

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Ghardaia



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par: OULAD HADJ YUCEF Zineb

OULAD MIR Halima Saadia

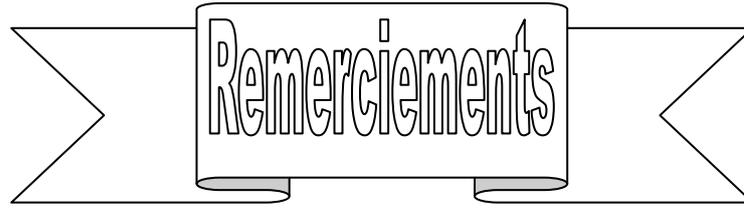
Thème

**Isolement des moisissures à partir de blé dur
(*Triticum durum*) et extraction de leurs mycotoxines**

Soutenu publiquement, le / / , devant le jury composé de

M. IDER Soufiane	Maitre des conférences B	Univ. Ghardaia	Président
M. BELGHIT Saïd	Maitre des conférences A	Univ. Ghardaia	Directeur de mémoire
Mme. MAIDI Lila	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaia	Examineur

Année universitaire: 2021/2022



Remerciements

Nous devons tout d'abord remercier Allah notre créateur, pour le courage et la patience qu'il nous a donnée afin de mener ce projet à terme.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et reconnaissance à l'égard de notre directeur de mémoire M. BELGHIT Saïd pour son aide, sa constante disponibilité et ses précieux conseils.

Nos remerciements sont adressés à nos chères enseignantes, Mme MAIDI Leila et M. IDER Sofiane de l'Université de Ghardaïa, de nous avoir honoré d'examiner ce mémoire.

Nous remercions également tous nos enseignants du département de Biologie de l'Université de Ghardaïa de nous avoir aidés lors de la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à tout l'équipe du laboratoire de mycologie pour leur gentillesse et serviabilité.

Nous remercions finalement toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents : pour leurs amours, leurs encouragements, leurs patiences et leurs conseils

Mon mari : m'avoir soutenu pendant toute cette épreuve, pour son gentillesse, son patience, son encouragement et pour son amour

À ma fille bien-aimée, **Maisson**.

A Mes frères et mes sœurs

A toute ma belle-famille «**OULAD HADJ YUCEF**» et famille «**DJEKAOUA**» et «**HOUTIA**».

A toutes mes amies que j'aime et à tous ceux qui me sont chers.



ZINEB



Dédicace

Au propriétaire d'une biographie parfumée et d'une
pensée éclairée, mon cher père
À qui j'ai veillé la nuit afin d'être inclus dans ses
prières chaque fois et quand ma chère mère

A ceux qui m'ont donné un amour pur et sincère
mes chers frères

A tous mes chers amis

A tous ceux qui m'ont appris tout au long de ma
formation

Jevous dédie cet humble travail



Halima

LISTE DES ABREVIATIONS

AFs	Aflatoxines
Aw	Activité de l'eau
CCM	Chromatographie couche mince.
CMA	Coconut Agar Medium
CPG	la chromatographie gazeuse
CYA	CzapekYeast Agar
g	Gramme
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
mg	Milligramme
PDA	Potatos Dextrose Agar
pH	potential Hydrogène
OTA	Ochratoxine A
Rf	Rapport frontal
SAB	Milieu de culture sabouraud
T°	Température
UV	Ultra-violet

عزل فطريات مجهرية من القمح الصلب (*Triticum durum*) واستخلاص سمومها الفطرية

الملخص

الهدف من دراستنا هو عزل فطريات مجهرية من القمح الصلب ودراسة قدرتها على إنتاج السموم الفطرية. لهذا الغرض، تم جمع بعض عينات من القمح الصلب على مستوى نقاط تجارية مختلفة في منطقة متليلي (إحدى بلديات ولاية غرداية). سمح العزل بطريقة وضع الحبوب مباشرة على الأوساط الزراعية PDA و Sabouraud مضافا إليها الكلورامفينيكول في درجة حرارة 28 °د لمدة 7 أيام بالحصول على 10 عزلات فطرية. بعد الدراسة المرفولوجية والمجهرية لهذه العزلات تبين أنها تنتمي إلى الأجناس الأربعة التالية: *Alternaria* (40%)، *Ulocladium* (30%)، *Aspergillus* (20%) و *Penicillium* (10%).

تم إجراء استخلاص السموم الفطرية باستعمال المحاليل العضوية إنطلاقا من ركيزة القمح ومن خلال كل عزلة فطرية بعد زرعها على الأوساط الصلبة CMA و CYA لمدة 7 أيام ليتم الكشف عنها باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) وتحت الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 365 نانومتر. أظهرت النتائج عدة بقع مفصولة و بعضها مفلورة ولكن للتعرف التقريبي عليها تطلب منا استعمال طريقة الكشف الكيميائي حيث أظهرت النتائج باستعمال نترات الفضة وجود السم الفطري Citrinin على مستوى الركيزة كما أظهرت باستعمال حمض الكبريت إنتاج ال Aflatoxine G1 من طرف *Aspergillus* sp. 1 و Aflatoxine B1 من طرف *Penicillium* sp.1.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب، فطريات مجهرية، السموم الفطرية، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Résumé

L'objectif de notre étude est l'isolement à partir de blé dur des moisissures et étudier leur pouvoir producteur des mycotoxines. Pour cela, nous avons collecté quelques échantillons de blé dur à partir de divers points de commerce à Métlili (une commune de la wilaya de Ghardaïa). L'isolement effectué par la méthode des grains (directe) sur milieu PDA et Sabouraud ajoutés du chloramphénicol, nous a permis d'obtenir 10 isolats fongiques contaminants. Après une identification préliminaire macro et microscopique, ces isolats ont été affiliés aux 4 genres: *Alternaria* (40%), *Ulocladium* (30%), *Aspergillus* (20%) et *Penicillium* (10%). L'extraction des mycotoxines a été effectuée globalement à partir du substrat de blé et à partir de chaque isolat fongique inoculé sur les milieux solides CMA et CYA. La détection a été faite par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et sous lumière UV à 365 nm. Les résultats ont montré plusieurs taches séparées par CCM et fluorées sous UV, cependant leur identification approximative en utilisant des révélations chimiques a révélé en utilisant nitrate d'argent la présence de Citrinin au niveau du substrat de blé et la production de l'Aflatoxine G1 par *Aspergillus* et de l'aflatoxine B1 par *Penicillium* sp.1 après l'utilisation de H₂SO₄.

Mots clés : Blé dur, moisissures, mycotoxines, CCM.

Abstract

The objective of our study is to isolate microscopic fungi from durum wheat and to study their ability of mycotoxin production. For this, we collected some samples of durum wheat from various trade points in Metlili (a town in the wilaya of Ghardaïa). The isolation by the grain method (direct) on PDA and Sabouraud media added chloramphenicol, allowed us to obtain 10 fungal isolates. After preliminary macro and microscopic identification, these isolates were affiliated to the 4 genera: *Alternaria* (40%), *Ulocladium* (30%), *Aspergillus* (20%) and *Penicillium* (10%). The extraction of mycotoxins was carried out globally from the wheat substrate and from each fungal isolate inoculated on CMA and CYA media. Detection was made by Thin Layer Chromatography (TLC) and under UV light at 365 nm. The results showed several spots separated by TLC and fluorinated under UV, however their approximate identification requires chemical revelations which revealed the presence of Citrinin in the substrate and production of Aflatoxin G1 by *Aspergillus* and Aflatoxin B1 by *Penicillium* sp. 1, according to the use of H₂ SO₄.

Key words: durum wheat, microscopic fungi, mycotoxins, TLC.

Table Des Matières

Remerciements	
Dédicace	
Dédicace	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
INTRODUCTION GENERALE.....	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	3
I.-Données générales sur le blé dur	3
1.Histoire du blé	3
2. Définition et origine	3
3. Classification botanique et description morphologique du blé dur	4
3.1. Classification botanique	4
3.2.Description morphologique	4
3.2.1. L'appareil végétatif	4
3.2.1.1.Système aérien.....	4
3.2.1.2. Système racinaire:	5
3.2.2 Appareil reproducteur.....	5
3.2.3.Grain de blé	5
4. Cycle de développement du blé.....	6
A. Période végétative	6
A.1.Phase germination-levée.....	6
A.2. Le tallage	7
B. Période reproductrice.....	7
B.1. Montaison-floraison.....	7
C. Période remplissage et maturité du grain.....	7
C.1.Floraison-maturité.....	7
5. Importance et production du blé.....	8
II.- Les moisissures pathogènes du blé.....	10
1. Morphologie	10
2. Caractères généraux	10
3. Caractères physiologiques	10
4. Classement des moisissures.....	10
5. Conditions de développement des moisissures	10
5.1. Activité en eau (AW)	11

5.2. Température	11
5.3. PH.....	11
5.5. Composition gazeuse.....	11
5.6. Interactions microbiennes.....	11
5.7. Présence d’insectes.....	11
6. Principaux genres fongiques	12
7. Identification des moisissures.....	12
8. Types de moisissures.....	12
8.1. Les moisissures de champ	12
8.2. Les moisissures de stockage	12
III.- Les mycotoxines	13
1. Nature et origine des mycotoxines	13
2. Effets des mycotoxines.....	14
3. Les moisissures mycotoxinogènes	15
3.1. Les Aflatoxines.....	15
3.2. Les Ochratoxines	16
3.3. Les Trichothécènes.....	17
3.4. Les Zéaralénones	17
3.5. Les fumonisines.....	18
4. Méthodes d’analyse des mycotoxines	18
4.1. Généralités.....	18
4.2. Description des méthodes physico-chimiques.....	18
A. Chromatographie sur couche mince	18
B. Chromatographie liquide à haute performance.....	18
C. Chromatographie en phase gazeuse.....	19
4.3. Méthodes immunologiques	19
<i>Chapitre II</i>	20
I. Etude mycologique des grains de blé dur	20
1. Echantillonnage	Erreur ! Signet non défini.
3. Désinfection des grains	20
4. Isolement des champignons mycotoxinogènes à partir des graines de blé dur	21
4.2. Méthode d’isolement indirecte	21
4.3. Méthode d’isolement de filtre en papier stérile.....	23
6. Identification des souches fongiques.....	23
II. Etude mycotoxicologique	24
1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat.....	24

2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation	26
2.1. Préparation et ensemencement des milieux de culture.....	26
2.3. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)	27
3.Révélation Chimiques.....	28
3.1.Révélation des mycotoxines extraites à partir du substrat.....	28
3.2.Révélation des mycotoxines extraites à partir de chaque isolat	29
<i>Chapitre III. Résultats</i>	30
1. Etude mycologique des grains.....	30
1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de blé dur	30
1.2. Identification des souches fongiques isolées	30
1.2.1. Identification macroscopique	30
1.2.2. Identification microscopique	33
2. Etude mycotoxicologique.....	36
2.1. CCM de l'extrait obtenu à partir du substrat	36
2. Révélation Chimiques.....	38
3.1.Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir de l'extrait du	39
substrat	39
3.2.Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir des extraits des.....	40
isolats fongiques.....	40
Discussion	42
Conclusion.....	44
<i>Références Bibliographiques</i>	45
annexe	

LISTE DES FIGURES

N°	TITRE	Page
01	Anatomie du grain de blé tendre. le grain de blé est constitué de trois parties : l'embryon, l'albumen et les couches périphériques	06
02	cycle de développement du blé	08
03	lieux de production, routes d'échanges et d'utilisation du blé dur dans le monde	09
04	aflatoxines et fumonisines : deux familles de mycotoxines aux propriétés très différentes	16
05	Etapes de désinfection des grains de blé dur	20
06	Techniques d'isolement des souches fongiques a partir des grains de blé dur par la méthode directe surPDA	21
07	L'isolement des souches fongiques par la méthode indirecte	22
08	Techniques d'isolement des souches fongiques a partir des grains de blé dur par la méthode indirecte	22
09	Isolement par la méthode de filtre en papier stérile	23
10	Détection des mycotoxines au niveau du substrat a) broyage de blé dur, b) le solvant +le blé dur, c) filtration de mélange, d) étalement de l'extrait, e) découpage de milieu, f) évaporation de l'extrait	25
11	Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide	25
12	Ensemencement du milieu de fermentation	26
13	Extraction des mycotoxines a partir du milieu de fermentation 1) rondelles de gélose +1 ml de méthanol, 2) le mélange est centrifuge,3) filtration de mélange	27
14	Préparation de la plaque CCM	28
15	Révélation Chimiques des mycotoxines	28
16	la flore fongique isolée a partir du blé dur	30
17	chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites a partir de substrat après révélation chimiques (FECL ₃ /AGNO ₃)	39
18	chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines après révélation h ₂ so ₄ (plaque n°3).	40
19	chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines après révélation h ₂ so ₄ (plaque n° : 1, 2 et 4) (résultat négatif)	41

LISTE DES TABLEAUX

N°	TITRE	page
01	Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines.	14
02	Principaux effets de certaines mycotoxine	15
03	structure de L'ochratoxine A	17
04	Couleurs avant et après traitement chimique (tableau de référence)	29
05	Les différents genres fongiques obtenus à partir de blé dur	30
06	caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé dur	31
07	caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé dur	34
08	chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines a partir de substrat	36
09	Les valeurs Rf des spots séparées à partir de l'extrait de substrat	37
10	Chromatographie sur couche mince présentant les spots des taches à partir des extraits des isolats	37
11	Les valeurs Rf des spots séparées à partir des extraits des isolats	38

Introduction



INTRODUCTION GENERALE

D'après les recommandations des nutritionnistes, les céréales doivent constituer la base de la pyramide alimentaire et prendre une part majeure dans les effets de la nourriture sur la santé (**Barronet al, 2012**). Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins (**Djermoun, 2009**). Les céréales constituent de loin la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour la consommation humaine et pour l'alimentation du bétail, le secteur des céréales est d'une importance cruciale pour les disponibilités alimentaires mondiales (**Ben Kaddour, 2014**).

Les blés sont les céréales les plus cultivées à l'échelle mondiale. Ils contribuent pour plus de 20 % de calories et de protéine dans l'alimentation humaine et sont utilisés par plus de 35% de la population du monde répartie dans plus de 40 pays. le blé dur (*Triticum durum*) occupe une place importante surtout dans les régions au climat de type méditerranéen (**Hannachi, 2017**). En Algérie, les produits céréaliers, dont le blé, occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (**Djermoun, 2009**). Le blé dur (*Triticum turgidum* var. durum) est l'espèce la plus cultivée dans le bassin méditerranéen de l'Afrique du Nord, il occupe dans le monde 5 % du total des terres réservées aux blés, avec une production de 38 million métrique de tons en 2014. En Algérie, le blé dur occupe 45% Du sol réservé aux céréales, soit 1,6 Mha, et qui offre une production de 2,5 millions de tonnes (**Kirouani et al., 2019**). Cependant, Les céréales sont les principaux vecteurs de mycotoxines car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Elles peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage). Les moisissures sont capables de produire plusieurs mycotoxines (**Nguyen, 2007**). Elles constituent un agent de détérioration très important. Elles sont omniprésentes dans la nature et possèdent un arsenal enzymatique très varié, ce qui leur permet de croître sur divers substrats. Elles diminuent la qualité technologique (taux du gluten) et sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et animales) réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économiques dus aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés (**Gacem, 2011**).

Parmi les agents pathogènes qui peuvent contaminer les aliments, les champignons mycotoxinogènes constituent un danger réel pour la santé de l'Homme et de l'animal

lorsqu'elles contaminent les différents produits alimentaires. La prolifération fongique et la contamination par les mycotoxines altèrent la qualité marchande des produits alimentaires impliquant d'énormes pertes économiques (**Amani, 2016**). Les mycotoxines les plus couramment rencontrées, et faisant l'objet d'une surveillance régulière, sont les aflatoxines, les ochratoxines. En Algérie, le manque de contrôles sanitaires, le mauvais conditionnement des aliments (lieux de stockage humides, chauds et mal aérés) ainsi que l'absence d'une réglementation stricte augmentent le risque de contamination par ces métabolites (**Guezlane-Tebibel et al., 2016**).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'effectuer un isolement des moisissures à partir de blé dur commercialisé et extraire les mycotoxines produites par ces moisissures.

Notre manuscrit est subdivisé en 4 chapitres :

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à la présentation bibliographique

Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et à la description des méthodes

Les résultats et leurs discussions sont présentés dans le troisième et le quatrième chapitre

Une conclusion générale et les perspectives qui en découlent ainsi que les références bibliographiques clôturent ce manuscrit.

Synthèse
bibliographique

I.-Données générales sur le blé dur

1.Histoire du blé

Le blé est parmi les premières espèces cueillies et cultivées par l'homme au proche Orient, il y a environ 10.000 à 15.000 ans. Des restes de blés, diploïdes et tétraploïdes, ont été découverts sur des sites archéologiques au proche Orient, le blé dur provient des territoires de la Turquie, de la Syrie, de l'Iraq et de l'Iran(**Ben Kaddour, 2014**).

Historiquement la principale zone de culture du blé tétraploïde (*Triticumturgidum*, var. durum L.) est la région du pourtour de la méditerranée qui détient près 80 % des superficies emblavées. La moyenne des superficies emblavées en blé dur, des 10 dernières années, de par le monde, est de 16.9 millions d'hectares ce qui représente 7.6% de la superficie totale réservée à la culture des blés. Le Kazakhstan, le Canada, la Turquie, l'Italie et l'Algérie sont les pays qui représentent plus de 50 % de la superficie mondiale du blé dur (**Hannachi, 2017**) . Ainsi, c'est seulement dans la seconde moitié du XXe siècle qu'il est devenu clair pour la communauté scientifique qu'il n'existait pas d'ancêtres sauvages des blés hexaploïdes et que les blés hexaploïdes cultivés résultaient d'hybridation spontanée entre blés tétraploïdes cultivés et espèces sauvages diploïdes (**Bonjean, 2001**).

2. Définition et origine

Le blé est une monocotylédone de la famille des Poaceae appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscant, le caryopse. Le blé tendre (*Triticumaestivum*) et le blé dur (*Triticumdurum*) sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde (**Debiton, 2010**).

La détermination de l'origine de chacun des génomes du blé est difficile du fait de l'évolution des espèces. Les connaissances actuelles concernant l'origine des génomes du blé ont été acquisesgrâces à des études cytologiques. Mais le développement des outils moléculaires a permis d'affineret de compléter ces connaissances (**Ben Kaddour,2014**) .

Les primo-agriculteurs sélectionnent, en vue d'une culture plus productive, des blés et orges à grains plus gros, à épis plus riches en grains, moins égrenables et à tallage plus intense et mieux synchronisé, ce qui conduit à la formation d'épis plus nombreux et mieux groupés dans le temps, donc aisément récoltables. Actuellement, les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticumaestivum*) et le blé dur (*Triticumdurum*) qui semble être l'espèce la plus ancienne(**Attab, 2014**).

3. Classification botanique et description morphologique du blé dur

3.1. Classification botanique

Le blé dur est une plante herbacée, appartenant au groupe des céréales à paille. Il est une monocotylédone classée de la manière suivante (Naville, 2005 ; BenKaddour, 2014). appelé aussi céréale à paille appartient à la famille des Graminées, genre Triticum. Cette famille comprend 600 genres et plus de 5000 espèces (Ben Kaddour, 2014).

Le blé appartient à la classification suivante (Attab, 2014) :

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Cypéales
Famille	Poacées
Tribu	Triticées
Genre	Triticum

3.2. Description morphologique

3.2.1. L'appareil végétatif

Le blé se présente d'abord comme une plante herbacée, dont l'appareil végétatif se caractérise par un :

3.2.1.1. Système aérien

La tige creuse ou chaume, dont les entre-nœuds ne se sont allongés qu'à la montaison, port des feuilles engainantes à nervures parallèles, issues chacune d'un nœud. Comme chez toute les graminées, la présence et la forme des oreillettes ou stipules et de la ligule, au point d'insertion de la feuille autour de la gaine, permet de déterminer l'espèce de la plante examinée avant l'apparition de l'épi (Soltner, 2012).

Comme pour d'autres poacées, les feuilles de blé dur se composent d'une gaine entourant la tige, d'un limbe qui s'aligne avec les nervures parallèles et d'une extrémité pointue. Au point d'attache de la gaine de la feuille se trouve une membrane mince et transparente (ligule) et deux petits appendices latéraux ou oreillettes. La tige principale et chacun des brins portent une inflorescence en épi terminal (Hadjout, 2013).

3.2.1.2. Système racinaire : L'épi de blé :

L'appareil végétatif du blé comprend en partie souterraine un système racinaire fasciculé assez développé. L'épillet se compose d'un ensemble de 3 ou 4 fleurs à l'intérieur de deux glumes (**Attab, 2014**).

Un système primaire (racines séminales) : ce système de racines fonctionne de la germination à la ramification de la plante c'est-à-dire au tallage. Ces racines sont d'origines embryonnaires cependant associés dans le grain aux différentes parties de l'embryon ce sont :

- ✓ - une racine principale résultant de l'allongement de la radicule.
- ✓ - deux paires de racines latérales.
- ✓ - une racine épiblastique.

Système secondaire (racines adventives) : c'est un système de racines coronaires ou système de racines de tallage. Il se forme dès le tallage et se substitue parallèlement au système séminal (**Ben Kaddour, 2014**).

3.2.2 Appareil reproducteur

Le rachis, ou axe de L'épi, port de 15 à 25 épillet constitués chacun de 3 à 4 fleurs la disposition de celles-ci fait ressortir une caractéristique d'une grande importance, c'est-à-dire que la fécondation a lieu à l'intérieur des glumelles, avant que les étamines n'apparaissent à l'extérieur de ce fait, la conservation de la pureté variétale sera parfaite d'une génération à l'autre, puisque le croisement accidentel par le pollen d'autres variétés est quasi impossible (**Soltner, 2012**).

3.2.3. Grain de blé

Le grain de blé est un fruit sec indéhiscent (caryopse) constitué d'une unique graine intimement soudée à l'enveloppe qui la contient. De la surface externe vers le centre du grain, on distingue l'enveloppe du fruit ou péricarpe, puis l'enveloppe de la graine, ou testa, et enfin à l'intérieur de la graine, l'épiderme du nucelle, l'albumen et le germe (Figure 1) le germe est riche en lipides et contient des vitamines B et des minéraux (**Barronet al., 2012**).

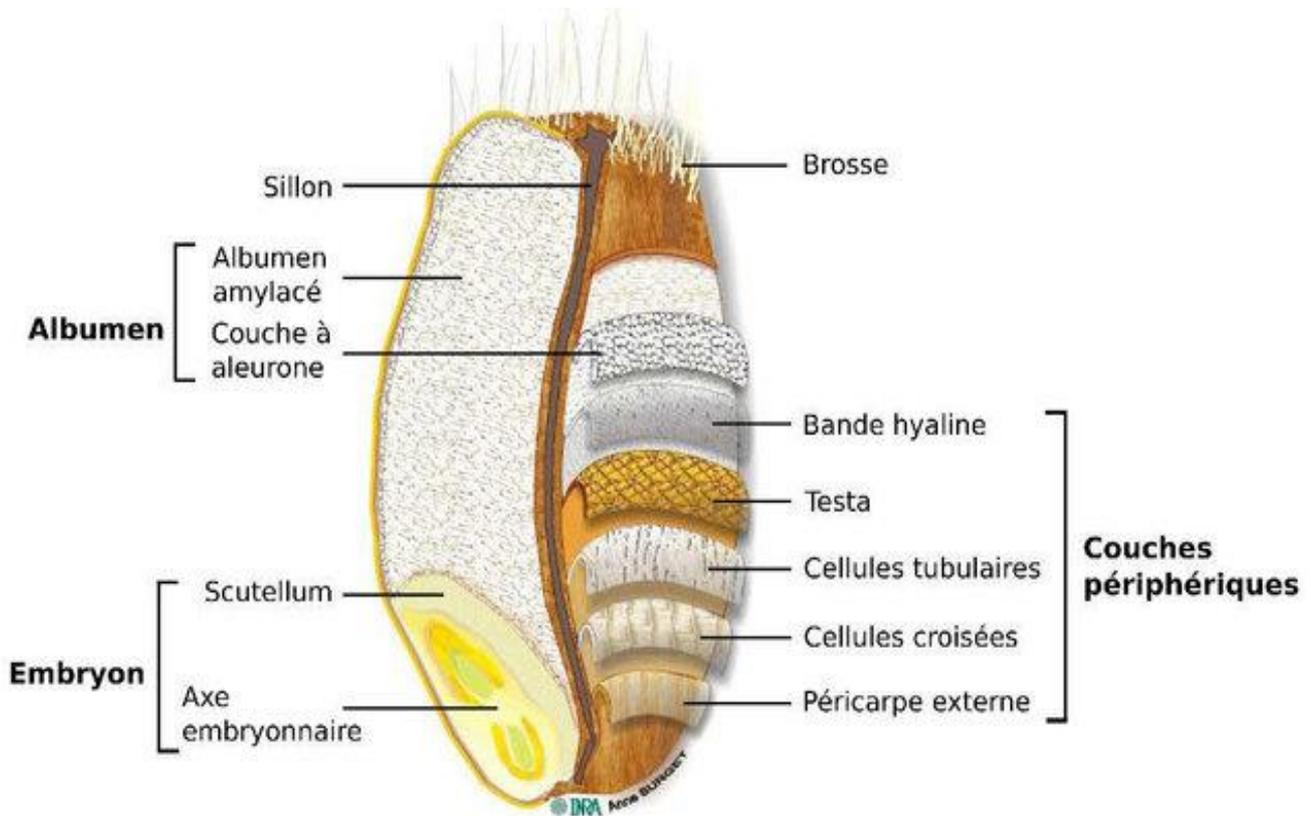


Figure1: Anatomie du grain de blé tendre. Le grain de blé est constitué de trois parties : l'embryon, l'albumen et les couches périphériques (**Bonnot, 2016**).

4. Cycle de développement du blé

- Dans ce cycle annuel, une série d'étapes séparées par des stades repères, permettent de diviser en deux périodes la vie des céréales :

- la Période végétative : durant laquelle la plante ne différencie que feuilles et des racines ; la période reproductrice : dominée par l'apparition de l'épi et la formation du grain (**Soltner, 2012**).

A. Période végétative

A.1.Phase germination-levée

Cette phase correspond à la mise en place du nombre de pieds/m². Le sol est percé par le 6 coléoptile qui est un étui protecteur de la première feuille. La levée est notée quand 50% des plantes sont sorties de la terre. Pendant cette phase, les jeunes plantes sont sensibles au manque d'eau qui provoque une perte des plantes et au froid qui provoque le déchaussage (**Salmi, 2015**).

A.2. Le tallage

Le début du tallage est marqué par l'apparition de l'extrémité de la première feuille de la talle latérale primaire. Il est caractérisé par trois caractéristiques :

- Formation du plateau de tallage,
- Emission des talles,
- Sortie de nouvelles racines.

L'importance du tallage dépendra de la variété, de la densité de semis, de la densité d'adventices et de la nutrition azotée. Le tallage marque la fin de la période végétative et le début de la phase reproductive, conditionnée par la photopériode et la vernalisation qui autorisent l'élongation des entre-nœuds (**Ait-Slimane-Ait-Kaki, 2008**).

B. Période reproductrice

B.1. Montaison-floraison

La montaison est des phases les plus critiques du développement du blé. Les stress hydrique ou thermique au cours de cette phase affectent le nombre d'épis montants par unité de surface. La phase de montaison se termine une fois l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la feuille étendard qui gonfle, ce qui correspond au stage gonflement (**Ouanzar, 2012**).

C. Période remplissage et maturité du grain

C.1. Floraison-maturité

La période floraison-maturité correspond à l'accumulation des hydrates de carbone et de l'azote dans le grain. Cette période correspond à la formation des 8 dernières composantes constitutives du rendement qui est le poids de 1000 grains. Le remplissage du grain, après la floraison, se fait de deux façons :

- ✓ Par la migration d'une partie des réserves de la tige.
- ✓ Par la photosynthèse des parties de la plante encore vertes (feuilles, épis, barbes).

Les fortes températures au cours de cette période provoquent l'arrêt de la migration des réserves des feuilles et de la tige vers le grain (échaudage du grain). Puis suit le dessèchement du grain, pour atteindre son poids sec final (**Salmi, 2015**).

- Le blé dur, essentiellement cultivé dans les zones chaudes et sèches du globe (le Sud de l'Europe et le Nord de l'Afrique), est une céréale très riche en gluten utilisée pour produire les semoules et les pâtes (**Attab, 2014**).

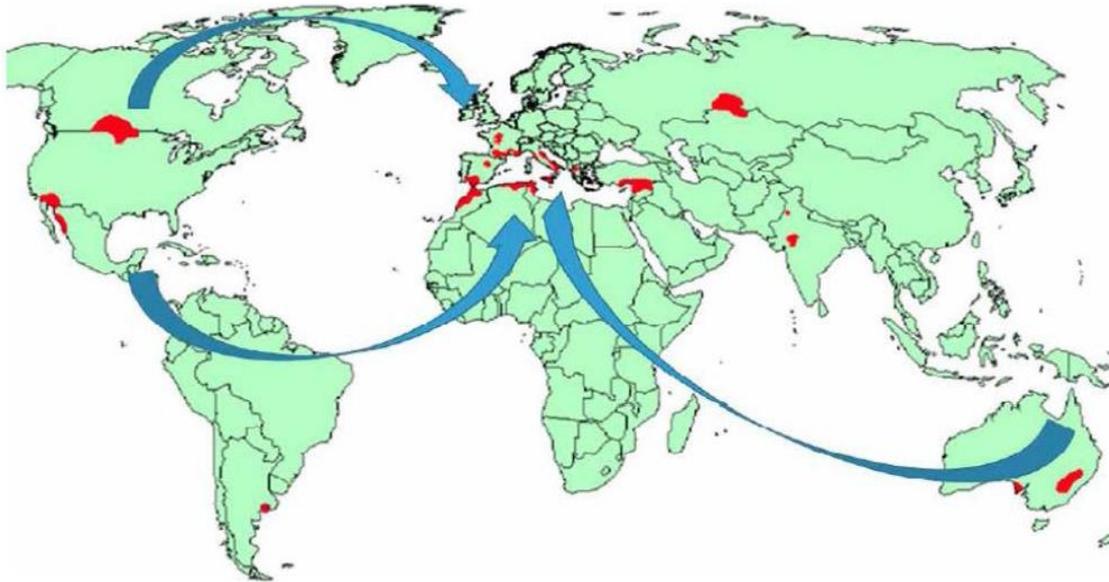


Figure 3:Lieux de production, routes d'échanges et d'utilisation du blé dur dans le monde(**Hannachi, 2017**).

Le blé dur, produit traditionnel ancré dans la tradition avec la semoule, le couscous et les pâtes alimentaires, a longtemps constitué la base de ce régime alimentaire unique au monde, reconnu par l'UNESCO comme patrimoine culturel immatériel de l'humanité, en 2013. Or, le blé dur est de plus en plus concurrencé par le blé tendre (pain). Le blé est l'une des grandes plantes nourricières de l'humanité et sa production a accompagné la croissance démographique, avec un triplement entre 1961 et 2014. Le blé dur, avec environ 6 % de la production mondiale de blés, figure loin derrière le blé tendre. Selon le Conseil International des céréales, la production de blé dur atteint en moyenne 38 millions de tonnes par an, (**Abecassis et al., 2014**).

Le blé dur demeure la base de l'alimentation en Algérie (semoule, principalement, et pâtes). On observe cependant une progression rapide du blé tendre (pain, biscuiterie, pâtisserie) avec l'occidentalisation du modèle de consommation. L'orge et le maïs sont destinés principalement à l'alimentation animale. Les disponibilités en céréales (ou consommation apparente théorique) s'élevaient en 2009 à 230 kg par habitant en Algérie (87% en blé) contre 206 en Tunisie et 175 au Maroc (**Rastoinet al., 2014**).

II.- Les moisissures pathogènes du blé

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques mais aussi né fastes pour l'homme. Ils sont ubiquitaires les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (Nguyen, 2007).

1. Morphologie

- Elles sont multicellulaires mais la nation de cellule est assez floue car leur structure est mycélienne et coenocytique.
- La paroi est riche en cellulose ou en chitine.
- Le corps ou thalle d'une moisissure est fait de 2 parties.
- Le mycélium et les spores, le mycélium est un ensemble de plusieurs filaments appelés hyphes (Ait Abdelouahb, 2007).

2. Caractères généraux

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

3. Caractères physiologiques

Ce sont des eucaryotes, non photosynthétiques, hétérotrophes et immobiles sur milieu a pH acide (pH compris entre 3 et 7) Elles sont mésophiles Elles sont à l'origine d'altérations superficielles, (Ait Abdelouahab, 2007).

4. Classement des moisissures

La classification de **Kwon Chung et Bennett (1992)** modifiée par de **Hoog et Guarro (1995)** est la plus utilisée actuellement : le règne des champignons est divisé en quatre « phylum » ou embranchements: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, et Basidiomycota

5. Conditions de développement des moisissures

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes : elles peuvent se développer seulement si le milieu lui permet de phagocyter les substances nutritives complexes du milieu : la moisissure est obligée les transformer préalablement en molécules simple absorbables ceci est rendu possible grâce à des dépolymérisés qui sont excrétées dans

l'environnement. Sous leurs actions les polymères complexes sont transformés en molécules simple (monosaccharides, acides gras, acides aminés) (Tabuc, 2007).

5.1. Activité en eau (AW)

La plupart des moisissures préfèrent une aw entre 0.85 et 0.99 pour leur développement. l'aw minimale permettant le développement de la plupart des champignons contaminant les céréales est de 0.7 (Nguyen, 2007).

5.2. Température

Les moisissures peuvent se développer entre 0°C et 35°C, certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporiumherbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *A.fumigatus* jusqu' 60°C (Nguyen, 2007).

5.3. PH

Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH : elles se développent normalement pour de pH compris entre 3 et 8, leur croissance étant normalement optimale entre 5 et 6. En raison de leur acidité (ph < 6) de nombreux aliments (Tabuc, 2007).

5.4. Lumière

La lumière favorise la maturation des conidies et germination des spores. Les moisissures sont. Généralement. Indifférents à l'action de lumière (Tabuc, 2007).

5.5. Composition gazeuse

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

5.6. Interactions microbiennes

La compétition pour les nutriments et l'espace est un phénomène rencontre fréquemment dans le monde vivant. La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu détermine des interactions entre les différentes espèces les conditions environnementales peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser les autres (Tabuc, 2007).

5.7. Présence d'insectes

Les insectes représentent les principaux vecteurs de spores de moisissure de champet dans les lieux de stockage. Les insectes en dégradant la paroi des grains favorisent la contamination. Par les moisissures et la production des mycotoxines. (Tabuc, 2007).

6. Principaux genres fongiques

Les études mycologiques sur les céréales sèches révèlent souvent des quantités importants de moisissures de champ particulièrement des espèces d'*alterneraï* et *fusarium*. Ainsi que les mycètes xérophiles capables de provoquer la détérioration du substrat (Nguyen, 2007).

- Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus* le *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments on les retrouve principalement dans les céréales (Tabuc, 2007).

7. Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturaux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification (Tabuc, 2007). Il existe maintenant des critères moléculaires qui permettent une identification précise des espèces, les loci les plus souvent testés sont les ADN codant pour les différentes fractions des ARN ribosomiaux (Boudih, 2011).

8. Types de moisissures

8.1. Les moisissures de champ

Les principaux genres sont : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* et *Fusarium*. Ces moisissures peuvent survivre pendant des années dans la graine sèche. Parmi les quatre genres, la toxicité du *Fusarium* spp présente un grand risque pour la santé humaine et animale. Les espèces de ce genre contaminent diverses cultures, principalement le maïs, le blé, le mil et le sorgho, ainsi que des plantes ligneuses. Le genre *Fusarium* est considéré comme "champignon des champs", qui secrète sa toxine lorsque les conditions lui deviennent favorables (Sara, 2016).

8.2. Les moisissures de stockage

Les champignons de stockage (par exemple les *Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage, (Atoui, 2006). Les moisissures xérotolérantes ou «de stockage», les plus redoutables font partie des *Aspergillus* spp. et les *Penicillium* spp. (Nadjetet al., 2016).

III.- Les mycotoxines

1. Nature et origine des mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. Les mycotoxines sont considérées parmi les contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique et l'économie de nombreux pays (Aman, 2016).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits principalement par des champignons filamenteux qui, lorsqu'ils sont consommés, provoquent des réponses pathologiques chez les hôtes animaux ou les consommateurs. Définies fonctionnellement plutôt que structurellement, les mycotoxines dérivent de nombreuses voies métaboliques primaires. Par des associations opportunistes ou mutualistes, les insectes herbivores infligent des dégâts qui peuvent prédisposer les plantes à l'infection par des phytopathogènes producteurs de mycotoxines, entraînant une contamination économiquement importante (Berenbaum *et al.*, 2021).

Les mycotoxines peuvent être classées en polycétoacides, terpènes, cyclopeptides et métabolites azotés selon leur origine biologique et leur structure. On peut aussi classer les mycotoxines plus simplement selon leurs principaux effets toxiques. On distingue parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire les aflatoxines, les ochratoxines et en particulier l'ochratoxine A, la patuline, les fumonisines, la zéaralène et les trichothécènes et tout spécialement le déoxynivalénol. Il convient de remarquer que dans un groupe structural de toxines, la toxicité peut varier considérablement d'une toxine à une autre et que le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même, mais peut aussi provenir de ses métabolites (Afssa, 2009). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Ruppel *et al.*, 2004).

Tableau1 : Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines (Atoui, 2006).

Mycotoxines	Moisissure
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus parasiticus, A. flavus</i>
Citrinine	<i>P. cltrinum, Monascusruber</i>
Déoxynivalénol(DON),Nivalenol Fusarenone, Toxine T2	<i>F. tricinctum, Fusarium sp</i>
Fumonisines	<i>F. monoliforme, F. proliferatum, Fusarium. sp</i>
Monolifirmine	<i>F. proliferum, F. subglutinans</i>
Ochratoxines A, B, C	<i>A. Ochraceus, A. carbonariu</i> <i>Penicillium verrucosum, P. nordicum</i>
Patuline	<i>P. ochraceus, P. cyclopium, P. puberulum</i>
Stérigmatocystine	<i>A .nidulans, A. versicolor</i>
Zéaralénone	<i>Fusarium roseum, Fusarium sp</i>

2. Effets des mycotoxines

Les propriétés chimiques et biologiques des mycotoxines sont diverses et leurs effets toxiques sont extrêmement variables. Ces effets concernent en général la carcérogénicité, la génotoxicité, la tératogénicité, la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité et l'immunotoxicité Les mycotoxines sont des métabolites capables de provoquer chez l'homme des syndromes spécifiques. Non seulement les mycotoxines sont dangereuses pour la santé du consommateur, mais elles altèrent aussi la qualité marchande des produits contaminés entraînant ainsi de fortes pertes économiques (Zinedine, 2007)

Les effets chroniques (exposition répétée à de faibles voire très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence de ces toxines. Les effets toxiques sont de nature variée (tableau 2). Certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes (Afssa, 2009).

Tableau2 : Principaux effets de certaines mycotoxines (Brochard *et al.*, 2009).

Mycotoxines	Effets avérés ou suspectés
Aflatoxines	Hépatotoxique - Mutagène - Cancérogène – Immunotoxique
Ochratoxine A	Néphrotoxique - Cancérogène – Mutagène
Fumonisine B1	Neurotoxique - Hépatotoxique - Immunotoxique– Cancérogène
Trichothécènes	Hématotoxique - Immunotoxique - Toxicité cutanée
Zéaralénone	Gestrogénique - Effets sur la fertilité et la reproduction
Patuline	Neurotoxique - Mutagène (in vitro)
Citrinine	Néphrotoxique
Stérigmatocystine	Hépatotoxique – Cancérogène

3. Les moisissures mycotoxinogènes

La mycotoxinogénèse est un phénomène d'une grande complexité, c'est l'ensemble des conditions nécessaires au processus de synthèse et de sécrétion des mycotoxines fongiques dans l'environnement, la croissance fongique et la production des mycotoxines sont intimement liées, une moisissure toxigène peut synthétiser différentes mycotoxines, et un type de mycotoxine peut être produit par plusieurs moisissures. Bien que toutes les mycotoxines soient d'origine fongique, tous les composés toxiques produits par les champignons ne sont pas appelés mycotoxines (Rkiba, 2020).

3.1. Les Aflatoxines

Les aflatoxines sont produites par les champignons *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* que l'on retrouve, entre autres, dans les pays d'Afrique sub-saharienne au climat tropical. Les aflatoxines posent des problèmes de sécurité sanitaire des aliments pour de nombreux pays. Ils affectent les produits agricoles, en particulier les céréales et sont nocifs pour l'homme (Hanviet *al.*, 2021).

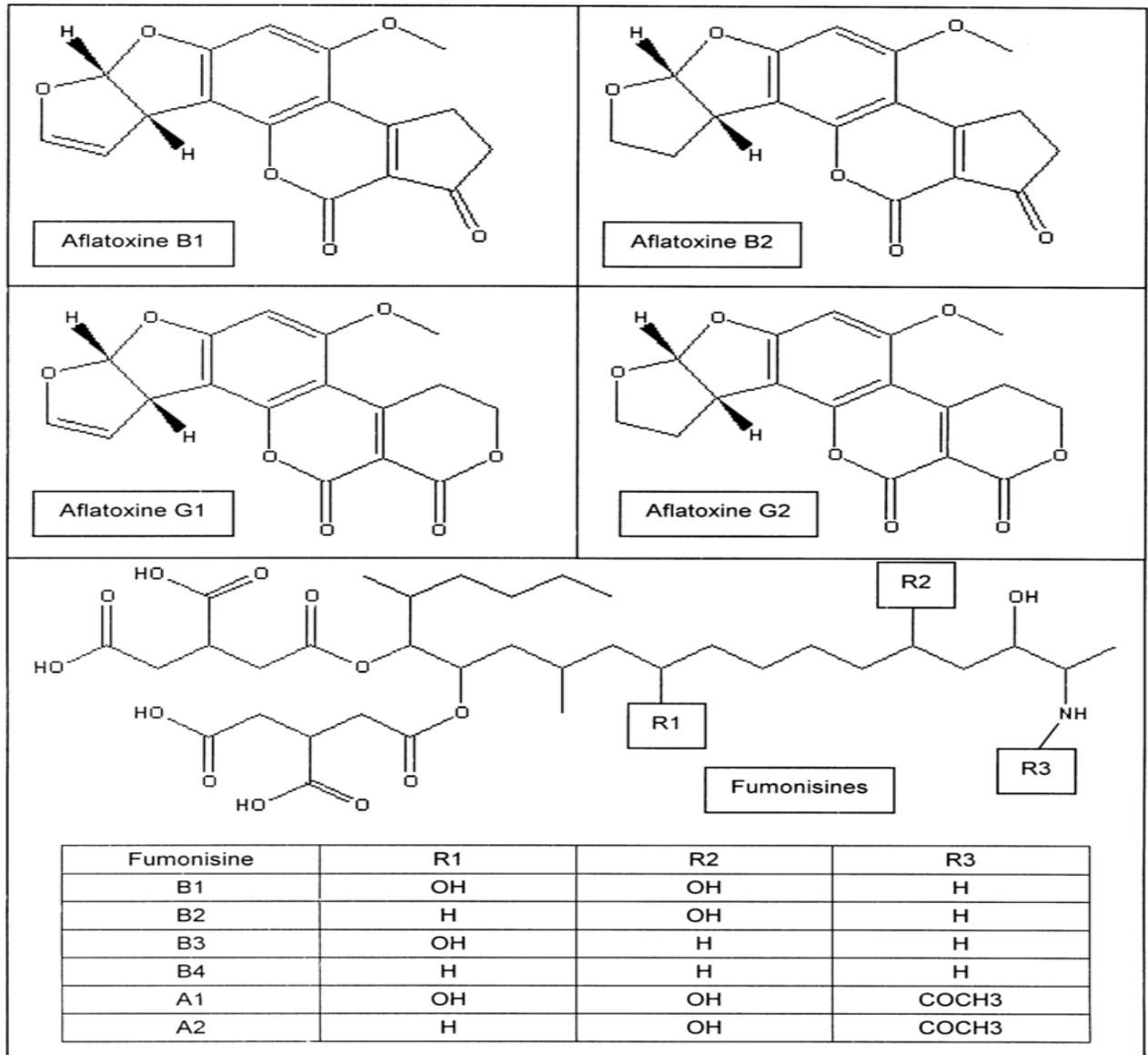


Figure4 : Aflatoxines et fumonisines : deux familles de mycotoxines aux propriétés très différentes (Guerre *et al.*, 2000) .

3.2. Les Ochratoxines

Ochratoxine A (OTA) : métabolite secondaire de champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* peuvent contaminer principalement les aliments à base de céréales. Le traitement thermique (y compris la cuisson) peut réduire les niveaux d'OTA, mais peut également produire des mélanges racémiques avec l'isomère 2'R-ochratoxine A (2'R-OTA) (Bryła, 2021) .La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important. L'ochratoxine A ou OTA (Tableau3) est produite par des espèces d'*Aspergillus* (*A. ochraceus*) et de *Penicillium* (*P.verrucosum*, *P. viridicatum*) ce qui en fait un contaminant pouvant être produit dans des

conditions assez variables. En effet, la température optimale de production de l'OTA par l'*Aspergillus ochraceus* est de 28 °C, cette production étant fortement réduite à 15 °C ou 37 °C. Au contraire, *Penicillium viridicatum* se développe et peut produire de l'OTA dans une gamme de températures qui varie de 4 à 30 °C. Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillium*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillus* qui la synthétisent (Lucienne *et al.*, 2021).

Tableau3: structure de L'ochratoxine A(Lucienneetal., 2021).

Masse moléculaire	Formule brute	
403,8 g/mol	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	

3.3. Les Trichothécènes

Les trichothécènes constituent une grande famille de mycotoxines qui comprend plus de 160 molécules. Cette famille est caractérisée par une structure sesquiterpénoïde constituée par un squelette tricyclique nommé trichothécane, lequel est formé par un cyclopentane, un cyclohexane et un cycle à six chaînons oxygénés (Boulal *et al.*, 2020).

3.4. Les Zéaralénones

La zéaralénone est la principale mycotoxine produite par *Fusarium graminearum*. Il résiste à la plupart des traitements opérés lors de la fabrication des aliments. Lorsqu'il est administré par voie orale, il est bien absorbé et peut atteindre les cellules intracellulaires. Cibles cellulaires. Son métabolisme est complexe, dominé par des réactions de conjugations considérées comme voies de détoxification et réactions de réductions qui correspondent à une activation biologique (Gaumy *et al.*, 2001).

3.5. Les fumonisines

Les fumonisines sont des métabolites secondaires produits dans les céréales par des champignons pathogènes, à savoir *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* et espèces apparentées. De plus, *Aspergillus nigri* produit également les fumonisines dans les plantes cultivées d'arachide, de maïs et de raisin (Kamle., 2019).

4. Méthodes d'analyse des mycotoxines

4.1. Généralités

Les mycotoxines étant présentes à l'état de traces dans les aliments et matières premières étudiés, il est indispensable d'avoir recours à des méthodes d'analyse extrêmement performantes. Qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, ces méthodes reposent le plus souvent sur le principe de séparation chromatographique, couplée à des procédés de détection comme la fluorimétrie, la spectrophotométrie ou la radiodétection. Les méthodes physico-chimiques comme la « chromatographie sur couche mince » (CCM), la « chromatographie liquide à haute performance » (HPLC) et la « chromatographie liquide en phase gazeuse » (CLPG) permettent la quantification des composés. Des méthodes plus récentes et plus rapides sont fondées sur des principes immunochimiques comme le test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Gauthier, 2016).

4.2. Description des méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie gazeuse (CPG) ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettent la quantification des mycotoxines (Dragaccietal., 2005).

A. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) a beaucoup été utilisée initialement pour doser les mycotoxines. Aujourd'hui, les analyses sont réalisées avec des instruments beaucoup plus performants afin d'améliorer la détection, la sensibilité, la spécificité et la répétabilité. Ces outils sont également utilisés pour automatiser les analyses, ce qui permet un gain de temps considérable. Cependant, les étapes de préparation des échantillons ne peuvent être automatisées, ce qui limite le gain de temps global (Heit, 2015).

B. Chromatographie liquide à haute performance

Pour obtenir des profils spectraux à partir de mélanges moléculaires ou d'échantillons isolés par chromatographie, des détecteurs à barrette de diodes (également appelés détecteurs DAD ou plus précisément détecteurs HPLC à barrette de photodiodes [PDA]) sont utilisés. Un détecteur HPLC PDA est combiné avec un système de séparation élue par poids moléculaire,

hydrophobicité (phase inverse) ou charge ionique, ce qui les rend importants pour HPLC. Détecteurs PDA utilisés pour analyser les molécules dans différentes conditions telles que des solides ou des solutions statiques, ou dans une cellule à écoulement, il fournit une analyse spectrale à faible bruit (Singhetal., 2020).

C. Chromatographie en phase gazeuse

La CPG s'applique aux composés gazeux. Le mélange à étudier est vaporisé à l'entrée d'une colonne contenant la phase stationnaire (liquide ou solide). Il est ensuite transporté à travers cette colonne à l'aide d'un gaz vecteur (phase mobile). Les différents composés du mélange vont se séparer et sortir de la colonne, les uns après les autres, suivant leur affinité avec la phase stationnaire. La CPG est peu utilisée car elle impose de volatiliser la molécule à analyser. Cependant, elle présente l'avantage d'être aisément associée à la spectrométrie de masse, qui facilite l'identification de la molécule (Gauthier, 2016).

4.3. Méthodes immunologiques

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

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. Etude mycologique des grains de blé dur

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de mycologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre à l'université de Ghardaïa.

1. Echantillonnage

La collection des échantillons de blé dur a été effectuée au niveau des points de commerce situés à la commune de Metlili, Wilaya de Ghardaïa. Par la suite, les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier stériles où ils sont soumis à des analyses microbiologiques et mycotoxiques.

2. Milieux de culture

Deux milieux de culture (composition en annexe) ont été utilisés pour l'isolement des moisissures à partir des grains de blé dur. Il s'agit des milieux PDA et Sabouraud. Après leurs préparations et stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, ces milieux ont été refroidis à 45 °C et coulés dans des boîtes de Pétri stériles. Le chloramphénicol est ajouté après sa filtration à 0,22 µm.

3. Désinfection des grains

Les grains de chaque échantillon de blé ont été désinfectés en surface dans l'eau de javel (5%) puis dans l'éthanol, pendant une minute. Après deux rinçages à l'eau distillée stérile, les grains ont été séchés avec du papier filtre stérile pour être, ensuite, ensemencés.

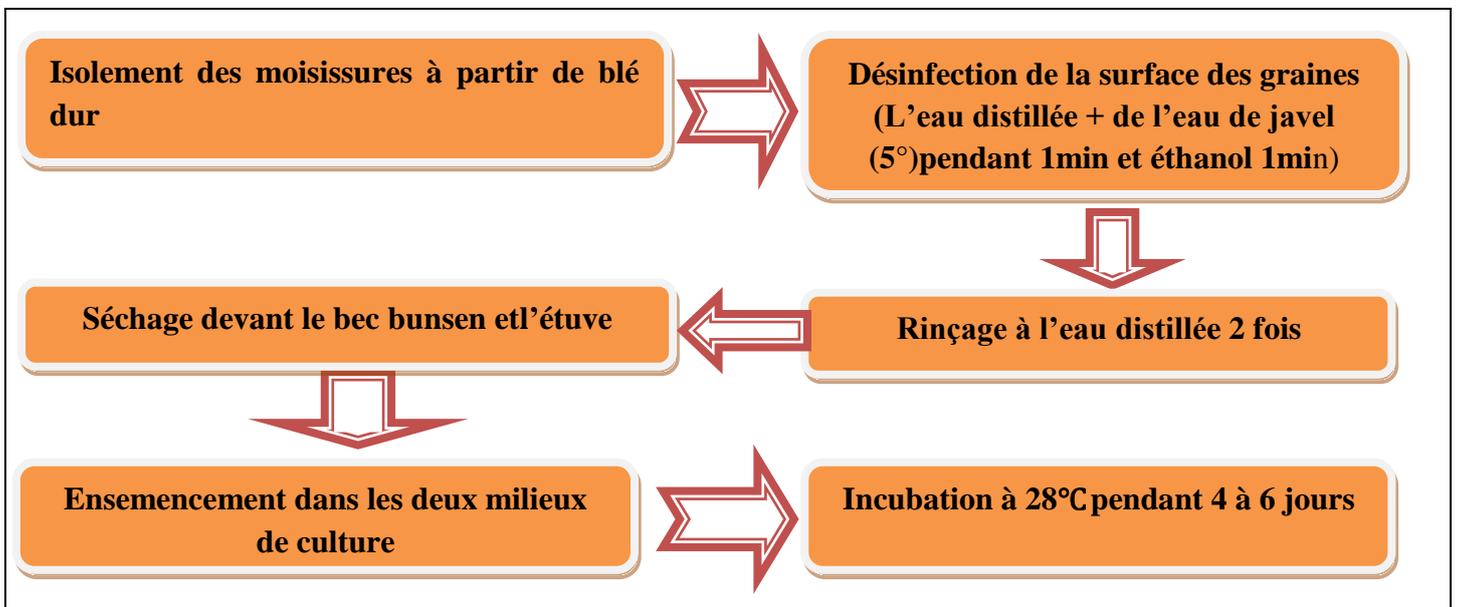


Figure 5 : Etapes de désinfection des grains de blé dur.

4. Isolement des champignons mycotoxinogènes à partir des grains de blé dur

Pour isoler la mycoflore des échantillons de blé dur considérés, nous avons utilisé Trois méthodes :

4.1. Méthode d'isolement directe

Cette méthode consiste à ensemercer les grains de blé directement sur milieux d'isolement solides PDA et SAB, (3 boîtes pour chaque milieu), à l'aide d'une pince stérile et à raison de 5 grains par boîte après désinfection superficielle. Après l'ensemencement ces boîtes sont incubées à 28°C pendant 4 à 6 jours à l'obscurité(Figure6) jusqu'à apparition des moisissures.

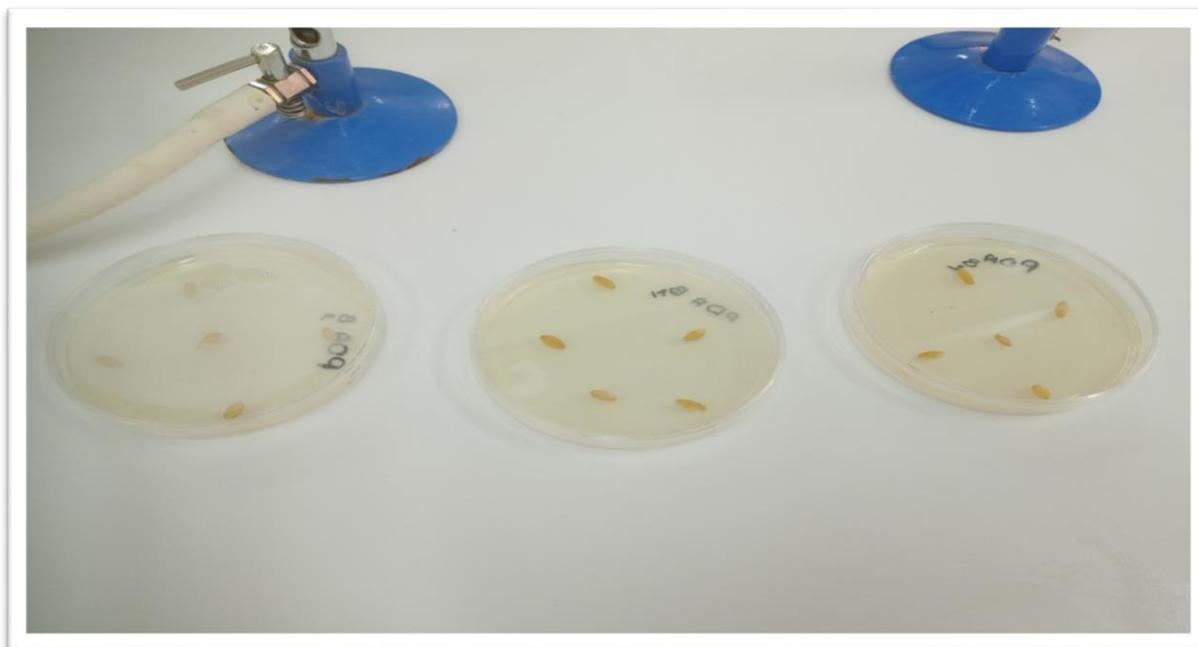


Figure 6 : Techniques d'isolement des souches fongiques à partir des grains de blé dur par la méthode directe sur PDA.

4.2. Méthode d'isolement indirecte

Autrement dite méthode de suspensions-dilutions. Elle consiste à préparer une solution mère à partir de chaque échantillon de blé. 1g de grains broyés aseptiquement a été additionné à 9ml d'eau physiologique contenu dans un tube à essai, ce qui correspond à la solution mère (dilution 1/10). A partir de cette solution, des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution-3 ; 100 μ L ont été prises de chaque dilution à l'aide d'une micropipette puis étalés dans des boîtes de Petri contenant les milieux PDA et SAB (2 répétitions) (Figure7 et 8). Après l'ensemencement, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 4 à 6 jours à l'obscurité jusqu'à apparition des champignons. Le développement bactérien a été inhibé par l'adjonction du chloramphénicol.

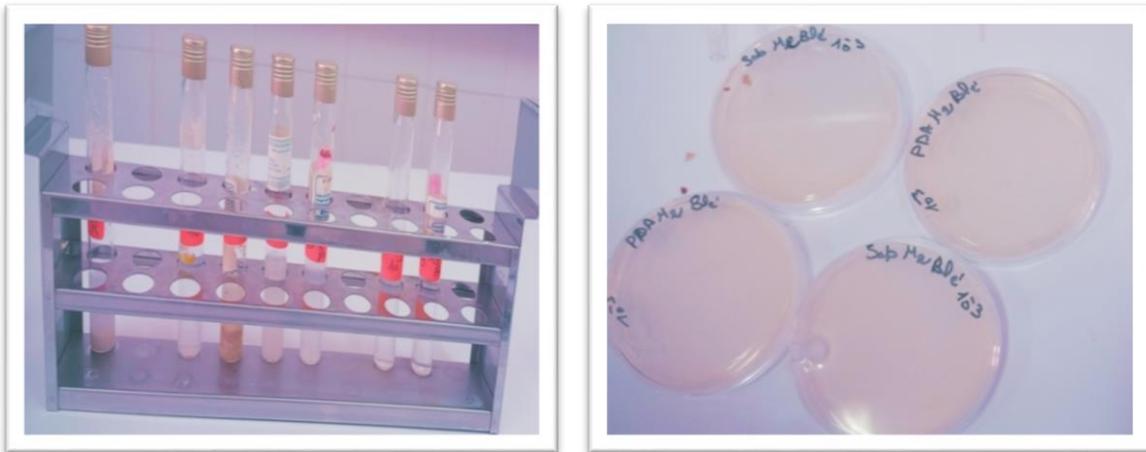


Figure 7 :L'isolement des souches fongiques par la méthode indirecte.

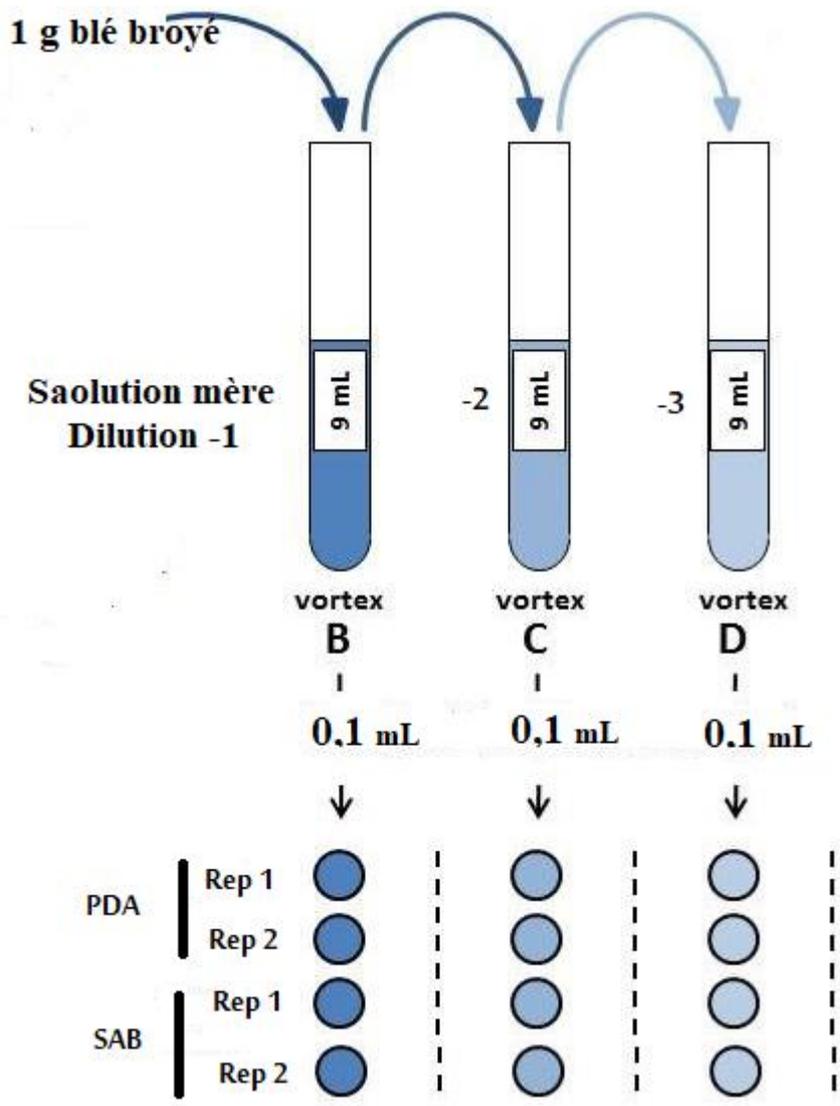


Figure8 : Techniques d'isolement des souches fongiques à partir des grains de blé dur par la méthode indirecte.

4.3. Méthode d'isolement de filtre en papier stérile

Cinq (5) grains de blé sélectionnés au hasard de chaque échantillon ont été mises dans une boîte de Pétri stériles contenant du papier filtre stérile, imbibé avec l'eau physiologique stérile (3 répétitions) (Figure 9).

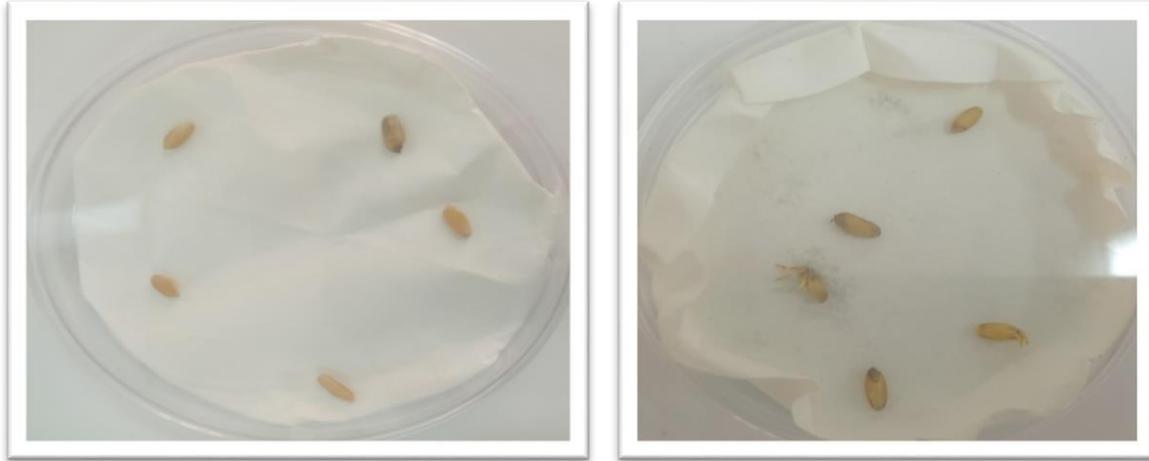


Figure 9 : Isolement par la méthode de filtre en papier stérile

5. Purification des isolats

La purification est réalisée par le transfert des colonies développées sur des boîtes contenant le milieu de culture PDA (chaque colonie récupérée dans une boîte). Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte ; puis incubé à 28°C pendant 6 jours.

6. Identification des souches fongiques

L'identification des champignons contaminants les grains de blé dur repose sur

6.1. Identification macroscopique

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques a porté sur tous les groupes de moisissures isolées. Les caractéristiques étudiées sont:

- ✓ Au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle, la couleur du revers de la colonie et la vitesse de croissance apicale
- ✓ Au niveau des spores: la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible et les exsudats (**Djossou, 2011**).
- ✓ L'identification se fait à l'œil nu puis en utilisant une binoculaire

6.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes. Les caractères microscopiques ont été observés par le prélèvement d'un fragment mycélien à l'aide

d'une anse de platine stérile. Le fragment a été dilacéré sur une lame portant une goutte d'eau, puis le tout a été recouvert d'une lamelle. L'observation a été faite avec le microscope optique-LCD numérique. La méthode microscopique du mycélium utilisée est basée sur l'absence ou la présence de cloisons, la couleur des filaments mycéliens, le mode de ramification des cloisons et la différenciation des thallospores (Houansouet *et al.*, 2020).

II. Etude mycotoxique

1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat

25 g de l'échantillon de blé dur finement broyé ont été additionnés à 50 ml d'un mélange de solvants (acétate de éthyle – méthanol V/V). Le mélange a été agité pendant 10 min et la phase liquide a été séparée du culot par filtration. Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant au liquide récupéré à chaque fois après filtration.

Le filtrat a été ensuite concentré jusqu'à un volume de 2 à 3 ml par évaporation au rotavapor. L'extrait obtenu a été étalé sur un gel d'agar à 2 % et à pH 7 coulé préalablement sur boîtes de pétri puis solidifié. Les boîtes ont été laissées entrouvertes afin de permettre l'évaporation du solvant d'extraction, puis elles ont été gardées à 4°C pendant 24 heures. Après la diffusion des mycotoxines à l'intérieur de la gélose, la surface a été essuyée à plusieurs reprises avec du papier filtre imbibé d'hexane pour éliminer les macromolécules de la matière organique. Le gel d'Agar a été ensuite découpé en petits carreaux et mélangé avec 100 ml de acétate de éthyle. Le tout a été agité pendant 10 minutes puis filtré. Le liquide obtenu a été ensuite additionné à 50 et 30 ml d'acétate d'éthyle et agité à chaque fois qu'il est récupéré après filtration. Les filtrats obtenus ont été également mélangés puis concentrés à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml (Zuber *et al.*, 1987).

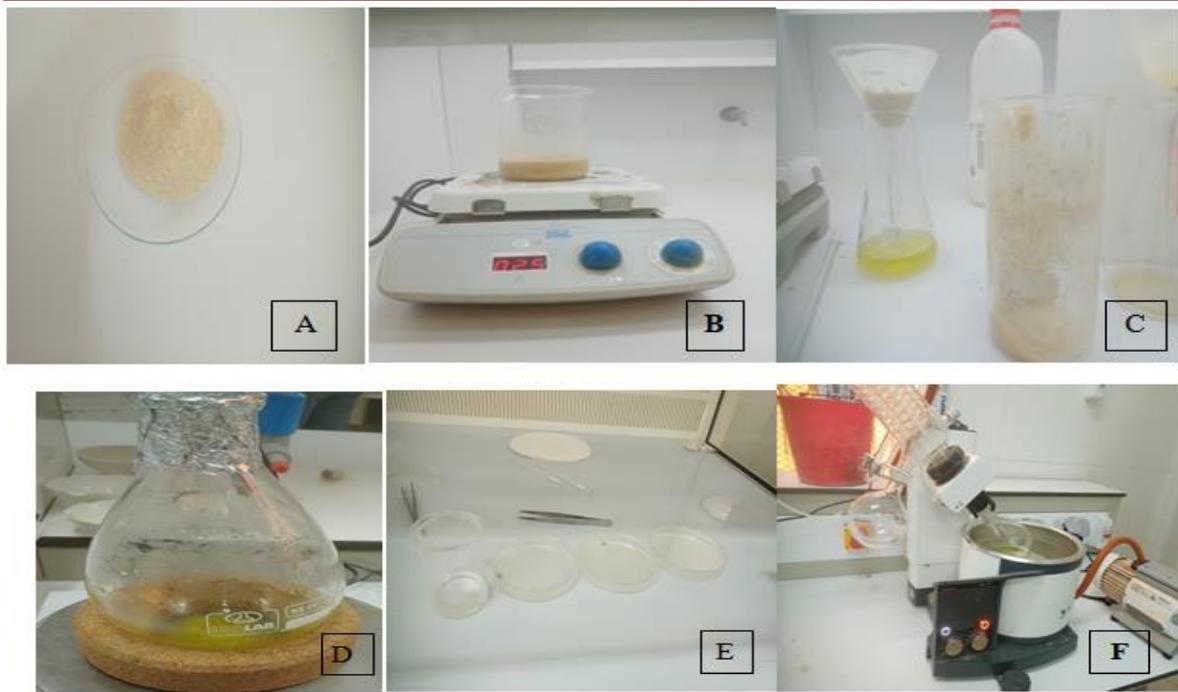


Figure10 : Détection des mycotoxines au niveau du substrat A) broyage de blé dur, B) le solvant+le blé dur, C) filtration de mélange, D) étalement de l'extrait, E) découpage de milieu,F) évaporation de l'extrait.

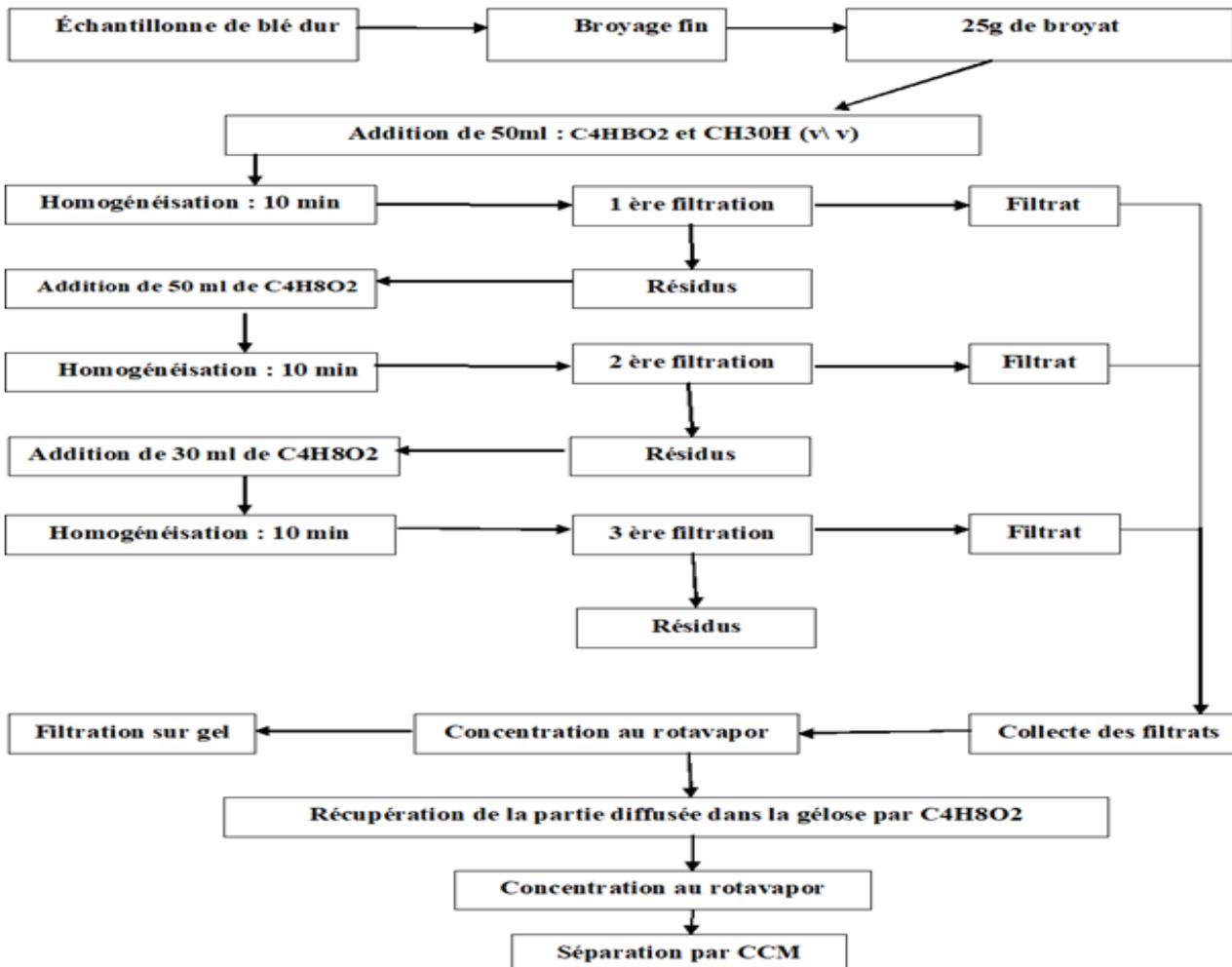


Figure11 : Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat (Zuber *et al.*, 1987).

2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation

La Production de mycotoxines a été effectuée à partir des isolats fongiques sur milieux de culture solides. La fermentation a été suivie par extraction en utilisant des solvants organiques puis séparation des extraits obtenus par chromatographie sur couche mince CCM.

2.1. Préparation et ensemencement des milieux de culture

Deux milieux de culture ont été choisis pour la production des mycotoxines. Il s'agit des milieux CYA (Czapek Yeast Agar) et CAM (Coconut Agar Medium). Ils ont été choisis pour leur pouvoir à favoriser la production des mycotoxines notamment les aflatoxines et les ochratoxines. Les milieux sont préparés, stérilisés puis coulés dans des boîtes de Petri.

L'ensemencement des souches fongiques sur CAM et CYA est fait par point centrale (une souche par boîte). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours (Figure 12).

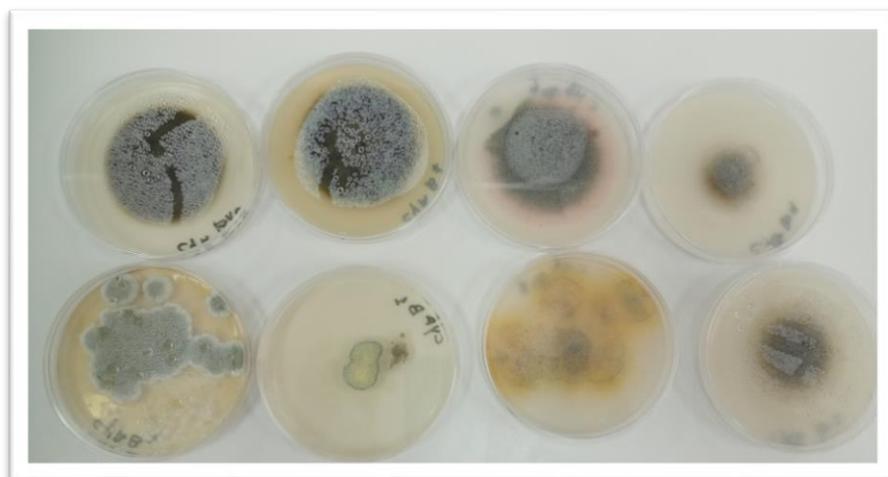


Figure 12 : Ensemencement du milieu de fermentation.

2.2. Extraction des mycotoxines

En vue d'une confirmation de la production des mycotoxines par CCM, les cultures des isolats sur milieu CAM et CYA ont subi une extraction au méthanol selon la méthode décrite par **Calvo et al. (2004)**.

- ✓ A près 7 jours d' incubation, quatre rondelles (6mm de diamètre) de milieu colonisé par le mycélium sont découpée à l'aide d' un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de pétrie, les carottes découpes sont introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml :
- ✓ l'extraction des mycotoxines est réalisée par addition de 1 ml de méthanol, tout en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction.
- ✓ après incubation pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/minutes puis le surnageant

est aspiré à l'aide d'une micropipette puis injecté dans un autre tube Eppendorf, le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et à une température de +4°C pour une analyse ultérieure.



Figure13 : Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation

1) rondelles de gélose +1 ml de méthanol, 2) le mélange est centrifugé,3) filtration de mélange.

2.3. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines. Elle a été faite sur une plaque de gel de silice sur laquelle est déposé un spot de 10 à 15µL de chaque extrait concentré.

L'utilisation de deux systèmes de solvants d'éluion pour le développement de CCM :

- ✓ Le 1er système est constitué par le chloroforme et l'acétone (90/10) v/v.
- ✓ le 2ème système composé par (toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (50/40/10 v/v/v).

Les plaques ont été ensuite placées dans les deux cuves contenant les systèmes d'éluion. Après migration et évaporation du produit d'éluion à sec, la plaque a été examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques (Figure 14). (**Elsaadani, 2019**).

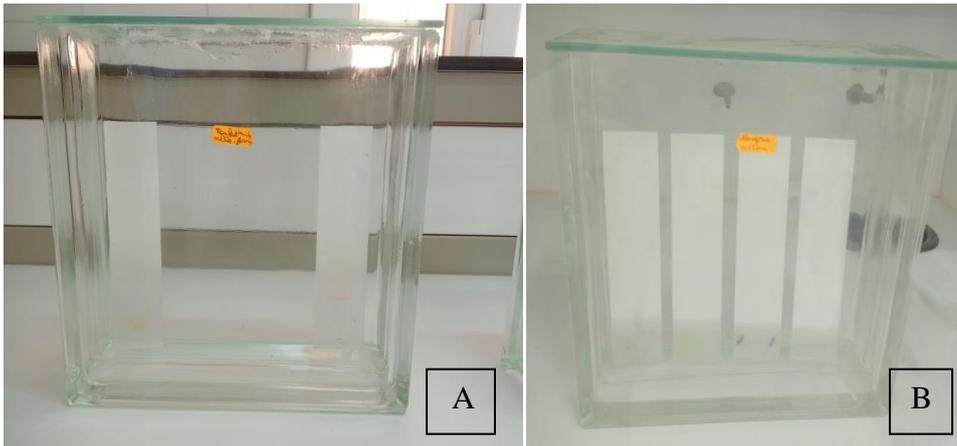


Figure14 : Préparation de la plaque CCM

A) CCM d'extrait de substrat, B) CCM d'extrait de chaque isolat après fermentation.

3. Révélation Chimiques

3.1. Révélation des mycotoxines extraites à partir du substrat

A. En utilisant $FeCl_3$

Préparer 1g de $FeCl_3$ dissous dans 100ml d'eau distillée, agiter pendant 10 minutes. pulvériser de la solution sur les plaques CCM, lire directement le résultat sous radiation UV à une longueur d'onde de 365 nm.

B. En utilisant $AgNO_3$

Préparer 1 g de mélange de nitrate d'argent($AgNO_3$) avec 100 ml d'eau distillée et agiter pendant 10 minutes. Pulvériser ensuite sur les plaques CCM, lire directement le résultat sous radiation UV à une longueur d'onde 365 nm (Scott *et al.*, 1970).

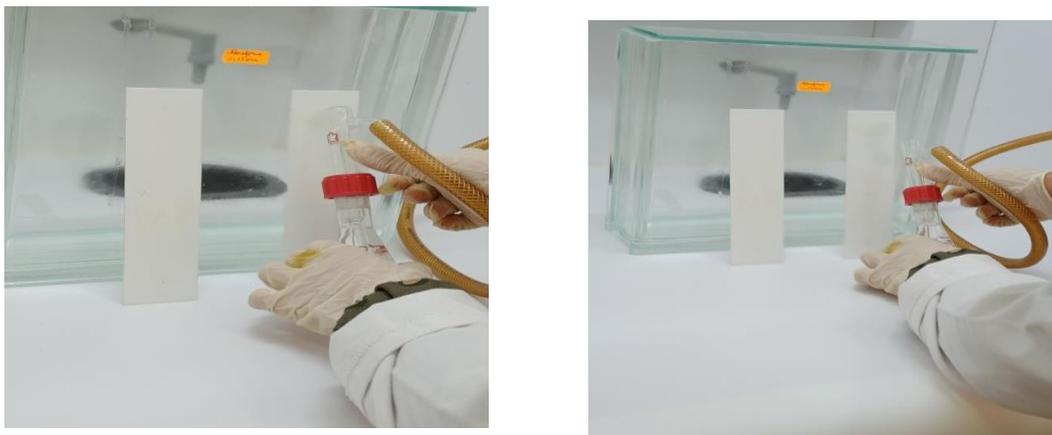


Figure15 : Révélation Chimiques des mycotoxines

3.2. Révélation des mycotoxines extraites à partir de chaque isolat

A. En Utilisant H₂SO₄

Préparer 10ml d'acide sulfurique H₂SO₄, puis ajouter 40ml de méthanol, pulvériser la solution sur plaques CCM, puis mettre la plaque en four Pasteur à 110 °C, pendant 10 minutes, puis lire directement le résultat sous UV à une longueur d'onde de 365 nm (Bilan, 2015).

Tableau 04 : Couleurs avant et après traitement chimique (tableau de référence), (Bilan, 2015 ; Scoot, 1970).

Mycotoxines	Fluorescence à 365 nm	Réactifs de couleur Sous UV
		H ₂ SO ₄
Aspertoxine	jaune clair	vert- jaune
Ochratoxine B	Blue	sans couleur
Acide sécalonique D	Foncé	brun clair
8 α -(3-méthylbutyryloxy)- 4 β , 15-diacétoxyscirp- -9-èn-3 α -ol	---	grisplomb
Aflatoxine G1	Verte	vert gris
Aflatoxine B1	Bleue	green-grey
6 β -Hydroxyroscnonolactone	---	rouge-orange
Ochratoxine A	Vert	sans couleur
Acide cyclopiazonique	Foncé	rouge-marron
Zéralénone	bleu pale	jaune clair
Stérigmatocystine	orange	vert gris

Mycotoxines	Lumière visible	FeCl ₃ ou AgNO ₃ (lumière visible)
Citrinin	Jaune	Orange gris

Chapitre III. Résultats
et discussion

1. Etude mycologique des grains

1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de blé dur

Après 6 jours de l'incubation, nous avons pu déterminer la croissance de 10 isolats fongiques au total répartis selon les méthodes d'isolement comme suit : 7 isolats obtenus par la méthode directe, 3 isolats par la méthode indirecte des suspensions-dilutions et aucun isolat n'a été enregistré par la méthode de filtre en papier stérile. La répartition selon les milieux d'isolement a montré la croissance de 6 isolats sur le milieu PDA, tandis que 4 isolats ont cru sur milieu Sabouraud.

Après une reconnaissance primaire des isolats nous avons pu affilier : 4 isolats au genre *Alternaria*, 3 isolats au genre *Ulocladium*, 2 isolats au genre *Aspergillus* et un isolat au genre *Penicillium* (tableau 5 et figure 16).

Tableau5 : Les différents genres fongiques obtenus à partir de blé dur

Genres	Pourcentage
<i>Alternaria</i> sp.	40%
<i>Ulocladium</i> sp.	30%
<i>Aspergillus</i> sp.	20%
<i>Penicillium</i> sp.	10%

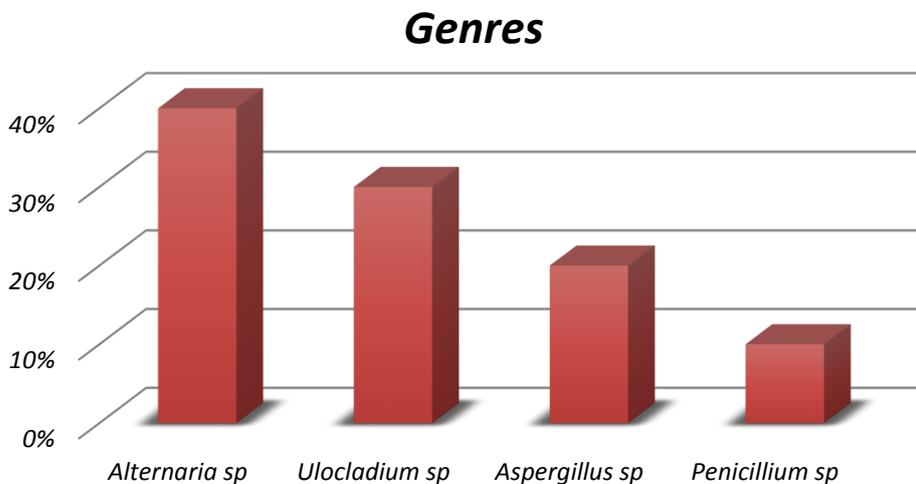


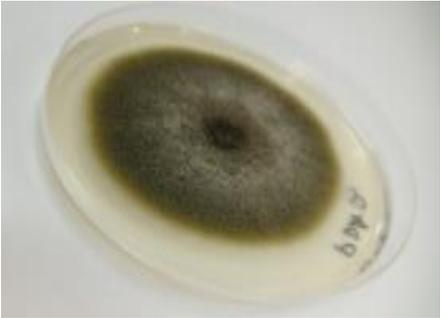
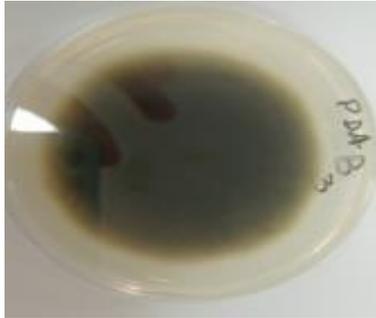
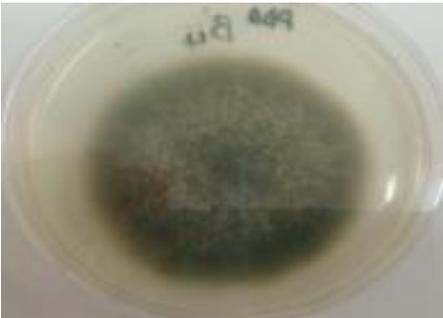
Figure16 : La flore fongique isolée à partir du blé dur.

1.2. Identification des souches fongiques isolées

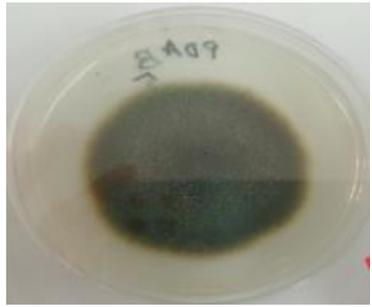
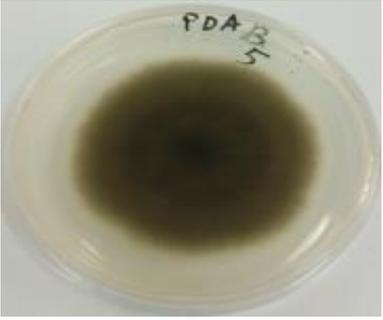
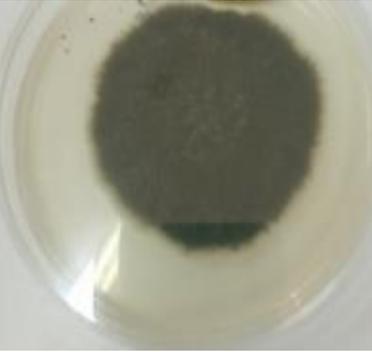
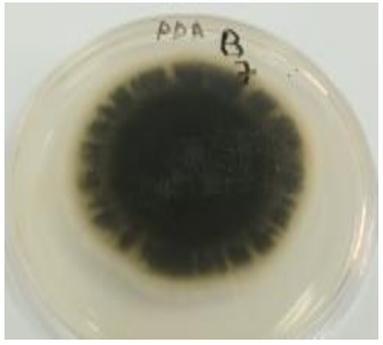
1.2.1. Identification macroscopique

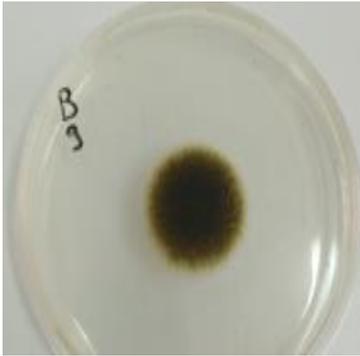
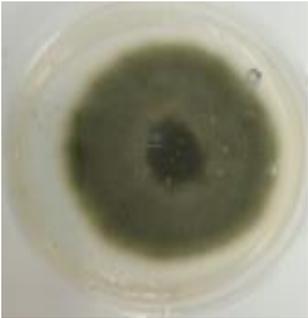
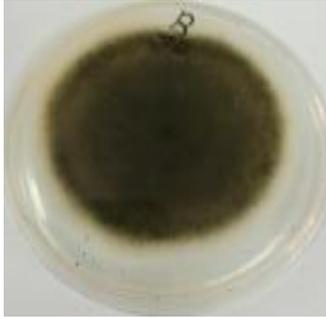
L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation des caractères culturaux à l'œil nu et à l'aide d'une loupe binoculaire. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau(06)

Tableau6 : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé dur

Aspect macroscopique des isolats		Aspect macroscopique
Surface (recto de la boîte)	Revers (verso de la boîte)	
		<p>Recto : couleur Jaune verdâtre</p> <p>Verso: couleur jaune</p> <p>Aspect: velouté</p> <p>Croissance lente</p>
		<p>Recto : couleur verte bleuâtre</p> <p>Verso : jaune pale</p> <p>Aspect :texture poudreuse</p> <p>Croissance lente</p>
		<p>Recto : couleur noir puis gris clair</p> <p>Verso : noir foncé</p> <p>Aspect: Croissance rapide</p>
		<p>Recto : couleur noir grisâtre puis gris clair</p> <p>Verso : brun noirâtre</p> <p>Aspect: texture poudreuse</p> <p>Croissance rapide</p>

Chapitre III: Résultats et discussion

		<p>Recto : couleur noir Verso : noir puis gris clair Aspect: texture poudreuse Croissance rapide</p>
		<p>Recto : noir puis gris blanchâtre Verso : noir puis brun Aspect: laineuses Croissance rapide</p>
		<p>Recto : couleur noir Verso : noir puis gris clair Aspect: texture poudreuse Croissance rapide</p>
		<p>Recto : couleur vert puis jaune clair puis blanche Verso : couleur jaune Aspect: texture poudreuse Croissance rapide</p>

		<p>Recto :gris foncé puis noir</p> <p>Verso : noir puis gris foncé</p> <p>Aspect: texture poudreuse</p> <p>Croissance rapide</p>
		<p>Recto : noir puis noir grisâtre puis gris</p> <p>Verso : noir puis gris</p> <p>Aspect: texture poudreuse</p> <p>Croissance rapide</p>

1.2.2. Identification microscopique

L'étude microscopique a été effectuée à l'aide un microscope optique-LCD numérique. Parmi les isolas observés 4 ont présenté les caractéristiques micro-morphologiques suivantes :

- ✓ Des conidiophores sont solitaires ou formant de petits groupes, simples ou ramifiés
- ✓ Les conidies se forment en longueur, souvent branchées en chaîne jusqu'à 10 conidies par chaîne elles sont septées avec cloisons transversales et longitudinales

Ces isolats semblent appartenir au genre *Alternaria* (Larone, 1987)

- 3 isolats ont présentés les caractéristiques suivantes
- ✓ Des conidies rondes et globuleuses portent plusieurs striations
- ✓ Filaments septés, fin et régulier

Ces isolats pourraient appartenir au genre *Ulocladium*

- 2 isolats ont présenté les caractéristiques suivantes :
- ✓ Conidiophore : long, hyalin.
- ✓ Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules.
- ✓ Spores: claires, globuleuses ou ovoides, plus ou moins colorées ou noirâtres selon les isolats.
- ✓ Tête aspergillaire: bisérée, radiée.

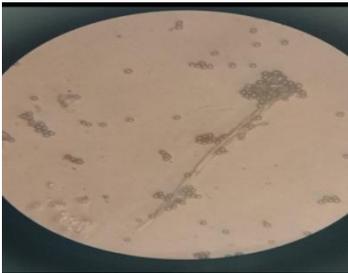
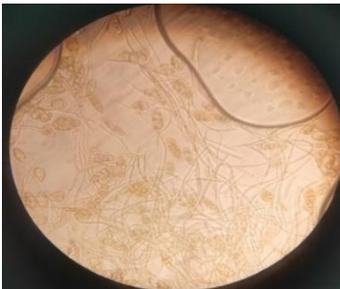
Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

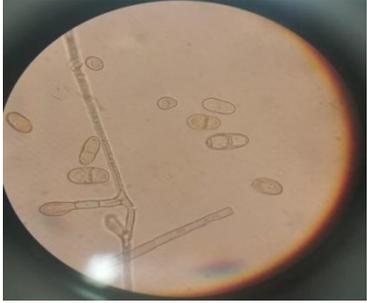
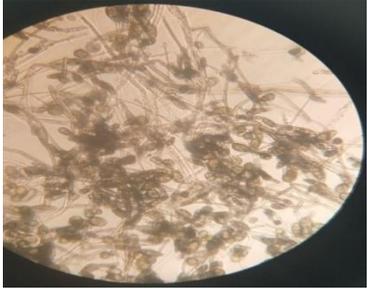
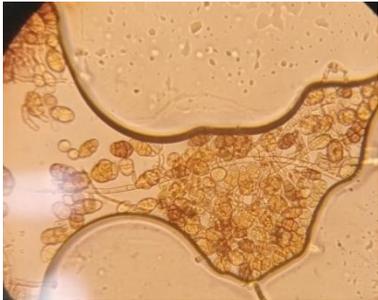
_ Un isolat a présenté les caractéristiques suivantes :

- ✓ Mycélium cloisonné, conidiophores simples ou ramifiés, parfois regroupés terminés par un pénicille.
- ✓ Phialidie donne naissance à des spores.
- ✓ Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium*.

Tableau7 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé dur

Aspect microscopique X40 ou X100	Identification de la souche
	<i>Aspergillus sp. 1</i>
	<i>Penicillium sp. 1</i>
	<i>Ulocladium sp. 1</i>
	<i>Alternaria sp. 1</i>

	<p><i>Alternaria sp. 2</i></p>
	<p><i>Ulocladium sp. 2</i></p>
	<p><i>Alternaria sp. 3</i></p>
	<p><i>Aspergillus sp. 2</i></p>
	<p><i>Ulocladium sp. 3</i></p>



2. Etude mycotoxilogique

2.1. CCM de l'extrait obtenu à partir du substrat

La chromatographie sur couche mince a été effectuée pour l'extrait obtenu à partir du substrat de blé et pour les extraits obtenus à partir des isolats fongiques. Les résultats ont montré que dans les deux cas, les chromatogrammes obtenus sont différents selon les systèmes éluant et que chacun contenant plusieurs taches séparées et certaines d'entre elles sont fluorescentes sous UV à 365nm (tableau 8, 9, 10 et 11).

Tableau 8 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines à partir de substrat

Extrait de substrat		
<p>Plaque CCM (Chromatogramme)</p>	 <p>A</p>	 <p>B</p>
<p>Systèmes des solvants</p>	<p>acétate de éthyle _ méthanol v/v (90:10)</p>	<p>Toluène- acétate d'éthyle- acide formique V/V(50:40:10)</p>

Tableau9 : Les valeurs Rf des spots séparées à partir de l'extrait de substrat

Système de Solvant	Numéro des taches	Couleur des taches sous Longueur d'onde 365 nm	Rapport frontal Rf
Chloroforme- acétone v/v (90:10)	1	Orange	Rf1 =0,16
	2	Vert claire	Rf2 =0,38
	3	Orange	Rf3 =0,75
	4	Vert	Rf4 =0,98
Toluène- acétate d'éthyle-acide formique V/V (50:40:10)	1	Vert claire	Rf1 =0,15
	2	Rose	Rf2 =0,42
	3	Jaune	Rf3 =0,51
	4	Bleu	Rf4 =0,67
	5	Vert Bleu fluorescent	Rf5 =0,86

Tableau 10 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des taches à partir des extraits des isolats

Plaque n° 1	Plaque n° 2	Plaque n° 3	Plaque n° 4
			
acétate de éthyle _ méthanol v/v (90:10)	Toluène- acétate d'éthyle-acide formique V/V(50:40:10)	acétate de éthyle _ méthanol v/v (90:10)	Toluène- acétate d'éthyle-acide formique V/V(50:40:10)

A: *Alternariasp.* 1 C: *Ulocladiumsp.* 2 E: *Aspergillus sp.* 1 G: *Alternariasp.* 3
 B: *Ulocladiumsp.* 1 D: *Aspergillus sp.* 2 F: *Penicilliumsp.* H: *Alternariasp.* 4

Tableau 11: Les valeurs Rf des spots séparées à partir des extraits des isolats

Système de solvant	Les souches	Numéro des taches	Couleur des taches sous Longueur d'onde 365 nm	Rapport frontal Rf
Chloroforme-acétone v/v (90:10)	<i>Ulocladium</i> sp.	1	Vert	Rf1 =0,42
	<i>Alternaria</i> sp. 1	1	Vert	Rf1 =0,30
		2	Vert	Rf1 =0,88
	<i>Ulocladium</i> sp. 2	1	Vert	Rf1 =0,88
	<i>Aspergillus</i> sp. 2	1	Vert	Rf1 =0,6
		2	Vert claire	Rf1 =0,84
		3	Vert claire	Rf3 =0,88
Toluène-acétate d'éthyle-acide formique V/V(50:40:10)	<i>Aspergillus</i> sp. 1	1	Bleu	Rf1 =0,3
		2	Vert	Rf2 =0,79
		3	Jaune	Rf3 =0,94
	<i>Penicillium</i> sp. 1	1	Bleu	Rf1 =0,16
		2	Bleu	Rf2 =0,19
		3	/	Rf3 =0,27
		4	vert jaunâtre	Rf4 =0,35
		5	Vert	Rf5=0,52
		6	Bleu	Rf6=0,58
		7	Bleu	Rf7=0,85
	<i>Alternaria</i> sp. 3	1	Bleu	Rf1 =0,25
		2	Bleu	Rf2 =0,39
		3	Vert claire	Rf3 =0,7
		4	Vert claire	Rf4 =0,9
	<i>Alternaria</i> sp. 4	1	Vert claire	Rf1 =0,67
2		Vert claire	Rf2 =0,90	

2. Révélations Chimiques

En raison du manque des mycotoxines standards au niveau de notre laboratoire qui peuvent être servir comme des témoins permettant la détection des mycotoxine par CCM, nous avons pensé à une autre méthode de détection. La méthode des révélations chimiques est connue pour son utilisation dans la seconde moitié du vingtième siècle. Elle consiste à contrôler les

changements des couleurs sous lumière visible et/ou Ultraviolet au niveau des taches entre avant et après leurs pulvérisations par des réactifs chimiques.

3.1. Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir de l'extrait du substrat

Les résultats obtenus en utilisant le réactif FeCl_3 n'ont pas montré des données exploitables (Figure 17-A). Par contre, l'utilisation du AgNO_3 a révélé la compatibilité au changement de couleur avec le tableau de référence pour une tache ($R_f=0,51$) qui a changé sa couleur après pulvérisation de la couleur jaune vers orange ce qui est compatible avec la présence probable de la **citrinin**.

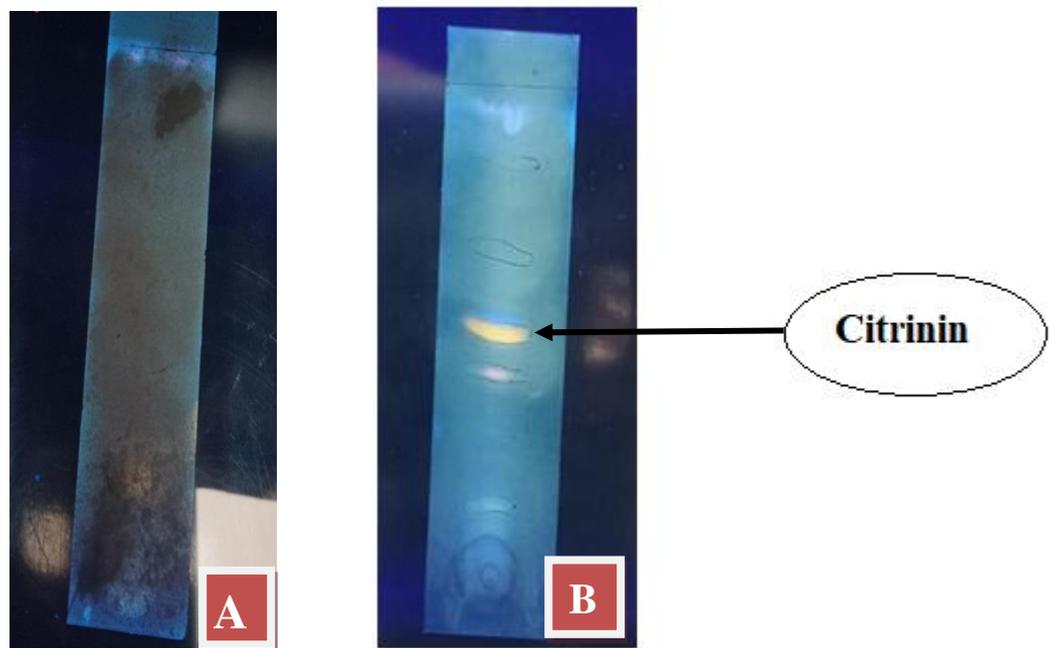


Figure 17 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites à partir de substrat après révélations chimiques (FeCl_3 / AgNO_3)

A) En Utilisant FeCl_3 ; le système de solvant 1 : le chloroforme et acétone,

B). En Utilisant AgNO_3 ; le système de solvant 2 : toluène, acétate d'éthyle et acide formique.

3.2. Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir des extraits des isolats fongiques

La pulvérisation des 4 plaques CCM contenant les taches séparées à partir des extraits des isolats nous n'a permis de trouver une compatibilité au changement de couleur que dans la plaque n° 3 contenant les extraits des isolats *Aspergillus* sp. 1 et *Penicillium* sp.1. Il s'agit de la tache n° 2 (Rf=0,79) de l'extrait d'*Aspergillus* sp. 1 et la tache n° 6 (Rf=0,58) de l'extrait de *Penicillium* sp.1. La première tache a changé sa couleur de vert à vert gris ce qui correspond probablement à l'**afatoxine G1** et la deuxième tache a changé sa couleur du bleu à vert gris ce qui nous indique la présence probable de la mycotoxine **afatoxine B1**. Quant au reste des plaques CCM (1,2 et 4), les résultats ne sont pas exploitables.

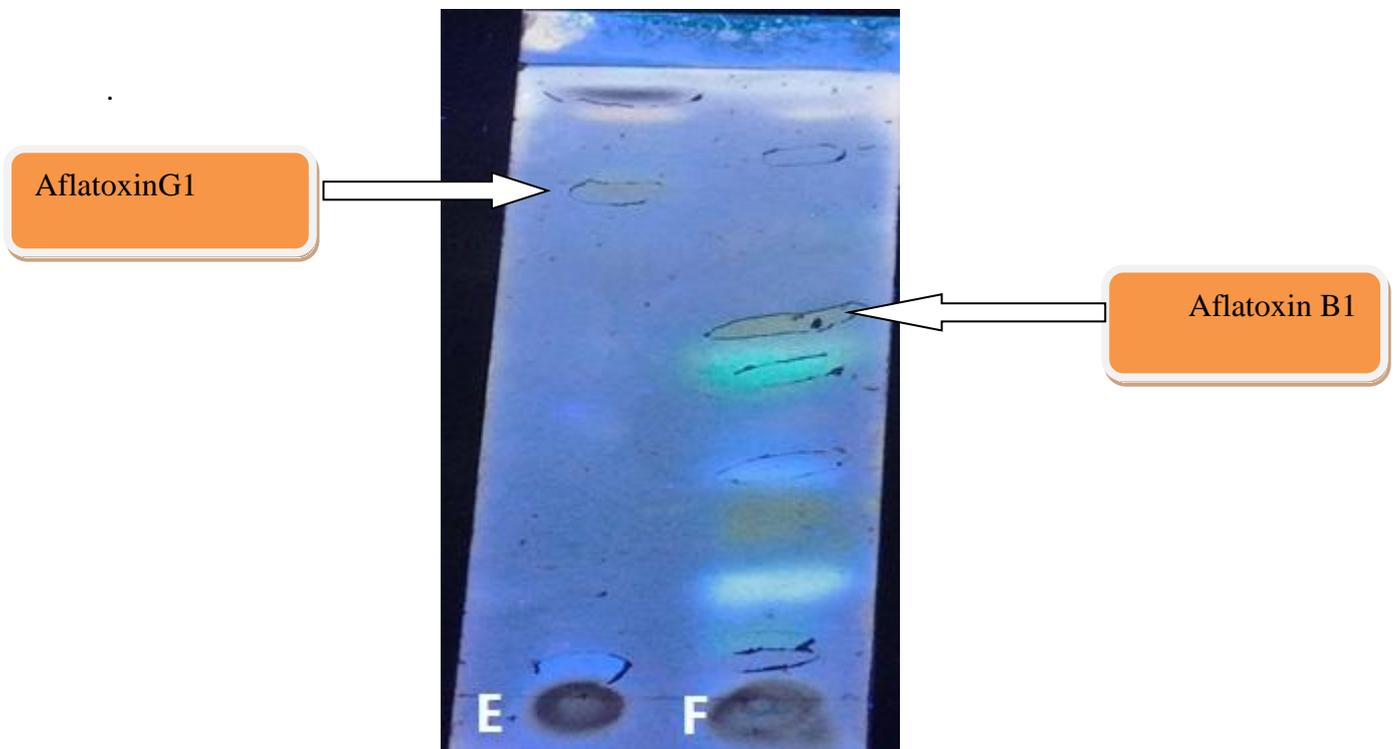


Figure18 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines après révélation H₂SO₄ (Plaque n°3)

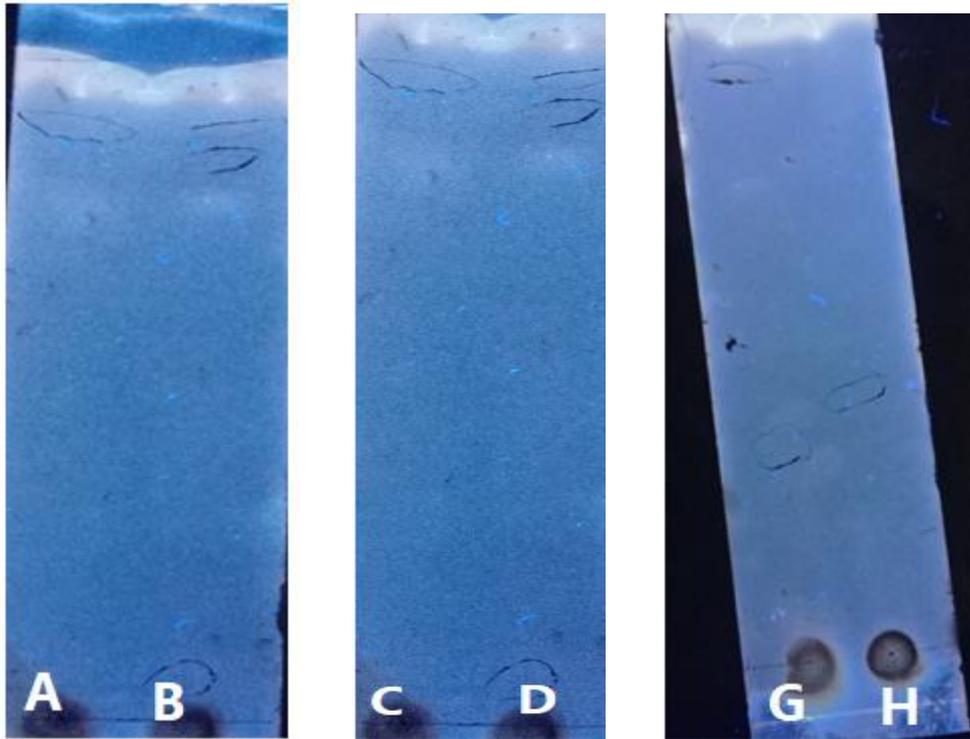


Figure19 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines après révélation H₂SO₄ (Plaque n° : 1, 2 et 4) (Résultat négatif)

Discussion

Le travail que nous avons abordé a pour objectif d'isoler à partir du blé dur commercialisé au niveau de marché des moisissures et tester leur pouvoir à produire des mycotoxines. Les résultats de l'isolement a montré l'échantillon utilisé est contaminé par les moisissures. Les genres qui sont représentés sont : *Alternaria*, *Ulocladium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Il est à rappeler que Les céréales sont des vecteurs importants de mycotoxines puisqu'elles sont universellement consommées par l'Homme et les animaux. L'enquête réalisée par Pittet à l'échelle mondiale (1998) montre que de 25 à 40 % des céréales sont contaminées par des mycotoxines (**yalannikouriseet al., 2002**). Les céréales sont, sans doute, les matières premières les plus exposées à la contamination fongique (**Senouci et al., 2012**). Ces quatre genres isolés appartenant à deux groupes distincts ont été énumérés: les groupe de "champs" comme *Alternaria*, *Ulocladium* et ceux appartenant au groupe de "stockage" sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Une prédominance a été remarquée pour le genre *Alternaria*.

La dominance de ce genre dans le blé qui est non traité semble être due à l'humidité élevée des échantillons. Ces mêmes résultats ont été constatés par **Weindenborner et al. (2000)** et Lors de la contamination du blé, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production de toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en mycoflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage des grains (**Gacemet al., 2011**). la fort fréquence de ce genre dans le blé, et la présence de *ulocladium* et *Aspergillus*, *Penicillium* concordent avec par **Aoues et al. (2017)** et par **Gacemet al. (2011)**. les conditions de récolte des grains et surtout celles de stockage ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que le facteur temporel lié au stockage (**Belkacem-Hanfiet al., 2013**).

Nous signalons ici que le genre *Alternaria* regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments, Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement. Ils sont généralement présents sur les semences provoquant des manques à la levée ou des fontes de semis (**Calmes, 2011**).

Dans notre travail nous avons utilisé pour l'isolement les milieux de culture PDA et Sabouraud additionnés le chloramphénicol. Ces milieux sont les principaux milieux d'enrichissement de base qui favorise la culture des champignons microscopiques (**Aloui, 2018**).

En ce qui concerne l'étude mycotoxinogène, nous avons fait une extraction directe à partir du substrat de blé et une autre à partir de chaque isolat fongique. La culture a été faite sur les milieux CYA et CAM. Le choix de ces milieux est basé sur leur pouvoir à favoriser la production des mycotoxines notamment les aflatoxines et les ochratoxines (Matmoura *et al.*, 2019). Les extraits que ce soit de substrat ou d'isolats sont par la suite soumis à une séparation de chromatographie sur couche mince. Les systèmes de solvant utilisés sont le mélange (Chloroforme- Acétone 90/10 ; V/V) et (Toluène-éthyle acétate acide formique, 50:40:10). Ces systèmes sont connus pour leur utilisation de séparation des mycotoxines notamment pour les aflatoxines et les Ochratoxines successivement (Lafont et Lafont, 1980). Les résultats obtenus ont montré plusieurs taches séparées et certaines semblent fluorées sous UV visible à 365 nm. Les révélations chimiques ont indiqué la présence de citrinin au niveau du substrat de blé ainsi que la production de l'aflatoxine G1 par *Aspegillus* sp. 1 et l'aflatoxine B1 par *Penicillium* sp. 1. Les *Aspergillus* et les *Penicillium* sont responsables de moisissures nuisibles au stockage, altèrent la qualité des grains en produisant éventuellement les mycotoxines telles que les aflatoxines, les ochratoxines, l'acide penicillique, la citrinine, la patuline, ...etc. (Matmoura *et al.*, 2019).

Les aflatoxines constituent un groupe de dix-huit composés dont quatre sont les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments. Il s'agit des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 produites par la moisissure *Aspergillus* et qui sont les plus toxiques. La production des mycotoxines par les champignons est une conséquence combinée de la propriété génétique de la souche et de son environnement (Blumenthal, 2004)

Conclusion

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de mycologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre à l'université de Ghardaïa.

Dans le but de rechercher des moisissures contaminant le blé dur et mycotoxinogènes, nous avons collecté quelques échantillons de blé au niveau de quelques points de vente à la commune de Metlili wilaya de Ghardaia. L'isolement a été mené en utilisant les milieux de culture PDA et Sabouraud additionnés du chloramphénicol afin d'inhiber la contamination des bactéries. Nous avons pu isoler 10 isolats appartenant aux différents genres à savoir : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Ulocladium* et *Penicillium*. Certaine dominance a été remarquée par le genre *Alternaria*. La recherche des mycotoxines a été suivie globalement dans le substrat du blé et au niveau de chaque isolat par la méthode de CCM suivie des révélations chimiques. Les résultats ont indiqué que le substrat de blé contient probablement la citrinin tandis que les isolats ont montré leur pouvoir producteur des mycotoxines. La souche d'*Aspergillus* sp. 1 produit probablement l'aflatoxine G1 tandis que la souche de *Penicillium* sp. 1 produit l'aflatoxine B1.

En fin nous pouvons dire que la présente étude a montré que le blé commercialisé au niveau des points de vente de Metlili n'est pas dépourvu des moisissures contaminant qui peuvent produire des mycotoxines nuisible pour la santé humaine et animale.

En perspectives de cette étude nous pouvons citer ce qui suit :

- Etendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons
- Identification moléculaire des souches fongiques isolées du blé dur
- Rechercher des antifongiques ciblant les champignons mycotoxinogènes.

Références Bibliographiques

Abecassis, J., Allaoua, A., Becher, L. B., Elloumi, M., Gharbi, S., Huyghe, C., ... & Robin, K. (2017). Blé dur : de l'organisation des filières à la structuration d'un réseau méditerranéen.

Acharya, T., & Hare, J. (2022). Sabouraud Agar and Other Fungal Growth Media. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 69-86). Springer, Cham.

Afssa,.(2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final, 308p.

Ait Abdelouahab, N. (2007). microbiologie alimentaire. 2ème édition. office des publications universitaire place centrale ben aknon Alger. p:147.

Ait-Slimane-Ait-Kaki, S. (2008). Contribution à l'étude de l'interaction génotype x milieu, pour la qualité technologiques chez le blé dur en Algérie (Doctoral dissertation, Thèse Doctorat es Sciences. Univ. Annaba).

Akroum, S., & Rouibah, M. (2020). Utilisation d'extraits méthanoliques de plantes pour la protection des cultures de tomates-cerises (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) contre l'infection fongique par *Alternaria alternata*. *Biologie Aujourd'hui*, 214(1-2), 55-61.

Aloui, N. (2018). *Etude de la contamination fongique alimentaire et mycotoxines* (Doctoral dissertation).

Amani. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysologiques thèse de doctorat en sciences biologiques et biotechnologie, p 225

Aoues, K., Boutoumi, H., & Benrima, A. (2017). État phytosanitaire du blé dur locale stocké en Algérie. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 286-296.

Atoui, A. (2006). Approche de la mycotoxinogenese chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: Etudes moleculaire et physiologique (Doctoral dissertation).

Attab S. (2014). Etude de quelques altérations physiologiques et biochimiques chez le blé causées par une maladie cryptogamique (l'oïdium)[En ligne].Thèse de Doctorat. Algérie : Université Badji Mokhtar- Annaba, p 145.

Barron, C., Abecassis, J., Chaurand, M., Lullien-Pellerin, V., Mabile, F., Rouau, X., ... & Samson, M. F. (2012). Accès à des molécules d'intérêt par fractionnement par voie sèche. *Innovations Agronomiques*, 19, 51-62.

Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., & Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2326-2329.

Belkacem-Hanfi, N., Semmar, N., Perraud-Gaime, I., Guesmi, A., Cherni, M., Cherif, I., ...& Roussos, S. (2013). Analyse spatio-temporelle de la distribution des genres de moisissures post-récolte sur blé dur stocké cultivé en Tunisie. *Journal de recherche sur les produits stockés*, 55, 116-123.

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

Berenbaum, MR, Bush, DS et Liao, LH. (2021). Métabolisme des mycotoxines médié par le cytochrome P450 par les insectes phytophages. *Opinion actuelle sur la science des insectes*, 43, 85-91.

Bilan, A. (2015). The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography.

Blumenthal CZ. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol Pharmacol.* 39:214–228

Bonjean, A. (2001). Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). *Dossier de l'environnement de l'INRA*, 21, 29-37p.

Bonnot, T. (2016). Réponse du grain de blé à la nutrition azotée et soufrée : étude intégrative des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement du grain par des analyses-omiques (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

Boudih, S. (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro (Doctoral dissertation, Université Paris-Est).

Boulal, A., Rabhi, Z. et Mamouni, K. (2020). Revue internationale des ressources naturelles et de l'environnement.

Brochard, G., & Le Bacle, C. (2009). Mycotoxines en milieu de travail. Origine et Propriétés Toxiques des Principales Mycotoxines. INRS, Documents pour le Médecin Du Travail, 119.

Bryła, M., Ksieniewicz-Woźniak, E., Stępniewska, S., Modrzewska, M., Waśkiewicz, A., Szymczyk, K. et Szafrńska, A. (2021). Transformation de l'ochratoxine A au cours des procédés de panification. *Contrôle alimentaire*, 125, 107950.

Bueno, D., Munoz, R., & Marty, J. L. (2014). Common methods to detect mycotoxins: a review with particular emphasis on electrochemical detection. *Sensing in Electroanalysis*. (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.), Volume 8

Calmes, B. (2011). réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées. *Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases* (Doctoral dissertation, Université d'Angers).

Calvo, A.M.; Bok, J.; Brooks, W. et Keller, N.P. (2004). -veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4733–4739.

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

Debiton, C. (2010). Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

Dedi, J. K. É., & Diomande, B. Y. (2017). Caractérisation de la mycoflore de grains de maïs (*Zea mays*) destinés à la préparation d'aliments composés pour la volaille. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(6), 2594-2603.

Diguta, C. F. (2010). *Ecologie des moisissures présentes sur les baies de raisin* (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne; Universitatea București).

Djermoun A. (2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques, *Revue Nature et Technologie*, N°1 : 45-53.

Djossou O., Perraud-Gaime I., LakhalMirleau F ., Rodriguez-Serrano G., Karou G ., Niamke S., Ouzari I., Boudabous A and Roussos S. (2011). Robusta coffee beans post harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*. p: 1-6.

Dragacci, S., Grosso, F., & Fremy, J. M. (2005). Analyse et détection des mycotoxines. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, (P3330).

Elsaadani, M. (2019). Détection des Ochratoxines A dans la production alimentaire par l'utilisation d'aptacapteur capacitif (Doctoral dissertation, Université Montpellier).

Gacem, M. A. (2011). Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelques moisissures d'altération de blé tendre stocké. *Magister en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouagra. Algérie.*

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

Gaumy, J. L., Bailly, J. D., Burgat, V., & Guerre, P. (2001). Zearalenone: propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de médecine vétérinaire*, 152(3), 217-234.

Gauthier, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. *Sciences pharmaceutiques*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux.

Guerre, P., Bailly, J. D., Benard, G., & Burgat, V. (2000). Excrétion lactée des mycotoxines: quels risques pour le consommateur. *Rev. Med. Vet.*, 151, 7-22.

Guezlane-Tebibel Nadjat , Bouras Nouredine Et Ould El Hadj Mohamed Didi.(2016) Les mycotoxines: un danger de santé public, *algerian journal of arid environment* , vol. 6, n°1, juin: 32-49

Hadjout, S. (2013). Etude comparative (in vitro et in situ) de quelques lignées sélectionnées de blé dur et de variétés cultivées pour leur comportement à la fusariose de l'épi causée par *Fusarium culmorum* (WG Sm.) sacc. et *Fusari* (Doctoral dissertation).

Hannachi A.(2017). Aptitude à la combinaison, sélection mono et multi caractères et adaptabilité du blé dur (*Triticum durum* Desf.) aux conditions semiarides. Thèse de doctorat. Univ Sétif .156p.

Hanvi, MD, Lawson-Evi, P., Bouka, EC et Eklu-Gadegbeku, K. (2021). Aflatoxines dans la pâte de maïs et exposition alimentaire des populations rurales du Togo. *Contrôle alimentaire* , 121 , 107673 .

Heit, S. (2015). Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF (Doctoral dissertation, Université de Lorraine)

Houansou, G. D., Ladekan, E., Adjagodo, A., Tchobo, P. F., & Agbangla, C.(2020). Identification des microflores mycologiques Présentes Dans Les Casse-Croûtes à base de céréales produits et vendus dans sept départements du Bénin Micheline Agassounon Djikpo Tchibozo 1.

Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M. T., & Said, S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(5), 868-874.

Kamle, M., Mahato, D. K., Devi, S., Lee, K. E., Kang, S. G., & Kumar, P. (2019). Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*, 11(6), 328..

Kirouani, Abderrezak, Kiar, Redha Ould, Boukhaloun, Leila, et al. . (2019). Caractérisation de quelques variétés Algériennes de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. durum) par le biais des marqueurs phénotypiques. *Journal of Applied Biosciences*, 2019, vol. 142, p. 14464-14477.

Klich, MA. (2007). *Aspergillus flavus* : le principal producteur d'aflatoxine. *Pathologie moléculaire des plantes* , 8 (6), 713-722.

Lafont, P., Lafont J. (1980). Contaminations du maïs par des mycotoxines. *Bulletin de l'académie vétérinaire*, (53), 533-538.

Larone D.H. (1987). Medically important fungi. A guide to identification, 2nd edition. New-York, London, Amsterdam : Elsevier Science Publishing. 230p

Lepivert G. ,MarengueE. , Tardieu D., Guerre P. ., .(2017). Démarche raisonnée pour évaluer l'impact des mycotoxines chez les volailles : qualité sanitaire des produits et critères d'alerte *Innovations Agronomiques* 55, 327-343.

Lucienne, E. D. A. H., Christelle, E. Z. I. N., Christiane, A. D. D. A., Latifou, A. B., Vissienon, C., Vissienon, Z., & Virgile, A. H. Y. I. (2021). Mycotoxines: Effets sur la Santé Humaine. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*, 24(2), 310-333.

Matmoura, A., Bouti, K., Bouras, N., & Houmani, Z. (2019). recherche des populations d'aspergillus section flaviaflatoxinogenes dans les amandes commercialisées dans trois régions algériennes. *African Review of Science, Technology and Development*, 4(01), 1-13.

Meghazi, N. (2015). Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké (Doctoral dissertation).

Nadjet, G. T., Noureddine, B. O. U. R. A. S., & Didi, O. E. H. M. (2016). Les mycotoxines: un danger de santé public. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 6(1).

Naville M. (2005). La biodiversité des espèces cultivées : Analyse dans le cas du blé, Paris: Université Paris XI, Paris, 20p.

Nguyen, M. T. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines (Doctoral dissertation).

Ouanzar.,(2012). Etude comparative de l'effet du semis direct et du labour conventionnel sur le comportement du blé dur (*Triticum durum* Desf.) Magister Production Végétale et Agriculture de Conservation universiteferhatabbassetif

Ouattara, S., Adou, K. M., Kporou, K. E., & Guédé-Guina, F. (2009). évaluation de l'activité antifongique des extraits de *terminaliaivorensis* (tekam 2) sur la croissance in vitro de *aspergillus fumigatus* evaluation of antifungal activity of *terminaliaivorensis* (tekam2) extracts on the in vitro growth of *aspergillus fumigatus*. *bulletin de la société royale des sciences de liège*.

Rastoin J.L. and Benabderrazik L.H. (2014) .Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb Pour un co-développement de filières territorialisées. IPEMED, Institut de Prospective Economique du Monde Méditerranéen.

RKIBA, Z. (2020). LES MYCOTOXINES ALIMENTAIRES. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Mohammed v De Rabat.

Ruppol, P., Delfosse, P., &Hornick, J. L. (2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines: un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 2, No. 148, pp. 141-146).

Salmi, M. (2015). Caractérisation morpho-physiologique et biochimique de quelques générations F2 de blé dur (*triticumdurumdesf.*) sous conditions semi-arides (Doctoral dissertation) Université Ferhat Abbas Sétif 1.

Sara, R. S. (2016). Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache: étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar. Annaba).

Scott, PM, Lawrence, JW et Van Walbeek, W. (1970). Détection des mycotoxines par chromatographie sur couche mince : application au criblage d'extraits fongiques. *Microbiologie appliquée* , 20 (5), 839-842.

Senouci, M. O. G. H. T. E. T., Hamid, K. A. D. I., Nora, N. B., Abdallah, M. O. U. S. S. A. O. U. I., Abdelilah, A. M. R. O. U. C. H. E., &Hammadi, L. A. (2012). Effet des paramètres physicochimiques sur la contamination fongique et mycotoxique dans le blé tendre français commercialisé en Algérie Physicochemicalfactors' effect on fungul and mycotoxical contamination of french soft wheatmarketed in Algeria.

Singh, J., &Mehta, A. (2020). Détection rapide et sensible des mycotoxines par des méthodes analytiques avancées et émergentes : une revue. *Sciences alimentaires et nutrition* , 8 (5), 2183-2204.

Soltner.Dominique .(2012).les Grande productions végétales .collection sciences et techniques agricoles. 21edition.chapitre1.P472.

Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines (Doctoral dissertation).

Weidenbörner, M., Wieczorek, C., Appel, S., & Kunz, B. (2000). Whole wheat and white wheat flour—the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology*, 17(1), 103-107.

Whitlow, L. W., & Hagler, W. M. (2001, October). Mycotoxin contamination of feedstuffs—An additional stress factor for dairy cattle. In *North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ, Québec.*

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

Zaamouchi, A., & Mihoubi-Djezzare, I. (2019). *Caractérisation moléculaire et par MALDI-TOF MS des espèces fongiques phytopathogènes inféodées aux céréales et mise en évidence de l’impact de l’utilisation des antifongiques azolés sur la résistance des souches* (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).

Zinedine, A., & Idrissi, L. (2007). Présence et réglementation des mycotoxines dans les aliments au Maroc : Situation actuelle et perspectives. *Les technologies de laboratoire*, 2(7).

Zuber, Y.M.H., Lillehoj, E, B. et Renfro, B.L., (1987). Aflatoxine in maize: A proceeding of the workshop. Published by cimmyt, mexico, pp.389.

Annexe

Composition des milieux de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre (macération 500 mL de filtrat)	200 g
Dextrose	10g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7

Sabouraud additionné de chloramphénicol

Peptone pepsique de viande	5g
Glucose	20 g
Chloramphénicol	0,5g
Agar	10g
Eau distillée	1000mL
pH	7,0

Composition de l'eau physiologique

Chlorure de sodium (NaCl)	1g
Eau distillée	100mL

Milieu Czapek Dox + Extrait de levure(CYA)

Sucrose	30 g
Agar	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	1 g
MgSO ₄	1 g
FeSO ₄	0.02g
NaNO ₃	6 g
Extrait de levure	2,5g
Eau distillée	1000 mL
pH	6

Milieu Coconut Agar Medium (CMA)

Noix De Coco	100g
Eau Distillée	1000 mL
Agar	20g
pH	7

الهدف من دراستنا هو عزل فطريات مجهرية من القمح الصلب ودراسة قدرتها على إنتاج السموم الفطرية. لهذا الغرض، تم جمع بعض عينات من القمح الصلب على مستوى نقاط تجارية مختلفة في منطقة متليلي (إحدى بلديات ولاية غرداية). سمح العزل بطريقة وضع الحبوب مباشرة على الأوساط الزراعية PDA و Sabouraud مضافا إليها الكلورامفينيكول في درجة حرارة 28 د° لمدة 7 أيام بالحصول على 10 عزلات فطرية. بعد الدراسة المرفولوجية والمجهرية لهذه العزلات تبين أنها تنتمي إلى الأجناس الأربعة التالية: *Alternaria* (40%)، *Ulocladium* (30%)، *Aspergillus* (20%) و *Penicillium* (10%). تم إجراء استخلاص السموم الفطرية باستعمال المحاليل العضوية إطلاقا من ركيزة القمح ومن خلال كل عزلة فطرية بعد زرعها على الأوساط الصلبة CMA و CYA لمدة 7 أيام ليتم الكشف عنها باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) وتحت الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 365 نانومتر. أظهرت النتائج عدة بقع مفصولة و بعضها مغلورة ولكن للتعرف التقريبي عليها تطلب منا استعمال طريقة الكشف الكيميائي حيث أظهرت النتائج باستعمال نترات الفضة وجود السم الفطري Citrinin على مستوى الركيزة كما أظهرت باستعمال حمض الكبريت إنتاج ال Aflatoxine G1 من طرف *Aspergillus* sp.1 و Aflatoxine B1 من طرف *Penicillium* sp.1.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب ، فطريات مجهرية ، السموم الفطرية، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Résumé

L'objectif de notre étude est l'isolement à partir de blé dur des moisissures et étudier leur pouvoir producteur des mycotoxines. Pour cela, nous avons collecté quelques échantillons de blé dur à partir de divers points de commerce à Metlili (une commune de la wilaya de Ghardaïa). L'isolement effectué par la méthode des grains (directe) sur milieu PDA et Sabouraud ajoutés du chloramphénicol, nous a permis d'obtenir 10 isolats fongiques contaminants. Après une identification préliminaire macro et microscopique, ces isolats ont été affiliés à 4 genres: *Alternaria* (40%), *Ulocladium* (30%), *Aspergillus* (20%) et *Penicillium* (10%). L'extraction des mycotoxines a été effectuée globalement à partir du substrat de blé et à partir de chaque isolat fongique inoculé sur les milieux solides CMA et CYA. La détection a été faite par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et sous lumière UV à 365 nm. Les résultats ont montré plusieurs taches séparées par CCM et fluorées sous UV, cependant leur identification aproximative en utilisant des révélations chimiques a révélé en utilisant nitrate d'argent la présence de Citrinin au niveau du substrat de blé et la production de l'Aflatoxin G1 par *Aspergillus* et de l'aflatoxine B1 par *Penicillium* sp.1 après l'utilisation de H₂SO₄.

Mots clés: Blé dur, moisissures, mycotoxines, CCM.

Abstract

The objective of our study is to isolate microscopic fungi from durum wheat and to study their ability of mycotoxin production. For this, we collected some samples of durum wheat from various trade points in Metlili (a town in the wilaya of Ghardaïa). The isolation by the grain method (direct) on PDA and Sabouraud media added chloramphenicol, allowed us to obtain 10 fungal isolates. After preliminary macro and microscopic identification, these isolates were affiliated to the 4 genera: *Alternaria* (40%), *Ulocladium* (30%), *Aspergillus* (20%) and *Penicillium* (10%). The extraction of mycotoxins was carried out globally from the wheat substrate and from each fungal isolate inoculated on CMA and CYA media. Detection was made by Thin Layer Chromatography (TLC) and under UV light at 365 nm. The results showed several spots separated by TLC and fluorinated under UV, however their approximate identification requires chemical revelations which revealed the presence of Citrinin in the substrat and production of Aflatoxin G1 by *Aspergillus* and Aflatoxin B1 by *Penicillium* sp. 1, according to the use of H₂ SO₄ .

Key words: durum wheat, microscopic fungi, mycotoxins, TLC

