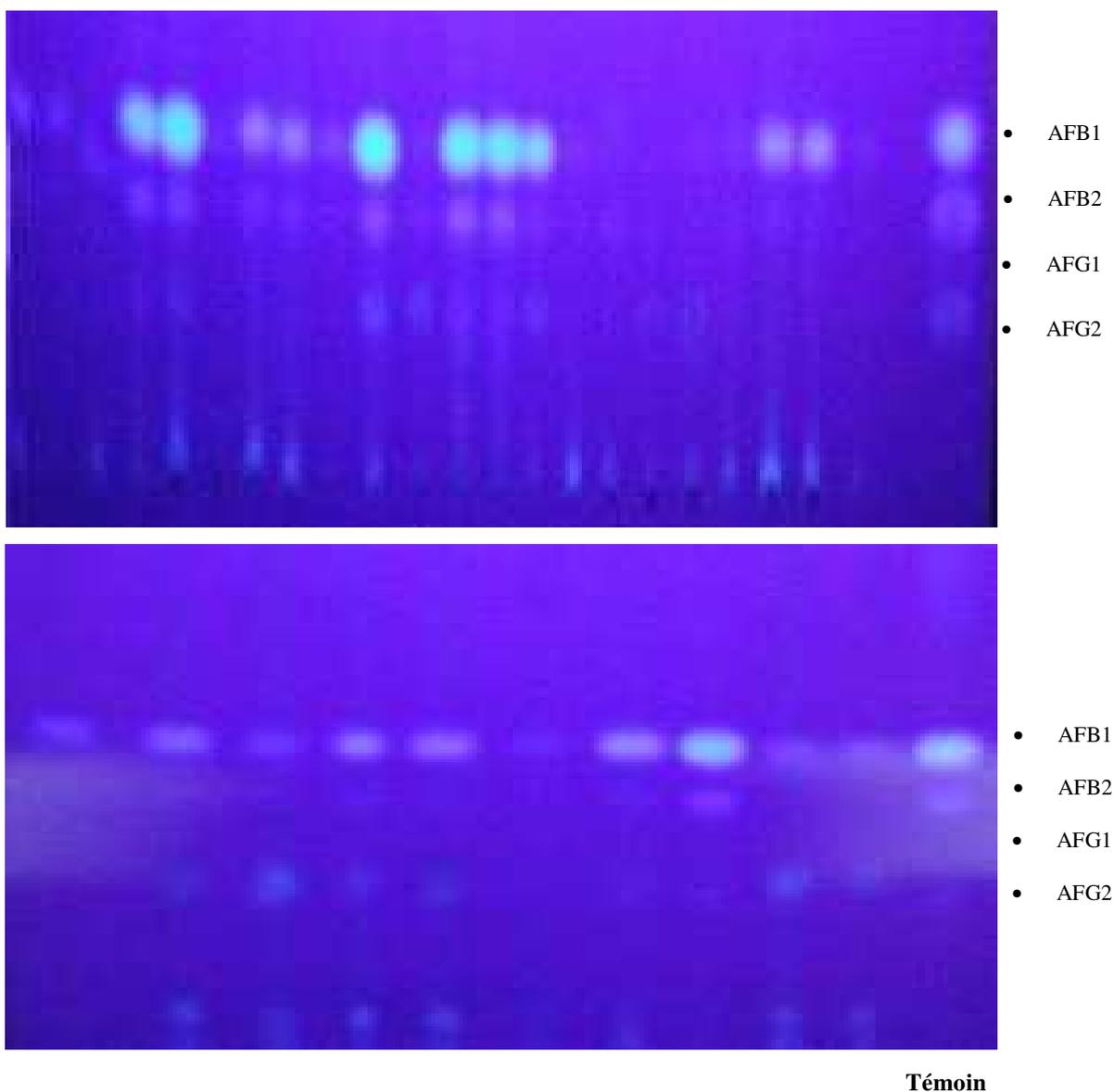
Ces quatre taches réagissent avec l'acide sulfurique, par une coloration jaune ; en pulvérisant le réactif p. anisaldéhyde, elles prennent une coloration rose, couleurs habituellement émises par les aflatoxines. En outre les caractéristiques (couleur de la fluorescence et rapport frontal) de ces quatre taches correspondent aux quatre aflatoxines identifiées AFG2, AFG1, AFB2, AFB1.

Les résultats du tableau 23 nous permettent de déduire que tous les isolats sélectionnés, ont excrété les aflatoxines B1 et B2, présentes dans la plupart des extraits de filtrat de culture, excepté les isolats numérotés 8, 33, 1 et 35. Alors que l'aflatoxine G1 est élaborée par tous les isolats d'*Aspergillus parasiticus*, AFG2 a été repérée uniquement dans quelques extraits des isolats numérotés 18, 12, 3, et 29. Nous pouvons déduire également que les isolats 33, 8, 1, 35 n'ont produit que l'aflatoxine B₁ alors que les isolats 18, 12, 3, et 29 ont la capacité de produire les quatre aflatoxines.

En plus de ces quatre aflatoxines identifiés en présence des standards, nous avons pu détecter deux nouveaux métabolites secondaires.

L'identification de la stérigmatocystine dans les extraits de quelques isolats, a été mise en évidence par le révélateur chimique AlCl₃, spécifique pour cette mycotoxine. Observée sous UV, la fluorescence rouge brique devient jaune.

Une autre tache importante dont le rapport frontal est de 0,74 bien visible de couleur marron clair observée sous UV, émet une fluorescence marron bleuâtre. Après révélation par les deux réactifs (H₂SO₄ et le p.anisaldéhyde), elle devient marron foncé à noirâtre ; cette tache détectée chez certains isolats est présumée être l'acide cyclopiazonique.



Figures 24 Chromatogrammes pris sous UV montrant les métabolites secondaires excrétés par les isolats aflatoxinogènes dans le milieu YES liquide.

3.11. Production de métabolites secondaires élaborés dans le milieu YES solide.

L'examen des chromatogrammes à la lumière du jour et sous UV, avant et après la révélation chimique, nous a permis de constater l'absence d'un grand nombre de tache précédemment mises en évidence dans les extraits de milieu de culture liquide (fig. 24).

Cependant, nous avons détecté les quatre aflatoxines, dont les caractéristiques des spots fluorescents et leurs rapports frontaux correspondent aux spots des étalons utilisés.

L'AFG₂ est détectée uniquement chez les deux isolats 16 et 18.

Nous avons détecté également trois taches produites simultanément par les mêmes isolats, aussi bien dans le milieu YES liquide que dans le milieu YES solide.

Deux de ces trois taches sont visibles à la lumière du jour, montrant la même couleur jaune grisâtre et ayant des Rf différents; l'une est de Rf 0,17 émet une fluorescence marron jaunâtre et ne réagit avec aucun réactif, l'autre spot de Rf 0,58 est de couleur bleu clair sous UV.

En contact avec l'acide sulfurique, ce spot émet une fluorescence vert jaunâtre. La troisième tache est de Rf 0,85 produite dans les deux milieux par les mêmes isolats. Elle est invisible à la lumière du jour, et sous UV, elle émet une fluorescence bleu-violette qui vire vers le jaune intense après une pulvérisation d'acide sulfurique. (Tab. 24)

Tableau 23 : Réactions caractéristiques des différents révélateurs chimiques avec les métabolites secondaires des isolats dans le milieu YES liquide.

| N° du spot | Rapport frontal | Observation avant la révélation | | Observation après la révélation | | | Métabolites identifiés | Isolats producteurs |
|------------|-----------------|---------------------------------|---------|---------------------------------|------------------|-------------------|------------------------|---|
| | | Au visible | Sous UV | H ₂ SO ₄ | P. Anis aldéhyde | AlCl ₃ | | |
| 1 | 0,10 | mc | bvi | bj | - | - | - | 35 – 1 – 36 – 16 – 32 – 18 - 15 |
| 2 | 0,17 | jg | mj | - | - | - | - | 33 |
| 3 | 0,21 | pr | vc | - | - | - | - | 36 – 6 |
| 4 | 0,24 | - | bv | j | rse | - | AFG2 | 18-12-3-16-29 |
| 5 | 0,27 | - | bv | j | rse | - | AFG1 | Tous les isolats d' <i>Aspergillus parasiticus</i> |
| 6 | 0,31 | - | bvi | j | rse | - | AFB2 | Tous les isolats sélectionnés excepté 8 – 33 – 1-35 |
| 7 | 0,40 | - | bvi | j | rse | - | AFB1 | Tous les isolats sélectionnés |
| 8 | 0,52 | - | - | jc | - | - | - | 21 – 18 |
| 9 | 0,58 | jg | bc | vj | - | - | - | 1- 2- 23- 24 |
| 10 | 0,71 | - | rvi | - | bo | - | - | 27 – 29 - 19 |
| 11 | 0,74 | mc | mb | mf | mn | - | CPA | 21 - 26 -30 |
| 12 | 0,77 | - | - | jo | - | - | - | 6 -8 -24 |
| 13 | 0,79 | mf | bj | - | - | - | - | 9 - 11- 34 |
| 14 | 0,84 | - | mrs | rbr | - | j | STGM | 28 -15 -27 - 36 -16 |
| 15 | 0,85 | - | bvi | j | - | - | - | 29 – 31 - 13 |
| 16 | 0,87 | - | b | - | mj | - | - | 1 - 36 |
| 17 | 0,89 | - | mj | bj | - | - | - | 8 - 37 |

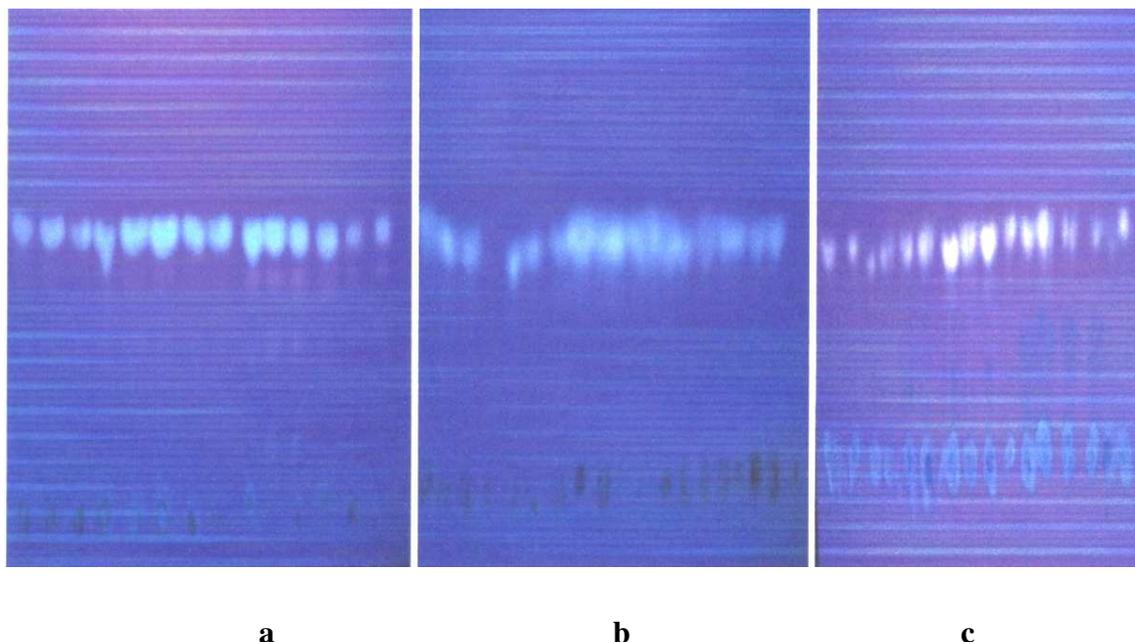


Figure 25 : Chromatogrammes pris sous UV montrant les métabolites excrétés par les isolats aflatoxinogènes dans le milieu YES solide

a - Chromatogrammes sous UV avant la révélation

b - Chromatogrammes sous UV après la révélation par H_2SO_4

c - Chromatogrammes sous UV après la révélation par le P anis aldéhyde

3.12. Métabolites secondaires détectés dans les grains d'arachides

Les extraits des échantillons étudiés ont été également soumis à la chromatographie sur couches minces, afin de séparer les différents constituants sur plaque de silicagel (fig. 26). L'interprétation des chromatogrammes est réalisée visuellement et sous UV, en comparant les rapports frontaux des différentes taches fluorescentes avec ceux des différents standards, afin de repérer à quel spot étalon correspond la fluorescence du spot concernant l'échantillon à analyser.

Peu de taches ont été détectées et n'ont pas été identifiées dans les extraits des échantillons analysés des céréales et des légumineuses alimentaires.

Parmi les sept échantillons d'arachides testés, nous avons détecté trois taches fluorescentes, dont les caractéristiques sont similaires à ceux des standards AFB1, AFB2 et AFG1.

Le tableau 25 illustre les résultats des différents métabolites et composés se trouvant dans les extraits des grains d'arachides séparés par chromatographie sur couches minces.

L'aflatoxine B1 est détectée chez cinq populations d'arachides à savoir P1, P3, P4, P6 et P7 alors que AFB2 est absente chez la population 7; AFG1 est présente chez P1, P3 et P4.

Tableau 24 : Réactions caractéristiques des différents révélateurs chimiques avec les métabolites secondaires des souches dans le milieu YES solide.

| N° du spot | Rapport frontal | Observation avant la révélation | | Observation après la révélation | | | Métabolites identifiés | Isolats producteurs |
|------------|-----------------|---------------------------------|---------|---------------------------------|------------------|-------------------|------------------------|---|
| | | Au visible | Sous UV | H ₂ SO ₄ | P. Anis aldéhyde | AlCl ₃ | | |
| 1 | 0,14 | - | bc | - | - | - | - | 1- 2 - 21 |
| 2 | 0,17 | jg | mj | - | - | - | - | 33 |
| 3 | 0,19 | - | gr | j | - | - | - | 9 - 29 |
| 4 | 0,24 | - | bv | j | rse | - | AFG2 | 16-18 |
| 5 | 0,27 | - | bv | j | rse | - | AFG1 | Ttes les souches <i>d'Aspergillus parasiticus</i> excepté les isolats 9 – 23 - 37 |
| 6 | 0,31 | - | bvi | j | rse | - | AFB2 | Tous les isolats sélectionnés excepté 1 – 8 – 33 –35 |
| 7 | 0,40 | - | bvi | j | rse | - | AFB1 | Tous les isolats sélectionnés |
| 8 | 0,58 | jg | bc | vj | - | - | - | 1 — 23 – 2 - 24 |
| 9 | 0,71 | - | rvi | - | bg | - | - | 27 – 29 – 19 – 16 - 18 |
| 10 | 0,74 | - | rrs | rbr | - | j | STGM | 16 – 32 - 15 |
| 11 | 0,85 | - | bvi | j | - | - | - | 29 – 31 - 13 |



Figure 26 : Chromatogrammes pris sous UV montrant les métabolites dans les grains d'arachides

3.13. Confirmation de l'identité de l'aflatoxine

Nous avons confirmé la présence de l'aflatoxine par la méthode d'utilisation de l'acide trifluoroacétique nous avons pu obtenir le dérivé B2a de l'aflatoxine B1 visible sous rayonnement ultra-violet dans les grandes longueurs d'ondes, sous forme d'une tache fluorescente ayant une valeur Rf inférieure à celle de l'aflatoxine B1. La figure 27 illustre le résultat de la dérivation par le réactif ATF (l'acide trifluoroacétique) comportant la formation de l'hémi-acétal B2a, dérivé de l'aflatoxine B1. La présence de l'hémi acétal de l'aflatoxine B2a dans les extraits des échantillons confirme bien la contamination des grains d'arachides par les aflatoxines.

L'étude de l'activité biologique de quelques spots prélevés de la chromatoplaque a montré qu'ils ont induit des inhibitions de la bactérie test, dont les diamètres d'inhibition varient de 25,5 mm à 33,63 mm. Ils ont également une influence sur la germination des grains de blé et de lentille, dont le pourcentage d'inhibition varie de 39 à 57 % chez le blé dur et de 45 à 63 % chez la lentille. Aucun effet inhibiteur n'a été constaté avec le témoin.

La purification de l'AFB1 est réalisée par chromatographie sur couches minces bidimensionnelle (fig.28) et est bien confirmée sur la plaque de silicagel ; les résultats obtenus montrent une seule tache de même Rf que la toxine utilisée comme témoin (fig.29).

Tableau 25 : Réactions caractéristiques des différents révélateurs chimiques avec les composés d'extraits d'arachides

| N° du spot | Rapport frontal | Observation avant la révélation | | Observation après la révélation | | | Métabolites identifiés | Echantillons contaminés |
|------------|-----------------|---------------------------------|---------|---------------------------------|------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|
| | | Au visible | Sous UV | H ₂ SO ₄ | P. Anis aldéhyde | AlCl ₃ | | |
| 1 | 0,10 | mc | bvi | bj | - | - | - | P3 - P7 - P1 |
| 2 | 0,20 | bge | bvi | mj | - | - | - | P2 |
| 3 | 0,22 | - | - | j | - | - | - | P1 - P6 |
| 4 | 0,27 | - | bv | j | rse | - | AFG1 | P1 - P3 - P4 |
| 5 | 0,31 | - | bvi | j | rse | - | AFB2 | P1 - P3 - P4 - P6 |
| 6 | 0,40 | - | bvi | j | rse | - | AFB1 | P1 - P3 - P4 - P6 - P7 |
| 7 | 0,49 | - | bc | - | - | - | - | P3 |
| 8 | 0,53 | jm | bpl | - | - | - | - | P1 - P5 |
| 9 | 0,66 | - | - | - | mo | - | - | P2 - P5 - P3 |
| 10 | 0,71 | - | rvi | - | bo | - | - | P4 |

b : bleu
 bge : beige
 bg : bleu grisâtre
 bo : bleu orangeâtes
 bv : bleu vert
 bpl : bleu pale
 bj : bleu jaunâtre
 bc : bleu clair

bvi : bleu violette
 gr : gris rose
 jg : jaune grisâtre
 j : jaune
 jc : jaune clair
 jo : jaune orange

mn : marron noirâtre
 mrs : marron rose
 mc : marron clair
 mj : marron jaunâtre
 mf : marron foncé
 mo : marron orange
 mb : marron bleu

pr : pourpre
 rvi : rose violet
 rbr : rouge brique
 rse : rose

vj : vert jaunâtre
 vc : vert clair

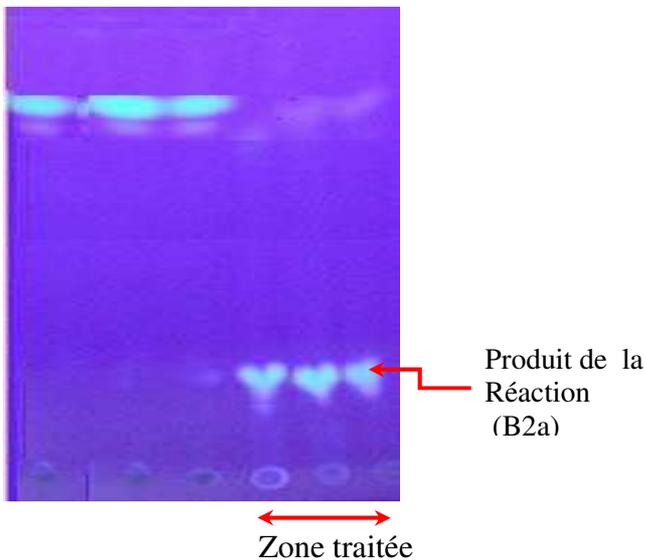


Figure 27 : Résultat de l'épreuve de confirmation par ATF

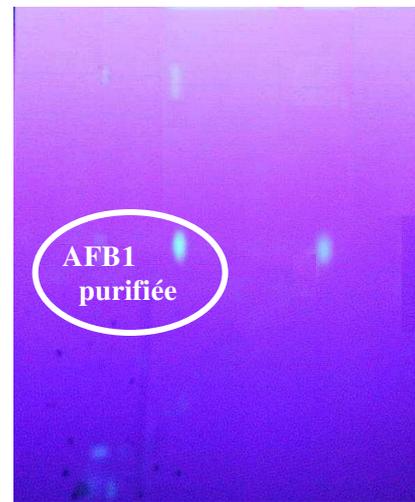


Figure 28 : Résultats de CCM bidimensionnelle

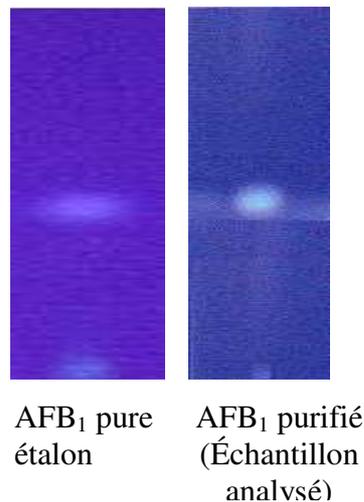


Figure 29 : Résultats de la purification de l'AFB1

Le tableau 26 illustre les résultats du poids sec du mycélium et la concentration de l'aflatoxine quantifiée par le spectrophotomètre. Nous remarquons que le poids sec du mycélium le plus élevé est enregistré chez l'isolat 32 (*Aspergillus flavus*), il est de 5,95 g / 50 ml alors qu'il atteint 6,33 g / 50 ml chez l'isolat 36 (*Aspergillus parasiticus*). Le taux d'aflatoxine varie de 28,49 à 79,52 mg / 50 ml chez les isolats d'*Aspergillus flavus* et il varie de 34,48 à 94,46 mg / 50 ml chez les isolats d'*Aspergillus parasiticus*.

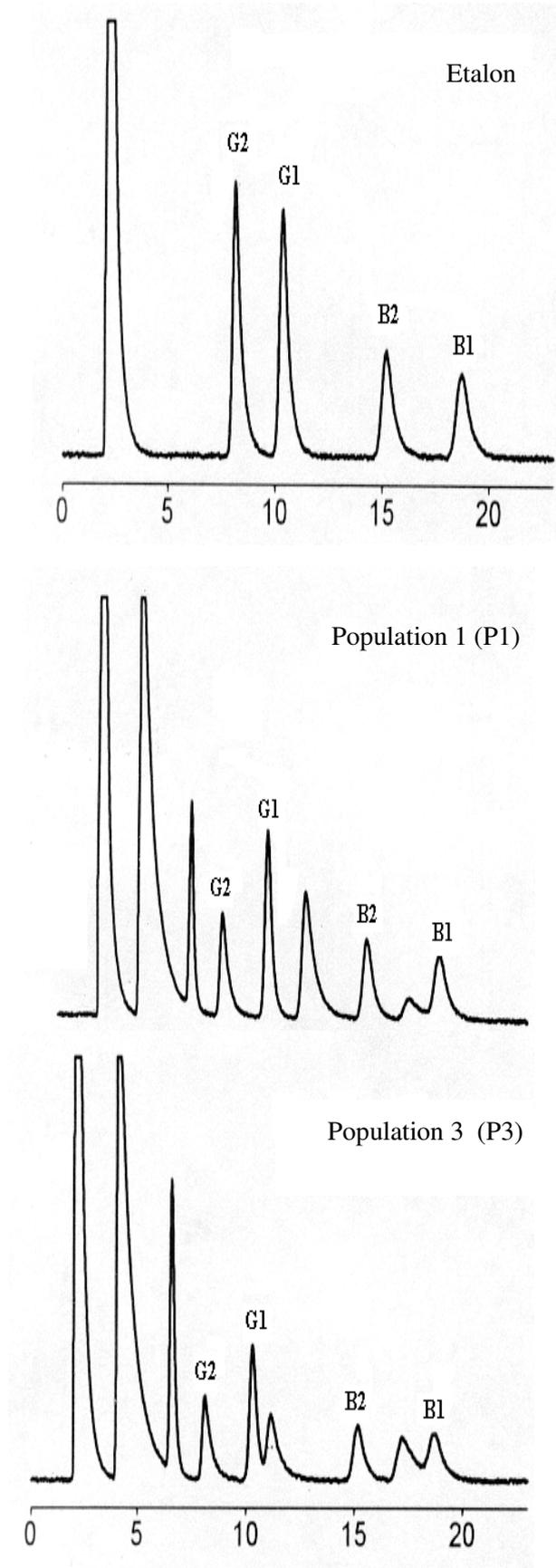
Tableau 26 : Détermination du poids sec du mycélium et concentration de l'AFB1

| N° des isolats A. Flavus | Poids sec du mycélium (g/50 ml) | [C] DE AFB1 (mg / 50ml) | N° des isolats A. Parasiticus | Poids sec du mycélium (g/50 ml) | [C] DE AFB1 (mg /50ml) |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 5,81 | 28,82 | 2 | 2,67 | 48,86 |
| 6 | 4,42 | 69,03 | 3 | 4,33 | 82,62 |
| 8 | 5,21 | 32,52 | 9 | 3,83 | 34,48 |
| 11 | 5,20 | 58,61 | 12 | 3,17 | 80,02 |
| 21 | 5,25 | 75,02 | 13 | 3,70 | 51,26 |
| 24 | 5,05 | 60,34 | 15 | 4,66 | 37,11 |
| 26 | 3,32 | 34,92 | 16 | 6,02 | 69,54 |
| 28 | 2,96 | 36,93 | 18 | 6,27 | 99,83 |
| 30 | 2,39 | 36,28 | 19 | 4,52 | 57,97 |
| 32 | 5,95 | 66,09 | 23 | 3,68 | 78,49 |
| 33 | 5,6 | 28,58 | 27 | 3,86 | 58,67 |
| 34 | 5,39 | 79,52 | 29 | 4,36 | 61,25 |
| 35 | 4,70 | 38,53 | 31 | 4,18 | 60,05 |
| | | | 36 | 6,33 | 64,26 |
| | | | 37 | 4,71 | 57,89 |

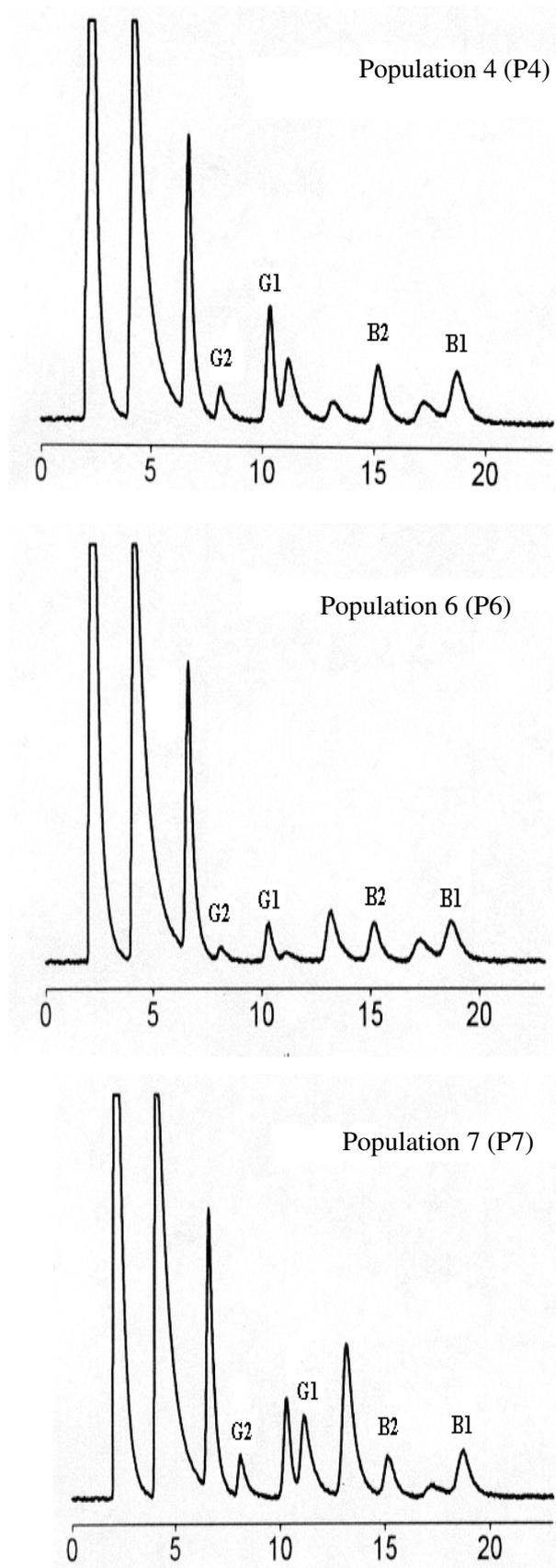
3.14. Détection et dosage des aflatoxines par HPLC

L'analyse qualitative et quantitative des extraits d'arachides par la chromatographie liquide haute performance, nous a permis de détecter plusieurs pics différents qui correspondent aux différents composés se trouvant dans les extraits des échantillons (Fig. 30). Les données des détecteurs sont enregistrées sur un chromatogramme (enregistrement des variations de signal en fonction du temps) sur lequel chaque composé séparé apparaît sous la forme d'un pic. La surface du pic est généralement proportionnelle à la concentration du composé correspondant à ce pic.

Ainsi dans les cinq échantillons analysés, quatre pics sont apparus caractérisés par des temps de rétention identiques à ceux des standards des aflatoxines. Ces pics sont immédiatement repérés et leur identification a été réalisée à partir des étalons préalablement injectés.



a) Extraits des échantillons de (P1- P3)



b) Extraits des échantillons de (P4 - P6 - P7)

Fig.30 Séparation des aflatoxines par HPLC des extraits de semence d'arachides

Les aflatoxines B1, B2, G1, G2 y sont discriminées dans cet ordre, en pics parfaitement séparés.

Les concentrations en ng / g des aflatoxine du groupe B et G dans les différents échantillons des grains d'arachides analysés s'établissent comme suit :

Pour l'échantillon P1 nous avons B1 (0, 80) ; B2 (0, 85) ; G1 (0, 74) ; G2 (0, 62)

Pour l'échantillon P3 nous avons B1 (0, 35) ; B2 (0, 31) ; G1 (0, 24) ; G2 (0,25)

Pour l'échantillon P4 nous avons B1 (0, 33) ; B2 (0, 35) ; G1 (0, 31) ; G2 (0, 41)

Pour l'échantillon P6 nous avons B1 (0, 10) ; B2 (0, 08) ; G1 (0, 06) ; G2 (0,05)

Pour l'échantillon P7 nous avons B1 (0, 22) ; B2 (0, 18) ; G1 (0, 15) ; G2 (0,11)

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que l'échantillon P1 est le plus contaminé suivi de P4, P3, P7 et P6 étant le moins contaminé.

3.15. Effet herbicide de l'aflatoxine

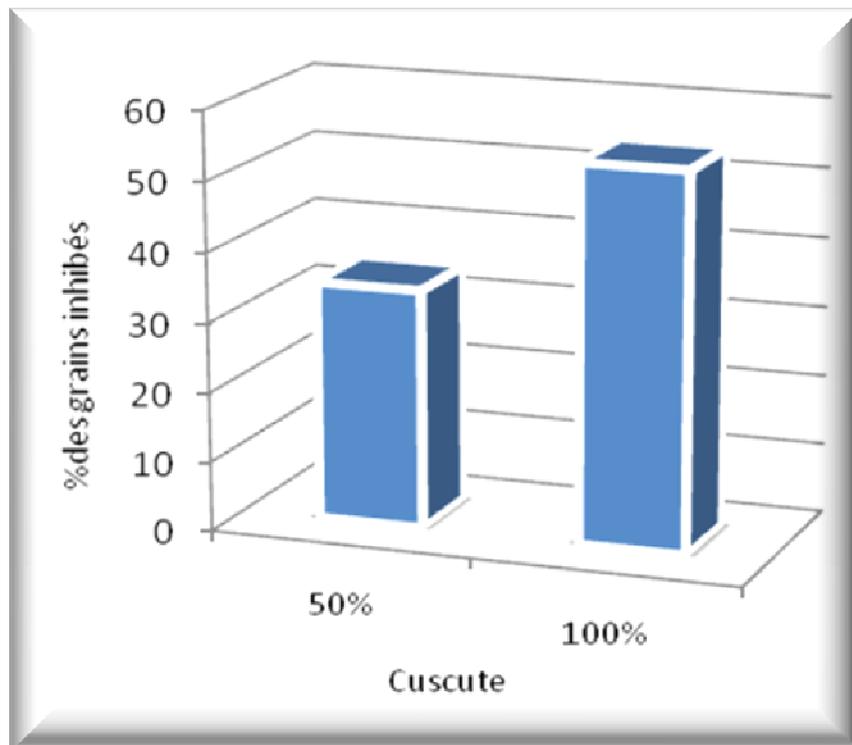
Les résultats obtenus des analyses de l'aflatoxine sur la germination des grains de plantes parasites sont répertoriés dans le tableau 27, figure 31 et l'annexe IV (b) montrent que l'aflatoxine s'est manifestée également par un effet inhibiteur sur la germination des grains des plantes parasites.

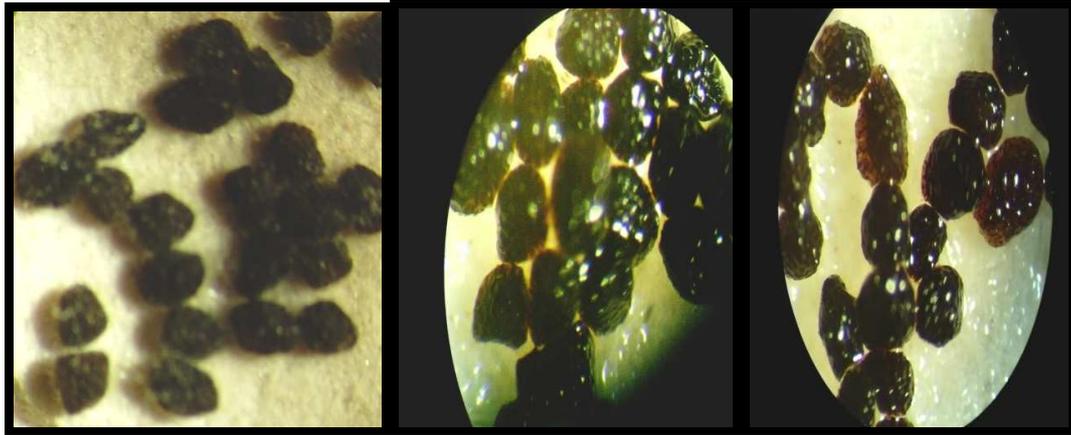
En effet la solution test (Aflatoxine purifiée + eau) a inhibé la germination des grains de la cuscute, dont l'inhibition est significative et le taux en pourcentage est proportionnel aux deux concentrations utilisées.

En revanche, malgré leur imbibition avec les exsudats racinaires, les grains d'orobanche n'ont pas pu germer aussi bien pour les grains du témoin que pour les grains soumis à l'action de la solution test (planche 7)

Tableau 27: Taux des grains inhibés chez la cuscute

| Répétition \ C% | 50% | 100% |
|-----------------|-------|-------|
| R1 | 37,09 | 51,61 |
| R2 | 29,03 | 48,38 |
| R3 | 30,64 | 54,83 |
| R4 | 40,32 | 61,12 |

**Figure 31 :** Effet de l'aflatoxine sur la germination des grains de cuscute

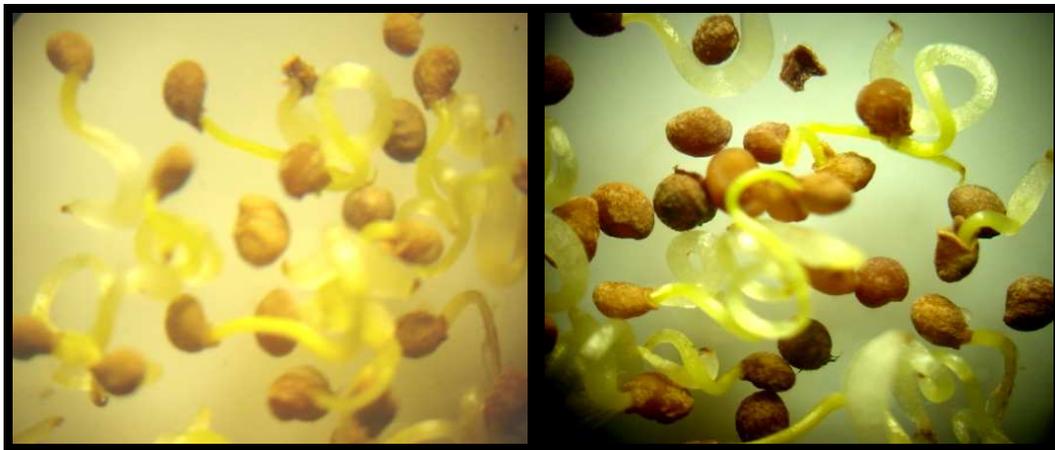


Témoin

[C] = 50%

[C] = 100%

a) Grains d'orobanches non germés



b) Grains de cuscute (témoin)



[C] d'aflatoxine = 50%

[C] d'aflatoxine = 100%

c) Effet inhibiteur de l'aflatoxine sur les grains de cuscute

Planche VII : Résultats d'inhibition de la germination des grains des plantes parasites

Discussion

La mycoflore des semences pose un problème de qualité et précisément de sécurité alimentaire par la présence de mycotoxines qu'elle peut occasionner dans les produits agricoles, en particuliers dans les grains et leurs dérivés au champ et au stockage (Lugauskas et al., 2006; Kumar et al., 2008). La flore fongique mise en évidence dans nos différents lots analysés est comparable à celle identifiées sur semence depuis des années par plusieurs chercheurs notamment Neergaard (1977), Richardson (1990) et Sauer (1992). C'est une mycoflore diversifiée que nous avons classée en trois catégories : mycoflore pathogène, mycoflore intermédiaire et mycoflore de stockage, en accord avec les résultats de Barchietto et Seng (1998).

Les résultats montrent que dans tous les lots analysés, les agents saprophytes et intermédiaires sont prédominants par rapport aux agents pathogènes. Fayret et al. (1996) expliquent ce pourcentage élevé des saprophytes par leur compétition trophique vis-à-vis des pathogènes qui défavorisent, voire empêchent leur développement. L'inventaire réalisé et le calcul de la fréquence et de l'abondance de chaque agent fongique, révèlent que la mycoflore est dominée par le genre *Alternaria* pour la majorité des lots analysés ; des résultats similaires ont été trouvés par Weidenborner et al. (1997). En effet, ce champignon n'a pas d'influence sur la germination des grains, mais sa présence avec celle du genre *Stemphylium* et du genre *Cladosporium* déprécie lourdement la qualité des grains, par l'apparition des points noirâtres (Ilyas et al., 1999). Fernandez et al. (1998) ont montré que ces points noirâtres sont influencés par la durée et les conditions de stockage (température et humidité).

Bien que numériquement limités dans les différents lots de semences examinés, certaines espèces de *Fusarium* tels que *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* sont des pathogènes majeurs de première importance pour les cultures céréalières (Krysinka – Traczyk et al., 2007), agents responsables de fusarioses (Windels, 2000) et qui ont provoqué des pertes sérieuses en Amérique du Nord à la fin des années 1990 (McMullen et al., 1997). Du fait que les *Fusaria* font partie des champignons de champ, ce qui suppose que les semences analysées étaient contaminées au champ, avant le stockage. Toutefois la colonisation peut s'effectuer à la récolte et cause des pertes économiques importantes. Les *Aspergilli* et les *Penicillia* sont responsables de moisissures nuisibles au stockage, altèrent la qualité des grains en produisant éventuellement des mycotoxines telles que les aflatoxines, les ochratoxines, l'acide penicillique, la citrinine, la patuline etc.... Nos résultats révèlent la présence des deux genres dans la majorité des lots analysés. Ainsi chez les grains d'arachides, les agents fongiques isolés sont en général les mêmes genres et mêmes espèces cités dans la littérature (Diener, 1960 ; Pensalwar et al., 1997). La présence d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* a retenu particulièrement notre attention et ce, par leur taux d'isolement élevé. En effet Giorni et al. (2007)

expliquaient que l'abondance relative de différents champignons varie entre les années, avec une incidence plus importante d'*Aspergillus flavus* en année sèche et chaude comparée aux années froides et pluvieuses. Alors que Pietri et al. (2004) attribuaient cette situation à la nature du substrat (grains d'arachides) qui est l'un des plus favorables au développement des *Aspergillus* (*A. flavus* et *A. parasiticus*). Sachant que l'arachide est la plus riche en teneur cumulée huile + protéines parmi les oléoprotéagineux (Schilling, 2003).

Nous avons identifié ces deux espèces d'*Aspergillus* en nous basant sur les critères morphologiques et microscopiques, en accord avec Klich (1988, 2002) et nous avons confirmé l'identité de ces deux espèces par la coloration jaune orange sur le milieu AFPA ; la même identification a été faite par Monga et Mahipal (1993) et Frändberg (2003). Horn et Dorner (2002) rapportent que le transfert successif des souches d'un milieu de culture à l'autre affaiblit la capacité des souches à produire des mycotoxines. La teneur en eau est déterminée dans tous les échantillons analysés et les résultats obtenus montrent que le taux d'humidité dans quelques échantillons a dépassé le seuil critique de conservation donné par Christensen et Sauer (1983) ; Monilié et PholfLeszkowicz (2003) qui est de 12 – 13 % pour les céréales et de 7 à 8 % pour les oléagineux. Ce paramètre est important puisque lorsque le taux d'humidité augmente le taux de contamination augmente également. Certains auteurs tels que (Kumari et Reddy, 1993) ont montré que l'activité d'eau (a_w) est un facteur, limitant du développement de la flore fongique des denrées peu hydratées et toute variation légère peut avoir une influence sur le grain et le champignon. L'embryon est la structure essentielle de la graine, qui est à l'origine de la nouvelle plante au moment de la germination. Les caractéristiques morphologiques et microscopiques de l'agent fongique rencontré sous forme de mycélium dans les embryons des grains de quelques lots de céréales analysés sont similaires de celles de l'*Alternaria* déjà rencontrés dans les enveloppes du péricarpe par Sauer et al. (1988) et dans les embryons de blé par Jianquian et al. (1999)

La répartition des agents fongiques isolés dans toutes les parties de la graine fait apparaître une certaine hétérogénéité de contamination. La mycoflore externe est plus abondante que la mycoflore interne, résultats comparables à ceux de Nwachukwu et Umechuruba (1997) qui ont montré que les taux de contamination les plus élevés, se trouvent dans les enveloppes externes et diminuent de plus en plus vers l'intérieur de la graine. Ces résultats sont encore confirmés par Weidenborner (2001) qui a montré une différence assez nette entre le taux de contamination des grains non désinfectés (mycoflore externe) et celui des grains désinfectés (mycoflore interne).

De façon générale, la présence d'agents fongiques dans la semence posait la question d'une éventuelle inhibition de la germination (Benjak, 1984 ; Godika et al., 1996).

Cependant les résultats obtenus par les tests portant sur la germination des grains en boîtes de Pétri, montrent que malgré l'abondance des agents fongiques il n'y a pas, un effet sévère sur la viabilité. Des notations similaires ont été enregistrées en serre pour la plupart des lots analysés à savoir une germination régulière et un taux de grains germés chez certaines variétés qui est voisin de 100 %. En effet, les analyses statistiques ne montrent aucune corrélation entre le pourcentage de contamination et celui de la germination. Selon Maude (1996), l'impact des agents fongiques sur l'état sanitaire de la graine dépend de leur site d'infection ; le maximum d'effet est atteint lorsque le pathogène se localise dans l'embryon. Cantalejo et al. (1996) révèlent qu'il existe une corrélation significative entre la contamination par les champignons et les conditions climatiques. D'après Sauer et al. (1984) ; Mitchell et al. (2004) l'humidité et la température sont les principaux facteurs physiques ayant une influence considérable sur la croissance et la production des mycotoxines. Orliz-Luthadt (1998) attribue cette situation à la forte contamination des isolements par des agents fongiques saprophytes et le développement normal des plantes à leur contact, montrent leur innocuité. Il est utile toutefois de signaler que chez les arachides, le taux de germination est réduit par rapport aux autres lots, ceci pourrait s'expliquer par la présence d'*Aspergillus flavus* dans toutes les parties de la graine. D'après Bhatia et al. (1995) cette dernière espèce influe énormément sur la germination des grains.

Dans l'analyse de la mycoflore, malgré la présence de toute une gamme d'agents fongiques dans tous les lots examinés, à part quelques échantillons d'arachides, la plupart sont indemnes de mycotoxines. Ces données sont en accord avec les conclusions d'observation rapportées par de nombreux auteurs notamment Al-Nahdi, (2000); Monilié et Pholf-Leskowicz (2003) qui ont montré que la présence d'agents fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par la présence d'un champignon bien spécifique. Ainsi les conditions permettant la toxogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique (Pholf-Leskowicz, 2000 ; Castegnaro et Pholf-Leskowicz, 2002). Ces résultats montrent que tous les isolats soumis à l'analyse ne sont pas tous toxogènes, ce qui est comparable à ceux de Castegnaro et Pholf-Leskowicz, (2002).

Les tests de fluorescence (BGYF) ont montré une fluorescence jaune verdâtre dans un seul échantillon d'arachide ce qui indique selon Bothast et Hesseltine (1975) la présence de l'aflatoxine dans cet échantillon. Ringue et al. (1998) ont expliqué cette fluorescence par l'acide kojique qui s'oxyde et produit le composant de BGYF. Parmi les trente six échantillons analysés, un seul

présente une fluorescence (BGYF) positive, alors que les analyses chimiques ont révélé cinq échantillons d'arachide contaminés par les aflatoxines. Sauer et al. (1982) expliquaient les tests de BGYF négatifs par les faibles taux de l'aflatoxine dans les échantillons contaminés.

Les études du test biologique sur la croissance bactérienne ont montré que les isolats cultivés sur le milieu YES solide et incubés à 4°C puis à la température ambiante, ont inhibé la croissance bactérienne, ceci pourrait s'expliquer par la production d'inhibiteurs de croissance, dont l'aflatoxine. Ces résultats confirment ceux rapportés par Barrios et al. (1996) qui ont montré que les conditions cycliques de température sont plus favorables à l'aflatoxinogénèse qu'une température constante. Les mêmes observations ont été faites avec des isolats incubés sur milieu YES liquide, ce qui montre une fois de plus que le milieu YES liquide ou solide, est le milieu favorable à la production des aflatoxines, confirmant ainsi les résultats de Gqaleni et al. (1997). Les isolats se sont donc manifestés de façon comparable sur les deux milieux ; les diamètres des zones d'inhibition varient d'un isolat à l'autre. Ces résultats sont d'une part comparables à ceux de Arsecule-Ratne et al (1969) ; Le Bar et Le Bar (1988) et d'autre part confirment ceux obtenus par Abbas et al. (2004), qui ont montré que les isolats d'une même espèce ont un potentiel toxigénique variable. Criseo et al. (2008) attribuaient cette variabilité importante de toxigénèse au génotype de l'isolat.

Les études sur la phytotoxicité ont révélé une inhibition significative de la germination des grains des végétaux supérieurs traités par le filtrat de culture des isolats aflatoxinogènes. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par de nombreux chercheurs notamment Niranjara et Shetty, (1998) ; El Naghy et al. (1998) ; Zeng et al. (2001) et qui ont montré que les filtrats de culture des champignons toxigènes inhibent d'une façon proportionnelle la germination des grains des végétaux supérieurs. Les résultats sur la croissance fongique et la production de l'aflatoxine a révélé qu'il n'y a aucune relation étroite entre les deux paramètres, ce qui confirme les données rapportées par Keller et al. (1997) ; Melcion et al. (1997).

La purification par CCM des extraits de filtrat de culture des isolats d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, nous a permis de détecter plusieurs spots sur les chromatogrammes. Selon Trucksess (1990), ces spots correspondent à des métabolites secondaires sécrétés par les isolats d'*Aspergillus* testés. Les résultats montrent que tous les isolats d'*Aspergillus parasiticus* sont toxigènes et certains d'entre eux ont sécrétés les quatre aflatoxines (B1, B2, G1, G2) tandis que les isolats d'*Aspergillus flavus* n'ont sécrété que la B1 et la B2 en accord avec les travaux de Dorner, (2004). L'examen des chromatogrammes montre que quelques isolats d'*Aspergillus flavus* ont sécrété non seulement l'aflatoxine, mais aussi la stérigmatocystine et l'acide cyclopiazonique ce qui

convergent avec les résultats de Vargas et al. (2003). Des substances comparables ont été obtenus par de nombreux autres auteurs Gqaleni et al. (1996) ; Yen et Bidasee (1993). Les résultats obtenus par la pulvérisation de H₂SO₄ sont en accord avec ceux de Robb (1983). La pulvérisation avec le P. Anis aldéhyde a révélé une coloration rose rapportée par Scott et al. (1970). L'utilisation du solvant méthanol et eau : 55 / 45 (v / v) s'est révélée convenable pour les aflatoxines. D'ailleurs Hesseltine et al. (1966) ; Urano et al. (1993) l'ont qualifié de meilleur solvant pour l'extraction des aflatoxines. Le système de développement TEF a donné de bons résultats et sous UV, la visualisation a révélé une fluorescence bien nette avec une bonne séparation des spots.

Dans le test de confirmation par l'acide trifluoroacétique, le dérivé B_{2a} est obtenu avec une valeur plus petite que celle de B₁, Résultats déjà trouvés par Hutchins et al. (1989) et Park et al. (1990). L'analyse du dosage des aflatoxines dans les grains d'arachides par la HPLC a révélé que dans la population 4 (P4), l'aflatoxine G₂ est supérieure que l'aflatoxine B₁ alors que dans la nature l'AFB₁ est le métabolite le plus toxique et le plus prédominant (Kaaya et al., 2006), ces résultats convergent avec ceux obtenus par Davis et al. (1966) ; El Gazzar et Marthen (1988); Nakazato et al.(1991). Hartley (1963) et Biolaz et al (1970) expliquent ces observations par le mécanisme d'oxydation de B₁ et G₁ en B₂ et G₂ respectivement. Bhatnagar et al. (1992) rapportent que G₁ et G₂ sont des précurseurs de B₁ et B₂. Yabe et al., 1988 montrent que les enzymes impliquées dans la conversion de stérigmatocystine en AFB₁, AFG₁ et de dihydrostérigmatocystine en AFB₂ et AFG₂ sont les mêmes. Dans le milieu liquide YES, le taux d'aflatoxine dans le filtrat de culture est élevé et varie entre 28, 58 et 99, 83 mg / 50 ml par rapport à celui détecté dans les grains d'arachides qui varie de 0, 29 à 3, 01 ng / g. Les chercheurs en particulier Abbas et al. (2006) et Yin et al. (2008) expliquent cette variation par l'existence d'une possible interaction compétitive entre les souches non toxigènes et les souches toxigènes. Selon Wicklow et al. (1980) l'*Aspergillus flavus* produit moins d'aflatoxine lorsque *Aspergillus niger* est présent. De même Aziz et al. (1997) rapportent que *Trichoderma viride* et *A. niger* réduisent fortement la croissance d'*A. flavus* et inhibent de ce fait la production d'aflatoxine. Des recherches en Australie ont montré qu'en présence des souches non toxigènes, la production d'aflatoxine dans les arachides peut être réduite à 95% (Pitt et Hocking, 2006; Dorner, 2008).

Il est toutefois important de noter que lorsque des graines oléagineuses sont contaminées, les aflatoxines ne sont pas extraites avec l'huile mais se retrouvent dans les tourteaux. Les analyses sur blé, orge, fève et pois chiche ne révèlent aucune contamination en mycotoxines, malgré que certains échantillons soient fortement contaminés par des agents fongiques. En effet, les germes de

blé sont qualifiés au même titre que les arachides comme d'excellents substrats, jouant un rôle déterminant dans la production de l'aflatoxine. Ehrlich et al. (2005); Bhatnagar et al. (2006) ont montré qu'il existe une influence significative entre les facteurs environnementaux et la biosynthèse de l'aflatoxine. Elmholt (2003) rapporte que les conditions de conservation mal contrôlées posent un risque majeur pour la formation des mycotoxines. Nous supposons alors que les conditions de stockage de ces grains dans les stations de l'ITGC étaient convenables et que certains facteurs (H% -T°C) n'étaient pas en faveur du développement de la mycoflore toxigène et de la production des mycotoxines, ce qui implique que les agents fongiques isolés de ces grains ne sont pas toxigènes. Kaaya et al. (2006) rapportent que la durée de stockage a une grande influence sur le développement de la flore fongique et la contamination en mycotoxines.

Les filtrats de la majorité des isolats ont inhibé la croissance bactérienne et en même temps ont induit un effet inhibiteur de la germination des grains des végétaux supérieurs, ce qui suppose qu'ils peuvent induire les mêmes effets sur les grains des plantes parasites, pour cela nous avons soumis les grains de la cuscute et les grains d'orobanche au traitement par l'aflatoxine

Le test d'aflatoxine comme herbicide naturel a montré que les grains d'orobanche n'ont pas germé aussi bien avec le témoin que les traités, ceci pourrait être dû à la viabilité de ces grains. Alors que pour les grains de la cuscute les résultats indiquent que le taux d'inhibition est proportionnel aux concentrations utilisées. Ces résultats sont comparables à ceux de Zonno et Verrou (2002), Amsellem, et al. (2001) et Abouzeid et al. (2003), qui ont travaillé sur les plantes parasites et qui ont montré que la majorité des mycotoxines inhibent la germination des grains des plantes parasites et que plus la concentration augmente plus le taux d'inhibition augmente.

Conclusion

Dans plusieurs régions du monde, toute sorte de mycotoxines constituent un problème majeur de sécurité sanitaire des aliments et font actuellement l'objet de nombreuses études scientifiques. La plupart des mycotoxines étudiées concernent les produits agricoles stratégiques destinés à l'alimentation humaine (céréales, légumineuses et oléagineux) et à l'alimentation animale (fourrage, tourteaux etc.) ; la plupart des mycotoxines signalées sont produites par les trois principaux genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Leur présence est inévitable et peut poser un problème en matière de santé aussi bien chez l'homme que chez l'animal ainsi que sur les transactions commerciales. Ce sont des molécules stables dans le temps, et qui ne peuvent pas être détruites par les processus de transformation (pasteurisation, cuisson...). Lorsqu'elles sont présentes dans le grain, on les retrouve tout au long de la chaîne alimentaire.

L'objectif principal retenu dans ce présent travail, était d'évaluer la qualité sanitaire de quelques semences de céréale et de légumineuses alimentaires à propos de la mycoflore et de ses métabolites secondaires. L'accent était mis sur les champignons toxinogènes et les mycotoxines, en particulier les aflatoxines, groupe de mycotoxines extrêmement cancérigènes, ayant fait l'objet d'études très poussées de part le monde. Au cours de cette étude, nous avons relevé les points suivants: Les grains récoltés en Algérie dans différentes régions, d'apparence saine peuvent être porteuses de toute une gamme de champignons, dont plusieurs sont des saprophytes appartenant à des genres et espèces très variés. Nous les avons classés en trois catégories: mycoflore de champ, mycoflore de stockage et mycoflore intermédiaire. Le calcul de la fréquence et de l'abondance, nous a permis de connaître le pourcentage de contamination de chaque lot. Les espèces du genre *Alternaria* ont dominé la mycoflore isolée, tant par leur fréquence que par leur abondance. Chez les céréales, plus de la moitié des grains hébergeait un agent fongique interne dans la plupart des lots de semences analysées, alors que chez les légumineuses le pourcentage maximum des grains contaminés est de moins de 40 %. L'identification et la confirmation de l'*A. flavus* et *A. parasiticus* ont été basées sur leur aspect morphologique sur différents milieux, en particulier l'AFPA un milieu spécifique pour les deux espèces ainsi que sur les critères morphologiques et microscopiques. Globalement la mycoflore présente dans les semences n'a pas affecté d'une manière significative la germination des grains et la vigueur des jeunes plantes, ce qui montre qu'il faut accorder plus d'importance à la nature de l'inoculum et à sa localisation, qu'à son taux et sa présence uniquement. La mesure de la teneur en eau des semences est une donnée capitale, qui présente des intérêts technologiques, analytiques, commerciales et réglementaires. A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'utilisation des semences saines, sèches et exemptes d'agents fongiques pathogènes est indispensable pour limiter la propagation rapide

des maladies et constitue la méthode la plus économique et la plus fiable de lutte contre ces agents. La méthode de fluorescence (BGYF) est une procédure de criblage utilisée pour l'évaluation rapide de l'aflatoxine présente dans un échantillon. Elle est simple à mettre en œuvre et non coûteuse, mais ne peut pas fournir une estimation quantitative satisfaisante de la teneur en aflatoxine. Elle peut être utilisée pour effectuer un premier tri pour des analyses chimiques plus poussées. Par ailleurs, ces recherches nous ont permis de mettre en évidence une activité inhibitrice du filtrat de culture sur la croissance bactérienne et la germination des grains des végétaux supérieurs, ce qui indique que ces isolats ont produit des inhibiteurs de croissance, dont l'aflatoxine. L'aflatoxine a été détectée également dans les grains d'arachides contaminés par *A. flavus* par CCM, confirmé par la pulvérisation d'acide trifluoroacétique et le P. Anis aldéhyde et quantifié par HPLC. Cette dernière technique nous a permis une identification qualitative par l'utilisation des temps de rétention et une identification quantitative par les aires ou les hauteurs des pics. La présence d'aflatoxine dans les arachides n'est donc plus à démontrer, également mise en évidence par plusieurs travaux dans plusieurs régions du monde; sa présence est étroitement liée à la nature de l'isolat et au substrat. En considérant nos résultats, le taux d'aflatoxine le plus élevé n'a pas atteint la concentration toxique, soit de 3,1 ng /g qui est observée dans le lot de la population P1, la consommation de ces grains n'influerait pas sur la santé du consommateur car le taux déterminé est inférieur au seuil critique. La contamination des arachides par *A. flavus* et *A. parasiticus* est donc une contrainte économique sérieuse. Par conséquent les résultats indiquent que les arachides doivent faire parti intégrante de la chaîne de contrôle nationale et doivent être certifiés.

Les semences de la plupart des lots collectés ont été minutieusement examinées sur échantillons représentatifs et sont jugés pratiquement indemnes des maladies dangereuses et des mycotoxines. Ces semences ont été produites majoritairement par les stations de l'Institut Technique de Grandes Cultures (ITGC) ce qui reflète les bonnes conditions de stockage, l'absence de mycotoxines et la présence limitée de certains agents fongiques pourrait ainsi s'expliquer.

Les résultats montrent que les métabolites phytotoxiques dont l'aflatoxine peuvent être une source intéressante pour de nouveaux composés actifs qui ont une action herbicide naturelle et originale. Les résultats obtenus avec un nombre limité d'échantillons montrent la non présence de mycotoxines dans les grains, ceci ne veut pas dire que les semences sont indemnes de mycotoxines, mais il faut chercher dans un grand nombre d'échantillons. Nous suggérons également que les semences importées ou locales doivent être soumises au contrôle alimentaire national en particulier les grains d'arachides. Il convient de ne pas négliger la question des agents fongiques ni des mycotoxines, car à l'état de traces ils peuvent nuire à la santé du consommateur

et par conséquent à l'économie du pays.

De part les conclusions des présents résultats, nous suggérons que l'évaluation de l'état sanitaire des semences doit être poursuivi et la mise en œuvre des moyens et des techniques doit être la plus rapide et la plus large ; la réglementation et la surveillance doivent être accentuées en établissant des plans de contrôles mycotoxiques pertinents. Ainsi la disponibilité des techniques simples et fiables pour le suivi de la contamination est essentielle. Afin d'améliorer les techniques de détection, nous préconisons d'introduire les marqueurs moléculaires qui permettront de faire progresser de manière décisive l'identification et la détection des agents pathogènes et leurs métabolites secondaires sans toutefois passer par les techniques morphologiques longues et fastidieuses. Ceci rentre dans le cadre d'économiser le temps et le coût d'analyse et ouvre la voie sur la possibilité d'analyse par voie moléculaire qui s'avère une technique très précise, très rapide et beaucoup moins coûteuse. Enfin nous terminons par dire :

Il faut produire beaucoup en peu de temps mais produire mieux.

Références

bibliographiques

- Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Weaver, M.A. and Horn, B.W.**, 2004. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Canadian Journal of Microbiology* **50** (3): 193 -197.
- Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Bruns, H.A. and Abel, C.A.**, 2006. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Sci Technol.* **16** (5): 437 - 449
- Abdel-Rehim, M.A., Abo-Taleb, E.M., Michail, S.H. and Metwally, S.M.**, 1997. Seed health testing of peas for *Ascochyta spp* and their impact on foliage seed health and seed yield. *Acta phytopathologica and entomologica Hungarica* **32**: 89 - 95
- Abouzeid, M.A. Boari, A., Zonno, M.C. Vurro, M. and Evidente, A.**, 2003. Toxicity profiles of potential biocontrol agents of Oranbanche ramosa. *Weed science* **52** (3): 326 – 332
- Accinelli, C., Abbas, H.K., Zablowicz, R.M. and Wilkinson, J.R.**, 2008. *Aspergillus flavus* aflatoxin occurrence and expression of aflatoxin biosynthesis genes in soil. *Canadian Journal of Microbiology* **54** (5): 371 -379
- Afnor Norme NF en ISO 712** 1989. Détermination de la teneur en eau (Céréales et produits céréaliers). Méthode de référence pratique Afnor, ed. Paris.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments)**, 2006. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales. "Rapport synthétiques" 181p.
- Aléo, M.D., Wyatt, R.D. and Scnelmann, R.G.**, 1991. The role of altered mitochondrial function in citrinin induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **109**: 455 – 463
- Al - Jabre, S., Al - Akloby, O.M., Al - Qurashi, A.R., Akhtar, N., Al -Dossary, A. and Randhawa, M.A.**, 2003. Thymoquinone an active principle of *Nigella Sativa*, inhibited *Aspergillus niger*. *Pakistan J. Med. Res.* **42** (3): 102 - 104
- Al -Nahdi, S.**, 2000. Mycotoxins from groundnuts marketed in Yemen. *International Arachis Newsletter* **20**: 59 – 62
- Amsellem, Z., Barghouthi, S., Cohen, B., Goldwasser, Y., Gressel, J., Hornok, L., Kerényi, Z., Kleifeld, Y., Klein, O., Kroschel, J., Sauerborn, J., Müller-Stöver, D., Thomas, H., Vurro, M. and Zonno, M.C.**, 2001. Recent advances in the biocontrol of orobanche (broomrape) species. *Biocontrol* **46** (2): 211 - 228
- Arbault, P. et Daussant, J.**, 2005. Méthodes d'analyses immunochimiques pour le contrôle de la qualité dans les IAA. *Tec. et Doc. Lavoisier* 409 p.
- Arranz, I., Sizoo, E., Van Egmond, H., Kroeger,k., Legarda, T.M., Burdaspal, P., Reif, K. and Stroka, J.**, 2006. Determination of aflatoxin B1 in medical herbs: interlaboratory study. *J. AOAC int.* **89** (3): 595 – 605
- Arsecule – Ratne, S., Silva, L. and Wijesundera, S.**, 1969. Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* **18** (1): 88 – 94
- Assao, T., Buchi, G.A. and Belkadem, A.**, 1963. Aflatoxins B and G. *J. of the American chemists society* **85**: 1706 - 1707
- Aziz, N.H. and Shahin, A.**, 1997. Influence of other fungi on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize kernels. *Journal of food safety* **17** : 113 - 123
- Barchietto, T. et Seng, J.M.**, 1998. La qualité sanitaire des épis de blé: Une mycoflore variée dont une petite partie peut nuire à la qualité. *La protection des végétaux* **511**: 8 - 12
- Barnett, H. and Hunter B.B.**, 1972. Illustrated Genera of imperfecti fungi. 3rd ed. Minneapolis MN: Burgess publishing company, 237 p.

- Barrios, M.J., Medina, L.M., Lopez, M.C. and Jordano, R.,** 1996. Mycotoxins in cheeses. *Alimentaria* **270**: 93 - 98
- Bean, G.A. and Southall, A.** 1983. Effect of pyridazinone herbicides on growth and aflatoxin release by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *App. Environ. Microbiol.* **45**: 503 – 505
- Benjak, P.,** 1984. Report of the seed storage committee working group on the "effects of storage fungi on seed viability". *Seed sci. and technol.* **12**: 233 - 253
- Benjamin, C.F., Hogaboam, C.M., Lukas, N.W. and Kunkel, S.L.,** 2003 Septic Mice ara susceptible to pulmonary aspergillosis. *American journal of pathology* **163**: 2605 - 2617
- Bennett, J.N. and Christensen, S.B.,** 1983. New perspectives on aflatoxins biosynthesis. *Adv. App. Microbiol.* **29**: 53-92
- Bennett, J.W. and Klich, M.,** 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* **16** (3): 497 - 516.
- Betran, F.J. and Isakeit, T.,** 2004. Aflatoxin Accumulation in maize hybrids of different maturities. *Agronomy journal* **96**: 565 - 570
- Bhatia, A., Singh, T. and Singh, D.,** 1995. Invasion of *Aspergillus flavus* in cluster bean seeds and its pathogenic behaviour. *Seed Research* **23** (1) 50 - 52
- Bhatnagar, D., Lillehoj, B.L. and Arora, K.D.,** 1992. Mycotoxins in Ecological systems Marcel Deker, INC, *Handbook of applied mycology* **5**: 225 – 286
- Bhatnagar, D., Yu, J. And Ehrlich, K.C.,** 2002 .Toxins of filamentous fungi. *Chemistry and Immunology*, **81**: 167-206
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. and Cleveland, T.E.,** 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **61**: 83 - 93.
- Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K.C. , Yu, J. And Cleveland, T.E.,** 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* **162** (3): 155 -166
- Biollaz, M.G., Buchi, G. and Milane, G.,** 1970. The biosynthesis of aflatoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **92**: 1035-1043
- Bothast, R.J. and Hesseltine, C.W.,** 1975. Bright greenish yellow fluorescence and aflatoxin in agricultural commodities. *App. Microbiol.,* **30**: 337 - 338
- Botton, B., Breton, A. Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, JP., Reymon, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. and Veau, P.,** 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson ed. Paris 512 p.
- Booth, C.** 1971. The genus *Fusarium* .Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237p.
- Booth, C.** 1977. *Fusarium*. Laboratory Guide to the identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England.
- Brera, C., Catano, C., de Santis, B., Debegnach, F., de Giacomo, M., Pannunzi, E. and Miraglia, M.,** 2006. Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and Zearalenone in corn milling fractions. *J. Agric. Food chem.* **54** (14): 5014 – 5019
- Broggi, L.E., Resnick, S.L. Pacin, A.M., Gonzalez, H.H, Cano, G. and Taglieri, D.,** 2002. Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Addit. Contam.* **19**: 465 - 469
- Cahagnier, B.,** 1998. Moisissures des aliments peu hydratés. Lavoisier Tec et Doc, Paris 226 p.
- Cairns – Fuller, V., Aldred, D. and Magan, N.,** 2005. Water, Temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain *J. Appl. Microbiol.,* **99**: 1215 - 1221

- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. and Keller, N.P.**, 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66** (3): 447 – 459
- Campa, D., Tavanti, A., Genignani, F., Mogavero, C.S., Bellini, I., Bottari, F., Barale, R., Landi, S. and Senesi, S.**, 2008. DNA Microarray based on Arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *Journal of clinical microbiology* **46** (3): 909 – 915
- Cantalejo, M.J., Carrasco, J.M. and Hernande, E.**, 1996. Influence of climatic conditions geographical origin and type of sample of fungal contamination of commodities. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* **14** (2): 175 - 184
- Cappelli, C.**, 1997. Pathologie des semences. Cours " Production des semences" Perugia Italia Florence 3-4 Avril
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C., Bland, J.M. and Montalbano, B.G.**, 2006. The aflatoxin biosynthesis cluster gene. aflX, encodes an oxidoreductase involved in conversion of versicolorin A to Demethylsterigmatocystin. *App. Environ. Microbiol.* **72** (2) 1096 – 1101
- CAST** (Council for Agricultural Science and Technology). 2003. Mycotoxins : Risks in plant, Animal, and Human Systems. Task Force Report N°. 139, Ames, Iowa, USA.
- Castegnaro, M. et Pfohl-Leskowicz, A.**, 2002. Les mycotoxines contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, in : Moll, M., Moll, N., Sécurité alimentaire du consommateur 2^{ème} éd. Lavoisier Tec et Doc 442 p.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chenezemsky, I.N. and Pfohl Leskowicz, A.**, 2006. Balkan endemic nephropathy, Role of ochratoxin A through biomarkers. *Molecular Nutrition and Food Research* **50** : 519 - 529
- Chellule, P.K., Gqaleni, N., Chuturgoon, A.A. and Dutton, M.**, 2000. The determination of fumonisin B1 in human faces: a short term marker for assessment of exposure. *Biomarkers* **5**(1): 1 – 8
- Christensen, C.M. and Sauer, D.B.**, 1983. Microflora. PP.219 – 240 (C.M Christensen, Ed) In storage of cereal grains and their products. American Association of cereal chemistry Inc., St Paul. Minnesota.
- Criseo, G., Racco, C. And Romeo, O.**, 2008. High genetic variability in non –aflatoxigenic *A. flavus* strains by using Quadruplex. *Int. J. Food Microbiol.* **125** (3): 341 – 343
- Davet, P. and Rouxel, F.**, 1997. Détection et isolement des champignons du sol INRA éd. Paris 203 p.
- Davis, N.D., Diener, U.L. and Eldridge, D.W.**, 1966. Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semi synthetic medium. *App. Microbiol.* **3**: 378 – 380
- Davis, N.D., Iyer, S.K. and Diener, U.L.**, 1987. Improved method of screening for aflatoxin with coconut agar medium. *App. Environ. Microbiol.* **53**: 1593 - 1595
- De Aguirre, L., Hurst, S.F., Choi, J.S., Shin, J.H, Hirinkson, H.P. and Morrison, C.J.**, 2004. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. *J. clin. Microbiol.* **42** (8): 3495 - 3504
- Dihara, N. and Dilek, B.**, 2002. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini . *Journal of agricultural and food chemistry* **50** (12): 3375 p.
- Diener, V.**, 1960. The mycoflora of peanuts in storage. *Phytopathology* **50**: 220 – 223
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H.** and 1980. Compendium of soil fungi. ed. London, 859 p.
- Dorner, J.W.**, 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *J. Toxicol. Toxin Rev.* (23): 425 - 450

- Dorner, J.W.**, 2008. Management and prevention of Mycotoxins in peanuts. *Food Addit. Contam.* **25** (2): 203-208
- Draughon, F.A., Elahi, M.E. and West, D.R.**, 1983. Insecticide production in corn. *J. food chemi.* **31**: 692 – 695
- Dutton, M.F., Ehrlich, K. and Bennett, J.W.**, 1985. Biosynthetic relationship among aflatoxin B₁, B₂, M₁ and M₂. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1392 - 1398
- Egner, P.A., Groopman, J.D., Wang, J.S., Kensher, T.W. and Friesen, M.D.**, 2006. Quantification of aflatoxin B₁ – N₇ Guanine in Human urine by high – performance liquid chromatography and isotope dilution tandem mass spectrometry chem. *Res Toxicol*, **19** (9): 1191 -1195
- Ehrlich , K C. , Yu, J; Cotty , P.J.**, 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *J. Appl Microbiol.* **99** (3): 518 – 527
- Ehrlich , K.C. ' Kobbeman, K., Montalbano, B.G. and Cotty , P.J.**, 2007. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology* **114** : 153-159
- El Gazzar, FE. And Marth, E.H. ,** 1988. Sodium Benzoate in the control of growth and aflatoxin production by *A. parasiticus*. *Journal of food protection* **50** (4): 305 - 309
- Elmholt, S.** 2003. Ecology of the ochratoxine A producing *Penicillium verrucosum*: Occurrence in field soil and grain with special attention to farming system and on – farm drying practices. *Biological Agriculture Horticulture.* **20**: 311 - 337
- El Naghy, MA. , Fadl – Allah, E.M., Samhan, M.**, 1998. Effect of aflatoxins G₁ on germination growth and metabolic activities of some crop plants. *Cytobios* **97** (385) : 87 - 93
- FAO**, 1992. Manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. 10 Cours de formation sur l'analyse des mycotoxines FAO. Rome 143 p.
- FAO**, 2003. Manuel sur l'application du système de l'analyse des risques – Points critiques pour leur maîtrises (HACCP) pour la prévention et le contrôle des mycotoxines. Rome 2003 88 p.
- FAO**, 2004. Réglementation relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale à l'échelle mondiale en 2003 Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, Italy, 81, 183 p.
- Farnsworth, E.R. and Trenholm, H.L.**, 1983. The metabolism of the mycotoxin Zearalenone and its effects on the reproductive tracts of young male and female pigs. *Canad. J. Anim. Sci.*, **63**: 967 – 975
- Fayret, J., Quenin, H. and Permy, A.**, 1996. Evolution de l'état sanitaire des Semences de tournesol. *La protection des végétaux* **487** (10) : 37 – 40
- Fernandez, M.R., De Pauw, R.M., Clarke, J.M. and Fox, S.L.**, 1998. Discoloration of wheat kernels by *pyrenophora tritici repentis*. *Canadian journal of plant pathology* **20** (4): 380 - 383
- Feuillet, P.**, 2000. Le grain de blé (Composition et utilisation) Ed. INRA Paris 312 p.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. and Svendsen, J.A.** 1983. Simple screening method for moulds producing intracellular mycotoxin in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 581 – 585
- Frändberg, E., Pitt, J. and Olsen, M.**, 2003. Quality control of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* agar and comparison with dichloran 18 % glycerol agar: a collaborative study. *Int J. of food microbiol* **89** (1). 99 - 102
- Frayssinet, C. and Fremy, J.M.**, 1991. Dosage des mycotoxines. Techniques d'analyse et contrôle dans les industries agro-alimentaires IV: Analyses des constituants alimentaires. Lavoisier pp. 349 – 371

- Frisvad, J.C., Filtenborg, O.**, 1984. Classification of Tervercillate penicillia based on profiles mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1301 – 1310
- Garcia, S., Heredia, N.**, 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia* **162** (3): 255 - 264
- Gathumbi, J.K., Usleber, E., Ngatia, T.A., Kangethe, E.K., Martlbauer, E.**, 2003 Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B1 in chicken liver tissues. *Poultry science* **82** (4): 585 – 590
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R. and Kiek, N.P.**, 1988. Fumonisin: Novel Mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1806 – 1811
- Gelderblom W.C., Galendo D., Abel S., Swanevelder S., Marasas W.F. and Wild C.P.**, 2001. Cancer initiation by fumonisin B1 in rat liver: role of cell proliferation. *Cancer Lett.* **169**: 127 - 137
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. and Battilani, P.**, 2007. Studies on *Aspergillus* section *flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 330 – 338
- Godika, S., Agarwal, K. and Singh, T.**, 1996. Fungi associated with seeds of sunflower (*Heliathus annus* L.) grown in a jasthan and their effects. *Journal of phytopathological Research* **9** (1): 61 - 63
- Gorst-Allman, C.P., Steyn, P.S.**, 1979. Screening methods for the detection of thirteen common Mycotoxins. *Journal of chromatography.* **175**: 325 – 331
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., Gettinby, G.**, 1996. The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia* **136**: 103 – 108
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., Gettinby, G.**, 1997. Effects of temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1048 – 1053
- Green, C.F., Scarpino, P.V., Jensen, P., Jensen, J.N., Nancy, J.J. and Gibbs, S.G.**, 2004. Disinfection of selected *Aspergillus spp.* Using ultraviolet germicidal irradiation. *Canadian Journal of Microbiology* **50** (3): 221-224
- Grinstein, A., Kritzman, G., Riven, Y., Peretz-Alon, I. and Bar, Z.**, 1997. Chemical and physical disinfection of peanut pods for improved seed quality. *Crop protection* **16** (4) : 353 – 357
- Guiraud, J. and Galzy, P.**, 1980. Analyse microbiologique dans les industries alimentaires ed. Paris 21 -178
- Haddidane, R., Roger-Regnault, C., Bouatour, H., Ellouzi, F., Bacha, H., Creppy, E. and Dirheimer, G.**, 1989. Correlation between Alimentary Mycotoxin contamination and specific diseases. *Human Toxicol.* **4**: 491 – 501
- Haider, M.M., Soulaïman, E.D. and Dawood, P.K.**, 1986. Effect of culture filtrate of five species of fungi and their inciture on seed germination and seedling development of sunflower. *J. Bio. Sci. Res.* **17**: 141 – 150
- Hartley, R., Nesbitt, B. and O'Kelly, J.**, 1963. Toxics metabolites of *Aspergillus flavus* *Nature*, **198**, 1056 – 1058
- Hell, K., Cadwell, K.F., Setamou, M. and Schulthess, F.** 2000. Influence of insect infestation on aflatoxin contamination of stored maize in four agroecological regions of Benin *African Entomology* **8**: 169 - 177
- Hesseltine, C.W., Shotwell, O.D.L., Ellis, J.J. and Stubblefield, R.D.**, 1966. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* . *Bacteriological Reviews* **30** (1): 795 – 805

- Horn, W.B. and Dorner, W.J.**, 2002. Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycologia* **94** (5): 741 - 751
- Hubert, J., Stejskal, V., Munzbergova, Z., Kubatova, A., Vanova, M. and Zdarkova, E.**, 2007. mites and fungi in heavily infested stores in the Czech Republic, *J. Econ. Entomol.*, **97**(6): 2144-2153
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M.**, 2001. Toxicity metabolism and impact of Mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**: 101 – 134
- Hutchins, J.E., Lee, Y.J., Tyczkowska, K. and Hagler, W.M.**, 1989. Evaluation of silica cartridge purification and hemi-acetal formation for liquid chromatographic determination of aflatoxin in corn. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* **18**: 319-326
- Igawa, T., Takahashi-Ando, N., Ochiai, N., Ohsato, S., Shimizu, T., Kudo, T., Yamaguchi, I., Kimura, M.**, 2007. Reduced contamination by the *Fusarium* Mycotoxin Zearalenone in Maize kernels through genetic modification with a detoxification gene. *App. Environ. Microbiol.* **73** (5): 1622 - 1629
- Ilyas, M.B., Sabir, S. and Randhwa, M.A.**, 1999. Relative response of grains of naturally infected advanced wheat lines to black point disease at Faisalabad. *Pakistan journal of Phytopathology* **11**(1): 81 – 83
- Jarvis, B.B. and Miller, J.D.**, 2005. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 67 - 372
- Jianqiang, L., Xili, L., Feng, W. and Muhai, Z.**, 1999. Microscopy and scanning electron microscopy of black embryo of wheat seed and the seed borne fungi. *Acta phytopathologica sinica* **29** (1) 22 – 26
- Joly, P.**, 1964. Le genre *Alternaria* recherche physiologiques et systématiques ed. P. Lechevalier 251p.
- Kaaya, A.N and Kyamuhangire, W.**, 2006. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* **110** (3): 217 – 223
- Kaliamurthy, J., Geraldine, P. and Thomas, P.A.**, 1997. Effect of zearalénone on food consumption, growth rate, organ weigh and serum testosterone level in male rats. *J. Environ. Biol.* **18**: 115 – 120
- Keller, S.E., Sullivan, T.M. and Chirtel, S.**, 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of Fumonisin B1 oxygen and pH. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* **19**: 305 – 309
- Klich, M.A. and Pitt, J.I.**, 1988. Differentiation of *A.F.* from *A.P.* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **91**: 99 – 108
- Klich, M.A.**, 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter *Mycologia*, **94**: 21-27
- Krysinska - Traczyk, E., Perkowski, J. and Dutkiewicz, J.**, 2007. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **14** (1): 159 - 167
- Kumar, V., Singh, G.P. and Babu, A.M.**, 2004. Surface ultrastructural studies on the germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link: Fries infecting Silkworm, *Bombyx Mori Linn. Mycopathologia* **157**(1): 127 p.
- Kumar, V., Basu, M.S. and Rajendran, T.P.**, 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, **27**: 891 – 905
- Kumari, R and Reddy, S.M.**, 1993. Influence of water activity on seed mycoflora of fennel *Indian phytopathology* **46** (4): 389 - 392
- Kumeda, Y. and Assao, T.**, 2001. Heteroduplex panel Analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (9): 4084 - 4090

- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W.,** 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari* *Antonie van Leeuwenhoek* **53**: 147 - 158
- Larpent, J.P. and Larpent-Gourgaud, M.,** 1997. Mémento Technique de microbiologie 3^{ème} édition Tec et Doc Lavoisier Paris 946 p.
- Le Bars, J. et Le Bars, P.,** 1988. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. *Bull.Asso. A.E. Inst. Pasteur Paris*, **30** (115) : 8 – 21
- Li, F., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, Y. and Li, W.,** 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepato cellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of agricultural and food chemistry*; **49** (8): 4122
- Lugauskas, A., Raila, A., Railiene M. and Raudoniene V.,** 2006. Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *Ann. Agric. Environ. Med.* **13**: 147 - 161
- Luo, M., Dang, P., Guo, B.Z., He, G., Holbrook, C.C., Bausher, M.G. and Lee, R.D.,** 2005. Generation of Expressed sequence Tags (ESTs) for gene Discovery and Marker development in cultivated peanut. *Crop Science* **45**: 346 - 353
- Lutz, M.P., Feichtinger, G., Défago, G. and Duffy, B.,** 2003. Mycotoxigenic *Fusarium* and Déoxynivalenol Production Repress Chitinase Gene Expression in the Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* *PI Appl. Environ. Microbiol.* **69** (6): 3077 - 3084
- Mahoney, N.E and Molyneux, R.J.,** 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of agricultural and food chemistry* **52**(7): 1882 p.
- Marasas, W.F.O., Riley., R.L, Hendricks, K.A., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Gelineau-van, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martinez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr,L, Sullards M.C, Roman A.V, Voss K.A, Wang E. and Merrill, A.H.,** 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. *J. Nutr.* **134**: 711–716.
- Massimango, N., Ramaut, J.T. and Remacle, J.,** 1977. Production de l'aflatoxine B1 in vitro en fonction de diverse conditions de culture. *Ann. Nutr. Alim.* **31**: 583 – 605.
- Maude, R.B.,** 1996. Seed borne diseases and their control Principal and practice CAB international 280 p.
- Mazza, G.,** 1982. *Bacillus subtilis* " rec Assay " Test with isogenic strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** (1): 77 - 184
- Mazza, G.,** 1983. Rapid Assay for detection of microorganisms producing DNA – damaging metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(6) p. 1949 - 1952
- Mc Mullen, M., Jones, R. and Gallenberg, D.,** 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* **81**: 1340 – 1348
- Melcion , D., Cahagnier, B. and Richard-Molard, D.,** 1997. Study of the biosynthesis of fumonisins B₁, B₂ and B₃ by different strains of *Fusarium moniliforme*. *Letters in applied Microbiology*, **24**, 301 - 305
- Messiaen, C.M., and Cassini, R.,** 1968. Recherches sur les Fusarioses. IV. L a systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiphyties* **19**: 387 – 454
- Miller, B.S., Lee, M.S., Hughes, J.W. and Pomeranz, Y.,** 1980. Measuring high moisture content of cereal grains by pulsed nuclear magnetic resonances. *Cereal Chemistry*, **57**: 126 – 129

- Minervin, F., Fornelli, F., Lucivero, G., Romano, C. and Visconti, A.**, 2005. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines *Toxicology*, 210 : 81-91
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., and Magan, N.**, 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97: 439 - 445
- Monga, D.P. and Mahipal, S.K.**, 1993. A comparison on the efficacy of fluorotoxin meter and *Aspergillus* differential medium in the detection of aflatoxins in animal feed Indian. *journal of comparative microbiology immunology and infectious diseases* 14 : 1 - 3
- Monilié, A. et Pfohl – Leszkowicz, A.**, 2003. Les mycotoxines dans les céréales : Les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés Note de l'ASEDIS – SO N° special mycotoxines (2003) ENSAT
- Moreau, C.**, 1974. Moisissures toxiques dans l'alimentation Ed. Masson et Cie, Paris 471 p.
- Moreau, C.**, 1996. Les moisissures p. 235 – 248 in: Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. & Zucca, J. eds Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et la qualité des aliments Lavoisier London Paris – NewYork
- Nakazato, O.M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T. and Kasai, N.**, 1990. Interconversion of Aflatoxin B1 and Aflatoxicol by several fungi *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (5): 1465 – 1470
- Nakazato, O.M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T. et Kasai, N.**, 1991. Production of aflatoxins and aflatoxicols by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and metabolism of Aflatoxin B1 by Aflatoxin-non Producing *Aspergillus flavus*. *Japanese journal of toxicology* 37(2): 107 - 116
- Neergaard, P.**, 1977. Seed pathology, The Macmillan press L.T.D, London 839 p.
- Neergaard, P.**, 1979. Seed pathology, The Macmillan press L.T.D, London 1191 p.
- Neergaard, P.**, 1981. Risks for EPPO region from seed-borne pathogens. *EPPO Bulletin* 11: 207 – 212
- Nelson, P., Toussoun, T.A. and Marassas, W.F.O.**, 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Park and London
- Nesbitt, B.F., O'Kelly, J., Sargeant, K. and Sheridan, A.**, 1962. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature (London)* 195: 1062 – 1063
- Niranjana, S.R. and Shetty, H.S.**, 1998. Effect of metabolites of *Fusarium moniliforme* on seed quality of sorghum. *Journal of mycology and plant pathology* 28(1): 42 – 44
- Nwachukwu, E.O. and Umechuruba, C.I.**, 1997. Location, transmission and pathogenicity of major seed borne fungi of African yam bean, *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst ex, A, Rich) Harms seed. *Global journal of pure and Appl. Sciences* 3(3): 313 – 321
- Orlicz-Luthadt, A.**, 1998. On transfer of *Fusarium* wilts by seed in China aster. *Seed science and technology* 26 (1): 67 – 76
- Palumbo, J.D; Baker, J.L. and Mahoney, N.E.**, 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microb. Ecol.* 52(1): 45 - 52
- Park, J.L., Nesheim, S., Trucksess, M.W., Stack, M.E. and Newell, R.**, 1990. Liquid chromatography method for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn and peanut products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(2): 260 - 266

- Patterson, M. and Domoglou, A.P.**, 1986. The effect of water activity and pH on the production of Mycotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Letter Appl. Microbiol.* **3**: 123 – 128
- Payne, G.A., Hagler, W.M.**, 1983. Effect of specific amino acids on *Aspergillus flavus* in defined media *App. Environ. Microbiol.* **4**: 805 - 812
- Pensalwar, N., Solanke, R.B. Kore, SS.** 1997. Association of fungi with groundnut seeds and effect of various seed dressers on *Fusarium moniliforme* inoculation. *Journal of Mycology and plant pathology*, **27** (3): 299 – 301
- Pfohl – Leszkowicz, A.**, 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation. Evaluation et gestion du risque Tec et Doc London – Paris – Newyork 478 p.
- Pfohl-Leszkowicz, A.**, 2000. Ecology of moulds and Mycotoxins: Situation in France. *Cahiers de nutrition et de diététique*, **35**(6): 379 – 388
- Pfohl-Leszkowicz, A., and Castegnaro, M.**, 2002. Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancer .dans toxines et recherche biomédicales, collection SFET, Goudey-Perrière,F., Puiseux-Dao, S. & Sauviat M.P. eds. Elsevier, pp. 143-152
- Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R.A.**, 2007. Ochratoxin A toxicity: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research* **51**: 61 - 69
- Pietri, A., Bertuzzi,T., Pallaroni, L. and Piva, G.**, 2004. Occurrence of Mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy, *Food Addit. Contam.* **21**, 479 – 487
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. and Glenn, D.R.**, 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **54**: 109 - 114
- Pitt, J.I., and Hocking, A.D.**, 1985. Fungi and Food spoilage. Academic press, London pp. 169 - 257
- Pitt, J.I., and Hocking , A.D.**, 1999. Fungi and Feed spoilage. 2 ed. *A Chapman and Hall Food science. Book Aspen publication Gaithersburg, Marylan pp. 375 – 383.*
- Pitt, J.I.**, 2000. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, **38** (1): 17 – 22
- Pitt, J.I., and Hocking, AD.** 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia.* **162** (3): 233 - 243
- Probst, C., Njapan, H., Cotty, P.J.**, 2007. Outbreak of an Acute aflatoxicosis in Kenya 2004: Identification of the causal Agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **10**, 1128 / *AEM.* 02370 - 06
- Proctor, DL.**, 1995. Techniques d'emmagasinage des grains. Evolution et tendances dans les pays en développement. *Bull. des services agricoles de la FAO.* 265 p.
- Ramirez, M., Chulze S., Magan N.**, 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two Argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain, *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 291 - 296
- Randerath, K.**, 1971. Chromatographie sur couches minces 398 p.
- Rapilly, F.**, 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des épiphyties* **19** N° hors serie: 102 p.
- Raymond, S.L., Smith, T.K. and Swamy, H.V.**, 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake serum chemistry and hematology of horses and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent *J. Anim. Sci* **81**: 2123 – 2130
- Richard, J.L. and Payne, G.A.**, 2003. Mycotoxins in plant, animal, and human systems. *Task Force Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology.*

- Richardson, M.J.**, 1990. An annotated list of seed-borne diseases, 4th edn. International seed testing association, Zurich, Switzerland
- Robb, J. and Norval, M.**, 1983. Comparison of cytotoxicity and thin-layer chromatography methods for detection of mycotoxins Appl. *Environ. Microbiol.* **46** (4): 948 - 950
- Robens J. and Cardwell K.**, 2003. The costs of mycotoxin management to the USA: management of aflatoxins in the United States. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2**: 143 - 156
- Rosenthal, E., Marty, P., Ferrero, C., Le Fichoux, Y. and Cassuto, J.P.**, 2000. Infection à *Penicillium marneffei* chez un patient infecté par le HIV, *Press Med.*, **29**: 363-364
- Sakuno, E., Yabe, K. and Nakajima, H.**, 2003. Involvement of two cytosolic enzymes and novel intermediate, 5' – Oxoaverantin in the pathway from 5' – hydroxyaverantin to averufin in aflatoxin biosynthesis *App. Environ. Microbiol.* **69**: 6418 – 6426
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei- Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, j. and Devlieghere, F.**, 2007. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiolgy.* **24**: 465-473
- Sargeant, K., Sheridan, A., O' kelly, J. and Carnaghan, R.B.A.**, 1961. Toxicity associate with certain samples of groundnuts. *Nature (London)* **192**: 1095 – 1097
- Sauer, DB., Storey,C.L., Ecker, O. and Fulk, D.W.**, 1982. Fungi in US Export wheat and corn. *Phytopathology* **72** (11): 1449 - 1452
- Sauer, D.B., Storey,C.L. and Walker, D.E.** 1984. Fungal population in US. Farm - stored grain and their relationship to moisture, storage time, region, and insect infestation. *Phytopathology* **74**: 1050 - 1053
- Sauer, D.B.**, 1988. Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, Toxicity, germination, *International journal of food Microbiology* **7**: 167 - 275
- Sauer, D.B., Meronuck, RA. and Christensen, C.M.**, 1992. Microflora . In storage of cereal grains and their products. (Sauer, DB.) American Association of cereal chemists USA pp. 313 – 340
- Schabereiter-Gurtner, C., Selitsch, B., Rotter, M.L., Hirschl, A.M. and Willinger, B.**, 2007. Development of novel real-time PCR Assays for detection and Differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *candida* species in clinical specimens. *J.clin. Microbiol.* **97** (3) : 317 – 326
- Schilling, R.**, 2003. L'arachide situation et perspectives Résumé de la conférence donnée à Agropolis Museum
- Schollenberger, M., Jara, H.T., Suchy, S., Drochner, W. And Müller, H.M.**, 2002. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in Southwest Germany. *International journal of Food Microbiology* **72**: 85 – 89
- Scott, P.M., Lawrence, J.W. and Vanwalbeek, N.** 1970. Detection of Mycotoxins by TLC: Application to fungal screening extracts. *Appl. Microbiol.* **28**: 839 – 842
- Scott, P.M., Van Walbeek, W., Kennedy, B. and Anyeti, D.**, 1972. Mycotoxins (Ochratoxins A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic Fungi in Grains and other Agricultural products. *Agricultural and food chemistry* **20**: 1103 – 1109
- Shaw, P.D.**, 1981. Production and isolation in toxins in plant disease (R.D. Durbin ed.) Acad. Press Newyork pp. 21 - 44
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Lee, B.L. and Ong, C.N.**, 1994. Aflatoxin B1 induced lipid peroxidation in rat liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**: 145 – 150

- Shotwell, O.I., Goulden, M.L. and Hesseltine, C.W.**, 1974. Aflatoxin distribution in contaminated corn . *cereal chem.*, **51**: 492 - 499
- Shotwell, O.I. and Hesseltine, C.W.**, 1981. Use of bright greenish yellow fluorescence as a presumptive test for aflatoxin in corn. *Cereal chem.* **58**: 124 - 127
- Singh, K., Frisvad, J.C., Thrane U.L.F. and Mathur, S.B.**, 1991. An illustrated manuel on identification of some seed borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins Denmark 133 p.
- Singh, D. and Okpul, T.**, 2000. Evaluation of 12 taro (*colocasia exulenta* L) leaf blight-resistant clones for yield and eating quality in papua new Guinea. *Journal of breeding and genetics* **32** (1): 39-45
- Smith, G.**, 1969. An introduction industrial mycology, 6th ed. Edward Arnold Ltd. London, 390 p.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Eppley, R.M., Tumbleson, M.E., Gumprecht, L.A. and Haschek-Hock, W.M.**, 2000. Purified Fumonisin B1 diseases cardiovascular function but does not .alter pulmonary capillary permeability in swine. *Toxicol. Sci.* **56**: 240 - 249
- Stettler, P. M. and Sengstag' C.**, 2001. Liver carcinogen aflatoxin B₁ as an inducer of mitotic recombination in a human cell line *Molecular carcinogenesis* **31**(3): 125 – 138
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Angelov, G., Petkova-Bocharova, T. and Creppy, E.E.**, 2001. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet contaning Ochratoxin A and penicillic acid. *Veterinary research communications*, **25**: 205 – 223
- Strickland, P.T., Groopman, G.D.**, 1995. Biomarkers for assessing environmental exposure to carcinogens in the diet. *American Journal of clinical nutrition* **61**: 7107 - 7205
- Takahashi, H., Kamimura, H. Ichinoe, M.**, 2004 . Distribution of Aflatoxin producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southern most Islands of Japan. *Journal of food protection* **67**(1): 90 p.
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D. and Fleet, G.H.**, 2001. Growth of fungi and mycotoxin production in cheese under modified atmospheres . *International Journal of Food Microbiology*, **68**: 125 – 133
- Tojeta, G.S., Mukherjee, A., Diwakar, S., Singh, P. Saxena, B.N., Sinha, K.K., Sinha, A.K., Kumar, N., Nagaraja, K.V., Bai, G., Prasad, C.A., Vanchinathan, S., Roy, R. and Parkar, S.**, 2006. Aflatoxin B1 contamination in wheat grain samples collected from different geographical regions of India: a multicenter study. *J. Food protection* **969**: 1463 - 1467
- Tominaga, M., Lee, Y.H., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, Y., Goth,K. and Akita, O.**, 2006. Molecular Analysis of an inactive Aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus Oryzae* RIB strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 484 – 490
- Toussoun, T.A. and Nelson, P.E.** , 1968.. *Fusarium*. A Pictorial Guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. The Pennsylvania State University Park and London (second edition). 51p.
- Toussoun, T.A. and Nelson, P.E.**, 1975. Variations and speciation in the *Fusaria*. *Annual Review of Phytopathology* **13**: 71 – 82
- Trucksess, M.W., Young, K.**, 1990. Comparison of two immunochemical methods with Thin-Layer chromatographic methods for determination of aflatoxins. *J. Ass. off. Anal. Chem.* **3**: 425 – 428

- Trucksess, M.W., Dorbrink-Kurtzman, M.A., Tournas, V., Whitw, K.D.,** 2002. Occurrence of aflatoxin and fumonisins in Incaparina from Guatemala. Analysis, surveillance, evaluation control. *Food additives and contaminants*. **19** (7): 671p.
- Trucksess, M.W., Weatver, C., Oles, C., D'ovidio, K. and Rader, J.,** 2006. Determination of Aflatoxins and OchratoxinA in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* **89** (3): 624 – 630
- Urano, T., Trucksess, M.W., Samuel, W.,** 1993. Automated Affinity liquid chromatography system for on-line Isolation, separation, and quantitation of aflatoxins in methanol-water extracts of corn or peanuts. *J. Agric. Food chem.* **41**(11): 1982-1985
- Van Egmond, H.P. and Jonker, M.A.,** 2004. Worldwide regulations on aflatoxins – the situation in 2002. *J. Toxicol Toxin Rev.* **23** (2, 3): 273 - 293
- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. And Kozakiewicz, Z.** (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and biotechnology.* **41**: 29 - 36
- Vargas, E.A., Preis, R.A., Castro, L . and Silva, C.M.,** 2001. Co – occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 G2, Zearalenone and Fumonisin B. In Brazilian corn. *Food Additive and Contaminants.* **18**: 981 – 986
- Wang, J., Fitzpatrick, D.W. and Wilson, J.R.,** 1998. Effects of the trichothecene mycotoxin T-2 toxin on neurotransmitters and metabolites in discrete areas of the rat brain. *Food Chem. Toxicol.*, **36**(11): 947 - 953
- Waterwarth, H.,** 1993. Processing foreign plant germplasm at the national quarantine center. *Plant disease*, **77**: 854 – 859
- Weidenborner, M., Berleth, M., Kramer, J., Kunz, B.,** 1997. Mycoflora of German grain brands harvested in 1996. *Universiteit Gent* **62** (36): 1079 – 1083
- Weidenborner, M.,** 2001. Pine nuts: The mycobiota and potential mycotoxins. *Canadian journal of microbiology* **47**(5): 460 - 464
- Wen, Y., Hatabayashi, H., Aray, H., Kitamoto, H.K. and Yabe, K.,** 2005. Function of the cyp X and moX Y gene in Aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6): 3192 – 3198
- Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W. Shotwell, O.L. and Adams, G.L.,** 1980. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* **70** (45): 761 – 764
- Williams, S.,** 1984. Official methods of analysis Inc, Arlington, USA, 1141p.
- Williams J.H., Phillips D.T., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M. and Agarwal D.,** 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, Exposure, potential health consequences, and intervention. *American journal of clinical nutrition.* **80** (5): 1106 – 1122
- Windels, C.E.,** 2000. Economic and social impacts of *fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. *Phytopathology* **90** (1): 17- 21
- Woloshuk, C.P., Seip, ER., Payne, GA., and Adkins, CR.,** 1989 Genetic transformation system for the aflatoxin – producing fungus *Aspergillus flavus*. *App. Environ. Microbiol.* **55**(1): 86 - 90
- Wong, Z.A and Hsieh, D.P.H.,** 1980. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey rat and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**: 115 – 125
- Xie, W., Mirocha, C.J. and Chen, J.,** 1997. Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B1 in corn by on line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **45**(4): 1251-1255

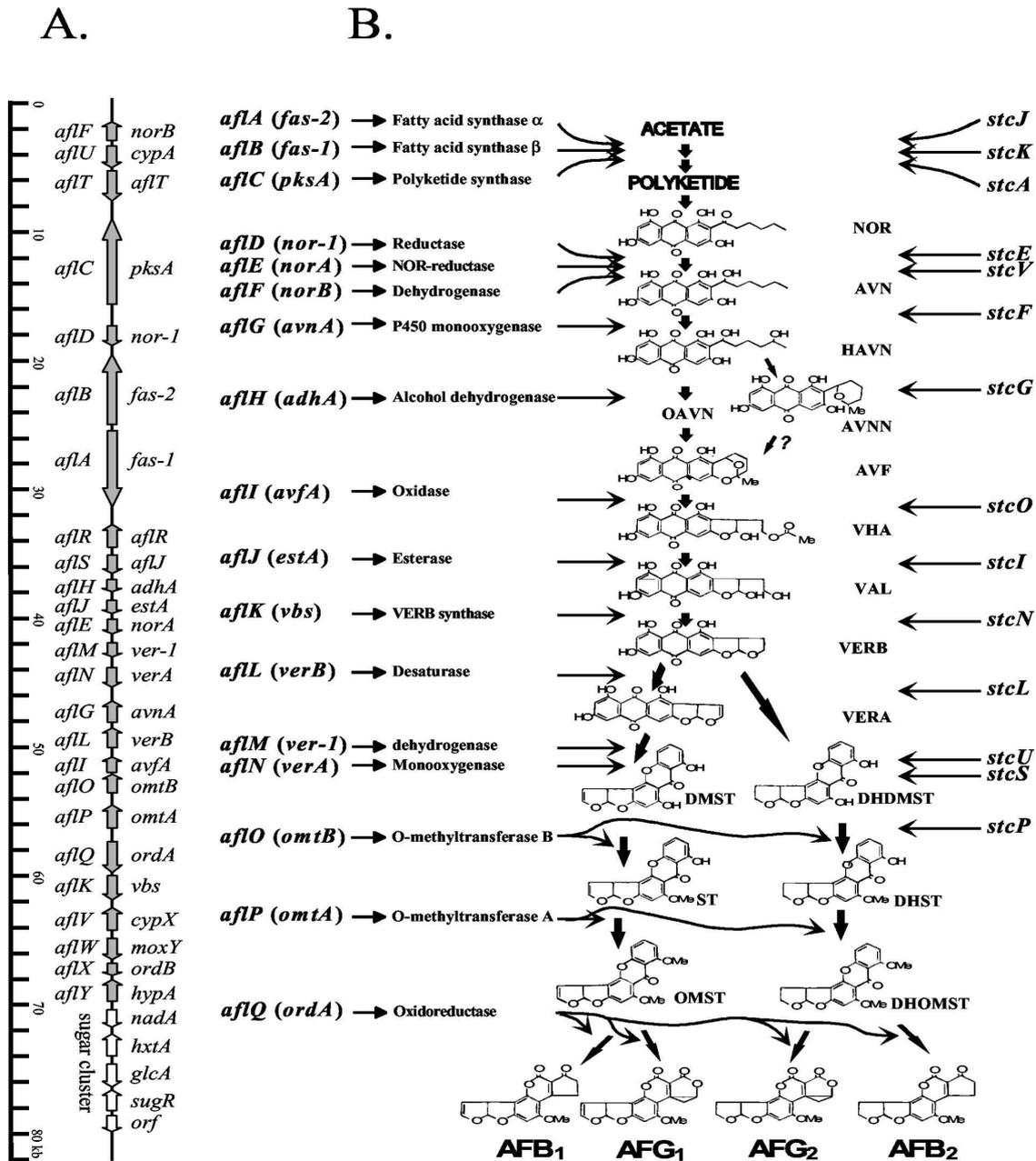
- Yabe, K., Ando, Y., Hashimoto, J. and Hamazaki, T.**, 1988. Biosynthetic Relationship among Aflatoxins B1, B2, G1, G2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (8): 2101 – 2106.
- Yan, P.S., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H. and Yabe K .**, 2004 Cyclo (L-Leucyl – L prolyl) produced by *achromobacter Xyloscoxidans* Inhibits Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (12): 7466 – 7473.
- Yen, I.C. and Bidasee, K.R.**, 1993. Liquid chromatography determination of aflatoxins in animal feeds and feed components. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **76** (2): 366 – 370.
- Yiannikouris, A. and Jouany, J.P.**, 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leur effets chez l’animal INRA – *Production animales* **15** (1) : 3-16
- Yin, Y.N., Yan, L.Y., Jiang, J.H. and Ma, Z.H.**, 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science* **9** (10): 787 – 792
- Yu, J., Chang, P.k., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. and Bennett, J.W.**, 2004. Clustered pathway genes in Aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (3): 1253 – 1262
- Zeringue ,H.J., Shih,B.Y.**, 1998.Extraction and separationof the brightgreenish yellow fluorescent material from aflatoxigenic *Aspergillus* spp . infected cotton Lint by HPLC . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (3) 1071 – 1075
- Zeng, R.S., Luo, S.M., Shi, M.B., Shi, Y.H., Zeng, Q., Tan, H.F.**, 2001. Allelopathy of *Aspergillus japonicus* on crops. *Agronomy journal* **93**: 60 – 64
- Zonno M.C and Vurro, M.**, 1999. Effect of fungal toxins on germination of *striga hermonthica* seeds. *Weed Research (oxford)* **39** (1): 15 – 20
- Zonno M.C., Vurro, M.**, 2002. Inhibition of germination of *Orobanche ramosa* seeds by *Fusarium* toxins. *Phytoparasitica* **30** (5): 519 – 524

Références Website

- 1- (<http://nbc.nim.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode>)
- 2- (<http://www.nal.usda.gov/fsrio/research/fsheets/fsheet01.htm>)
- 3- (<http://www.nri.org/images/foodsafety1.jpg>)Aflatoxin(<http://www.aflatoxin.info/health.asp>)
- 4- [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/H_phomycetes_\(hyaline\)/index.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/H_phomycetes_(hyaline)/index.html)
- 5- [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/flavus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/flavus.html)
- 6- http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus_flavus.htm .

Annexes

NNEXE I



Comparaison du cluster d'aflatoxine (AF) chez *Aspergillus flavus* (A) et celui de stérigmatocystine (ST) chez *Aspergillus nidulans* (B). Les flèches indiquent le sens de transcription du gène. Les gènes homologues entre clusters sont numérotés par le même chiffre. Les étapes de biosynthèse sont schématisées par (C).

Abréviations:

NOR : acide norsolorinique ; AVN: averantine; HAVN: 5'-hydroxyaverantine; OAVN: oxoaverantine; AVNN: averufanine; AVF: averufine; VHA: versiconal hemiacetal acétate; VAL: versiconal; VERB : versicolorine B; VERA : versicolorine A; DMST, dimethylsterigmatocystine; DHDMST: dihydrodimethylsterigmatocystine; ST: stérigmatocystine; DHST : dihydrosterigmatocystine; OMST : O-methylsterigmatocystine; DHOMST : dihydro-O-methylsterigmatocystine;
AFB1, aflatoxine B1; AFB2, aflatoxine B2; AFG1, aflatoxine G1; AFG2, aflatoxine G2.

ANNEXE II

| Pays Denrées alimentaires | Limites AFB1 (μ / kg) | Limites AF (B1 + B2+ G1+G2) (μ / kg) |
|--|--|---|
| Afrique du sud | | |
| Produits d'alimentation humaine | 5 | 10 |
| Algérie | | |
| Produits d'alimentation humaine | 10 | 20 |
| Aliments pour bétail | 20 | |
| Chine | | |
| Mais, Arachides et produits dérivés | 20 | |
| Riz et Huile végétal comestibles | 10 | |
| Céréales, légumineuses et leurs dérivés | 5 | |
| Aliments pour nourrissons | Indétectables | |
| Egypte | | |
| Arachides et céréales | 5 | 10 |
| Mais, et produits dérivés - Aliments pour bétail | 10 | 20 |
| Etats – Unis d Amérique | | |
| Produits d'alimentation humaine sauf lait | | 20 |
| Aliments pour bétail | | 300 |
| Produits dérivés de maïs et d arachides destinés aux animaux reproducteurs | | 100 |
| Produits destinés aux animaux immatures et laitiers | | 20 |
| Fédération de la Russie | | |
| Céréales, légumineuses, oléagineux et leurs dérivés | 5 | |
| Etats membres de l Union Européenne (U E) | | |
| Céréales, légumineuses, oléagineux et leurs dérivés | 2 | 4 |
| Aliments pour bétail et dérivés | 20 | |
| Aliments pour bétail laitier | 5 | |

FAO, 2004

ANNEXE III

Composition des milieux de culture utilisés

Czapek Yeast Extract Agar (CYA)

K₂HPO₄: 1 g
 Czapek concentré : 10ml
 Extrait de levure: 5g
 Saccharose : 30g
 Agar : 15 g
 Eau distillée : 1l

Czapek concentré

NaNO₃: 30g
 KCl : 5g
 MgSO₄, 7H₂O / 0,1g
 Eau/ 100ml

Malt Extract Agar (MEA)

Extrait de malt en poudre : 20g
 Peptone: 1,0g
 Glucose: 20g
 Agar: 20g
 Eau distillée: 1l

Malt Agar (MA)

Extrait de Malt: 20g
 Agar: 20g
 Eau distillée: 1l

Pommes de terre Dextrose Agar (PDA)

Pommes de terre: 200g
 Glucose: 20g
 Agar: 20g

Milieu Yeast Extract Sucrose Agar (YES)

Extrait de levure : 20g
 MgSO₄: 0,5 g
 Sucre: 150g
 Agar: 20 g
 Eau distillée: 1000 ml

Préparation de la solution Tween 80 à 0,05 %

0,125 de la solution Tween 80 (origine) + 249,875ml d'eau distillée, on obtient un volume de 250 ml de la solution Tween 80 à 0,05 %. Autoclaver à 120°C pendant 20 mn

Révélateur de p anisaldehyde

0,5 % p anisaldehyde dans le méthanol / acide acétique / acide sulfurique (17 / 2 / 1 V / V / V)

Aspergillus flavus parasiticus agar (AFPA)

Peptone: 10 g
 Extrait de levure: 20 g
 Citrate d'ammonium ferrique: 0,5 g
 Chloromphénicol: 100mg
 Agar: 15g
 Dichloran: 2mg
 L'eau distillée: 1 l

Milieu (SNA)

KH₂PO₄: 1g
 KNO₃: 1g
 MgSO₄, 7H₂O: 0,5g
 KCl: 0,5g
 Glucose: 0,2g
 Saccharose: 0,2g
 Agar: 15g

Gélose nutritive

Peptone: 5g
 Extrait de viande: 3g
 Agar: 20g
 Eau distillée: 1l

Bouillon nutritif

Peptone: 5g
 Extrait de viande: 3g
 Eau distillée: 1l

Préparation du colorant au bleu de Méthyle pour l'observation microscopique

Bleu de méthyle : 50 mg
 Lactophénol : 100 ml

ANNEXE IV

Analyse statistique

Calcul de r (coefficient de corrélation)

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x-m_x)(y-m_y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x-m_x)^2 \sum_{i=1}^n (y-m_y)^2}}$$

Où m_x et m_y désignent les moyennes observées des x (contaminations) et des y (germination)

$r_o \leq r_t$ \implies La liaison n'est pas significative

$r_o \geq r_t$ \implies La liaison est significative avec

r_t : Coefficient de corrélation tiré de table

r_o : Coefficient de corrélation observé

ANNEXE V

Analyse de variance (STATI TCF)

a) Effet du filtrat de culture sur la germination des grains de quelques plantes (blé dur et lentille)

Tableau ANOVA

| | S.C.E | DDL | Carres moyens | Test F | Proba | E.T | C.V |
|-------------------|---------|-----|------------------|--------|--------|------|-------|
| VAR. Totale | 2460,48 | 15 | 164,03 | | | | |
| VAR. Facteur 1 | 13,91 | 1 | 13,91 | 0,30 | 0,5965 | | |
| VAR. Facteur 2 | 1878,79 | 1 | 1878,79 | 41,16 | 0,0000 | | |
| VAR.INTER F1 .2 | 20,03 | 1 | 20,03 | 0,44 | 0,5264 | | |
| Var. Résiduelle 1 | 547,75 | 12 | 45,65 | | | 6,76 | 14,2% |

Tableau ANOVA

b) Effet herbicide de l'aflatoxine

| | S.C.E | DDL | Carres moyens | Test F | Prob | E.T | C.V |
|-------------------|---------|-----|------------------|-----------|--------|------|-------|
| Var. Totale | 951 ,23 | 7 | 135 ,89 | | | | |
| Var. Facteur 1 | 777 ,36 | 1 | 777,36 | 26,83 | 0,0023 | | |
| Var. Résiduelle 1 | 173 ,89 | 6 | 28,98 | | | 5,38 | 12,2% |

Résumé

Les céréales et les légumineuses alimentaires occupent une place importante en Algérie de part leur diversité ainsi que l'intérêt nutritionnel et agronomique. Aussi comme beaucoup de produits agricoles, ils sont le siège d'une riche mycoflore fongique qui peut se développer aussi bien en plein champ qu'au cours du stockage. L'incidence d'une telle population biologique sur la qualité de conservation de ces produits devient une problématique aussi bien pour leur valeur nutritionnelle que le maintien de leur valeur germinative. Parmi la flore qui se développe, certains champignons tels que *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont des producteurs potentiels de mycotoxines et dont certaines sont très dangereuses pour la santé humaine et / ou animale (Aflatoxine, Ochratoxine, Fumonisine, Trichothécène, Zearalénone etc...). En Algérie, ces substances toxiques ont fait l'objet de peu d'études et de ce fait nos connaissances restent encore très limitées.

L'objectif de ce présent travail est donc d'évaluer la qualité phytosanitaire de semences des céréales et des légumineuses alimentaires quant à leur contamination éventuelle en mycoflore et en mycotoxines. Les résultats de l'analyse de la flore fongique de quelques espèces de céréales (Blé dur, Blé tendre et Orge) et de légumineuses (Fève, Pois chiche et Arachides) ont montré une mycoflore abondante et diversifiée à savoir une mycoflore pathogène, une mycoflore intermédiaire et une mycoflore de stockage. L'inventaire réalisé et le calcul de la fréquence et de l'abondance de chaque agent fongique ont révélé que dans tous lots confondus hormis les arachides, les espèces d'*Alternaria* sont les plus dominants. La présence d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* était importante dans les échantillons d'arachides. La répartition des agents fongiques isolés dans toute les parties de la graine fait apparaître une certaine hétérogénéité de contamination, les taux les plus élevés, se trouvent dans les enveloppes externes et diminuent de plus en plus en allant vers l'intérieur de la graine (embryon). L'analyse statistique de l'effet de la mycoflore sur la germination n'a montré aucune corrélation entre le pourcentage de contamination et celui de la germination, l'impact des agents fongiques sur l'état sanitaire de la graine dépend de leur site d'infection.

Les analyses chimiques concernant les mycotoxines ont montré que parmi ce cortège floristique, seules deux espèces du genre *Aspergillus* isolées des grains d'arachides se sont montrées potentiellement toxigènes à savoir *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Le pouvoir aflatoxinogène des 28 isolats obtenus a été évalué par la CCM et par le spectrophotomètre, les quantités d'aflatoxines varient de 28,58 à 99,83 mg / 50 ml. La purification par CCM et la quantification par HPLC de l'aflatoxine extraite des grains d'arachides a montré que le taux d'aflatoxine dans ces derniers varie de 0,29 à 3,1 ng / g. L'étude sur la phytotoxicité des grains traités par le filtrat de culture a révélé une inhibition significative de la germination des grains de végétaux.

Le test d'aflatoxine comme herbicide naturel a induit un effet inhibiteur des grains des plantes parasites, le taux d'inhibition est proportionnel aux concentrations utilisées.

Mots clés : Semences, mycoflore, mycotoxine, Aflatoxine

Summary

Food cereals and legumes are an important part in Algeria in their diversity as well as agronomic and nutritional value. Also like many agricultural products, they are a very good substrate to a rich fungal mycoflora which can develop both in field and during storage. The impact of such a population on the biological quality of preservation of these products becomes a problem both for their nutritional value as the maintenance of their germination.

Among the fungal flora that grows, some fungi such as *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* are potential producers of mycotoxins and some are very dangerous to human health and / or animal (Aflatoxin, Ochratoxin, Fumonisin, Trichothecenes, Zearalenone etc...). In Algeria, these toxic substances have been few studies and so our knowledge is still very limited.

The aim of this present work is to assess the phytosanitary quality of seed grains and food legumes as to their possible contamination with fungal and mycotoxin.

The results of the analysis of the fungal flora of cereals (durum wheat, soft wheat and barley) and legumes (bean, chick peas and peanuts) reveals an abundant and diverse mycoflora, a fungal pathogen, intermediate mycoflora and storage fungi. The inventory and the calculation of the frequency and abundance of each fungal agent revealed that in all samples analysed except peanuts, *Alternaria* species are most dominant

The presence of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* was significant in samples of peanuts. The distribution of fungal agents isolated in all parts of the seed showed a certain heterogeneity of contamination, the highest rates are found in the external envelope and decrease more and more by going to the inside of the seed (embryo).

Statistical analysis of the effect on fungal germination showed no correlation between the percentage of contamination and the germination, the impact of fungal agents on the health of the seed depends on their site infection.

Chemical analysis on mycotoxins revealed that among the total mycoflora only two species of the genus *Aspergillus* isolated from peanut seeds were shown to potentially toxigenic; *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*.

The aflatoxigenic potential of isolated strain obtained from 28 isolates was assessed by TLC and by the spectrometer, the quantities of aflatoxins varies from 28.58 to 99.83 mg / 50 ml.

Purification by TLC and quantification by HPLC of aflatoxin extracted from peanut kernels showed that the level of aflatoxin in the latter varies from 0.29 to 3.1 ng / g.

The study on the phytotoxicity of grain handled by the culture filtrate registered a significant inhibition of seeds germination of plants.

The test of aflatoxin as a natural herbicide induces an inhibitory effect of *Cuscuta* seeds. The rate of inhibition is proportional to the concentrations used.

Keywords: Seeds, fungal mycoflora, mycotoxin, Aflatoxin

ملخص

الحبوب و البقوليات الغذائية تشكل جزءا هاما في الجزائر من حيث تنوعها وكذلك من حيث القيمة الغذائية و الزراعية. أيضا كمثل الكثير من المنتجات الزراعية تعتبر المكان الجيد لتطور الميكوفلورا في الحقول وفي المخازن والتي تؤثر سلبا على النوعية البيولوجية للمنتجات وبالتالي تخلق مشكلا حقيقيا من حيث القيمة الغذائية والانبات. من بين النباتات الفطرية التي تنمو كالفيزاريوم، البتسيليوم و الأسبارجيلوس منتجو السموم الفطرية والتي يعتبر بعضها خطيرا جدا في الجزائر على صحة الإنسان و الحيوان مثل (Trichothécène ,loneara ,Fumonisine ,Ochratoxine ,Aflatoxine) الدراسات حول هذه المواد السامة قليلة ولا تزال محدودة.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم جودة الصحة النباتية للحبوب و للبقوليات الغذائية من التلوث المحتمل من طرف الفطريات و السموم المفرة منها.

أظهرت نتائج تحليل النباتات الفطرية من بين أصناف الحبوب و البقوليات (القمح القاسي، القمح اللين و الشعير الفول، الحمص و الفول السوداني) على احتوائها على الفطريات بكميات و فيره و متنوعة منها الممرض الفطري، الفطر المتوسطي (في الحقول و في المخازن) و فطر المخازن و كما تبين لنا من خلال عملية الجرد و الحساب ان الفطر الألتغناغية (*Alternaria*) الأكثر وفرة في جميع العينات ما عدا الفول السوداني الذي بدوره يحتوي بكثرة على الاسبرجيلوس فيما يخص نسبة الفطريات، المعزولة من جميع أنحاء البذرة (الغلاف الخارجي، الغلاف الداخلي والرشيم) تنخفض تدريجيا كلما اقتربنا نحو الداخل. أثبتت نتائج الإحصاء أن نسبة التلوث الفطري لا علاقة له مع الإنبات بينما يعتمد على موقع وجود الفطر الذي يؤثر سلبا على صحة البذرة، أما التحليل الكيميائي أظهر لنا من بين الفطريات المعزولة عن وجود فطريين سامين هما :

Aspergillus flavus et A. parasiticus

المعزولين من الفول السوداني وعددهما 28 عزلة والذي تم كشفهما عن طريق جهاز الكروماتوغرافية على الطبقة الرقيقة وكذلك سباكتروفوتومتر (Spectrophotomètre)

كميات الأفلاتوكسين المتحصل عليها تختلف ما بين 28.58 و 99.83ملغ/50مل. أما السم الفطري المتحصل عليه من بذور الفول السوداني يختلف بنسبة 0.29 الى 3.1 ناتوغرام/غرام والذي تم كشفه عن طريق الكروماتوغرافية على الطبقة الرقيقة CMC

HPLC و

أظهرت دراسة علاج البذور برشاحة الاسبرجلوس تثبيط واضح في انبات بذور النباتات. كما أظهر اختبار الأفلاتوكسين المستعمل كمبيد للإعشاب الضارة بأن معدل التثبيط يتناسب مع التركيزات المستعملة.

الكلمات الرئيسية: بذور، الميكوفلورا ، السموم الفطرية، الأفلاتوكسين.