

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de recherche: **Biotechnologie végétale et microbienne, biodiversité et environnement.**
Structure de Recherche: **Équipe de Botanique et Valorisation des Ressources Végétales et Fongiques.**
Discipline: **Biologie**
Spécialité : **Mycologie et toxicologie.**

Présentée et soutenue le 26/09/2020 par :

Abdelali ENNOUARI

**CONTAMINATION DU BLÉ DUR PAR LES MYCOTOXINES AU MAROC :
ÉTUDE DE LA PRÉSENCE DU DÉOXYNIVALÉNOL, DE L'OCHRATOXINE A
ET DES MOISSISSURES TOXINOGENES**

JURY

Hicham BELLAOUI	PES, Université Mohammed V- Rabat, Faculté des Sciences.	Président
Mohamed RAHOUTI	PES, Université Mohammed V- Rabat, Faculté des Sciences.	Directeur de thèse
Abdellah ZINEDINE	PH, Université Chouaib Doukkali El Jadida, Faculté des Sciences.	Co- Directeur de thèse
EL Hassane ABDENNEBI	PES, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan-II, Rabat.	Rapporteur/Examineur
Hassan HAJJAJ	PES, Université Moulay Ismail - Meknès Faculté des Sciences.	Rapporteur/Examineur
Abderrahim EL HOURCH	PES, Université Mohammed V- Rabat, Faculté des Sciences.	Rapporteur/Examineur
Mohammed EL AZZOUZI	PES, Université Mohammed V- Rabat, Faculté des Sciences.	Invité

Année universitaire 2019/2020

DEDICACES

Je dédie cette thèse à...

Ma chère mère et mon cher père,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'affection que j'ai toujours eu envers vous. Vos conseils, votre bienveillance et vos encouragements m'ont permis de dépasser toutes les difficultés.

Ce travail est le fruit des efforts et sacrifices que vous avez consenti pour mon éducation et ma formation.

Que Dieu vous prête longue vie et bonne santé.

Avec beaucoup de patience et de volonté, vous vous êtes sacrifiés pour moi et mon frère, vous avez tout fait pour que j'arrive à mon but.

Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Je vous dédie ce travail en gage de mon amour et de mon estime les plus profonds.

Mère, Père vous étés formidables, je vous aime...

À Mon cher petit frère, Cher Yahya, tu as toujours été pour moi un exemple, dur à suivre parfois, mais le meilleur certainement. J'ai toujours su que j'ai le plus beau et le plus adorable des petits frères. Tu m'as toujours apporté amour, soutien et compréhension. Pour ta grande gentillesse, tu trouveras dans ce travail l'expression de mon profond amour pour toi. Que Dieu te protège et illumine tes chemins.

À Ma chère épouse, depuis le jour où je t'ai connue, ma vie est comblée de bonheur. Ta présence m'inspire la sérénité et la tranquillité de l'âme. Merci pour tes encouragements, tu as toujours su trouver les mots qui conviennent pour me remonter le moral dans les moments pénibles, grâce à toi j'ai pu surmonter toutes les difficultés. Tu m'as aussi aidé à réaliser ce travail que j'espère sera le témoignage de mon profond amour pour toi.

À Mes beaux-parents, Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

À mes familles maternelles et paternelles. Puisse ce travail être la preuve de mon estime pour vous.

AVANT PROPOS

*Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein de l'Equipe de Botanique et Valorisation des Ressources Végétale et Fongique (BOVAREF) affiliée au Centre de Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement (BIOBIO) domicilié à la Faculté des Sciences de Rabat et dans le cadre d'une collaboration scientifique avec le Département de Technologie des aliments de l'Université de Lleida (Espagne). Cette étude a été accomplie sous la direction de Monsieur **Mohamed RAHOUTI**, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat et la co-direction de **Abdellah ZINEDINE**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences d'El Jadida.*

*Au terme de ce travail, je remercie Monsieur **Mohamed RAHOUTI**, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat. Pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.*

*Je remercie aussi Monsieur **Abdellah ZINEDINE**, Professeur à la Faculté des Sciences d'El Jadida d'avoir co-dirigé ce travail, pour sa disponibilité et ces conseils très précieux qui m'ont beaucoup aidé à surmonter les difficultés. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements d'avoir suivi et orienté ce travail.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **Hicham BELLAOUI**, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir accepter d'être Président de ce jury.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux Messieurs **EL Hassane ABDENNEBI**, Professeur d'enseignement supérieur à l'Institut agronomique et vétérinaire Hassan II et **Hassan HAJJAJ**, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Meknès, **Abderrahim EL HOURCH**, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, **Mohammed EL AZZOUZI**, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, qui ont bien voulu me faire le plaisir d'être examinateurs de ce travail. Veuillez croire en ma profonde considération.*

*Je remercie vivement Monsieur **SANCHIS ALMENAR Vicente**, Professeur à l'Université de Lleida, pour l'accueil bienveillant au sein du*

Département de Technologie des aliments de l'Université de Lleida, pour son aide et son orientation et surtout pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée.

J'aimerais adresser ma profonde gratitude aux membres de l'Equipe de Botanique et Valorisation des Ressources Végétale et Fongique de la Faculté des Sciences de Rabat, pour la disponibilité, la gentillesse, et leurs encouragements qui m'ont beaucoup aidé pendant mon séjour de recherche dans ce laboratoire.

Je remercie vivement les membres du Laboratoire Toxicologie/hydrologie de l'Institut d'Hygiène à Rabat, qui m'ont soutenu et j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir intégré dans une équipe formidable et dynamique.

*Il m'est particulièrement agréable d'adresser un remerciement très chaleureux à Madame **Montes PRIME LATORRE**, Technicienne au Laboratoire de Mycologie Appliquée du Département de Technologie des Aliments de l'Université de Lleida pour son aide précieuse et sa gentillesse.*

*Ma reconnaissance s'adresse également à mes chers ami-e-s, **Esther GARCIA, Cyndia GONZALEZ, Daiana GARCIA, Jordi VIDAL, Fernando LOPEZ, Janeth RODRIGUEZ, Rogelio SANCHEZ, Maria BERNARDA COLONEL, Miguel ANGEL INDIGNOO** et tous mes autres amis en Espagne.*

J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mes chers amis de la Faculté des Sciences de Rabat pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer et leur sympathie.

Ce travail a bénéficié d'un soutien financier du Ministère de l'Education Nationale, de la Formation Professionnelle, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, du Centre National Pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) et de l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques à Taounate (ANPMA) dans le cadre du programme de recherche dans le domaine de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques (Projet n° PMA 2019-3). Nous tenons, à cette occasion, remercier vivement les responsables de ces organismes nationaux.

RÉSUMÉ

Quatre-vingt-un (81) échantillons de blé dur prélevés dans sept régions du Maroc (Khémiset, Béni Méllal, Séttat, Fès-Meknès, Skhirat-Témara, Tansift-El Haouz et Rabat-Salé) ont été examinés pour la recherche de la présence des mycotoxines désoxynivalénol (DON) et ochratoxine A (OTA), ainsi que l'isolement des moisissures toxigènes responsables de leur production, puis l'identification des espèces fongiques par des techniques classiques et de biologie moléculaire.

Les échantillons ont été d'abord extraits à l'eau, puis les extraits ont été purifiés par des colonnes de chromatographie d'immunoaffinité. Le DON a été ensuite identifié et quantifié avec la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur à barrette de photodiodes. Les résultats analytiques ont montré que 9 des 81 échantillons totaux (11,1%) étaient contaminés par le DON. Les niveaux de contamination par le DON dans les échantillons positifs variaient entre 65 et 1310 µg/Kg. Le niveau maximal de contamination par le DON (1310 µg/Kg) a été trouvé dans un échantillon de blé dur de Rabat-Salé, tandis que la valeur minimale (65 µg/Kg) a été enregistrée dans un échantillon de la région de Béni Méllal. Le niveau moyen de DON dans les échantillons positifs était de $502,1 \pm 40,4$ µg/Kg. Un total de 1053 isolats de moisissures ont été isolés des 81 échantillons de blé dur récoltés au Maroc. L'identification moléculaire des isolats a été réalisée par une méthode à base de la réaction de polymérisation en chaîne. Des souches fongiques sélectionnées ont été ensuite étudiées pour leur potentiel de production des mycotoxines, en particulier l'OTA et le DON. Les résultats de la biodiversité fongique montrent que les espèces les plus abondantes appartiennent aux genres *Alternaria* (86,2%), *Fusarium* (71,1%) et *Aspergillus* (6,01%).

Les résultats de l'analyse par HPLC ont également indiqué que 27 des 980 isolats (2,75%) de *Fusarium* produisent la toxine DON. La quantité maximale de DON trouvée (5220 µg/Kg) a été produite sur un échantillon de blé de la zone de Séttat. Ces résultats concordent avec nos travaux antérieurs où nous avons signalé la présence de DON dans le blé dur (1013 µg/Kg). Quant à l'OTA, les résultats de l'analyse par HPLC ont montré qu'elle a été produite par 8 des 43 isolats totaux (18,6%) de la section d'*Aspergillus* Nigri. Le niveau maximal d'OTA produit a été également trouvé dans un échantillon de blé de la zone de Séttat (0,72 µg/Kg). L'identification moléculaire des isolats de *Fusarium* a montré la présence de *F. equiseti* (61,1%), *F. graminearum* (11,1%), *F. verticillioides* (11,1%), *F. ecuminatum* (5,5%), *F. sporotrichioides* (5,5%), *F. coeruleum* (5,5%) et *F. oxysporum* (5,5%). L'identification des espèces d'*Aspergillus* a montré l'abondance d'*A. flavus* (41,1%), *A. niger* (35,6%), *A. tubingensis* (15,1%) et *A. niger aggregate* (8,2%).

Mots-clés: activité de l'eau, *Aspergillus*, blé dur, désoxynivalénol, flore fongique, *Fusarium*, mycotoxines, ochratoxine, température.

ABSTRACT

Eighty-one (81) durum wheat samples collected from seven regions of Morocco (Khemiset, Beni Mellal, Settât, Fes-Meknes, Skhirat-Temara, Tansift-El Haouz and Rabat-Sale) were examined for mycotoxins deoxynivalenol (DON) and ochratoxin A (OTA) as well as the isolation of the toxigenic fungi responsible for their production and then the identification of fungal species by conventional techniques and molecular biology.

The samples were first extracted with water, the extracts were purified by immunoaffinity chromatography columns and the DON was then identified and quantified with high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode bar detector. Analytical results showed that 9 of the 81 total samples (11.1%) were contaminated with DON. Levels of DON contamination in the positive samples ranged from 65 to 1310 µg / kg. The maximum contamination level of DON (1310 µg / kg) was found in a Rabat-Sale durum wheat sample, while the minimum value (65 µg / kg) was recorded in a sample of the Beni Mellal region. . The mean level of DON in the positive samples was 502.1 ± 40.4 µg / kg.

A total of 1053 fungi isolates were isolated from the 81 durum wheat samples harvested in Morocco. Molecular identification of the isolates was performed using a polymerase chain reaction method. Selected fungal strains were then investigated for their potential for mycotoxin production, particularly OTA and DON. The results of fungal biodiversity show that the most important species belong to the genera *Alternaria* (86.2%), *Fusarium* (71.1%) and *Aspergillus* (6.01%).

HPLC results also indicated that 27 of the 980 isolates (2.75%) of *Fusarium* produce the DON toxin. The maximum amount of DON found (5220 µg / kg) was produced on a wheat sample from the Settât area. These results are consistent with our previous work where we reported the presence of DON in durum wheat (1013 µg / kg). As for OTA, the results of the HPLC analysis showed that it was produced by 8 of the 43 isolates (18. 6%) of the *Aspergillus Nigri* section. The maximum level of OTA produced was also found in a wheat sample from the Settât area (0.72 µg / kg). Molecular identification of *Fusarium* isolates showed *F. equiseti* (61.1%), *F. graminearum* (11.1%), *F. verticillioides* (11.1%), *F. ecuminatum* (5.5 %), *F. sporotrichioides* (5.5%), *F. coeruleum* (5.5%) and *F. oxysporum* (5.5%). The identification of *Aspergillus* species has shown the abundance of *A. flavus* (41.1%), *A. niger* (35.6%), *A. tubingensis* (15.1%) and *A. niger aggregate* (8.2%).

Key words: *Aspergillus*, deoxynivalenol, fungal flora, *Fusarium*, mycotoxins, ochratoxin, temperature, water activity.

SOMMAIRE

DEDICACES.....	- 1 -
AVANT PROPOS.....	- 3 -
RÉSUMÉ.....	- 5 -
ABSTRACT.....	- 6 -
SOMMAIRE.....	- 7 -
LISTE DES ABREVIATIONS.....	- 11 -
LISTE DES FIGURES.....	- 12 -
LISTE DES TABLEAUX.....	- 13 -
LISTE DES ANNEXES.....	- 14 -
VALORISATION SCIENTIFIQUE	- 15 -
INTRODUCTION GENERALE	- 16 -
CHAPITRE I : Revue bibliographique	- 19 -
I.1 GENERALITES SUR LE BLE	- 20 -
I. 1. 1 DESCRIPTION ET TAXONOMIE DU BLE.....	- 20 -
I. 1. 1. 1 Blé tendre	- 20 -
I. 1. 1. 2 Blé dur	- 21 -
I. 1. 2. GRAIN DE BLE	- 21 -
I. 1. 2. 1. Constitution histologique du grain	- 21 -
I. 1. 2. 1. 1. Enveloppes et couche à aleurone.....	- 22 -
I. 1. 2. 1. 2. Germe	- 22 -
I. 1. 2. 1. 3. Albumen	- 23 -
I. 1. 3 COMPOSITION CHIMIQUE DES GRAINS.....	- 23 -
I. 1. 4. ACTIVITES VITALES DES GRAINS.....	- 24 -
I. 1. 5 CEREALICULTURE AU MAROC	- 25 -
I.2 FLORE FONGIQUE DU BLE DUR	- 28 -
1.2.1 GENERALITES SUR LES MOISSURES.....	- 28 -
I.2.1.1 Caractères morphologiques des moisissures.....	- 29 -
I.2.1.1.1. Appareil végétatif.....	-30-
I.2.1.1.2. Spores.....	-31-
I.2.1.2 Reproduction des moisissures	- 31 -
I.2.1.3 Identification des moisissures.....	- 32 -
I.2.1.3.1 Méthode classique	- 32 -
	- 7 -

- Critères macroscopiques.....	- 32 -
- Critères microscopiques	- 33 -
I.2.1.3.2 Identification par des outils de biologie moléculaire.....	- 35 -
I.2.1.4 Taxonomie des moisissures.....	- 36 -
I.2.1.5 Moisissures toxigènes.....	- 38 -
I.2.1.5.1 Moisissures productrices de mycotoxines	- 39 -
• Penicillium.....	- 39 -
• Aspergillus.....	- 41 -
• Fusarium.....	- 43 -
• Alternaria.....	- 45 -
I.2. 1.5.2 Contamination du blé par les moisissures toxigènes.....	- 47 -
a) Mycoflore du champ.....	- 47 -
b) Mycoflore intermédiaire	- 48 -
c) Mycoflore de stockage.	- 48 -
I.3 MYCOTOXINES	- 49 -
I.3.1 HISTORIQUE.....	- 50 -
I.3.2 DESCRIPTION DES PRINCIPALES MYCOTOXINES.....	- 51 -
I.3.2.1 Déoxynivalénol (DON).....	- 51 -
I.3.2.2 Ochratoxine A (OTA)	- 55 -
I.3.2.3 Aflatoxines (AFs).....	- 61 -
I.3.2.4 Autres mycotoxines	- 67 -
I.3.3 LES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS.....	- 71 -
• Conditions de contamination.....	- 71 -
• Répartition géographique des principales mycotoxines	- 72 -
• Principales denrées concernées.....	- 72 -
I.3.4 IMPACT ÉCONOMIQUE DE LA CONTAMINATION DES ALIMENTS PAR LES MYCOTOXINES ET RÉPERCUSSION SUR LA SANTÉ HUMAINE	- 75 -
I.3.4.1 Voie de contamination	- 75 -
I.3.4.2 Un impact économique flagrant.....	- 75 -
I.3.4.3 Les risques sanitaires	- 76 -
I.3.4.4 Manifestations cliniques :	- 77 -
I.3.4.4.1 Lésions causées par les mycotoxines.....	- 77 -
I.3.4.4.2 Implication avérée des mycotoxines dans des épidémies humaines ..	- 78 -

I.3.4.4.3 Implication supposée des mycotoxines dans des maladies humaines	- 79 -
I.3.5 CONTROLE ET PREVENTION DES MYCOTOXINES DANS LES GRAINS	- 80 -
I.3.5.1 Norme et législation	- 80 -
I.3.5.2 Lutte contre les moisissures	- 84 -
I.3.5.3 Méthodes de détoxification ou de décontamination des aliments	- 88 -
I.3.6 MYCOTOXINOGENÈSE	- 89 -
I.3.6.1 Facteurs physiques	- 90 -
I.3.6.1.1 Activité de l'eau	- 90 -
I.3.6.1.2 Température	- 91 -
I.3.6.1.3 Lumière	- 91 -
I.3.6.2 Facteurs chimiques	- 92 -
I.3.6.2.1 Acidité du milieu (pH)	- 92 -
I.3.6.2.2 Composition gazeuse	- 92 -
I.3.6.2.3 Nature du substrat	- 92 -
I.3.6.2.4 Traitement chimique du milieu	- 93 -
I.3.6.3 Facteurs biologiques	- 93 -
I.3.6.3.1 Facteurs intrinsèques	- 93 -
I.3.6.3.2 Interactions entre micro-organismes	- 93 -
I.3.6.3.3 Présence d'acariens et insectes	- 93 -
I.3.6.3.4 Pratiques agricoles	- 94 -
CHAPITRE II : Presence du desoxynivalenol dans le ble dur	- 95 -
II. 1. INTRODUCTION	- 96 -
II. 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	- 96 -
II. 2. 1. ECHANTILLONNAGE	- 96 -
II. 2. 2. PRODUITS CHIMIQUES	- 96 -
II. 2. 3. EQUIPEMENTS	- 96 -
II. 2. 4. ANALYSE DU DÉOXYNIVALÉNOL	- 97 -
II. 2. 5. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	- 97 -
II. 2. 6. VALIDATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE	- 97 -
a) Méthode d'analyse du DON et validation de la méthode	- 98 -
II. 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	- 99 -
CHAPITRE III : Isolement et identification des moisissures productrices de mycotoxines dans le blé dur au Maroc	- 103 -

III. 1. INTRODUCTION	- 104 -
III. 2. MATERIEL ET MÉTHODES.....	- 104 -
III. 2. 1 ECHANTILLONNAGE	- 104 -
III. 2. 2. ANALYSE DE LA MYCOFLORE.....	- 104 -
III. 2. 3. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES FONGIQUES	- 105 -
III. 2. 3. 1. Extraction de l'ADN.....	- 105 -
III. 2. 4. CAPACITÉ DE PRODUCTION DES TOXINES OTA ET DON	-108-
III. 2. 4. 1. Production de l'ochratoxine A.....	-108-
III. 2. 4. 2. Production du déoxynivalénol.....	- 108 -
III. 2. 5. Activité de l'eau (aw).....	- 108 -
III. 2. 6. Conditions chromatographiques.....	- 108 -
III. 2. 6. 1. Déoxynivalénol (DON).....	- 108 -
III. 2. 6. 2. Ochratoxine A.....	- 109 -
III. 2. 7. Validation de la méthode analytique	- 109 -
III. 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	- 110 -
III. 3. 1. TRAITEMENT DES DONNÉES DE LA BIODIVERSITÉ FONGIQUE. -	110 -
III. 3. 2. TENEUR EN HUMIDITÉ ET ACTIVITÉ DE L'EAU	112
III.3.3. CAPACITÉ DE PRODUCTION DES MYCOTOXINES ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES DE FUSARIUM ET D'ASPERGILLUS.....	113
III. 4. CONCLUSION.....	117
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120
ANNEXES	14635
ARTICLE 1	146
ARTICLE 2	150

LISTE DES ABREVIATIONS

AF	Aflatoxine
AFB1	Aflatoxine B1
AFM1	Aflatoxine M1
AFs	Aflatoxines totales
aw	Water activity (activité de l'eau)
CIT	Citrinine
CMA	Concentration Maximale Autorisée (ou Admissible).
CYP	Cytocromes P
CYA	Czapek Yeast extract Agar
DAS	Diacétoxyscirpénol
DON	Déoxynivalénol
EC	European Commission
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food and Agriculture Organisation
FB1	Fumonisine B1
FNM	Fédération Nationale de la Minoterie
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
INNORPI	Institut National de la Normalisation et de la Propriété Industrielle
IAC	Colonne d'Immuno-Affinité
IARC	International Agency for Research on Cancer
JECFA	Joint Expert Committee of Food and Additives
LOD	Limit of detection (limite de détection)
LOQ	Limit of quantification (limite de quantification)
MEA	Malt Extract Agar
NG	No Growth (pas de croissance)
OTA	Ochratoxine A
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PDA	Potato Dextrose Agar
PAT	Patuline
PIB	Produit intérieur brut
SAU	Surface agricole utile
T2	Toxine T2
ZEA	Zéaralénone

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Histologie du grain de blé.
- Figure 2** : Superficie de la production céréalière entre 2004 et 2016.
- Figure 3** : Evolution des productions des principales céréales.
- Figure 4** : Chaîne de valeur des céréales locales au Maroc.
- Figure 5** : Schéma du consensus actuel sur la phylogénie fongique.
- Figure 6** : Observation microscopique du mycélium d'un *Penicillium*.
- Figure 7** : Tête aspergillaire portant des conidies d'un *Aspergillus*.
- Figure 8** : Schéma récapitulatif des deux modes de reproduction chez les Ascomycètes.
- Figure 9** : *P. notatum* au microscope électronique.
- Figure 10** : Schéma des différentes dispositions de verticilles chez *Penicillium*.
- Figure 11** : Observation microscopique et schéma d'une tête aspergillaire.
- Figure 12** : Observation microscopique de l'appareil végétatif de *Fusarium verticillioides* (à gauche) et des macroconidies de *Fusarium graminearum* (à droite).
- Figure 13** : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'*Alternaria alternata*.
- Figure 14** : Structure chimique du déoxynivalénol.
- Figure 15** : Structures chimiques des ochratoxines A, B et C.
- Figure 16** : Principaux métabolites de l'ochratoxine.
- Figure 17** : Voies de métabolisation et d'élimination de l'aflatoxine B1.
- Figure 18** : Structure des fumonisines.
- Figure 19** : Structures chimiques de la zéaralénone et de ses principaux métabolites.
- Figure 20** : Structures chimiques de la patuline.
- Figure 21** : Contamination par les moisissures le long de la chaîne alimentaire et des moyens de prévention.
- Figure 22** : Taux de contamination alimentaire par les principales mycotoxines dans différentes régions du monde.
- Figure 23** : Estimation des apports d'AFM1, en nanogrammes, par individu et par an, selon le type de produit laitier consommé.
- Figure 24** : Rotation triennale des cultures.
- Figure 25** : Cycle de vie d'une méthode analytique.
- Figure 26** : Courbe d'étalonnage de la toxine DON pour l'analyse HPLC.
- Figure 27** : Chromatogramme LC de séparation de déoxynivalénol: (a) standard de DON (1000 µg / kg), (b) une contamination de DON (319 µg / kg).

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Toxines sécrétées par les principaux genres de moisissures.
- Tableau 2 :** Taxonomie des moisissures.
- Tableau 3:** Quelques toxines produites par des espèces de *Penicillium*.
- Tableau 4 :** Quelques toxines produites par des espèces d'*Aspergillus*.
- Tableau 5 :** Quelques toxines produites par des espèces de *Fusarium*.
- Tableau 6 :** Quelques toxines produites par des espèces d'*Alternaria*.
- Tableau 7 :** Structures chimiques de quelques TCT.
- Tableau 8 :** Principaux champignons producteurs de TCT.
- Tableau 9 :** Principales aflatoxines.
- Tableau 10 :** Principales fumonisines.
- Tableau 12 :** Modes d'action et manifestation clinique chez l'humain des principales mycotoxines.
- Tableau 13 :** Récapitulatif des signes de la maladie NEB chez l'Homme.
- Tableau 14 :** Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme.
- Tableau 15:** Teneurs maximales ($\mu\text{g/kg}$) en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord.
- Tableau 16 :** Aw minimale et maximale de plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*.
- Tableau 17 :** Températures de croissance de quelques espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.
- Tableau 18 :** Impact de la restriction d' O_2 sur *Fusarium proliferatum* et la production de FB1.
- Tableau 19:** Niveaux de DON dans les échantillons de blé dur du Maroc.
- Tableau 20:** Paires d'amorces utilisées dans l'identification des espèces fongiques.
- Tableau 21 :** Méthodes de performance de détection du DON et d'OTA dans un milieu de culture.
- Tableau 22:** Mycobiotas internes d'échantillons de blé provenant de différentes régions du Maroc.
- Tableau 23:** Activité hydrique des grains de blé marocain.
- Tableau 24:** Identification moléculaire des espèces de *Fusarium* et d'*Aspergillus* présentes dans le blé marocain.
- Tableau 25:** Production de (DON) et (OTA) par les isolats.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Différentes méthodes de réduction de la contamination par des mycotoxines, leurs avantages et inconvénients.

Annexe 2 : Extrait de l'arrêté fixant les limites maximales autorisées des contaminants dans les produits primaires et les produits alimentaires (pages 3 à 6)

Annexe 3 : Voie de synthèse de l'ochratoxine A.

Annexe 4 : Voie de synthèse du déoxynivalénol.

Annexe 5 : Tableau récapitulatif de la contamination des aliments par les moisissures et les mycotoxines ainsi que leur répartition géographique.

Annexe 6 : Préparation des milieux de cultures.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications internationales :

Ennouari, A., Sanchis, V., Marín, S., Rahouti, M. and Zinedine, A. (2013). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. *Food Control*, 32 (1), 115–118.

Ennouari, A., Sanchis, V., Rahouti, M. and Zinedine, A. (2018). Isolation and molecular identification of mycotoxin producing fungi in durum wheat from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.*, 9 (7), 1470-1479.

Communications orales :

Ennouari, A., Sanchis, V., Crespo A., Rahouti, M. and Zinedine, A. Determination of deoxynivalenol mycotoxin and its associated fungi in durum wheat from Morocco. **The second Edition: MICROBIOD 2 «Microbial Technology for Development».** Marrakech, 02-04 Octobre 2012. Morocco.

Ennouari, A., Sanchis, V., Rahouti, M. et Zinedine, A. Presence du déoxynivalénol et des moisissures associées dans le blé dur au Maroc. **Journées Internationales « Substances Naturelles et Développement Durable ».** Rabat, 22 et 23 Juin 2012.

Ennouari, A., Sanchis, V., Rahouti, M. et Zinedine, A. Production des mycotoxines (aflatoxines, déoxynivalénol et ochratoxine A) par les moisissures contaminant le blé dur au Maroc. **1^{ère} Edition du congrès international “Mycotoxines et cancer”.** Marrakech, 24 et 25 Mars 2016. Maroc.

Posters :

Ennouari, A., Crespo-Sempere A., Zinedine, A., Sanchis, V. Occurrence of the toxin deoxynivalenol (DON) and its associated fungi in durum wheat from Morocco. **International MPU Workshop « Plant Protection for the Quality and Safety of the Mediterranean Diet ».** 24, 26 October 2012. Bari, Italie.

Ennouari, A., Sanchis, V., Zinedine, A. et Rahouti, M. Détection, isolement et identification moléculaire de champignons producteurs de déoxynivalénol et de l'ochratoxine A dans le blé dur du Maroc. **Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques.** 26 et 27 avril 2018. Marrakech. Maroc.

Participation :

Participation autant qu'organisateur à la 1^{ère} Edition de la journée nationale organisée par la **Société Marocaine de Mycotoxicologie** sous le thème « **MYCOTOXINES ET SÉCURITÉ SANITAIRE DES PRODUITS ALIMENTAIRES** ». 15 décembre 2012. Rabat. Maroc.

INTRODUCTION GENERALE

L'Etre humain s'alimente de nourriture d'origine végétale ou animale, crue ou cuite dont il peut s'en procurer dans son environnement et prise directement de la nature ou transformée par l'industrie alimentaire. Tous ces aliments risquent de devenir de véritables vecteurs de maladies lorsqu'ils renferment des substances chimiques toxiques (métaux lourds, toxines bactériennes ou fongiques, hydrocarbures, pesticides, ...) ou des agents pathogènes biologiques (virus, bactéries, champignons). Ces états pathologiques sont presque toujours en rapport avec des contaminations diverses qui relèvent d'un manque d'hygiène, d'erreurs grossières de préparation ou de conservation des aliments et l'absence de la maîtrise des bonnes pratiques d'agriculture, de fabrication, de stockage et de distribution.

Les répercussions sur la santé humaine et l'économie qui résultent de la dégradation de la qualité nutritionnelle et hygiénique des produits alimentaires sont énormes à l'échelle mondiale. L'enjeu actuel de prévenir la contamination des denrées alimentaires par tout agent pathogène devient de plus en plus une nécessité de premier ordre. Vu le progrès industriel, économique et social que le monde a connu durant les deux derniers siècles et l'accroissement remarquable de la production et de la circulation des aliments et ce afin de satisfaire les besoins nutritionnels de la population mondiale.

Les céréales sont des aliments de base de l'alimentation humaine et animale. Au Maroc, le grain le plus important est le grain de blé.

Les aspects qualitatifs et sanitaires sont très importants. Un des critères importants de la qualité sanitaire des céréales est la contamination par les mycotoxines. La présence de moisissures et de toxines dans les aliments est devenue un sujet de préoccupation pour les professionnels de la santé, ainsi que pour le commerce mondial.

Les mycotoxines sont des molécules toxiques issues du métabolisme secondaire de certaines espèces de moisissures qui se développent sur un aliment. Si la toxine est en quantité suffisante dans l'aliment, elle peut provoquer une intoxication chez le consommateur. Une intoxication aiguë est la conséquence d'une ingestion massive de la toxine ; elle peut aboutir à la mort après diverses manifestations (nausées, léthargie, ...). L'intoxication chronique, en revanche, se produit à long terme et se traduit, par exemple pour les aflatoxines, par des infiltrations graisseuses et est à l'origine de cancers (ANSES, 2018).

Un grand nombre d'espèces de moisissures appartenant principalement à trois genres très communs *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, présents dans l'air ambiant, le sol, sur les cultures sont capables, en se développant par exemple sur certains substrats tels que l'arachide, le café, le raisin, les céréales et leurs dérivés de synthétiser et d'excréter des mycotoxines. Les mycotoxines les plus couramment rencontrées, et faisant l'objet d'une surveillance régulière, sont les aflatoxines et les ochratoxines.

La mycotoxinogénèse (la condition de synthèse et d'excrétion des mycotoxines) est un phénomène d'une grande complexité. Les conditions optimales de la toxinogénèse dépendent d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. La plupart des moisissures se développent entre 15 et 30°C.

Dans le cadre de la production d'aliment de bétail, les céréales (blé, orge, maïs, seigle, ...) sont collectées et entreposées dans un bâtiment de stockage dédié. Lors de leurs récoltes, les blés

sont analysés pour déterminer leurs caractéristiques nutritionnelles. En fonction des résultats d'analyse, la minoterie peut valoriser des blés en blé panifiable, utilisés en meunerie pour la production de farine ; ou au contraire, elle peut les déclasser en blés fourragers qui seront utilisés pour la fabrication d'aliments pour bétail. Le taux d'incorporation des céréales dans les aliments pour animaux varient en fonction de l'espèce à laquelle est destiné l'aliment, et en fonction des objectifs de l'éleveur et de sa production (engraissement, production de lait, production d'œuf). La présence de moisissures dans les céréales doit nous alerter et provoquer une surveillance des céréales. Néanmoins, il faut savoir que la présence de moisissures ne révèle pas la présence ni l'absence de mycotoxines. En effet, une toxine peut persister dans un milieu alors qu'une moisissure ne persiste pas forcément (WHO, 2018).

De nos jours, les mycotoxines sont présentes dans tout un ensemble de produits alimentaires. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime qu'environ un quart de la production mondiale est contaminée, représentant ainsi une perte économique de 5 à 10 %. Outre l'impact économique, les mycotoxines posent un réel problème de santé publique. Leur contact peut donner lieu à des intoxications aiguës ou chroniques, ces dernières étant plus fréquentes. Cancérogénèse, immunotoxicité, néphrotoxicité, hépatotoxicité et neurotoxicité forment la palette des effets néfastes des toxines fongiques.

La gestion du risque passe donc par la prévention de la contamination des matières premières, le respect des bonnes pratiques de culture et de stockage, ainsi que la mise en place d'une réglementation fixant des concentrations maximales admissibles dans les denrées alimentaires. Pour établir un plan d'action efficace et cohérent dans le but de limiter la contamination par les mycotoxines, il faut également inclure l'aspect budgétaire.

Il est important également de noter que toutes les méthodes de gestion de contamination ne peuvent pas être utilisées au même moment. Les méthodes seront présentées en fonction de moments de la vie des céréales. En tenant compte de ces différents aspects, un plan d'action adaptatif et évolutif a été proposé à la minoterie pour réduire et maîtriser le risque mycotoxine et maintenir les coûts.

Les différentes méthodes de gestion sont : (voir Annexe 1).

- Maîtrise des matières premières lors de la croissance et au moment de la récolte et du stockage ;
- Sélection, contrôle et dilution des matières premières selon l'espèce ;
- Utilisation de levures, d'argile et de biocapteurs.

La modélisation de la croissance des moisissures et l'étude de la production des mycotoxines sous l'influence des facteurs écologiques est une étape essentielle qui nous permet de comprendre ces microorganismes, de prédire et d'anticiper les niveaux finaux de contamination par les moisissures et les mycotoxines et de déterminer les conditions de stockage et la durée de conservation. La mycologie prédictive est un outil très utile pour la prise de décision et la mise en place des solutions pertinentes afin de prévenir les risques pour la santé humaine et animale.

Afin d'établir des méthodes de prévention et de minimisation de la contamination des céréales au Maroc, une détermination de l'occurrence des mycotoxines ainsi que celle des champignons toxigènes dans le blé suivi d'une détermination des profils écophysiologiques des souches toxigènes doivent être réalisées.

Dans le cadre de cette thèse, et afin de répondre à certaines des questions importantes, nous avons réalisé les travaux suivants :

-Étude de l'incidence du déoxynivalénol, de l'ochratoxine A dans le blé commercialisé au Maroc.

-Étude de la composition de la flore fongique du blé et de la capacité de produire les mycotoxines à partir des isolats appartenant aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* section *Nigri*.

-Utilisation de la technique de biologie moléculaire pour l'identification des souches isolées.

Ce travail bibliographique et expérimental a pour but de décrire et d'étudier les mycotoxines présentes dans le blé dur marocain en montrant leur composition, leurs effets les plus délétères ainsi que leur impact sur l'industrie agro-alimentaire et sur la santé humaine.

Cette thèse comporte quatre chapitres ; dans le premier nous nous intéresserons aux moisissures et au grain de blé (taxonomie, composition chimique, ...), pour le deuxième nous traiterons l'histoire des mycotoxines, leurs normes législatives ainsi que leurs impacts économiques. Dans le troisième chapitre, nous présenterons la mycotoxinogenèse et les champignons toxinogènes ; enfin nous terminerons par la partie expérimentale qui consiste à étudier la présence de deux mycotoxines, le déoxynivalénol et l'ochratoxine A, dans le blé dur et d'identifier les moisissures produisant ces deux toxines.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 GENERALITES SUR LE BLE

I. 1. 1 DESCRIPTION ET TAXONOMIE DU BLE

Le blé est la céréale la plus cultivée ; en effet selon la FAO (2018), la production mondiale des céréales est estimée à 744 millions de tonnes en 2018. Cette céréale est la deuxième plus consommée aujourd'hui dans le monde. Domestiqué au Proche Orient à partir d'une graminée sauvage il y a environ 10 000 ans. La production mondiale, en progression, et les échanges qui se multiplient entre les régions du monde font de cette céréale l'un des principaux acteurs de l'économie mondiale et justifient les nombreux travaux qui lui sont consacrés. Le système agricole marocain dominant est caractérisé par le triptyque céréales/élevage/olivier. Concernant les céréales, la superficie cultivée pour le blé dur est de 800 000 ha et pour le blé tendre elle est de 2 000 000 ha (2013/2014). Concernant la production du Maroc, les chiffres de la même année sont de 15 000 000 qx blé dur et de 40 000 000 qx pour le blé tendre (Agriculture. gov. ma, 2018).

Le blé est une plante annuelle appartenant à la famille des Graminées ou Poacées qui s'adapte à des sols et des climats variés (Fredot, 2012). La classification botanique de cette plante est donnée selon la classification APG IV (2016) comme suit :

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous/Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
Tribu	Triticées
Genre	<i>Triticum</i>

Deux espèces de blé sont connues :

- Le blé dur (*Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn.) présente un génome tétraploïde (génome AA BB) constitué de 7 paires de chromosomes homologues, soit un total de 28 chromosomes ($2n = 28$).
- Le blé tendre ou blé commun (*Triticum aestivum* L.) est hexaploïde (génome AA BB DD) avec un total de 42 chromosomes (El Khilifi *et al.*, 2003).

I. 1. 1. 1 Blé tendre

C'est un blé destiné à l'industrie de la meunerie et permet d'obtenir une farine de bonne qualité, dotée d'une aptitude pour la panification et contenant environ 8 à 10 % de gluten (Fredot, 2012).

I. 1. 1. 2 Blé dur

Il est de forme effilée, une teneur protéique plus importante ainsi qu'un albumen de consistance cornée plus difficile à réduire en farine. Ce dernier est aussi plus riche en gluten, en lipides, en minéraux et en vitamines (Fredot, 2012). Le blé dur est considéré comme étant le principal apport énergétique (Hamroun, 2013). Il est principalement utilisé pour la fabrication des semoules, celles-ci sont utilisées dans la fabrication des pâtes alimentaires sèches et du couscous (ANSES, 2012).

I. 1. 2. GRAIN DE BLE

I.1.2.1. Constitution histologique du grain

Le grain de blé est constitué de trois grandes parties : le germe, l'albumen et les enveloppes (figure 1).

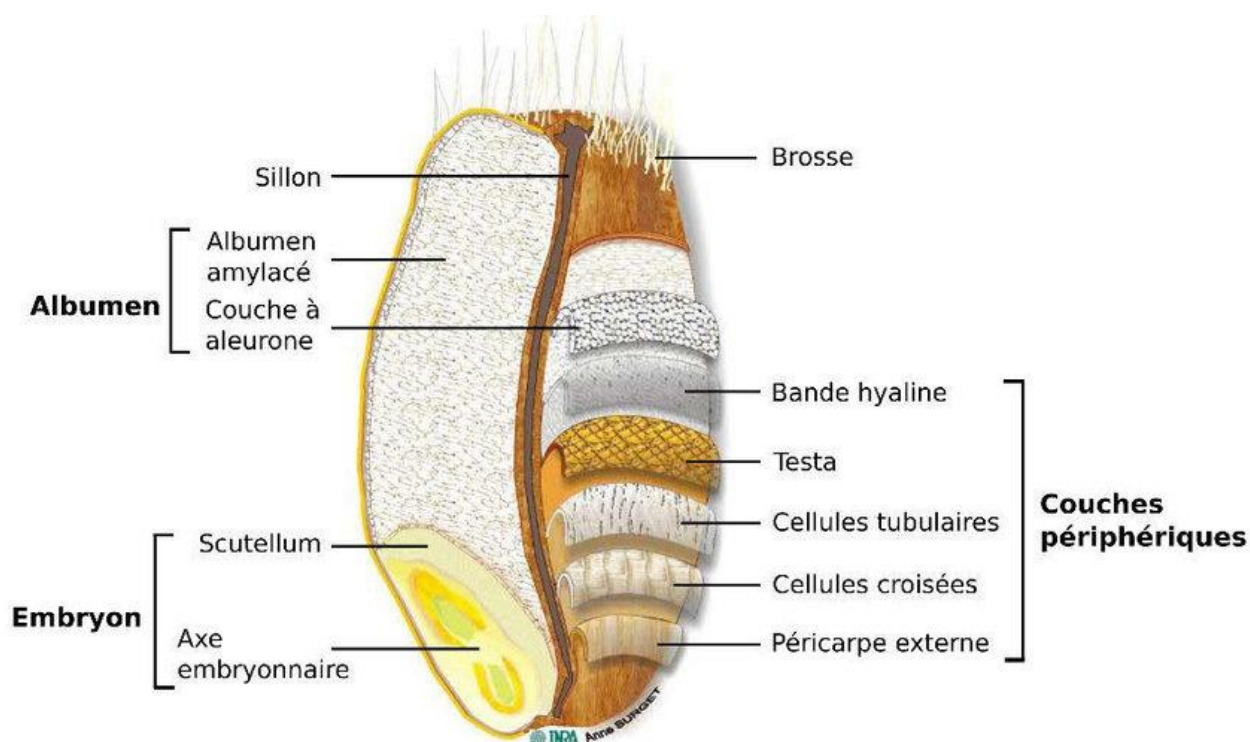


Figure 1 : Histologie du grain de blé (Surget et Barron, 2005).

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

I.1.2.1.1. Enveloppes et couche à aleurone

Les enveloppes sont constituées de quatre tissus : le péricarpe externe, le péricarpe interne, la testa et la couche nucellaire ou bande hyaline (qui correspond à l'épiderme du nucelle). Ces enveloppes et la couche à aleurone sont composées principalement de polysaccharides (arabinoxylanes, xyloglucanes et cellulose) mais aussi d'acides phénoliques, lignine et de protéines (principalement albumines globulines localisées dans la couche à aleurone). Le péricarpe externe d'une épaisseur de 15-30µm correspond à l'épicarpe. Il est constitué de deux tissus composés de cellules mortes : l'épiderme et l'hypoderme (Pommerez, 1988 ; Suret et Baron, 2005). Le péricarpe interne correspond à l'endocarpe et au mésocarpe, respectivement constitués de cellules tubulaires et de cellules croisées.

Les cellules croisées sont perpendiculaires à l'axe longitudinal du grain tandis que les cellules tubulaires lui sont parallèles. Les cellules croisées sont de tailles variables mesurant en moyenne 150 µm de longueur sur 20 µm de largeur. Chez le blé, la continuité entre les cellules croisées et le péricarpe externe est interrompue au niveau de l'arête dorsale du grain du fait de l'autolyse des cellules parachymenteuses lors de la maturation. Le péricarpe permet d'éviter les pertes d'eau durant le développement du grain mais n'empêche pas sa pénétration (Evers *et al.*, 1999). Les cellules mortes du péricarpe sont capables de retenir l'eau et d'augmenter le poids du grain de 4-5% après seulement quelques minutes d'imbibition (Hinton, 1955). La testa correspond au spermodermes ; sa face interne repose sur la cuticule de la couche hyaline. Les axes des cellules de ces deux couches sont perpendiculaires ; l'un parallèle au sillon, l'autre perpendiculaire à celui-ci (Evers et Bechtel, 1988). La testa est décrite comme très hydrophobe. La couche nucellaire ou bande hyaline correspond au périsperme. Son épaisseur est d'environ 20 µm. Elle est constituée d'une assise cellulaire tassée due au remplissage de l'albumen amylicé et au développement de l'embryon (Fulcher et Wong, 1980). Elle est composée de cellules de taille comprise entre 30 et 200 µm de longueur et 15 à 40 µm de largeur. Cette couche est tapissée d'une fine cuticule qui la relie à la couche à aleurone aussi appelée couche du lysat nucellaire. Cette bande hyaline est très hydrophobe et semble avoir un rôle important dans la circulation de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la graine. Une seule couche à aleurone entoure l'albumen amylicé chez le blé. Elle est, avec le germe, la seule partie du grain constituée de cellules vivantes. Les cellules de la couche à aleurone sont de forme polygonale et mesurent approximativement 65 µm. Elles possèdent de gros noyaux, des parois épaisses (jusqu'à 8 µm) et sont riches en vitamines (B1, B2, B3, B6, B9 et E) et en minéraux (P, K, Mg, Mn et Fe) (Pomeranz, 1988 ; Antoine *et al.*, 2002 ; McKevith, 2004). La couche à aleurone par sa richesse en métabolites a un rôle nourricier et par sa structure a un rôle de protection (Evers *et al.*, 1999).

I.1.2.1.2. Germe

Le germe provient de la fusion des gamètes mâles et femelles. Il est constitué d'une part, de l'axe embryonnaire qui donnera la tigelle, la mésocotyle et la radicule et d'autre part du scutellum qui donnera le cotylédon (Evers et Millar, 2002 ; Surget et Barron, 2005). Le germe est la partie du grain où le taux d'humidité et la concentration en lipides sont les plus importantes (Pomeranz, 1988). Les protéines dans le germe sont des albumines et globulines et représentent environ 35% de la matière sèche.

I.1.2.1.3. Albumen

L'albumen constitue le plus important compartiment du grain et représente environ 80% de son poids (Pomeranz, 1988). Il correspond au tissu de réserve. L'albumen amylicé est essentiellement constitué des granules d'amidon enchâssés dans une matrice protéique composée en grande partie de prolamines (gliadines, gluténines de hauts et faibles poids moléculaires) mais aussi d'albumines et de globulines. Ces deux familles protéiques, gluténines et gliadines, sont hydrolysées lors de la germination et du développement de la plantule par les enzymes produites dans l'embryon et la couche à aleurone. Elles constituent la source d'acides aminés nécessaires à la germination de la graine. Les cellules de l'albumen amylicé possèdent des parois fines et peuvent être classées en trois grands groupes (Evers et Millar, 2002) :

- Les cellules périphériques situées sous la couche à aleurone et mesurant 60 µm,
- Les cellules prismatiques situées sous les cellules périphériques qui mesurent entre 128-200 µm de long et 40-60 µm de large,
- Les cellules situées dans la partie centrale de l'albumen qui sont de forme arrondie ou polygonale mesurant entre 72-144 µm de long et 69-120 µm de large.

L'albumen est la partie du grain qui présente le plus de protéines de réserve qui ont de l'intérêt pour l'utilisation humaine.

I. 1. 3 COMPOSITION CHIMIQUE DES GRAINS

Le grain est composé de matières minérales et de matières organiques, on retrouve :

- Glucides

Principalement constitué d'amidon, qui est un glucide complexe, environ 70% (Feillet, 2000) et d'autres glucides simples comme le glucose, le fructose, le saccharose et le raffinose (Fredot, 2009). La cellulose qui entre dans la composition du péricarpe est un glucide complexe, difficilement digestible par les monogastriques (FAO, 2018).

- Protéines

Contient entre 10 et 15% de protéines selon la variété, elles sont divisées en deux types, protéines de structure et de fonction (Battais *et al.*, 2007).

La teneur en protéines des céréales et des protéagineux varie suivant les espèces, elle est en moyenne de 12 % pour le blé et 11 % pour l'orge. Certains acides aminés, telle la lysine, sont indispensables pour l'alimentation animale (FAO, 2018).

- Lipides

Ce sont les matières grasses. Dans les céréales, elles sont fortement concentrées dans le germe et l'assise protéique. Le blé en contient 1 à 2 % (Fredot, 2012 ; FAO, 2018).

- Eau

Le grain du blé mûr est constitué de 13,5% d'eau, cette faible teneur lui permet d'être stocké longtemps en évitant le développement de micro-organismes en particulier les moisissures (Feillet, 2000). L'eau est toujours présente dans le grain, à une teneur plus ou moins grande. Du point de vue chimique et physique, son action solvante favorise les réactions enzymatiques et les attaques microbiennes lorsque sa teneur dans le grain dépasse un certain seuil. Le rôle de l'eau et les problèmes qu'elle engendre pour la conservation sont étudiés plus loin (FAO, 2018).

- Minéraux

Ils sont présents dans les grains en faible quantité. Les principaux sont le phosphore, le potassium, le manganèse et le cuivre ; ils sont souvent associés ou présents sous forme de sels tels que les phosphates, chlorures ou sulfates (Berhaut *et al.*, 2003).

- Vitamines et pigments

Les vitamines sont des substances chimiques complexes jouant un rôle important dans la nutrition. Dans le grain, elles sont concentrées au niveau du péricarpe et du germe et des enveloppes à des teneurs très faibles (FAO, 2018). Les pigments sont spécifiques à chaque espèce et même à chaque variété. Ils sont parfois associés à des vitamines (pigments caroténoïdes).

I. 1. 4. ACTIVITES VITALES DES GRAINS

- ✓ Respiration

Le grain est un organisme vivant qui respire entraînant ainsi un dégagement de gaz carbonique, d'eau et de chaleur (Feillet, 2000). Avec ses réactions d'oxydation, la respiration a toujours lieu quelles que soient les conditions de stockage, que les grains aient ou non leur faculté germinative intacte. L'intensité du phénomène est fonction de la température et de l'humidité du grain ainsi que la quantité d'oxygène présente dans la cellule de stockage (Berhaut *et al.*, 2003). La chaleur dégagée par cette respiration va accélérer les autres manifestations vitales du grain comme la respiration anaérobie et, notamment, la germination (Feillet, 2000).

- ✓ Fermentation

En absence d'oxygène, le grain évolue quand même, ce sont alors des fermentations qui se mettent en place. Sous l'action de certaines bactéries, les sucres sont transformés en gaz carbonique et en alcool avec un léger dégagement de chaleur (Berhaut *et al.*, 2003). En anaérobiose, une déviation du métabolisme conduit à des réactions intracellulaires produisant une odeur caractéristique de fermentation alcoolique (Feillet, 2000).

- ✓ Germination

La germination est l'aboutissement naturel de l'activité vitale du grain en présence d'oxygène et dans des conditions optimales d'humidité et de température. Au stockage, lorsqu'une masse de grain humide (18% et plus) est mal refroidie, le processus de germination peut se déclencher avec ou sans signe visible extérieurement (Berhaut *et al.*, 2003).

I.1.5 CEREALICULTURE AU MAROC

La filière céréalière constitue l'ossature de l'agriculture nationale et occupe une place déterminante dans l'économie agricole et ce, à plusieurs niveaux :

- Importance agronomique et économique majeure, selon le rapport annuel de la Fédération Nationale de la Minoterie (FNM) en 2012 :

- ✓ 75 % de la superficie agricole utile (hors jachère) ;
- ✓ 10-20 % du PIB agricole avec de fortes fluctuations en fonction de la pluviométrie ;
- ✓ Environ 70 % des importations agricoles (près de 8 milliards de dirhams), ce qui aggrave le déficit de la balance commerciale.

- Poids social majeur pour un tissu de producteurs fragiles : culture prédominante pour la quasi-totalité des exploitations agricoles.

- Importance primordiale dans la consommation :

- ✓ Consommation humaine très élevée avec une autoconsommation atteignant près de 30% des volumes produits ;
- ✓ Forte contribution dans la consommation animale (orge, maïs, paille, chaume, sous-produits de la transformation des céréales, ...) engendrant des interdépendances très marquées entre les cultures céréalières et l'élevage (MAPMDREF, 2018).

La superficie réservée à la céréaliculture au Maroc totalise plus de 5 millions d'hectares, soit plus de 75% de la surface agricole utile (SAU) totale. Le blé dur, le blé tendre et l'orge représentent respectivement 33%, 35%, 32% de la SAU totale céréalière (figure 2). Par ailleurs, la majorité des superficies céréalières (90%) est localisée au niveau des zones Bour avec 50% dans les régions arides et semi-arides (MAPMDREF, 2018)

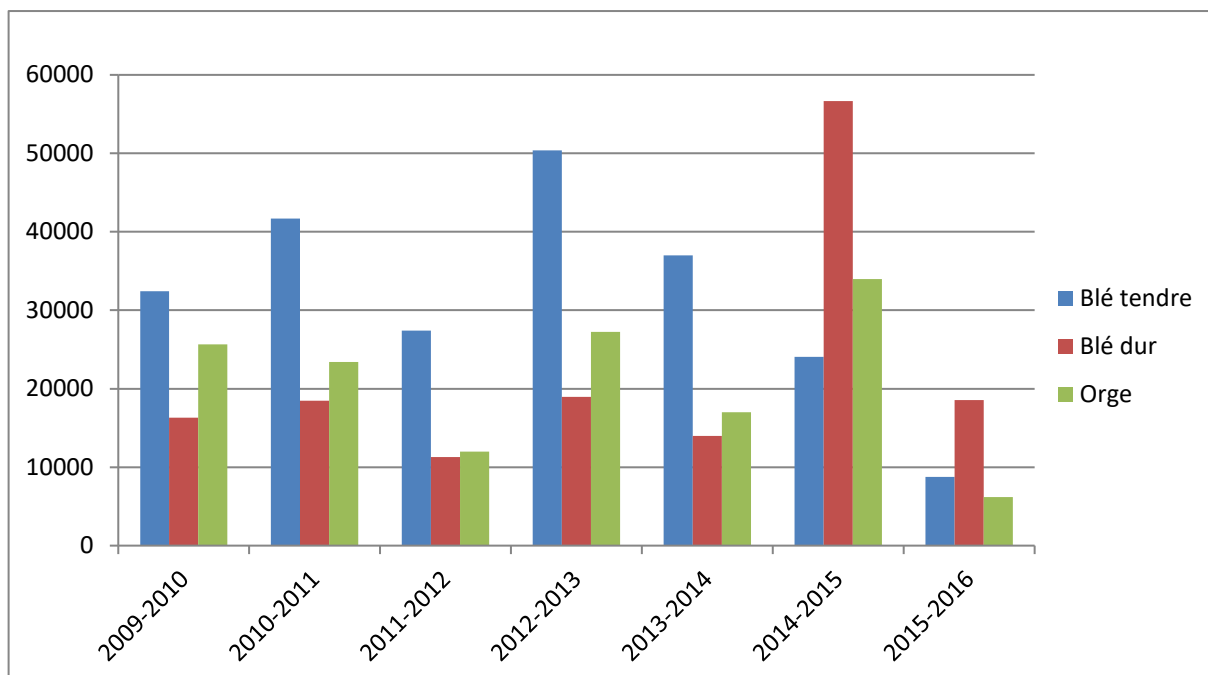


Figure 2 : Superficie en hectares de la production céréalière entre 2009 et 2016 (MAPMDREF, 2018).

D'après la figure 3, la production totale des trois principales céréales au titre de la production céréalière se situe entre 50 et 100 millions de quintaux en fonction des conditions climatiques. La campagne agricole 2015-2016 s'est établie à 35 millions de quintaux. Le blé tendre est la céréale dominante en occupant plus de la moitié de la production, suivi de l'orge (24%) et du blé dur (22%) (MAPMDREF, 2018).



Figure 3 : Évolution des productions des principales céréales (MAPMDREF, 2018)

Le Maroc a mis en exergue l'importance socio-économique de cette filière. Avec une superficie de 5,3 millions d'hectares, il produit, en moyenne, 50 millions de quintaux par an. La contribution au PIB agricole est située entre 10 et 20%. Les 1,4 millions d'exploitations agricoles

nationales génèrent un chiffre d'affaire de 15 milliards de dirhams. Chaque année, le Maroc importe des céréales à hauteur de 6 milliards de dirhams.

Le tissu industriel de la filière céréalière est composé de 211 unités réparties comme suit :

- 134 minoteries industrielles de blé tendre,
- 58 semouleries de blé dur,
- 19 forgeries,
- 10 000 unités artisanales (35% des écrasements nationaux).

Selon les objectifs du plan Maroc vert à l'horizon 2020, le Maroc a pour projet d'avoir une superficie de culture céréalière d'environ 4,2 millions d'hectares, une production de 7 millions de tonnes et de diminuer l'importation de 20 % dans le but de faire un chiffre d'affaire 20 milliards dh.

La chaîne logistique des céréales peut être schématisée comme suit :

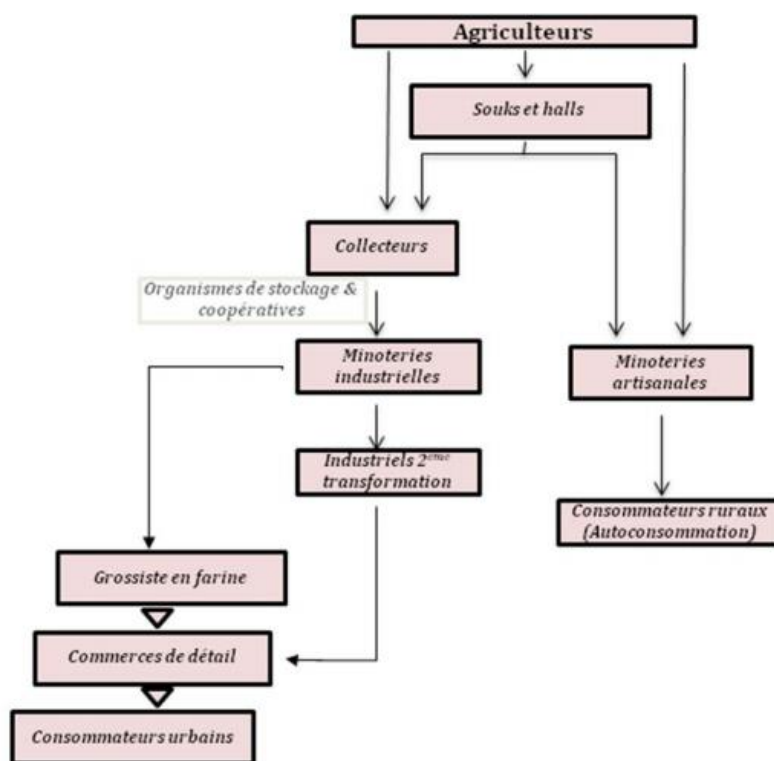


Figure 4 : Chaîne de valeur des céréales locales au Maroc (MAPMDREF, 2018).

La consommation moyenne des céréales au Maroc, en kg par an et par habitant, est de près de 200 kg, sachant que la moyenne mondiale se situe à environ 152 kg/an/habitant. Le blé tendre représente, à lui seul, 70% de la consommation des céréales en milieu urbain et 66% en milieu rural. Quant à la consommation de blé dur, elle est principalement issue de l'industrie pour le milieu urbain, tandis que pour le milieu rural, les ménages consomment le blé dur produit localement. L'orge et le maïs sont utilisés principalement comme aliment du bétail, leur consommation humaine

est devenue marginale et en particulier en milieu urbain. Selon les prévisions du Ministère de l'Agriculture de l'année 2014 (MAPMDREF, 2014), la demande locale pour les céréales pourrait atteindre, à l'horizon 2020, 137,5 millions de quintaux et se répartit à raison de 64% pour la consommation humaine, 30% pour la consommation animale et 6% pour les semences. Les demandes en blé tendre et en blé dur seraient respectivement de 33 et 23% de la consommation locale projetée (FNM, 2010). Il est à noter qu'on dispose de peu d'informations quantitatives concernant la consommation animale en céréales au Maroc.

I.2 FLORE FONGIQUE DU BLE DUR

1.2.1 GENERALITES SUR LES MOISSURES

Les moisissures sont largement répandues dans la nature, et peuvent être observées à divers endroits (atmosphère, sol, eau, végétaux et déchets organiques, etc.), et tout particulièrement sur les denrées alimentaires entreposées, stockées depuis un certain temps (pain rassis, fromage ou fruits) (Berthier et Valla, 2002 ; Marie *et al.*, 2002 ; Tabuc, 2007).

Le terme «moisissure» est communément utilisé pour désigner tout micro-organisme fongique saprophyte appartenant aussi bien aux champignons supérieurs (Ascomycètes, Basidiomycètes et Hyphomycètes) qu'aux champignons inférieurs à hyphes coenocytiques (Zygomycètes) (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Reboux et Millon, 2008). Ce sont des champignons microscopiques, eucaryotes, hétérotrophes dont les aliments sont généralement des substrats très favorables à leur développement (Cahagnier, 1998).

Le nombre d'espèces fongiques décrites jusqu'à présent est de 120 000 espèces environ. Elles sont omniprésentes dans notre environnement. La plupart sont phytopathogènes et se développent en saprophyte dans la terre et sur les plantes ou les débris végétaux en voie de putréfaction, elles se retrouvent aussi bien dans l'air que sur le sol et les surfaces, dans l'alimentation et parfois dans l'eau (Mathew *et al.*, 2011). Elles se rencontrent également sur les produits d'origine animale et les déjections des animaux herbivores (Delarras, 2007). Elles sont également considérées comme des formes imparfaites d'agents pathogènes entraînant mycoses et allergies (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les moisissures saprophytes contaminent les aliments et les dégradent de point de vue qualitatif. Les espèces pouvant contaminer les aliments sont très nombreuses, se retrouvent aussi bien sous forme végétative que sous leur forme sexuée, ces dernières étant particulièrement aptes à la survie (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005). Ces spores sont issues d'un mécanisme de reproduction sexuée ou asexuée. Les micromycètes peuvent être bénéfiques et prendre part à la transformation de matières premières alimentaires (notamment lors de la fermentation), dans la production d'enzymes, de protéines, ou encore d'agents aromatiques). Ils peuvent aussi être utilisés dans la production de médicaments comme les antibiotiques, les immunosuppresseurs ou les anticorps monoclonaux. Cependant, une souche employée à ces fins n'est pas nécessairement atoxique mais peut se révéler délétère dans certaines conditions (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

1.2.1.1 Caractères morphologiques des moisissures

Les mycètes sont des organismes eucaryotes, uni-ou pluricellulaires, comprenant des espèces microscopiques (ou moisissures) et des espèces macroscopiques (champignons supérieurs). Les micromycètes représentent entre 20 000 et 50 000 espèces de la mycoflore. Ils sont constitués de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser divers substrats. Ils sont ubiquitaires et hétérotrophes.

Les mycotoxines sont principalement synthétisées par cinq genres toxigènes de champignons microscopiques : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Fusarium* et *Alternaria* (Miller, 1994 ; tableau 1).

Tableau 1 : Toxines sécrétées par les principaux genres de moisissures (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Micromycètes	Toxines
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines, Ochratoxine A, Stérigmatocystine
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes, Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine
<i>Penicillium</i>	Citrinine, Patuline, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, Ochratoxine A
<i>Alternaria</i>	Acide ténuazonique, Alternariol
<i>Claviceps</i>	Paspalinine, Alcaloïdes de l'ergotamine, Alcaloïdes de la clavine

Les champignons sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle et vivent alors en saprophytes, parasites ou symbiotes. Traditionnellement, on croyait que les champignons étaient étroitement liés aux plantes; cependant, des études phylogénétiques récentes ont montré que les champignons sont plus étroitement liés aux animaux que les plantes. Le nombre exact d'espèces fongiques est inconnu, mais il est estimé à 1,5 million d'espèces.

Les analyses phylogénétiques initiales d'espèces fongiques avaient révélé quatre embranchements distincts dans le Règne fongique: les Ascomycota, les Basidiomycota, les Chytridiomycota et les Zygomycota. Des espèces divergentes précoces ont été trouvées dans les embranchements des Chytridiomycota et des Zygomycota. Des analyses phylogénétiques plus récentes ont suggéré que ni les Chytridiomycota ni les Zygomycota ne sont monophylétiques. Les espèces monophylétiques sont issues d'un ancêtre évolutif commun et ne sont partagées avec aucun autre groupe. Des études récentes suggèrent qu'il existe actuellement six embranchements fongiques et quatre sous-embranchements supplémentaires qui ne sont pas encore placés (figure 5) (Kavanagh, 2017).

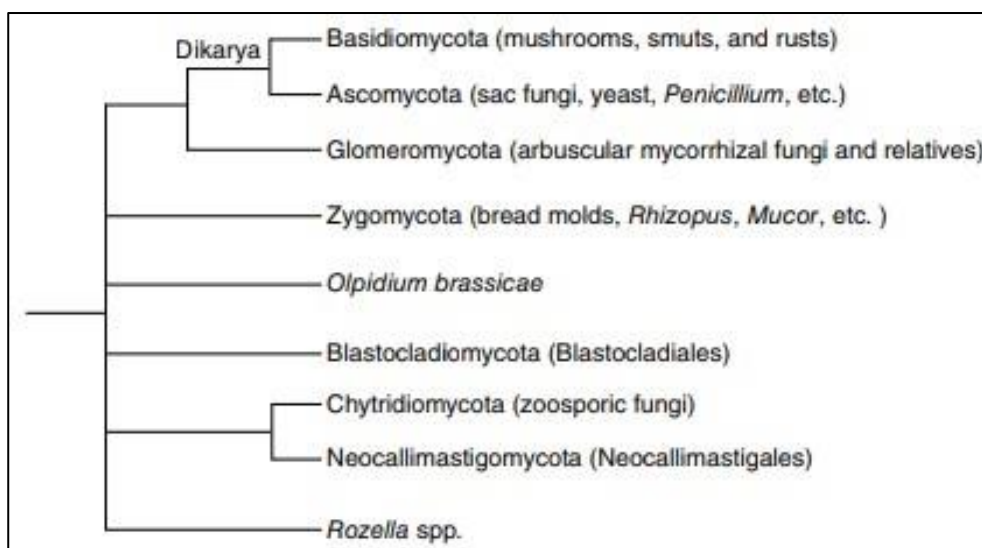


Figure 5 : Schéma du consensus actuel sur la phylogénie fongique (Kavanagh, 2017)

I.2.1.1.1. Appareil végétatif

Tous les champignons sont des organismes eucaryotes ; leur paroi cellulaire est épaisse et contient généralement un polysaccharide azoté souple et résistant : la chitine. Les mycètes possèdent un appareil végétatif constitué souvent de filaments regroupés en thalle filamenteux appelé mycélium (figure 6). C'est grâce à ce mycélium que le champignon peut se fixer sur un substrat et y proliférer (Botton *et al.*, 1990). Sa croissance est apicale, elle se fait par allongement du filament à son extrémité.

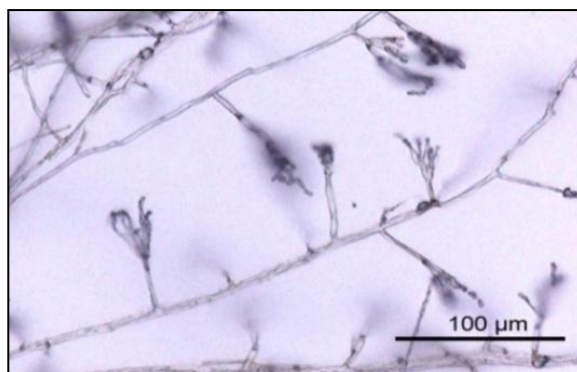


Figure 6 : Observation microscopique du mycélium d'un *Penicillium* (Istockphoto, 2018).

Le thalle peut être siphonné ou cloisonné :

-Thalle siphonné : les filaments constituant le mycélium sont non cloisonnés. Ce type de thalle est caractéristique des champignons appartenant aux Zygomycètes.

-Thalle cloisonné ou septé : les cellules du thalle sont séparées par des cloisons. Il peut y avoir soit un noyau par cellule soit plusieurs, dans ce cas on parle d'article et non de cellule. Ce système est spécifique des Deutéromycètes et des champignons supérieurs appartenant aux Ascomycètes et aux Basidiomycètes (Badillet *et al.*, 1987).

I.2.1.1.2. Spores

Les spores peuvent être constituées d'une ou plusieurs cellules. Elles participent au cycle de vie du champignon à travers les différents modes de reproduction (sexuée ou asexuée). Ce sont les unités de dissémination du champignon. Les spores issues de la reproduction asexuée peuvent être de deux types :

-**Les spores asexuées endogènes** sont produites à l'intérieur des sporocystes, sortes de sacs fermés et portés par les sporocystophores. À maturité, les sporocystes se déchirent, libérant ainsi les endospores. Ces spores sont spécifiques des champignons inférieurs, tels que les Mucorales.

-**Les spores asexuées exogènes**, autrement nommées conidies (figure 7), sont produites par bourgeonnement à partir de cellules spécialisées en forme de bouteille : les phialides. Ces phialides sont portées par des organes appelés conidiophores. Les conidies sont caractéristiques des formes anamorphes des mycètes. Au niveau génétique, les conidies sont haploïdes (Badillet *et al.*, 1987).

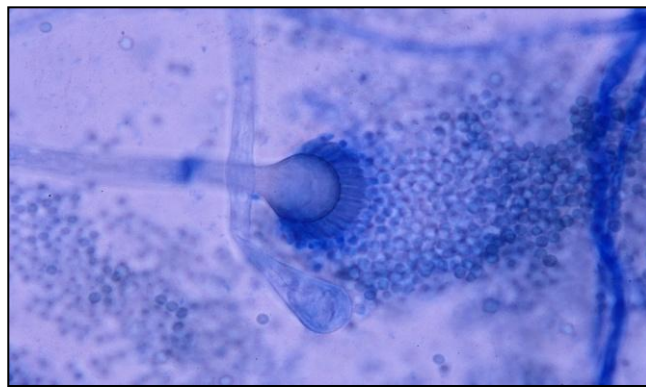


Figure 7 : Tête aspergillaire portant des conidies d'un *Aspergillus* (Flickr, 2018).

La dissémination des spores se produit soit par expulsion des organes qui les contiennent soit par chute au sol, sous l'effet de la gravité. D'autres sont dispersées grâce au vent ou aux insectes. Ces spores peuvent subsister plusieurs mois et années dans l'environnement. L'air ambiant contient toujours des spores en suspension, en quantité plus ou moins importante selon la saison. Les espèces les plus présentes dans l'air ambiant appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Alternaria* (Badillet *et al.*, 1987).

1.2.1.2 Reproduction des moisissures

Pour un même champignon, selon ses conditions de vie, deux types de processus peuvent être à l'origine de la production des spores :

✓ **La reproduction sexuée :**

Elle concerne les champignons téléomorphes, ou formes parfaites. Les gamètes mâles et femelles sont produits par des organes différenciés et spécialisés, appelés gamétocystes. Il y a par la suite fusion des gamètes, puis caryogamie, permettant l'obtention d'une cellule œuf diploïde contenant un nombre pair de chromosomes. Ce zygote va se diviser par méiose et donner des spores haploïdes, ne possédant qu'un seul exemplaire de chromosomes (Bouchet *et al.*, 2005).

✓ La reproduction asexuée :

Ce type de reproduction concerne les formes imparfaites, ou anamorphes (Deuteromycota). En général, elle se manifeste lorsque les conditions de vie sont difficiles (hiver, sécheresse). Le noyau des spores est issu directement du noyau du thalle par simple mitose. Les cellules obtenues sont identiques aux cellules-mères haploïdes (figure 8).

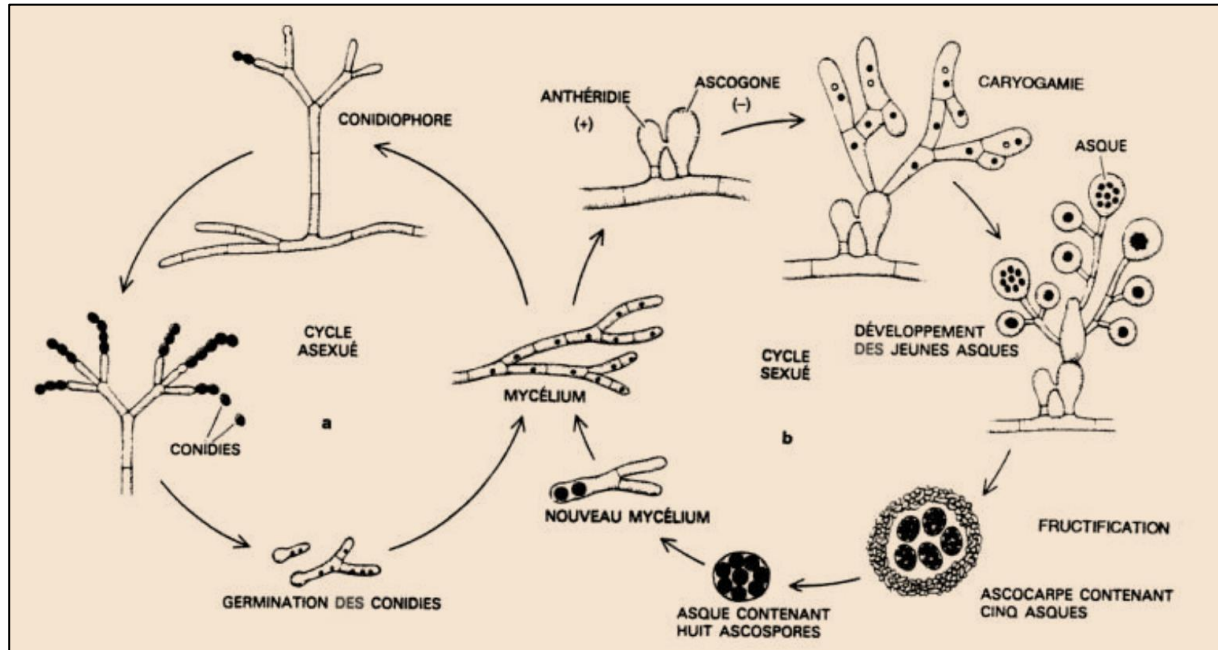


Figure 8: Schéma récapitulatif des deux modes de reproduction chez les Ascomycètes (Mediatheque.accesmad, 2018).

Chez la majorité des mycètes, les formes anamorphes et téléomorphes coexistent. Ces champignons, possédant à la fois le mode de reproduction sexuée et asexuée, sont désignés sous le terme de holomorphes (Campbell *et al.*, 1996). Les Deutéromycètes regroupent uniquement les formes anamorphes des champignons, les formes téléomorphes de ces champignons n'étant pas connues voire inexistantes.

1.2.1.3 Identification des moisissures

1.2.1.3.1 Méthode classique

L'identification des moisissures par la méthode dite classique repose sur deux types de critères :

- Critères macroscopiques

Ils reposent sur plusieurs paramètres ; l'observation des colonies et de leur couleur recto et verso est un élément pertinent d'orientation ainsi que la présence d'un pigment dans la gélose, bien que ces derniers critères sont soumis aux conditions de culture. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*), la taille des colonies peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*), ou colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*). Le relief il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure). L'aspect des champignons levuriformes donnent des colonies lisses, glabres, humides, d'aspect brillant ou

mat, parfois rugueuses. Par contre, les champignons filamenteux ont une texture différente : duveteuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse, leur transparence (opaque, translucide) (Botton *et al.*, 1990 ; Chabasse *et al.*, 2002).

- Critères microscopiques

Fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons :

Le thalle

La majorité des champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

-Le thalle siphonné, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné est caractéristique des Zygomycètes ;

-Le thalle septé ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes (Badillet *et al.*, 1987).

Les spores

Les spores produites par la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

-Les spores endogènes sont produites à l'intérieur des sporocystes, portés par les sporocystophores. À maturité, les sporocystes, libèrent les endospores. Ces spores sont spécifiques des champignons inférieurs, tels que les Mucorales.

-Les spores exogènes ou conidies, retrouvées chez les Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 1996).

Aspect des spores (Campbell *et al.*, 1996).

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue cinq groupes de spores :

- 1) Amérospores : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*) ;
- 2) Didymospores : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
- 3) Phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;
- 4) Dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
- 5) Scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

Modes de formation des conidies (Botton *et al.*, 1990)

1) Le mode thallique : la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales :

- le type thallique solitaire, ex : *Chrysosporium* ;
- le type thallique arthrique, ex : *Geotrichum*.

2) Le mode blastique : les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes :

- le type blastique acropète, ex : *Cladosporium*, *Alternaria* ;
- le type blastique synchrone, ex : *Botrytis* ;
- le type blastique sympodial, ex : *Beauveria* ;
- le type blastique régressif, ex : *Trichothecium* ;
- le type blastique percurrent (annellidique), ex : *Scopulariopsis* ;
- le type blastique phialidique, ex : *Aspergillus*, *Penicillium* ;
- le type blastique porique, ex : *Alternaria*, *Curvularia*.

Mode de groupement des conidies (Botton et al., 1990)

Les conidies sont, en général, regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène.

L'organisation de ce regroupement est aussi un facteur d'identification. Les principaux types sont:

- Grappes, ex. *Beauveria*, *Trichothecium* ;
- Masse, ex. *Botrytis* ;
- Têtes ou balles, ex. *Acremonium*, *Trichoderma* ;
- Chaînes basipètes, ex. *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium* ;
- Chaînes acropètes, ex. *Cladosporium*, *Alternaria*.

Mode d'implantation des cellules conidiogènes (de Hoog et Guarro, 1995)

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces. Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (ex : *Aureobasidium*). Les cellules conidiogènes différenciées peuvent alors être:

- ❖ Directement insérées sur les filaments végétatifs (ex : *Acremonium*, *Fusarium*) ;
- ❖ Bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :
 - a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex : *Aspergillus*) ;
 - b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex : *Penicillium*) ;
 - c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex : *Verticillium*) ;
- ❖ Bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés :
 - a) conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corèmie (ex : *Graphium*) ;
 - b) conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommés sporodochies (ex : *Myrothecium*).

Il existe aussi des structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée. Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules :

- a) Les pycnides sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est

tapissée de conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (*Phoma*).

b) Les acervules sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. À l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies.

Sur les milieux de culture seules les pycnides sont visibles, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal.

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types :

- a) *Apothécie* : l'ascocarpe est ouvert, en forme de coupe, portant les asques en surface ;
- b) *Cléistothèce* : l'ascocarpe est arrondi et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques ; il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (ex : *Emericella*) ;
- c) *Périthèce* : l'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitunique) ou à deux membranes (bitunique) et contenant chacun huit ascospores (*Chaetomium*).

Présence des chlamydospores

Les chlamydospores sont des éléments de résistance qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydospores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*) (Campbell *et al.*, 1996, Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

1.2.1.3.1 Identification par des outils de biologie moléculaire

La méthode classique de l'identification des moisissures est fondée sur des critères morphologiques comme cité précédemment. Cette identification nécessite plusieurs cultures, parfois sur des milieux spécifiques, pendant 7 jours ou plus afin d'obtenir la formation des spores. L'absence de l'apparition des spores rendra impossible l'identification de la moisissure. D'autre part, la présence d'un très grand nombre d'espèces au sein d'un seul genre rend la distinction très difficile et nécessite un haut degré de spécialisation. En outre, les changements constants dans la taxonomie peuvent conduire à une mauvaise identification et une fausse évaluation de son potentiel toxigène. Ceci dit, dans le but d'identifier les moisissures de manière rapide et précise on a recours à l'identification par biologie moléculaire qui repose sur l'analyse des séquences portant l'information génétique (Verschuere *et al.*, 2002).

Les techniques de biologie moléculaire s'intègrent progressivement aux côtés des méthodes mycologiques classiques, et tendent à se généraliser dans les laboratoires spécialisés (Bougnoux *et al.*, 2003). L'émergence de la PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis d'important progrès des

techniques moléculaires. Les différentes méthodes proposées permettent d'étudier le polymorphisme génétique des différents champignons filamenteux et de les discriminer à différents niveaux taxonomiques par l'étude de l'ensemble du génome, d'un ou de plusieurs gènes ou d'un fragment d'ADN bien défini.

Plusieurs techniques sont appliquées : la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est basée sur le polymorphisme de taille des fragments de restriction et a été utilisée pour la discrimination d'espèce d'*Aspergillus* (de Valk *et al.*, 2008), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), basée sur le polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard, a permis de mettre en évidence une différenciation des souches de *Penicillium roqueforti* (Geisen *et al.*, 2001), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), qui est une combinaison de la PCR et de la RFLP, a permis de discriminer différentes espèces d'*Aspergillus* (Perrone *et al.*, 2006). Ces méthodes sont généralement assez coûteuses et longues à mettre en œuvre. De plus, certaines de ces méthodes présentent des limites dues au manque de sensibilité et de reproductibilité et à la nécessité d'une standardisation des protocoles, notamment lors de l'extraction de l'ADN. Récemment, une nouvelle méthode d'analyse phénotypique a émergé comme outil d'identification des champignons filamenteux en routine. Cette technique qui repose sur la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS), permet d'obtenir sous forme de spectre le profil protéique des champignons filamenteux (Marvin *et al.*, 2003). La moisissure est identifiée en comparant son spectre avec ceux d'une librairie de spectres de référence. Cette méthode permet de discriminer des champignons filamenteux au niveau de l'espèce, en donnant des résultats comparables à ceux obtenus par les méthodes d'identification moléculaire (Cassagne *et al.*, 2011 ; De Carolis *et al.*, 2012). Cette technique simple, rapide et pouvant être utilisée à haut débit fait l'objet d'une standardisation tant au niveau du protocole (conditions de culture, méthodes d'extraction) qu'au niveau de la construction des banques de données (Normand *et al.*, 2013). Le coût de l'appareillage nécessite un investissement assez lourd.

1.2.1.4 Taxonomie des moisissures

La taxonomie des champignons est en constante évolution et les opinions divergent quant à la valeur des systèmes de classification concurrents. Des études récentes sur la classification des champignons suggèrent qu'il existe actuellement six embranchements fongiques et quatre sous-embranchements supplémentaires encore non placés (figure 5). La phylogénétique fongique est loin d'être statique ou résolue ; en fait, le placement d'espèces spécifiques dans le règne fongique a été remis en question. Par exemple, les habitants intestinaux d'arthropodes (Trichomycètes) que l'on croyait membres des Zygomycota sont en réalité des protistes. En outre, d'autres espèces considérées comme fongiques en raison de leur hétérotrophie et de leur morphologie semblable à celle des moisissures, sont en réalité des Stramenopiles (y compris les algues et les diatomées). Les séquences génomiques d'embranchements peu échantillonnés devraient aider à lever cette ambiguïté dans les années à venir. Les Chytridiomycota sont le seul embranchement fongique à produire des zoospores et ils ont besoin d'eau pour se disperser. Les Zygomycota se reproduisent sexuellement et forment des spores sexuelles à parois épaisses appelées zygospores. Les Zygomycota sont morphologiquement diversifiés et représentent 1% de toutes les espèces fongiques décrites. Les Ascomycota sont le plus grand embranchement fongique, représentant environ 65% de toutes les espèces fongiques connues. La particularité de cet ensemble est un asque. L'asque est la cellule

sexuelle contenant les spores où se produit la méiose, suivie d'une mitose pour générer huit (ou un multiple de huit) ascospores. Les Basidiomycota représentent environ 35% des espèces fongiques connues. Un certain nombre de Basidiomycota sont immédiatement reconnaissables car ils produisent de grands carpophores (champignons à chapeau et vesses- de-loup) (Kavanagh., 2018).

Les Deutéromycètes ou champignons imparfaits ne constituent pas un groupe naturel, mais un ensemble artificiel de champignons filamenteux septés ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée. Les représentants de ce groupe sont classés essentiellement parmi les Ascomycota dans les systèmes récents de classification.

La classification des trois principaux genres de moisissures toxigènes (*Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*) est présentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Taxonomie des moisissures (Houbraken et Samson, 2011; Inderbitzin *et al.*, 2011; Vitale *et al.*, 2011; Hermet *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2012; Wang, *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Classe	Ordre	Famille	Genre	Sous Genre	Section	Serie	Espèce
Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Flavi		<i>A. flavus</i>
					Nigri		<i>A. niger</i>
					Cremei		<i>A. tamari</i>
							<i>A. wentii</i>
					Usti		<i>A. calidoustus</i>
							<i>A. pseudoflectus</i>
					Candidi		<i>A. candidus</i>
					Clavati		<i>A. clavati</i>
					Fumigati		<i>A. fumigatus</i>
							<i>N. pseudofischeri</i>
							<i>N. fischeri</i>
							<i>N. fennelliae</i>
							<i>N. hiratsukae</i>
							<i>N. glabra</i>
					Nidulantes		<i>E. nidulans</i>
							<i>E. varicolor</i>
							<i>A. versicolor</i>
							<i>A. sydowii</i>
					Circumdati		<i>A. sclerotium</i>
							<i>A. elegans</i>
							<i>A. westerdijkiae</i>
					Eurotium		<i>E. amstelodami</i>
							<i>E. chevalieri</i>
							<i>E. rubrum</i>
							<i>E. repens</i>
			<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	Fasciculata	Verrucosa	<i>P. verrucosum</i>
							<i>P. nordicum</i>
						Solita	<i>P. solitum</i>
						Viridicata	<i>P. viridicatum</i>
							<i>P. aurantiogriseum</i>
					Camenberti		<i>P. freii</i>
							<i>P. camenberti</i>
							<i>P. commune</i>
							<i>P. palitans</i>
							<i>P. crustosum</i>
				Penicillium	Expansa		<i>P. expansum</i>
					Claviforma		<i>P. glandicola</i>
			Roquefortorum				<i>P. roqueforti</i>
							<i>P. carneum</i>

							<i>P. paneum</i>
					<i>Chrysogena</i>		<i>P. chrysogenum</i>
					<i>Brevicompacta</i>		<i>P. nalgiovense</i>
					<i>Ramosa</i>		<i>P. brevicompactum</i>
					<i>Canescentia</i>		<i>P. raistrickii</i>
							<i>P. coralligerum</i>
							<i>P. glabrum</i>
							<i>P. corylophilum</i>
							<i>P. oxalicum</i>
							<i>P. citrinum</i>
							<i>P. janthinellum</i>
							<i>P. rolfsii</i>
							<i>P. thomii</i>
							<i>P. spinulosum</i>
							<i>P. fellutanum</i>

Classe	Ordre	Famille	Genre	Sous Genre	Section	Serie	Espèce
				<i>Fusarium</i>	<i>Oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>
							<i>F. verticillioides</i>
							<i>F. subglutinans</i>
							<i>F. temperatum</i>
							<i>F. thapsinum</i>
							<i>F. proliferatum</i>
							<i>F. graminearum</i>
							<i>F. sambucinum</i>
							<i>F. culmorum</i>
							<i>F. sporotrichoides</i>
							<i>F. langsethiae</i>
					<i>Tricinctum</i>		<i>F. avenaceum</i>
					<i>Incarnatum-equiseti</i>		<i>F. equiseti</i>
					<i>Solani</i>		<i>F. solani</i>

1.2.1.5 Moisissures toxigènes

Les champignons produisent une très grande variété de métabolites. Sans surprise, certains d'entre eux sont toxiques. Les composés toxiques produits par les champignons ne sont pas tous appelés mycotoxines; ceux qui sont toxiques principalement pour les bactéries sont communément appelés antibiotiques, ceux qui sont toxiques pour les plantes sont appelés phytotoxines, et ceux que l'on trouve dans les fructifications des champignons vénéneux sont souvent appelés toxines. Le terme mycotoxine est réservé aux métabolites secondaires fongiques de faible poids moléculaire qui sont toxiques pour l'homme et les autres vertébrés à de faibles concentrations. Il est non seulement difficile de définir les mycotoxines, mais il est également difficile de les classer.

Les mycotoxines contaminent jusqu'à 25% des disponibilités alimentaires mondiales. L'exposition est plus courante dans les endroits où les méthodes de manipulation et de conservation des aliments sont mauvaises, la malnutrition est un problème et il existe peu de réglementations pour protéger les populations de l'exposition (Watkinson *et al.*, 2016).

1.2.1.5.1 Moisissures productrices de mycotoxines

❖ *Penicillium*

Le genre *Penicillium* comprend 304 espèces (Kirk *et al.*, 2008), appartenant à la division des Deutéromycètes. Les formes téléomorphes de certaines d'entre elles sont connues et appartiennent à l'embranchement des Ascomycètes dont les genres les plus représentatifs sont *Eupenicillium* et *Talaromyces* (Pitt *et al.*, 2000).

a. Critères d'identification macroscopiques et microscopiques

Les colonies présentent un aspect duveteux voire poudreux, de couleur vert de gris et, plus rarement, blanche. Morphologiquement, les individus du genre *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau (*Penicillius* en latin). Le thalle cloisonné porte les conidiophores, simples ou ramifiés, se terminant par un pénicille. Les conidiophores peuvent être groupés en faisceaux lâches ou rassemblés en corémies (colonne de conidiophores). Les phialides (cellules conidiogènes) sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores (figure 9) (Botton *et al.*, 1990). Les phialides donnent naissance aux conidies qui se positionnent alors en chaînes. Plusieurs dispositions sont possibles (figure 10):

- ✓ *Penicillium* monoverticillé : les phialides sont insérées directement sur le stipe ; exemples : *Penicillium restrictum* et *P. glabrum*.
- ✓ *Penicillium* biveriticillé : il se caractérise par la présence d'une rangée de métules (cellules stériles) ; exemples : *Penicillium funiculosum* et *P. purpurogenum*.
- ✓ *Penicillium* triveriticillé : présence de deux rangées de métules ; exemples : *Penicillium verrucosum*, *P. expansum* et *P. griseofulvum*.
- ✓ *Penicillium* quadriveriticillé : cette disposition est plutôt rare et se distingue par trois rangées de métules insérées sur les conidiophores (Botton *et al.*, 1990).

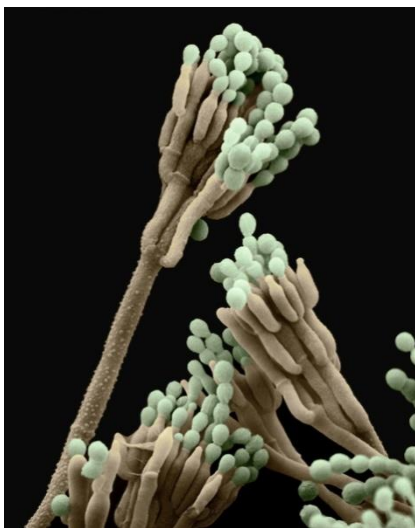


Figure 9 : *P. notatum* au microscope électronique (Pinterest, 2018)

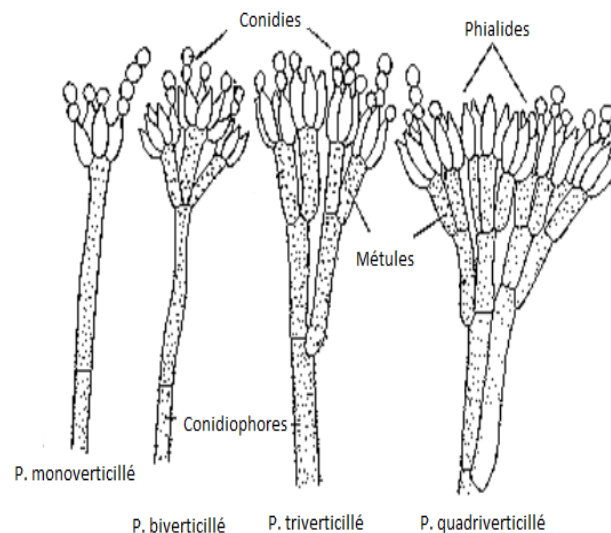


Figure 10 : Schéma des différentes dispositions de verticilles chez *Penicillium* (Techmicrobio, 2018)

b. Habitat

Le genre *Penicillium* est polyphage et saprophyte ; il est responsable de nombreuses dégradations. Il est très commun dans l'environnement ; on le retrouve aussi bien dans le sol et les matières organiques en décomposition que dans les denrées alimentaires telles que les céréales, les arachides et les produits laitiers. C'est un contaminant très fréquent des régions tempérées ; sa croissance est optimale à des températures comprises entre 20 et 27°C et dans une humidité importante. Il pousse également sur des matériaux de construction dans des environnements endommagés par l'eau, ainsi que dans l'air intérieur et la poussière domestique (Storey *et al.*, 2004).

c. Intérêt

Plusieurs espèces de *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines (tableau 3). Certaines espèces sont utiles en produisant des antibiotiques, d'autres sont exploitées dans le domaine de l'agroindustrie (enzymes, fromages et mycoprotéines) :

Tableau 3: Quelques toxines produites par des espèces de *Penicillium* (Norholt *et al.*, 1979, Pitt, 2000, Bennett *et al.* 2003)

Espèces	Toxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Acide cyclopiazonique, Roquefortine C
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinine
<i>Penicillium crustosum</i>	Pénitrem A, Roquefortine C
<i>Penicillium cyclopium</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinine, Patuline, Roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Acide cyclopiazonique, Patuline, Roquefortine C, Griséofulvine
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxine A
<i>Penicillium oxalicum</i>	Roquefortine C, Acide sécalonique D
<i>Penicillium roqueforti</i>	Acide pénicillique, Roquefortine C
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium notatum</i>	acide 6-aminopénicillanique
<i>Penicillium camemberti</i>	Protéase
<i>Penicillium roqueforti</i>	Protéase

Par ailleurs, les *Penicillia* peuvent être responsables d'inflammation de la cornée (kératomycose), d'onychomycose et d'infection de l'oreille externe (Hennequin *et al.*, 1998). Chez les personnes immunodéprimées (par exemple, les personnes atteintes par le VIH), les *Penicillia* sont à l'origine d'infections systémiques touchant les organes profonds comme le foie, la rate et les ganglions (Rosenthal *et al.*, 2000).

Si certaines espèces de *Penicillium* sont pathogènes, d'autres ont un intérêt industriel. C'est le cas de *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti*, indispensables à la fabrication de certains fromages bleus. *Penicillium griseofulvum* a quant à lui un intérêt médical car il joue un rôle dans la synthèse d'un antifongique : la griséofulvine. On peut aussi citer *Penicillium notatum*, producteur de la « pénicilline », découverte par Alexander Flemming et qui a permis de donner naissance à des antibiotiques majeurs (amoxicilline, pipéracilline, ...) (Rosenthal *et al.*, 2000).

❖ *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* est classé dans la division des Deutéromycètes. De même que pour les *Penicillia*, certaines formes sexuées d'*Aspergillus* sont connues et appartiennent à la division des Ascomycètes, dont les genres les plus notables sont *Eurotium* et *Emmericella*. Le genre *Aspergillus* comporte environ 266 espèces (Kirk *et al.*, 2008), réparties en 18 groupes (Pitt, 2000). Sur ces 266 espèces, une vingtaine est pathogène pour l'Homme et l'animal.

a. Critères d'identification macroscopiques et microscopiques

Les colonies d'*Aspergillus*, duveteuses ou poudreuses, à développement rapide, sont le plus souvent de couleurs vives et variées.

L'appareil végétatif des *Aspergillus* est formé de filaments mycéliens cloisonnés et ramifiés. Se dressent sur ces filaments végétatifs les conidiophores qui se terminent par une vésicule de forme variable. La forme et la taille de cette vésicule sont spécifiques de l'espèce en question. Les phialides

peuvent être insérées directement sur la vésicule : dans ce cas on parlera de «tête unisériée». Si les cellules conidiogènes sont précédées de métules, on parlera de «tête bisériée». L'ensemble phialides/métules forme le stérigmate. Le stérigmate, la vésicule et les spores constituent la «tête aspergillaire» (figure 11). Les spores sont insérées en chaîne sur les phialides. Elles sont unicellulaires, de forme globuleuse, ou elliptique, et de couleurs variables (Kirk *et al.*, 2008).

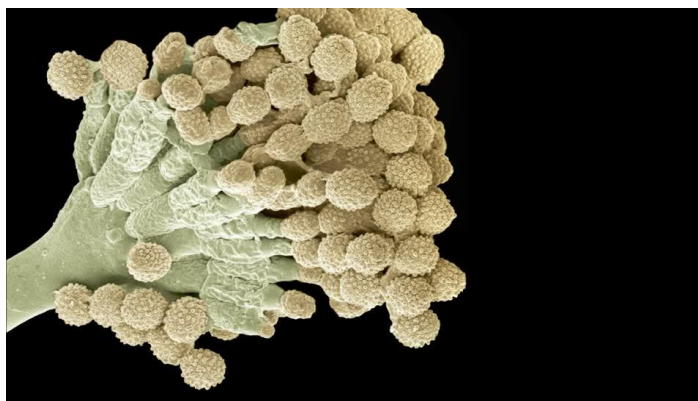


Figure 11 : Observation microscopique d'une tête aspergillaire (Pinterest, 2018).

b. Habitat

À l'instar des *Penicillia*, les *Aspergilli* sont cosmopolites et omniprésents dans l'environnement intérieur, surtout dans la poussière. Leur dissémination est d'autant plus facile qu'une «tête aspergillaire» est capable de produire au cours de sa vie plusieurs spores.

La répartition géographique des *Aspergilli* est assez vaste. Ils sont le plus souvent présents dans les zones tropicales et subtropicales, donc adaptés à des climats chauds et à des milieux pauvres en eau (Castegnaro *et al.*, 2002). La température optimale de croissance de la plupart des espèces d'*Aspergillus* se situe entre 25 et 40°C.

Les espèces thermophiles, comme *Aspergillus fumigatus*, se développent au-delà de 35°C et parfois même jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987). C'est pourquoi ils se développent très bien dans les produits alimentaires dits «secs» (salaisons, blé, farines, arachide, ...).

c. Intérêt

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur disposition à produire des toxines fongiques responsables de pathologies chez l'Homme et l'animal (tableau 4). Certaines espèces sont utiles et exploitées dans le domaine de l'agroindustrie (acide citrique) :

Tableau 4 : Quelques toxines produites par des espèces d'*Aspergillus* (Pitt, 2000).

Espèces	Toxines produites
<i>Aspergillus candidus</i>	Candiduline
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine
<i>Aspergillus clavatus</i>	Acide kojique, Patuline, Xanthocilline
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, Acide aspergillique, Acide cyclopiazonique, Acide kojique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavine, Fumagiline, Fumitoxine, Fumitremorgine A et C, Gliotoxine
<i>Aspergillus niger</i>	Malformine, Naftoquinone, acide citrique
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide kojique, Ochratoxines, Acide pénicillique, Acide sécalonique A
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acide cyclopiazonique, Acide kojique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, Acide aspergillique, Acide kojique
<i>Aspergillus sydowii</i>	Stérigmatocystine, Griséofulvine
<i>Aspergillus terreus</i>	Citrinine, Patuline, Territrem, Terréine, Terrétonine
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine

Quelques espèces d'*Aspergillus* sont responsables d'infections opportunistes, connues sous le nom d'aspergilloses. Elles apparaissent préférentiellement chez les sujets fragiles contractant par exemple des broncho-pneumopathies chroniques obstructives, des emphysèmes, des cancers broncho-pulmonaires (Badillet *et al.*, 1987) ou chez les patients soumis à des traitements immunosuppresseurs (corticothérapie, chimiothérapie).

Les espèces à l'origine d'aspergilloses sont (Morin *et al.*, 1994) :

- ✓ *Aspergillus fumigatus* : c'est l'agent responsable de l'aspergillose bronchopulmonaire, qui est une réaction allergique au champignon et d'aspergillomes (colonisation d'une cavité tuberculeuse).
- ✓ *A. flavus* : il est responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées.
- ✓ *A. niger* : il est à l'origine d'otites, de sinusites et d'infections cutanées.
- ✓ *A. terreus* : il est impliqué dans l'apparition d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez les patients immunodéficients (Baculard *et al.*, 1995).

D'autres espèces sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des biotechnologies, impliquée dans la production d'acides organiques, d'enzymes et de pigments (Botton *et al.*, 1990, Schuster *et al.*, 2002). *A. niger* est employé pour la synthèse d'acides alimentaires comme l'acide citrique et l'acide gluconique, ainsi que pour la production d'enzymes (alpha-amylase, lipase, pectinase, ...). *A. oryzae* est utilisé dans les pays asiatiques pour la production de produits fermentés à base de soja.

❖ *Fusarium*

Les Fusaria sont des champignons filamenteux appartenant aux Deutéromycètes, certains d'entre eux possèdent un potentiel phytopathogène. Certaines formes sexuées (*Gibberella*, *Nectria*) sont connues et rattachées à l'embranchement des Ascomycètes. C'est un genre qui comprend environ 111 espèces anamorphes (Kirk *et al.*, 2008) Le genre *Fusarium* tire son nom du latin «*fusus*» qui signifie fuseau, en référence à la forme des conidies (Leslie *et al.*, 2006).

a. Critères d'identification macroscopiques et microscopiques

Les *Fusaria* se développent rapidement et produisent des colonies planes, d'aspect cotonneux, voire floconneux, et de couleurs claires : crème, blanche, saumon, violette, brune, jaune (Chermette *et al.*, 1993). Le principal caractère microscopique de reconnaissance des *Fusaria* réside dans la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (Messiaen *et al.*, 1968). Les différentes espèces se distinguent essentiellement par la forme de leurs conidies. Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des grappes de spores.

Les cellules conidiogènes peuvent produire différents types de spores :

- Les microconidies : elles sont de petite taille et peuvent être uni- ou bicellulaires. Elles sont de différentes formes : fusiformes, ovoïdes, cylindriques, solitaires ou groupées. On peut citer en exemple *Fusarium verticillioides* (figure 12).

- Les macroconidies : ce sont des conidies pluricellulaires, cloisonnées, fusiformes et de grande taille. La cellule basale est pédicellée et la cellule apicale forme un crochet, idéal pour la dissémination. Elles sont fréquemment regroupées en grappe. On retrouve les macroconidies notamment chez *F. graminearum* (figure 12).

- Les chlamydospores : ce sont des spores résistantes ne se détachant pas de la moisissure. Elles ne sont pas produites par toutes les espèces de *Fusarium*. Elles peuvent être terminales ou intercalaires (Roqueber, 1998) et peuvent résister des années dans le sol, préservant ainsi le champignon.

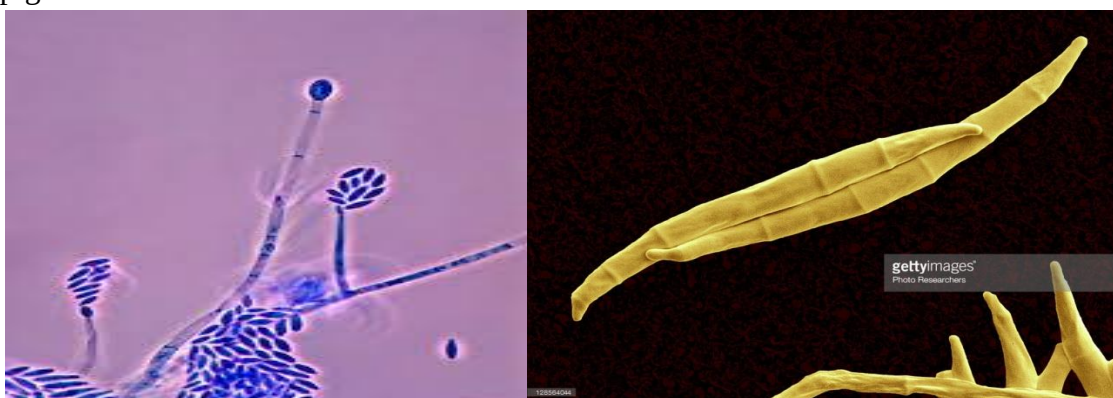


Figure 12 : Observation microscopique de l'appareil végétatif de *Fusarium verticillioides* (à gauche) et de macroconidies de *F. graminearum* (à droite) (Pinterest, 2018).

b. Habitat

Les *Fusaria* sont cosmopolites, on les retrouve dans toutes les régions du monde, des régions tropicales et désertiques aux régions tempérées ; leur température idéale de croissance est située entre 22 et 37°C (Pfohl-Leskowicz, 1999). Du fait de l'existence de chlamydospores chez certaines espèces, la conservation du mycélium dans le sol et sa dissémination sont facilitées.

c. Intérêt

Le genre *Fusarium* rassemble un grand nombre d'espèces phytopathogènes (Gupta *et al.*, 2000). Il a un impact économique important car c'est un contaminant de nombreuses céréales (blé, avoine et orge), de légumes et d'arbres fruitiers. Il se développe préférentiellement sur les végétaux sénescents ou stressés. Il est impliqué dans la pourriture des tiges, des fruits et du système racinaire (Trenholm *et al.*, 1988). De par leur capacité à produire des mycotoxines (tableau 5), les *Fusaria*

sont susceptibles de causer des infections et des intoxications graves chez l'Homme et chez les animaux, surtout d'élevage. Ces infections sont réunies sous le terme de fusarioses.

Tableau 5 : Quelques toxines produites par des espèces de *Fusarium* (Pitt, 2000).

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

La zéaralénone, notamment sécrétée par *F. graminearum*, présente un intérêt vétérinaire car c'est un perturbateur endocrinien mimant l'action des oestrogènes. Elle est supposée être à l'origine de problèmes de reproduction (infertilité, avortement) chez l'animal.

Chez l'Homme, les effets de *Fusarium* sont divers. Quelques espèces sont à l'origine d'infections systémiques (Guarro *et al.*, 1992), d'autres sont impliquées dans des kératites, des allergies, dans des mycoses unguéales ou des otomycoses (Pitt, 2000). Les patients immunodéprimés (diabétiques, grands brûlés) sont des cibles privilégiées de ces champignons opportunistes. *F. verticillioides* est responsable de fusarioses disséminées chez les personnes atteintes par le VIH (Duran *et al.*, 1989).

❖ *Alternaria*

Ces mycètes filamenteux imparfaits appartiennent à la division des Deutéromycètes. Environ une cinquantaine d'espèces est identifiée, mais on estime qu'il en existe plus du double. *Clathrospora*, *Lewia*, *Pleospora* sont les formes sexuées du genre *Alternaria*, elles sont rattachées aux Ascomycètes. *Alternaria alternata* est le chef de file de ce genre.

a. Critères d'identification macroscopiques et microscopiques

Au niveau macroscopique, les colonies d'*Alternaria alternata* ont un aspect de velours, de couleur noire ou grise. Au niveau microscopique, les conidiophores courts et cloisonnés sont de couleur foncée. A leur extrémité se situent des chaînes simples ou ramifiées de spores (figure 13). Les spores, initialement ovales, prennent une forme de massue en vieillissant. Elles sont pluricellulaires et divisées par des cloisons longitudinales ou transversales (Larone, 1987).



Figure 13 : Observation au microscope électronique à balayage d'*Alternaria alternata* (Pinterest, 2018).

b. Habitat

Le genre *Alternaria* est aussi un genre ubiquitaire, on le retrouve dans toutes les régions du globe. Les espèces d'*Alternaria* peuvent croître à des températures allant de 0 à 32°C, bien que leur température optimale de croissance soit comprise entre 22 et 27°C. Ce champignon est considéré comme une des moisissures aéroportées extérieures les plus importantes. Il est aussi très présent dans la poussière des environnements intérieurs (Rotem, 1994).

c. Intérêt

Certains *Alternaria* sont saprophytes. Toutefois, certaines espèces peuvent devenir des agents pathogènes opportunistes responsables de maladies atteignant plantes, insectes et êtres humains. De nombreuses espèces sont des phytopathogènes de plantes cultivées ou d'ornementation. La gamme de plantes concernées par les alternarioses est très vaste, allant des céréales (*Alternaria triticina*) aux cultures maraîchères et fruitières (Rotem, 1994). Par exemple : *A. brassicae* est l'agent responsable de la « maladie de la tâche noire du chou ». Chez l'Homme, les *Alternaria* spp sont principalement responsables d'affections cutanées, d'otites, de kératites et d'allergies sévères. *A. alternata* est connue pour être un puissant allergène, déclenchant d'importantes réactions (asthme ou rhinite) durant les mois d'été.

Seule une dizaine d'individus du genre *Alternaria* est productrice de toxines fongiques (tableau 6).

Tableau 6 : Quelques toxines produites par des espèces d'*Alternaria* (Kinoshita *et al.*, 1972 ; Hradil *et al.*, 1989 ; Bottalico, 1998).

Espèces	Toxines produites
<i>Alternaria alternata</i>	Alternariol, Alternariol monométhylether
<i>Alternaria brassicicola</i>	Alternariol, Alternariol monométhylether
<i>Alternaria cassiae</i>	Altértoxines I, II, III
<i>Alternaria oryzae</i>	Acide ténuazonique
<i>Alternaria radicina</i>	Acide ténuazonique, Altértoxines I, II, III
<i>Alternaria solani</i>	Alternariol, Alternariol monométhylether, Acide ténuazonique
<i>Alternaria tenuissima</i>	Tentoxine

Mais toutes les espèces d'*Alternaria* ne sont pas indésirables ; certaines ont une utilité dans le contrôle des plantes invasives. En effet, *A. alternata* a un pouvoir herbicide efficace envers l'amarante réfléchie (*Amaranthus retroflexus*), « mauvaise herbe » comestible (Lawrie *et al.*, 2000).

1.2.1.5.2 Contamination du blé par les moisissures toxigènes

Plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses ont été trouvées sur les grains de céréales comme contaminants extérieurs. Les grains sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre (activité de l'eau : *Aw*), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany *et al.*, 2002). Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25%), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (Molinie *et al.*, 2005). Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes, connus sous le nom de moisissures de champ, de stockage et la flore intermédiaire (Magan *et al.*, 1988).

a) Mycoflore du champ

Les grains de blé sont contaminés par les microorganismes dans le champ, et cette microflore est dominée par des moisissures. Les spores des champignons de champ envahissent les grains et croissent dans le champ ou attendent le battage. Les genres rencontrés sont: *Alternaria* (le plus fréquent), *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Helminthosporium* (moins fréquents), *Chaetomium*, *Curvularia*, *Rhizopus* et *Stemphylium* (Sauer *et al.*, 1982 ; Zillinsky, 1983). Cette flore est bien adaptée à des changements rapides des conditions dans le champ. Elle exige des activités en eau relativement élevées pour une croissance optimale (Adams *et al.*, 2008). En fonction des conditions précises, ces champignons peuvent mourir lentement au cours du stockage ou peuvent survivre pendant de longues périodes. La survie est plus longue à basse température et à faibles niveaux d'humidité (Roberts, 2005).

Le genre *Alternaria* : il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides. Les espèces les plus fréquentes sont : *A. alternata* est connue par la production des mycotoxines (tableau 6) ; *A. tenuissima* est capable de produire des toxines tel que l'acide ténuazonique (Andersen *et al.*,

2002) et *A. infectoria* cause la décoloration et la dévalorisation du grain mais elle est non toxigénique (Webley *et al.*, 1997).

Le genre *Fusarium* : il comprend les espèces qui ont à la fois des pouvoirs phytopathogènes. Les espèces rencontrées sont surtout : *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. poae* (Van der Burgt *et al.*, 2009). Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines.

F. culmorum et *F. graminearum* peuvent causer la pourriture de la tige et la brûlure de l'épi du blé et ces infections de champ peuvent conduire à une altération post-récolte plus importante de ce produit s'il est stocké à une trop forte activité de l'eau (Adams *et al.*, 2008).

b) Mycoflore intermédiaire

Elle est une catégorie à comportement plus diversifié et regroupe des germes capables d'un développement limité, au début de stockage, en condition particulière et notamment sur les grains insuffisamment secs. Les genres les plus rencontrés sont : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (Godon *et al.*, 1997).

c) Mycoflore de stockage.

Les facteurs environnementaux peuvent exercer une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques espèces mycotoxigéniques (Magan *et al.*, 2003). Les moisissures des grains de blé stockés sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés. Les principaux genres rencontrés sont *Aspergillus* et *Penicillium* en raison de leurs capacités de se développer sur tous substrats possibles et dans une large gamme de température et d'humidité (Mathew *et al.*, 2011).

Le genre *Aspergillus* : chaque espèce de moisissures de stockage a ses conditions de développement (Christensen *et al.*, 1969). Dans le blé stocké, les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000). Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans le grain de blé stocké sont surtout *A. flavus*, *A. niger* et *A. fumigatus* (Mathew *et al.*, 2011). Si le blé est stocké à une teneur d'humidité de 14 à 15% et à une température ambiante, il sera lentement envahi par d'autres espèces notamment *A. restrictus*. Cette dernière représente l'espèce qui prédomine dans le blé stocké pendant quelques mois si l'humidité est inférieure à 15%. Au dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que : *A. repens*, *A. amstelodami* et *A. ruber* prédominent et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (Christensen *et al.*, 1969).

Le genre *Penicillium* : les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (Neergaard, 1977 ; Boudreau *et al.*, 1992). Les espèces les plus communes sont essentiellement : *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. hordei*, *P. freii*, *P. melanoconidium*, *P. polonicum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum* et *P. crustosum* (Dijksterhuis *et al.*, 2007).

I.3 MYCOTOXINES

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. (Steyn, 1995 ; Pitt *et al.*, 2000). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, qui se développent dans ou sur les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et animale et qui provoquent de nombreuses maladies chez l'Homme et l'animal. Ces métabolites persistent tout au long de la chaîne alimentaire du fait de leur résistance aux traitements physiques et chimiques (Pitt *et al.*, 2000).

Plusieurs milliers de molécules toxiques ont été identifiées chez les champignons mais seule une vingtaine de familles posent des problèmes en nutrition humaine ou animale (Cahagnier *et al.*, 1998). L'origine chimique des mycotoxines est très diverses, certaines dérivent, des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acides aspergillique et cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine et sporidesmine), des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxines, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine et zéaralénone), des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, tricothécènes et verrucarine) ou encore des dérivés d'acides gras (fumonisines et alternariol) (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Les mycotoxines sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile. Ces molécules ne sont pas détruites au cours d'un stockage prolongé et sont souvent résistantes aux traitements thermiques ou chimiques (Cahagnier *et al.*, 1998).

La majorité des espèces fongiques connues productrices de la plupart des mycotoxines appartient aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Alternaria* à cause de leur nature ubiquitaire (Sidhu, 2002). Les céréales, les fruits secs, les graines oléagineuses, les raisins, les grains de café et les noix sont des produits agricoles bruts très sensibles à l'infestation par les mycètes avant, pendant ou après la récolte et donc souvent contaminés par les mycotoxines (D'Mello et McDonald, 1997 ; Scudamore et Livesey, 1998).

La contamination des aliments par les moisissures ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines. La production des mycotoxines peut s'effectuer depuis le champ jusqu'à l'assiette. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments ainsi que la quantité de mycotoxine produite dépendent de plusieurs éléments comme les espèces fongiques, les conditions écologiques dans lesquelles les champignons se développent et également la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire (Sidhu, 2002).

D'une façon générale, les mycotoxines pénètrent dans le corps par la consommation d'aliments contaminés. L'exposition aux mycotoxines peut être directe par la consommation de denrées alimentaires contaminées d'origine végétale appelée voie primaire, ou indirecte par le biais de produits alimentaires d'origine animale provenant d'animaux exposés appelée voie secondaire ou toxicité de relais. D'autres voies d'exposition peuvent avoir lieu tel que l'inhalation des spores transportés dans les poussières sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales et organiques et le contact dermique des mycotoxines (Miller, 1992 ; Jarvis et Miller, 2005).

L'exposition aux mycotoxines se traduit par des pathologies et des perturbations métaboliques appelées mycotoxicoses. Ces maladies ne sont ni infectieuses, ni contagieuses, leur allure pseudo-épidémique est due à l'ingestion des mêmes toxines par l'intermédiaire d'un aliment commun.

L'ingestion des aliments contaminés par des mycotoxines engendre une intoxication à condition que leur concentration soit suffisamment élevée pour produire un effet biologique quelconque. Ces effets sont divers et extrêmement variables d'une mycotoxine à une autre ; on distingue les mycotoxines à effet mutagène, cancérigène, tératogène, immunodépressive, néphrotoxique, hépatotoxique et oestrogène (Miller, 2001 ; Johanning *et al.*, 2002).

Les manifestations cliniques peuvent être soit aiguës (hémorragies, diarrhée, convulsions, tremblements, vomissement, léthargie, oedème, voire la mort), observées après exposition à une seule dose élevée, soit chroniques apparaissant après ingestion de doses modérées de toxine pendant une longue durée et se traduisant par une diminution des performances de l'animal ou de l'Homme et parallèlement à une altération de nombreux organes vitaux dont les modifications conduisent en particulier, à l'apparition de cirrhose ou d'hépatite atrophique, infiltration graisseuse au foie, hyperplasie nodulaire, cancers, etc.

Selon leur lieu de production, les mycotoxines peuvent être classées en deux catégories :

-Les mycotoxines de champs : on peut citer en exemple les fumonisines, principalement produites par le genre *Fusarium*. Les champignons producteurs se développent alors sur les plantes sénescents ou stressés.

-Les mycotoxines de stockage : la citrinine et la patuline sont produites essentiellement par les genres *Penicillium* et *Aspergillus*.

1.3.1 HISTORIQUE

La découverte des aflatoxines remonte à l'élucidation de la maladie X du dindon apparue en 1961 en Angleterre, suite à la consommation par ces volailles, d'aliments contaminés par des tourteaux d'arachide importés et contenant de fortes teneurs en toxines. Les arachides étaient contaminées par *Aspergillus flavus* ce qui a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de dindonneaux après l'apparition des premiers symptômes : perte de l'appétit, faiblesse des ailes et léthargie. Cet événement dénommé autrefois tout simplement « Turkey-X-Disease » a donné le départ d'une série d'études et de recherches physicochimiques et toxicologiques sur les substances actives élaborées par les moisissures.

Au Maroc, bien que l'on signale dès 1945 une intoxication de porcs par une alimentation moisie d'après Ninard et Hinterman, cité par Lafont (1970), les premières recherches scientifiques faisant mention de la contamination des denrées alimentaires par des champignons toxigènes n'ont vu le jour qu'au milieu des années 70 où un nombre de produits incluant des céréales, des légumineuses et des épices se sont révélées susceptibles d'héberger des spores d'*Aspergillus* toxigènes (Tantaoui Elaraki, 1977).

D'autres travaux ont montré la contamination des olives par *Aspergillus flavus* et *A. ochraceus* producteurs respectifs d'aflatoxines et ochratoxines (Gourama *et al.*, 1985), de même qu'avec une multitude d'autres espèces fongiques qui se sont avérées capables de produire des métabolites toxiques mis en évidence à l'aide de tests biologiques (Samane *et al.* 1991). Les investigations faites par Faid et Tantaoui Elaraki (1989) ont mis à jour la toxinogénèse de deux moisissures les plus fréquentes sur fruits d'agrumes *Penicillium italicum* et *P. digitatum*. Kichou et

Wasler (1993) ont signalé la présence de l'aflatoxine B1 dans l'alimentation destinée à la volaille. Tantaoui-Elaraki et Bartine (1994) ont ensuite isolé des souches d'*A. flavus* productrices d'ochratoxine A sur diverses épices distribuées au Maroc.

1.3.2 DESCRIPTION DES PRINCIPALES MYCOTOXINES

1.3.2.1 **Déoxynivalénol (DON)**

Le DON est la mycotoxine la plus abondante des trichothécènes du groupe B, qui sont des époxy-sesquiterpénoides (Clear et Patrick, 2000 ; Eriksen et Pettersson, 2004). Cette toxine est principalement produite par *Fusarium graminearum* et *F. culmorum* (Desjardins et Proctor, 2001). Son accumulation dans l'organisme humain ou animal peut engendrer des effets secondaires sur la santé après une administration aiguë ou chronique (Desjardins, 2006), y compris des effets tératogènes, neurotoxiques, embryotoxiques et immunosuppressives (Pestka, 2007).

Les trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par des espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis* et *Trichoderma*. Toutes les trichothécènes ont en commun un 12,13-époxytrichothécène et un acide olifénique avec une variété de substituants (Bennett et Klich, 2003).

Les trichothécènes provoquent principalement une nécrose et une hémorragie pendant les processus de régénération du sang dans la moelle osseuse et la rate. Les signes de pathologie sont la perte de poids, la perte d'appétit, les vomissements, la diarrhée, l'avortement et la mort. L'immunosuppression peut être très importante chez les animaux intoxiqués par les trichothécènes (CAST, 1989).

Il se forme presque toujours sur les plants avant la récolte. Sa formation dépend étroitement des conditions climatiques, et va donc varier d'une région à l'autre, voire d'une année à l'autre. Le DON (figure 14) ou vomitoxine à cause de ses puissants effets émétiques et son action en tant que facteur de refus d'alimentation ; il a été caractérisé et nommé après son isolement d'orge infecté par *Fusarium oxysporum* au Japon. Le DON est produit par *F. graminearum* et *F. culmorum* parmi d'autres espèces de *Fusarium* (Eriksen, 2003 ; Eriksen and Pettersson, 2004 ; Pestka et Smolinski, 2005). Au niveau cellulaire, les principaux effets toxiques du DON sont l'immunosuppression ou l'immunostimulation en fonction de la dose et la durée de l'exposition. Bien que ces effets aient été largement caractérisés chez la souris, plusieurs études sur le DON suggèrent que les effets immunotoxiques sont également susceptibles chez les animaux domestiques (Rotter *et al.*, 1996).

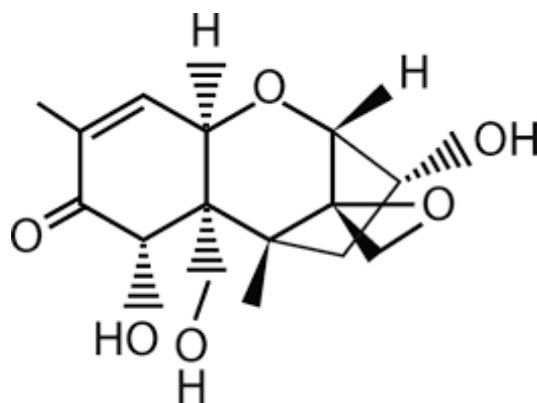


Figure 14 : Structure chimique du déoxynivalénol (Ueno, 1980).

✓ Structure et propriété chimique du DON

Les trichothécènes (TCT) sont composés exclusivement d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène (IARC, 1993). Les TCT appartiennent à la famille des sesquiterpénoïdes. Ces composés sont constitués de trois cycles accolés : un cyclopentane, un oxacyclohexane et un cyclohexane. Ce squelette est nommé «Trichothécane» (Ueno, 1980). (Annexe 4)

À ce squelette, s'additionnent des groupements méthyles, un groupe époxyde en position C₁₂-C₁₃ et une double liaison en position C₉-C₁₀ (Ueno, 1980 ; IARC, 1993). Les TCT diffèrent entre elles par la position des groupements hydroxyles et par la présence d'esters rattachés aux cycles.

Les TCT sont réparties en quatre groupes (Balzer *et al.*, 2004):

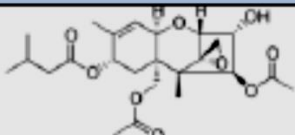
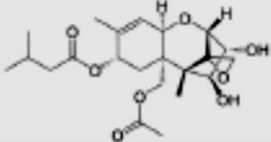
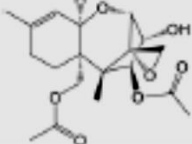
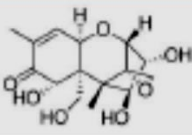
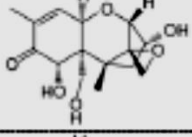
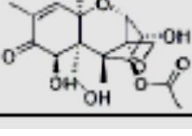
-Le groupe A est constitué des TCT ne présentant pas de fonction cétone en position C₈. Les principaux représentants sont la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS). La toxine T-2 est considérée comme étant la plus toxique des TCT.

-Le groupe B est constitué des TCT ayant une fonction cétone en position C₈ (tableau 7). Les plus courants sont le DON, le nivalénol (NIV) et la fusarénone-X (F-X).

-Le groupe C est constitué des TCT ayant un second époxyde en position C₇, comme la crotochine.

-Le groupe D est constitué des TCT présentant dans leur structure un macrocycle supplémentaire en position C₄-C₁₅. Les plus abondantes sont les verrucarines, les roridines et les satratoxines.

Tableau 7 : Structures chimiques de quelques TCT (Balzer *et al.*, 2004).

Dénomination	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure chimique
GROUPE A			
Toxine T-2	$C_{24}H_{34}O_9$	466,5	
Toxine HT-2	$C_{22}H_{32}O_8$	424,5	
Diacétoxyscirpénol	$C_{19}H_{26}O_7$	366,4	
GROUPE B			
Nivalénol	$C_{15}H_{20}O_7$	312,3	
Déoxynivalénol	$C_{15}H_{20}O_6$	296,3	
Fusarénone X	$C_{17}H_{22}O_8$	354,4	

Les TCT se présentent généralement sous la forme de poudres incolores et cristallisables dans certaines conditions (Ueno, 1980 ; IPCS, 1990). Ces toxines n'absorbent ni les UV, ni les radiations visibles, à l'exception des TCT macrocycliques du groupe D qui présentent des doubles liaisons conjuguées (IPCS, 1990). Ce sont des composés neutres d'un point de vue acido-basique. Ils sont le plus souvent solubles dans les solvants moyennement polaires (alcools, solvants chlorés). Le DON est quant à lui soluble dans les alcools et l'eau. Dans certaines conditions, les TCT sont légèrement solubles dans l'eau. Les composés estérifiés sont d'ailleurs moins solubles dans l'eau que les composés hydroxylés (Ueno, 1980 ; IPCS, 1990). Leur stabilité aux hautes températures est remarquable. La cuisson des aliments ne suffit donc pas à les détruire (Balzer *et al.*, 2004). La DON est stable à 120°C, modérément stable à 180°C, et ne se décompose qu'à 210°C après 20 à 40 minutes de chauffage. De manière générale, pour être inactivés, les TCT doivent être soumis à une température de 900°C pendant 10 minutes, ou de 500°C pendant 30 minutes.

D'autre part, les TCT résistent très bien aux solutions basiques concentrées. La destruction du DON et du NIV nécessite un pH égal à 12 et une température minimale de 80°C.

La toxicité des TCT est due principalement à la présence d'un groupement époxyde très réactif, et à la présence d'une double liaison C₉-C₁₀, la réduction de l'époxyde par l'hydruire

d'aluminium et de lithium, ou son attaque par un acide fort, conduit à l'ouverture de cet époxyde, rendant ainsi le composé formé totalement inactif (Balzer *et al.*, 2004).

✓ Moisissures productrices de TCT

Les trichothécènes sont majoritairement produites par des champignons appartenant aux genres *Fusarium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cephalosporum* et *Trichothecium* (tableau 8). Les *Fusaria* restent les mycètes les plus prolifiques (AFSSA, 2009).

Tableau 8 : Principaux champignons producteurs de TCT (AFSSA, 2009).

Toxines	Principaux champignons producteurs
Toxine T-2	<i>F. tricinctum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>
Toxine HT-2	<i>F. tricinctum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i>
DAS	<i>F. graminearum</i> , <i>F. roseum</i>
DON	<i>F. roseum</i> , <i>F. graminearum</i>
NIV	<i>F. nivale</i>
Fusarénone-X	<i>F. crookwellense</i> , <i>F. solani</i>
Groupe C	<i>Trichoderma spp</i> , <i>Trichothecium spp</i>
Groupe D	<i>Myrothexium spp</i> , <i>Stachybotrys spp</i>

Des régions humides et froides du Nord de l'Amérique aux régions tempérées de l'Europe, les trichothécènes sont présentes dans le monde entier. Les *Fusaria* affectent surtout les cultures céréalières (blé, orge, avoine, maïs, riz et millet) mais aussi les fruits (bananes et fruits à noyaux). Les mycètes du genre *Fusarium* vivent en parasites ou en saprophytes. La contamination peut survenir en cours de culture (*F. graminearum*, *F. nivale*), lors de la récolte (*F. tricinctum*) ou lors du stockage (*Trichoderma*), dans des conditions d'humidité importante (AFSSA, 2009).

La grande diversité des TCT et de leurs moisissures productrices fait que les conditions de toxigenèse et de croissance fongique sont complexes et partiellement identifiées. Ces conditions dépendent des espèces concernées. Par exemple, *Fusarium tricinctum*, produisant entre autres la toxine T-2, se développe à des températures allant de -2°C à 35°C, et pour un Aw supérieur à 0,88, tandis que *Fusarium roseum* préfère les températures supérieures à 20°C. Toutefois, il semblerait que pour la plupart des *Fusaria*, les épisodes de refroidissement et de pluies permettent d'accélérer le développement fongique et la production de toxines.

✓ Toxicité

Groupe B

Les TCT du groupe B, notamment le DON, présentent chez le rat une biodisponibilité importante. En effet, un tiers de la dose administrée par voie orale est retrouvé dans les urines 24 heures après l'ingestion (Meky, 2003). Ainsi une exposition aiguë au DON entraîne des vomissements importants, un refus de s'alimenter, une altération de l'état général et une perte de poids. De plus, des nécroses du tissu gastro-intestinal, de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes ont été mises en évidence chez l'animal (AFSSA, 2009).

Selon la durée d'exposition, les TCT du groupe B occasionnent soit une immunostimulation à faibles doses soit une immunodépression à fortes doses (Bondy *et al.*, 1991). De manière générale, les TCT du groupe B exercent la même toxicité sanguine et immune que celle du groupe A. Comme pour les TCT des autres groupes, la toxicité cutanée et les lésions digestives sont fréquentes lors d'intoxications aiguës ou chroniques. Enfin, comme pour le groupe A, les propriétés cancérogènes, tératogènes et génotoxiques n'ont pas été démontrées pour le groupe B. Le DON étant considéré comme agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme (groupe 3 du CIRC).

✓ **Mécanisme d'action**

Synthèse protéique

Les trichothécènes agissent comme des inhibiteurs de la synthèse protéique des cellules eucaryotes. Ils inhibent la traduction de l'ARN messager en protéine soit au moment de l'initiation du processus soit lors de l'élongation protéique.

Les TCT n'agissent pas tous au même niveau. Par exemple, le DON ne peut inhiber que l'élongation tandis que la F-X peut à la fois inhiber l'élongation et l'initiation. Il convient de noter que l'effet et la durée de l'action de la toxine sont dose-dépendants. L'inhibition de la traduction dépend également de l'encombrement stérique du trichothécène impliqué. Par ailleurs, plus la toxine est lipophile, meilleure sera sa pénétration intracellulaire et donc son action au niveau des ribosomes. Cette action sur la synthèse protéique aurait des conséquences directes sur la synthèse des acides nucléiques, et notamment celle de l'ADN (AFSSA, 2009).

Synthèse lipidique

Le mécanisme toxique des TCT repose aussi sur leur action au niveau des lipides des membranes cellulaires. Ils provoquent une modification des interactions des protéines et des lipides constitutifs de la paroi cellulaire. Selon certaines études, ils s'intercaleraient dans la bicouche phospholipidique, ce qui engendrerait une perte de fluidité membranaire voire une lyse de la membrane (AFSSA, 2009).

Apoptose cellulaire

Le mécanisme cytotoxique d'induction de l'apoptose, ou mort programmée d'une cellule, par les TCT n'est pas élucidé (AFSSA, 2009).

1.3.2.2 Ochratoxine A (OTA)

L'ochratoxine A est un métabolite secondaire fongique découvert en 1965 par une équipe Sud Africaine au cours d'une recherche systémique sur les mycotoxines (Van der Merwe, 1965).

L'OTA est un dérivé de la phénylalanine produit par des espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* (Pitt et Hocking, 1997). L'OTA est connue par ses propriétés néphrotoxiques, cancérogènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées (Pitt *et al.*, 2001, Clark et Snedeker, 2006).

Plusieurs maladies humaines sont spéculées ou attribuées à cette mycotoxine, telles que la néphropathie endémique des pays des Balkans (Petrova-Bocharova *et al.*, 1988), les tumeurs du tractus urinaire et rénales observées en Tunisie (Maaroufi *et al.*, 1999) et en Egypte (Waffa *et al.*, 1998).

En effet, l'Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un composé cancérigène pour l'Homme (IARC, 1999). Après consommation d'aliments contaminés, l'OTA est fréquemment détectée dans le sang humain. Elle est caractérisée par une longue demi-vie d'élimination (environ 35 jours dans le sérum), à cause de sa liaison aux protéines plasmatiques, sa circulation entéro-hépatique et sa réabsorption dans l'urine (Studer-Rohr *et al.*, 2000). Par conséquent, l'OTA est la mycotoxine la plus détectée dans le sang humain dans le monde (Pena *et al.*, 2006).

L'OTA est largement documentée en tant que contaminant global d'une grande variété d'aliments y compris les produits à base de céréales, les noix, les épices, le café, les raisins et le vin. La première espèce de moisissure incriminée dans la production de cette mycotoxine est *Aspergillus ochraceus*. Plus tard, plusieurs espèces au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été reconnues ochratoxinogènes.

✓ Structure

Les ochratoxines sont des dérivés de la phénylalanine (annexe 3). L'ochratoxine A est un métabolite secondaire constitué d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydrocoumarine couplée, par une liaison, à la L-phénylalanine (Pfohl-Leskowicz, 1999, figure 15). La formule brute de l'OTA est $C_{20}H_{18}ClNO_6$ (Weidenburner, 2001 ; IARC, 1993).

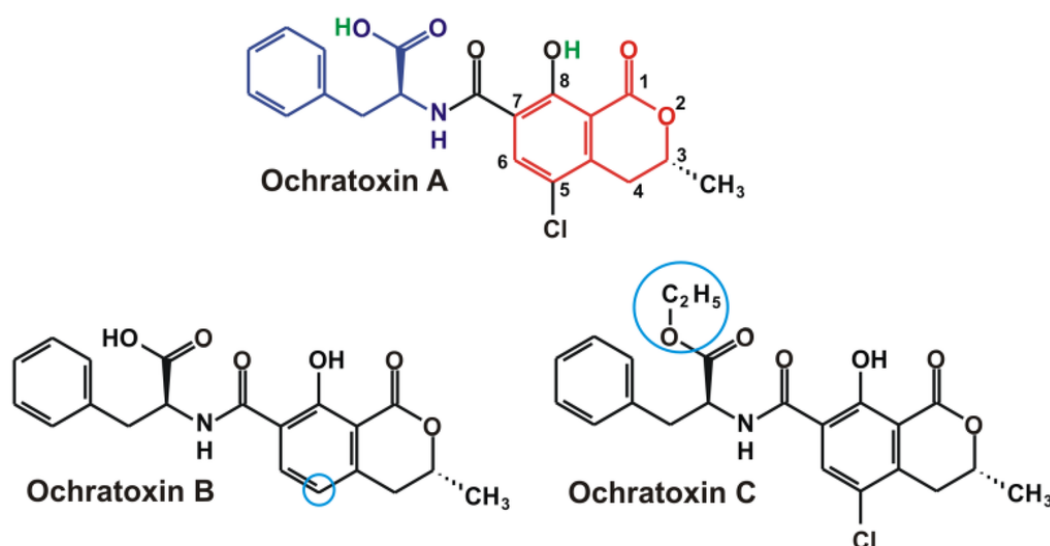


Figure 15 : Structures chimiques des ochratoxines A, B et C (IARC, 1993 ; Weidenburner, 2001).

✓ **Propriétés physico-chimiques**

L'OTA est un acide organique faible de pKa égal à 7,1. C'est un solide cristallin blanc ayant une masse molaire de 403,8 g/mol. A pH neutres et acides, l'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans les solutions aqueuses. A pH basiques, elle est soluble dans les solutions aqueuses de bicarbonate de sodium, et de manière générale dans les solutions aqueuses alcalines. Son point de fusion est de 90°C lorsqu'elle est sous forme cristallisée dans le benzène, et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène (Pohland, 1982).

L'OTA présente une fluorescence importante sous ultraviolets : de couleur verte en milieu acide, et bleue en milieu alcalin. Cette fluorescence est à l'origine des méthodes de détection et de dosage de l'OTA (Azemar, 2001). L'OTA résiste aisément aux procédés industriels de transformation. Elle est dégradée partiellement dans des conditions normales de cuisson (Müller, 1991) mais est totalement détruite par des solutions d'hypochlorite de sodium (WHO, 2001). D'autre part, l'OTA est instable à la lumière et à l'air ; elle se dégrade rapidement après une courte exposition à la lumière et à l'humidité.

✓ **Moisissures productrices et toxigénèse**

Il existe une vingtaine de micromycètes capables de produire de l'OTA. Cependant *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum* sont les deux principales espèces productrices d'OTA.

P. verrucosum et *Aspergillus carbonarius* sont plutôt retrouvés sous les climats froids et tempérés tandis qu'*A. ochraceus* croît préférentiellement dans les régions chaudes et tropicales. Ce sont des moisissures connues pour se développer de préférence sur les oléagineux et les céréales comme le maïs, le blé, le seigle, l'orge et l'avoine. Mais elles peuvent contaminer toutes sortes de denrées alimentaires telles que les abats, les viandes, le cacao, les fruits secs, le lait de vache, les farines, ... L'OTA est parfois présente en quantité importante dans le café, car elle résiste très bien à la torréfaction qui soumet les grains de café à une très forte chaleur pendant une courte période (Pfohl-Leskowicz, 1999 ; WHO, 2001 ; Maison Alfort, AFSSA, 2009).

L'OTA est un contaminant fréquent des vins : *Aspergillus carbonarius* est le premier responsable de la production d'OTA dans les vignobles méditerranéens (Maison Alfort, AFSSA, 2009).

La production d'OTA est assujettie aux conditions climatiques (humidité, température, ...). En effet, l'OTA est produite de manière optimale par *A. ochraceus* pour une température de 28°C, qui peut toutefois s'abaisser à 15°C (Trenk *et al.*, 1991), et pour un Aw de 0,79. Néanmoins, d'autres espèces sont moins soumises aux conditions environnementales, comme *Penicillium viridicatum* qui a la possibilité de produire de l'OTA pour un large intervalle de températures allant de 4 à 30°C (Mislivac, 1970). Par ailleurs, l'activité de l'eau (Aw) peut être faible pour la production d'OTA, allant de 0,83 à 0,90 (Norholt, 1979). L'OTA se retrouverait surtout dans les aliments acides (Cuero *et al.*, 1987).

Les champignons producteurs d'OTA peuvent également sécréter d'autres mycotoxines. La présence simultanée d'autres toxines, dans le même milieu, aurait pour conséquence un phénomène de synergie augmentant les effets néfastes de l'OTA. Ainsi l'OTA peut cohabiter avec la citrinine, les aflatoxines ou encore les fumonisines (Pohland *et al.*, 1992 ; Molinié, 2004).

✓ Toxicocinétique

L'absorption de l'OTA se produit majoritairement au niveau du jéjunum, la partie centrale de l'intestin grêle qui se situe entre le duodénum et l'iléon. Elle est moindre au niveau de l'estomac et du duodénum. Elle est facilitée par le fait que l'ochratoxine A possède un faible pouvoir acide et se trouve sous forme non ionisée à pH bas (Maison Alfort, AFSSA, 2009). L'absorption de la forme non ionisée s'effectue par diffusion passive, sans besoin en énergie, au travers de la paroi digestive, ou par transport actif via des transporteurs de la phénylalanine (Sokol *et al.*, 1988).

L'OTA est ensuite distribuée dans tout l'organisme par l'intermédiaire du système porte au niveau hépatique (Kumagai *et al.*, 1982). L'OTA est peu présente sous sa forme libre dans la circulation sanguine car elle présente une forte affinité pour les protéines plasmatiques, et notamment l'albumine humaine : le taux de fixation à cette protéine oscille entre 90 et 99 % (Brochard *et al.*, 2009). Cette propriété est à l'origine de la très longue demi-vie sérique de l'OTA et de son retard de distribution aux différents organes. On estime à 35,5 jours la valeur de cette demi-vie (Schlatter *et al.*, 1996). Elle contribue à la forte toxicité de l'OTA et à l'apparition d'effets chroniques. Cette demi-vie est d'autant plus importante qu'une réabsorption est possible au niveau des tubes collecteurs rénaux (Li *et al.*, 1997). L'OTA continue de s'accumuler dans le rein plus d'un mois après l'arrêt de la contamination, entraînant ainsi un possible retour dans la circulation sanguine. Les reins et le foie sont les deux principaux organes cibles de la distribution d'OTA (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

La métabolisation de l'OTA aboutit à la formation d'une vingtaine de composés différents (figure 16).

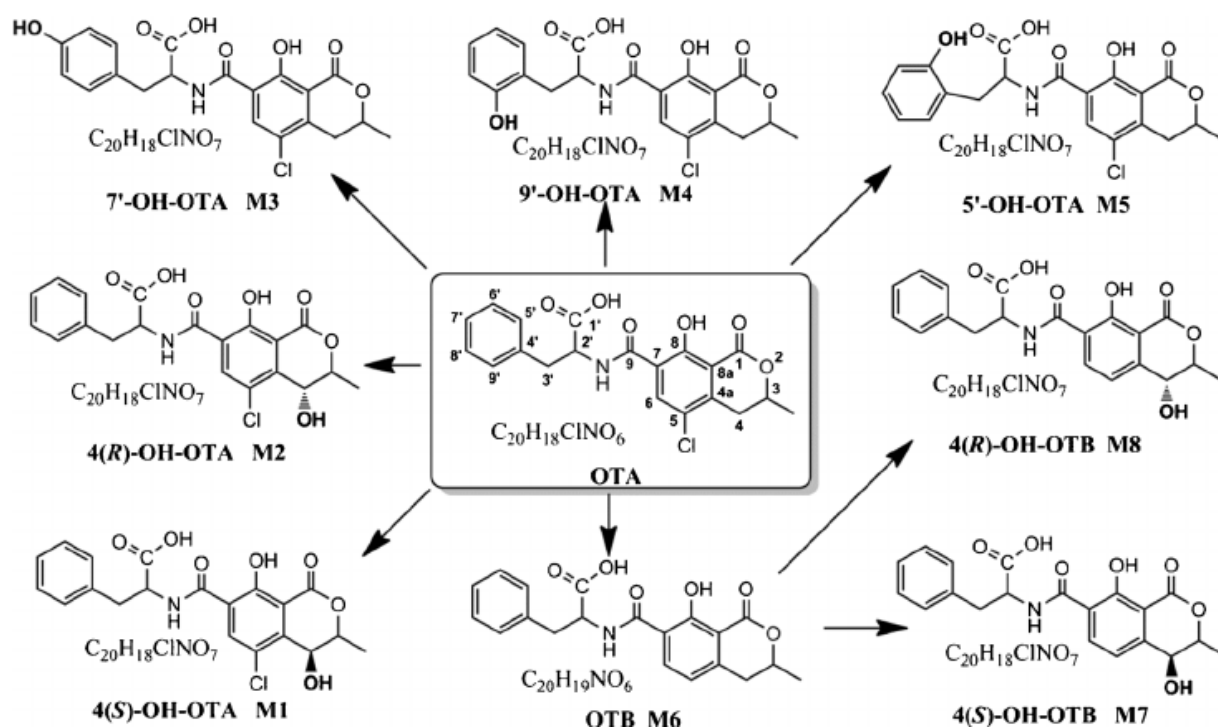


Figure 16 : Principaux métabolites de l'ochratoxine A (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Les voies d'élimination de l'OTA sont multiples : voies urinaires, fécale et biliaire. 30 à 40% de l'OTA absorbée sont majoritairement éliminés dans les urines sous forme inchangée ou sous forme d'OTa (Kane *et al.*, 1986). Les ochratoxines hydroxylées sont quant à elles plutôt éliminées par voie biliaire (Maison Alfort, AFSSA, 2009). Une partie de cette OTA excrétée dans les urines est réabsorbée et remise en circulation dans le sang. L'OTA est éliminée très lentement contrairement à ses métabolites qui le sont nettement plus rapidement (Pfohl-Leskowicz, 1999).

✓ Toxicité

La toxicité de l'OTA est très variable : elle dépend avant tout de l'espèce contaminée, du sexe et de la voie d'administration (Pfohl-Leskowicz, 1999).

L'OTA est surtout reconnue pour sa toxicité rénale. C'est en effet un néphrotoxique puissant ; les signes d'une atteinte rénale apparaissent rapidement à faibles doses (Pohland *et al.*, 1992). Le rein est donc l'organe cible de la toxine. L'OTA agit en inhibant les mécanismes de transports anioniques des membranes des cellules tubulaires (Kane *et al.*, 1986 ; Sokol *et al.*, 1988), par arrêt de la production d'ATP par les mitochondries (Wei *et al.*, 1985). L'OTA est filtrée et réabsorbée dans les tubules proximaux et s'y accumule, diminuant ainsi son élimination dans les urines. L'OTA serait en cause dans la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) caractérisée par une insuffisance rénale chronique et une tubulonéphrite interstitielle. Elle serait aussi à l'origine de cancers rénaux et hépatiques chez l'Homme. Bien que son pouvoir cancérogène soit établi chez l'animal, l'OTA est classée comme cancérogène possible pour l'Homme par le CIRC.

Chez l'animal, l'OTA est responsable d'anomalies et de malformations morphologiques. L'OTA traverse aisément le placenta et s'accumule ainsi dans les tissus foetaux (Brochard *et al.*, 2009). On observe chez les porcins et les volailles, soumis à une dose massive et unique d'OTA, une augmentation de la mortalité foetale (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Au niveau immunitaire, l'OTA permet la déplétion cellulaire des organes lymphoïdes tels que la rate et le thymus (Lea *et al.*, 1989, Singh *et al.*, 1992). À cet aspect immunotoxique s'ajoute une atteinte de la moelle osseuse qui se traduit par une modification des différentes lignées de globules blancs et du nombre de cellules immunitaires (lymphopénie).

L'OTA inhibe la prolifération des lymphocytes T et B, et empêche la production d'Interleukine 2 (IL2) qui a pour rôle de stimuler la réponse immunitaire de l'organisme (Lea *et al.*, 1989).

✓ **Mécanisme d'action**

Formation d'adduits à l'ADN

À ce jour, le mécanisme d'action génotoxique de l'OTA n'est pas entièrement élucidé. Deux possibilités ont été avancées pour tenter d'expliquer ce phénomène cancérigène. La première hypothèse suggère que l'OTA provoque un flux de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Ce sont des espèces chimiques oxygénées (comme les radicaux libres, les ions oxygénés ou encore les peroxydes) rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés. Ces composés génèrent un stress oxydant très important, causant ainsi des dommages oxydatifs et des cassures des brins d'ADN. La seconde hypothèse propose la possibilité que l'OTA subisse une bio-activation menant à la formation d'espèces électrophiles, c'est-à-dire déficientes en électrons, qui réagiraient avec l'ADN par la formation d'adduits liés de manière covalente (Faucet-Marquis, 2005).

Métabolisme des lipides

L'OTA augmente la peroxydation des lipides. C'est le phénomène à l'origine de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. L'OTA aurait donc un effet néfaste sur les lipides constituant les membranes cellulaires phospholipidiques, processus qui serait à l'origine d'altérations structurales (Halliwell *et al.*, 1986).

Métabolisme des protéines

L'inhibition de la synthèse protéique s'effectue au niveau post-transcriptionnel (copie de l'ADN en ARN) ; la compétition entre l'OTA et la phénylalanine, lors de la réaction d'aminacylation entre l'ARN de transfert et la phénylalanine (catalysée par la phénylalaninyl-ARNt-synthétase), empêche l'élongation du futur peptide (Faucet-Marquis, 2005).

Métabolisme des glucides

Le pouvoir diabétogène de l'OTA découlerait de sa capacité à inhiber la glycolyse et la synthèse d'insuline (Maison Alfort, AFSSA, 2009), et de son implication dans l'augmentation de la peroxydation lipidique. Cet effet provient de l'inhibition de la synthèse de l'ARN messager qui code pour le phosphoénolpyruvate carboxykinase (Meisner *et al.*, 1986), enzyme intervenant dans la néoglucogenèse (synthèse de glucose à partir de molécules non glucidiques).

Respiration cellulaire

L'altération des transporteurs de phosphates de la membrane des mitochondries, l'inactivation de l'activité ATP-asyque, ainsi que l'inhibition de la synthèse d'enzymes indispensables au cycle de Krebs, entraînent une diminution de la respiration mitochondriale (Faucet-Marquis, 2005).

1.3.2.3 Aflatoxines (AFs)

La « maladie X du dindon », qui a sévi en Angleterre au début des années 1960, a permis de mettre en lumière l'existence des toxines de moisissures. Les aflatoxines ont été isolées à partir de farines d'arachides, habituellement consommées par les volailles et contaminées par des souches d'*Aspergillus*. Le terme d'aflatoxine a été attribué à ces toxines en référence à *Aspergillus flavus*, premier champignon identifié comme étant responsable de la sécrétion de ces toxines (Asao *et al.*, 1963).

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires hautement toxiques produites par différentes espèces fongiques toxigènes (*A. flavus*, *A. parasiticus*, ...). Ces contaminants naturels de l'alimentation humaine et animale sont à la base de divers problèmes tels que les déficiences nutritionnelles, l'immunosuppression, le cancer du foie, les effets mutagènes et tératogènes (Wagacha et Muthomi, 2008).

Dans le groupe des aflatoxines, 18 composés sont connus, mais seulement les aflatoxines B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1) et M2 (AFM2) sont habituellement surveillées. Ces dernières sont produites par *Aspergillus flavus* et/ou *A. parasiticus* (Papp *et al.*, 2002 ; Coppock et Christian, 2007).

Les noms de ces 4 aflatoxines B1, B2, G1, et G2 sont basés sur leur fluorescence sous la lumière ultra-violette (bleu « blue » ou vert « green ») et la mobilité chromatographique relative pendant la chromatographie (Bennett et Klich, 2003). Par contre les aflatoxines M1 et M2 tiennent leur appellation du fait de leur détection dans le lait « milk » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée. Cependant, les autres aflatoxines (telles que P1, Q1, B2a, et G2a) ont été décrites, particulièrement en tant que produits de biotransformation des métabolites principaux chez les mammifères (Guerre *et al.*, 1996).

- Structure

Les AFs forment un groupe de 18 composés structurellement proches (tableau 9), dont six constituent les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments (B1, B2, G1, G2, M1 et M2). Ce groupe de toxines est issu de la voie des polycétolides. La structure générale des AFs est constituée d'un cycle coumarinique et de deux furanes, auxquels peuvent être accolés un cycle

pentone (AFs B et M) ou un cycle lactone hexagonal (AFs G). Les structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur le squelette de base.

- **Propriétés physico-chimiques**

Les AFs sont des molécules de faibles poids moléculaires (312 à 330 g/mol). Elles sont très peu solubles dans l'eau (10 à 30 µg/ml), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants polaires comme le chloroforme et le méthanol (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

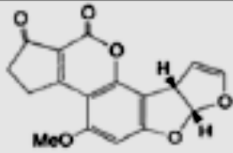
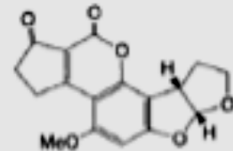
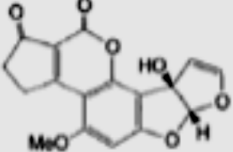
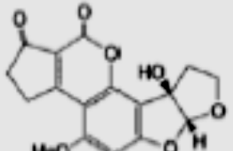
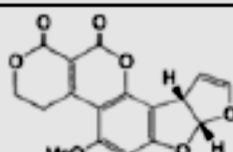
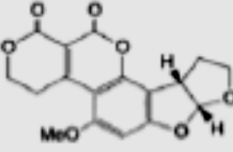
Les pH extrêmes, supérieurs à 10 et inférieurs à 3, entraînent une instabilité de ces structures, également sensibles aux agents oxydants. La température minimale de décomposition s'élève à 237°C. Cette température peut atteindre 299°C pour les structures les plus thermostables telles que les AFs M (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Cette propriété les rend particulièrement résistantes aux traitements thermiques comme la congélation, la pasteurisation ou encore la stérilisation.

- **Moisissures productrices et toxinogénèse**

Les AFs sont produites principalement par trois espèces appartenant au genre *Aspergillus* : *A. flavus*, *A. nomius* et *A. parasiticus* (Castegnaro *et al.*, 2002). *A. flavus* produit essentiellement les AFs du groupe B (Wicklow *et al.*, 1983) tandis qu'*A. parasiticus* sécrète les quatre AFs principales appartenant aux groupes B et G (Dorner *et al.*, 1984).

Ces espèces d'*Aspergillus* sont fréquemment retrouvées dans les zones chaudes et humides. Elles ont été mises en évidence dans les denrées alimentaires telles que les noix (arachides, pistaches, noisettes, ...), les grains (maïs, millet, sorgho, ...), les épices ainsi que le lait (Dorner *et al.*, 2009). La prolifération fongique et la production d'AFs ont lieu au champ et au moment du stockage. La contamination par la moisissure et la toxinogénèse sont facilitées par les mauvaises conditions de stockage (Zinedine *et al* 2017), de transport et d'hygiène. En effet, l'humidité excessive, la sécheresse, les températures élevées sont autant de facteurs facilitant la croissance fongique et la toxinogénèse (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Tableau 9 : Principales aflatoxines (Dutton *et al.*, 1985).

Dénomination	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure chimique
Aflatoxine B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	
Aflatoxine B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	
Aflatoxine M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	
Aflatoxine M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	
Aflatoxine G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	
Aflatoxine G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	

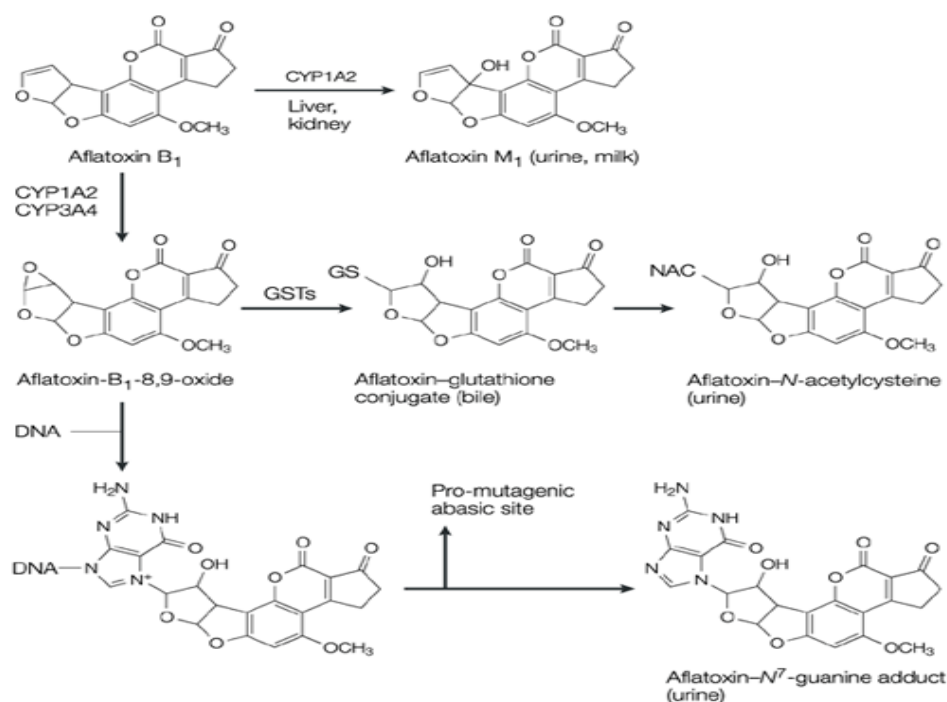


Figure 16 : Principaux métabolites de l'ochratoxine A (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les conditions optimales de croissance et de production d'AFs nécessitent une activité en eau faible, de l'ordre de 0,84 à 0,86, ainsi qu'une température comprise entre 25 et 40°C. Par ailleurs, une contamination conjointe avec une autre mycotoxine peut avoir un effet amplificateur sur la production d'une des toxines. C'est le cas de la production d'AFs si le substrat est déjà contaminé par des fumonisines (IARC, 1993).

- Toxicocinétique

L'absorption des AFs est possible par voie orale et trachéale. Elle est relativement rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle, plus précisément au niveau du duodénum (Kumagai, 1989). Les toxines sont ensuite transportées dans l'organisme grâce au phénomène de fixation aux protéines plasmatiques, notamment à l'albumine.

La distribution de l'AFB₁ a lieu principalement au niveau du foie via la veine porte. Elle s'effectue à partir du plasma sanguin vers les hépatocytes, par un processus de diffusion passive à travers les membranes cellulaires (Müller et Petzinger, 1988). La distribution au sein même de la cellule se fait essentiellement au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique, du cytosol et des mitochondries (Müller et Petzinger, 1988).

Le métabolisme hépatique de l'AFB₁ se produit en deux étapes. La phase I s'effectue par l'intermédiaire des cytochromes hépatiques P450 (CYP450). Sous l'action des CYP450, notamment le cytochrome P1A2 (CYP1A2), l'AFB₁ donne par hydroxylation l'AFM₁ et par époxydation l'AFB₁-8,9-époxyde, le métabolite le plus toxique (figure 17).

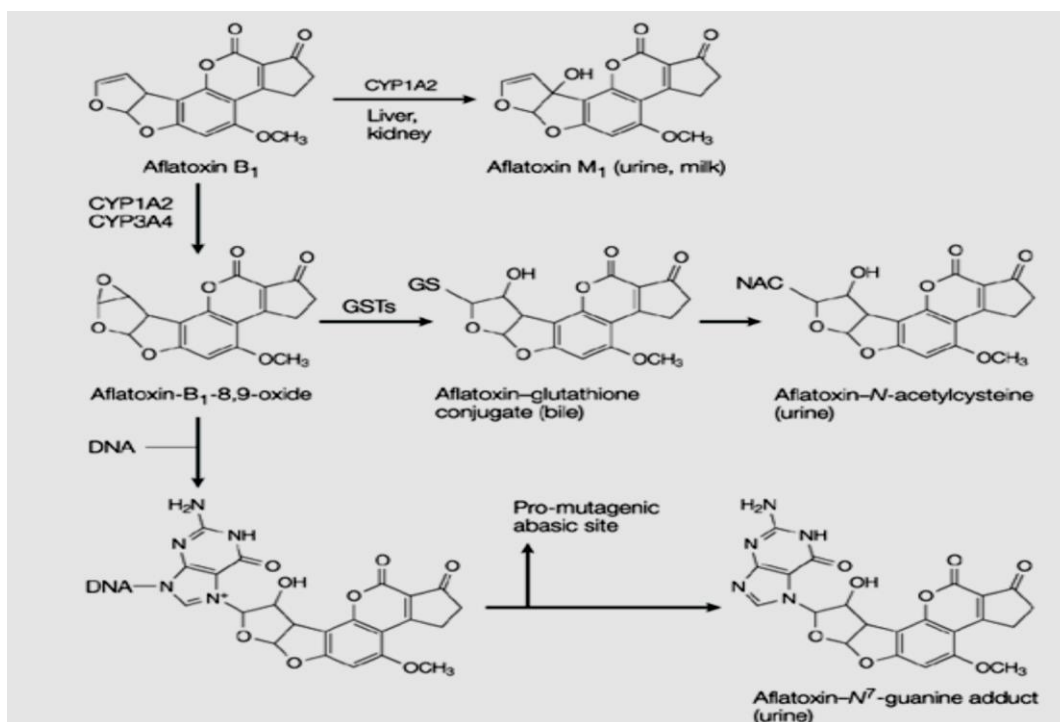


Figure 17 : Voies de métabolisation et d'élimination de l'aflatoxine B₁ (Galtier, 2005)

L'Aflatoxicol, l'AFM₁, l'AFQ₁ et l'AFP₁ sont d'autres composés qui résultent du métabolisme de l'AFB₁ (Brochard *et al.*, 1984). La phase II concerne le devenir de l'AFB₁-8,9-époxyde (développé plus loin). L'AFB₁ n'est pas directement néfaste, c'est sa métabolisation qui active sa toxicité. Bien que le métabolisme hépatique soit prédominant, un métabolisme pulmonaire est possible par l'intermédiaire d'enzymes oxydantes : la lipo-oxygénase et la prostaglandine-H-synthétase (Brochard *et al.*, 1984).

L'élimination est principalement biliaire. Elle représente environ 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales, tandis que la voie urinaire représente 15 à 25 % de la dose ingérée (Wong *et al.*, 1980). La détoxification de l'AFB₁-8,9-époxyde s'effectue principalement par conjugaison au glutathion par le biais de la glutathion-S-transférase. Une partie de l'AFB₁ est éliminée dans la bile, conjuguée au glutathion ou à l'acide glucuronique. Elle peut être excrétée dans les urines sous forme inchangée ou sous forme métabolisée (Brochard *et al.*, 1984). 1 à 10 % de l'AFB₁ restent liés de façon covalente aux protéines hépatiques plusieurs jours après l'ingestion (Wong *et al.*, 1980). Chez certains animaux, il semblerait que les AFs persistent dans le foie et le rein sous forme liée et non métabolisée (Chen *et al.*, 1984).

- Toxicité

L'AFB₁ possède des propriétés cancérogènes, hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques. Des groupes B et G, l'AFB₁ est le composé présentant le potentiel toxique le plus important. L'AFB₁ est la seule mycotoxine ayant un rôle avéré dans l'apparition de certains cancers du foie (Wogan, 2000). C'est la raison pour laquelle elle a été déclarée agent cancérogène pour l'Homme par le CIRC (groupe 1). Les effets d'une toxicité aiguë varient d'une espèce animale à

l'autre suivant l'âge, le sexe, l'état général et le mode de contamination. Chez l'animal, l'intoxication aiguë se traduit par un malaise, une perte d'appétit, un ictère, de l'ascite puis par le décès rapide de l'individu. Le foie présente un aspect décoloré, un volume augmenté, des lésions nécrotiques ainsi que des foyers d'infiltration graisseuse. Des lésions rénales et une congestion des poumons sont aussi observables (Brochard *et al.*, 1984). Chez l'Homme, les cas de toxicité aiguë sont rares. Les derniers cas d'intoxication aiguë remontent aux débuts des années 2000 au Kenya, et ont été attribués à l'ingestion de maïs contaminés (CDC, 2004). L'exposition à des doses massives d'AFs entraîne un ensemble de symptômes ressemblant à une hépatite aiguë : vomissements, ictère, douleurs abdominales, hépatomégalie et oedèmes (Brochard *et al.*, 1984).

Dans le cas d'une intoxication chronique, le foie est la cible privilégiée des AFs. Elle est fréquemment observée chez les animaux d'élevage (volailles, porcs, ruminants, ...). La toxicité chronique se manifeste par une diminution de la prise alimentaire, une asthénie voire un coma dans les cas très sévères. De même que pour une intoxication aiguë, le foie est pâle et présente des lésions de fibrose et parfois de cirrhose. Outre son rôle dans l'apparition d'hépatocarcinomes, l'exposition chronique aux AFs semble être à l'origine de troubles de la reproduction et de malformations fœtales (AFSSA, 2009). Des études sur des souris ont mis en évidence des anomalies du nombre et de la morphologie des spermatozoïdes, ainsi que des malformations squelettiques et cardiaques chez les nouveaux nés. D'autre part, les effets immunosuppresseurs de l'AFB1 rendent les espèces animales sensibles aux infections opportunistes, par diminution de la réponse inflammatoire de l'organisme (Brochard *et al.*, 1984).

- Mécanisme d'action

Formation d'adduits à l'ADN

Les effets cancérogènes et mutagènes de l'AFB1 sont dus à sa biotransformation par les CYP450, ayant pour résultat la formation d'AFB1-8,9-époxyde. L'AFB1-8,9-époxyde a une durée de vie courte mais est particulièrement réactif : il est considéré comme le principal métabolite génotoxique via sa fixation à l'ADN (AFSSA, 2009).

L'AFB1-8,9-époxyde va se lier de manière covalente à l'ADN, l'ARN et les protéines. Il a une affinité particulière pour l'azote N7 de la guanine. La réaction d'addition de ces deux composés aboutit à la formation d'un adduit à l'ADN : le trans-8,9-dihydro-8(7-guanyl) -9-hydroxy-AFB1. C'est la présence de cet adduit qui est à l'origine des mutations (Joubrane, 2011). La mutation la plus fréquemment observée est la transversion G en T, c'est-à-dire le remplacement d'une base nucléique guanine par une thymine. Les mutations les plus étudiées concernent les gènes suppresseurs de tumeurs (gène p53, oncogène ras) et les gènes codant pour la glutathion-S-transférase, enzyme permettant la détoxification de l'AFB1-8,9-époxyde (Brochard *et al.*, 1984).

Il existerait une relation entre cancer hépatique et infection simultanée par le virus de l'hépatite B (VHB). L'infection par le VHB aurait pour conséquence d'augmenter le métabolisme des AF et de diminuer l'activité de la glutathion-S-transférase, et par conséquent la détoxification des composés néfastes (Joubrane, 2011).

Métabolisme des protéines

L'effet immunosuppresseur semble être dû à l'altération de la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il a pour conséquences de provoquer une diminution de la prolifération, de la maturation et de la production des lymphocytes et cytokines (médiateurs de la signalisation cellulaire), une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages, ainsi qu'une diminution des fonctions neutrophile et inflammatoire (AFSSA, 2009).

1.3.2.4 Autres mycotoxines

✓ Fumonisin

Le groupe des fumonisines est constitué de molécules différentes, réparties en 4 groupes : les fumonisines A, B, C et P. Elles ont été identifiées assez tardivement en 1988 (Bezuidenhout *et al.*, 1988). Elles sont souvent à l'origine d'atteintes du système nerveux chez les équidés consommant de l'avoine et du maïs contaminés par des moisissures du genre *Fusarium*. Ce groupe de toxines fait partie des fusariotoxines, toxines produites par les Fusaria. Les fumonisines les plus fréquemment rencontrées sont celles du groupe B (FB).

- Structure

Chimiquement, leur structure de base est proche de celle de la sphingosine, molécule à 18 atomes de carbone à l'origine de la synthèse des sphingolipides, qui entrent dans la composition de la structure des membranes plasmiques. Les fumonisines sont donc des analogues structuraux des acides gras (figure 18).

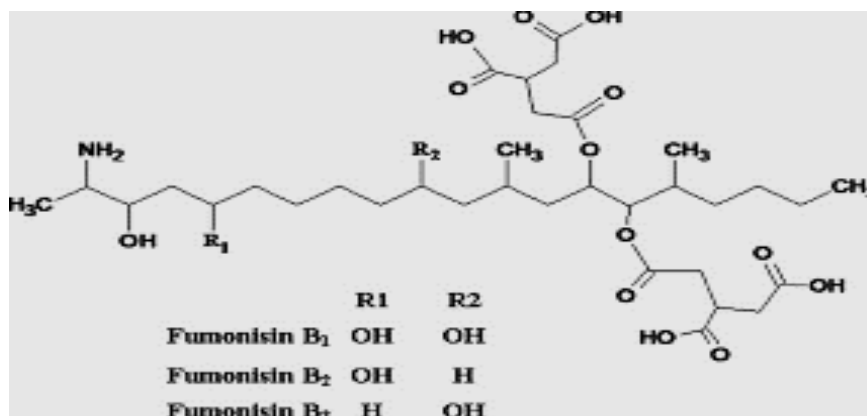


Figure 18 : Structure des fumonisines (Ozonesolutions, 2018).

La structure de base des fumonisines (figure 18) est constituée d'une longue chaîne carbonée, hydroxylée, portant des groupements méthyles et amines primaires (-RNH₂). À cette structure viennent s'ajouter des groupements méthyles, amines, acétylamines et pyridines, permettant la distinction entre les différentes fumonisines (tableau 10). La FB1 est encore dénommée

Macrofusine. Les autres toxines du groupe B sont des analogues deshydroxylés de la FB1 (Gelderblom *et al.*, 1992).

Tableau 10 : Principales fumonisines (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

Dénominations	R ₁	R ₂	R ₃
Fumonisine A ₁	OH	OH	NHCOCH ₃
Fumonisine A ₂	H	OH	NHCOCH ₃
Fumonisine B ₁	OH	OH	NH ₂
Fumonisine B ₂	H	OH	NH ₂
Fumonisine B ₃	OH	H	NH ₂
Fumonisine B ₄	H	H	NH ₂
Fumonisine C ₁	OH	OH	NH ₂
Fumonisine C ₂	H	OH	NH ₂
Fumonisine C ₃	OH	H	NH ₂
Fumonisine C ₄	H	H	NH ₂
Fumonisine P ₁	OH	OH	OH-Pyr
Fumonisine P ₂	H	OH	OH-Pyr
Fumonisine P ₃	OH	H	OH-Pyr

Les fumonisines du groupe B ne présentent pas quant à elles de groupement méthyle en R₃. Les FB se distinguent entre elles par la présence, ou non, de groupements hydroxyles (-OH) en R₁ et R₂ (Branham *et al.*, 1993, tableau 10). Les fumonisines du groupe P se différencient des fumonisines des autres groupes par la présence en R₃ d'un cycle pyridine.

- Moisissures productrices et toxinogénèse

Les fumonisines sont des mycotoxines uniquement produites par des micromycètes du genre *Fusarium*, les deux espèces les plus actives étant *F. proliferatum* et *F. moniliforme* (aussi nommé *F. verticillioides*).

Le genre *Fusarium* infeste feuilles, grains et racines (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999). C'est un parasite courant des végétaux et plus particulièrement du maïs (Nelson, 1992). De plus, c'est une espèce cosmopolite adaptée aussi bien aux climats tempérés qu'aux régions chaudes et humides. Elle est un peu moins présente dans les régions froides.

L'infestation du végétal par *Fusarium* spp peut être exogène ; elle se produit via des éléments extérieurs tels que les insectes, les oiseaux ou encore le vent. Mais l'infestation peut aussi être endogène ; dans ce cas la semence est contaminée avant la germination (Maison Alfort, AFSSA, 2009).

Les moisissures du genre *Fusarium* sont thermotolérantes, elles peuvent se développer à des températures comprises entre 5 et 40°C, et de façon optimale pour une température de 35°C. Au-

delà de 40°C, plus aucune croissance n'est observée. Par ailleurs, la toxine n'est plus produite à partir de 35°C ; elle peut être produite dès 4°C, bien qu'une température de 20°C soit optimale pour sa production (Jaskiewicz *et al.*, 1987). La demande en eau libre (Aw) pour la toxinogénèse est bien supérieure à celle nécessaire à la croissance du champignon. Ainsi, la production de toxines peut être divisée par 300 lorsque la valeur de l'activité de l'eau passe de 1 à 0,9 (Cahagnier *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'humidité du substrat doit être de 32 % pour que la production de fumonisines soit maximale.

Comme pour la moisissure, la toxine résiste très mal aux atmosphères confinées ou modifiées, riches en diazote (N₂) ou en dioxyde de carbone.

✓ Zéaralénone

La zéaralénone (ZEA) ou Toxine F-2, mycotoxine à action oestrogénique, a été isolée pour la première fois en 1962 à partir de maïs contaminé par le champignon *Gibberella zeae* (Stob *et al.*, 1962), la forme téléomorphe de *Fusarium graminearum*.

- Structure

La ZEA, de formule brute C₁₈H₂₂O₅, provient du métabolisme des polycétoacides. C'est une lactone macrocyclique qui dérive de l'acide-β-résorcyclique (Merck Index, 1996). Sa formule développée, ainsi que celles de ses principaux dérivés, sont représentées sur la (figure 19).

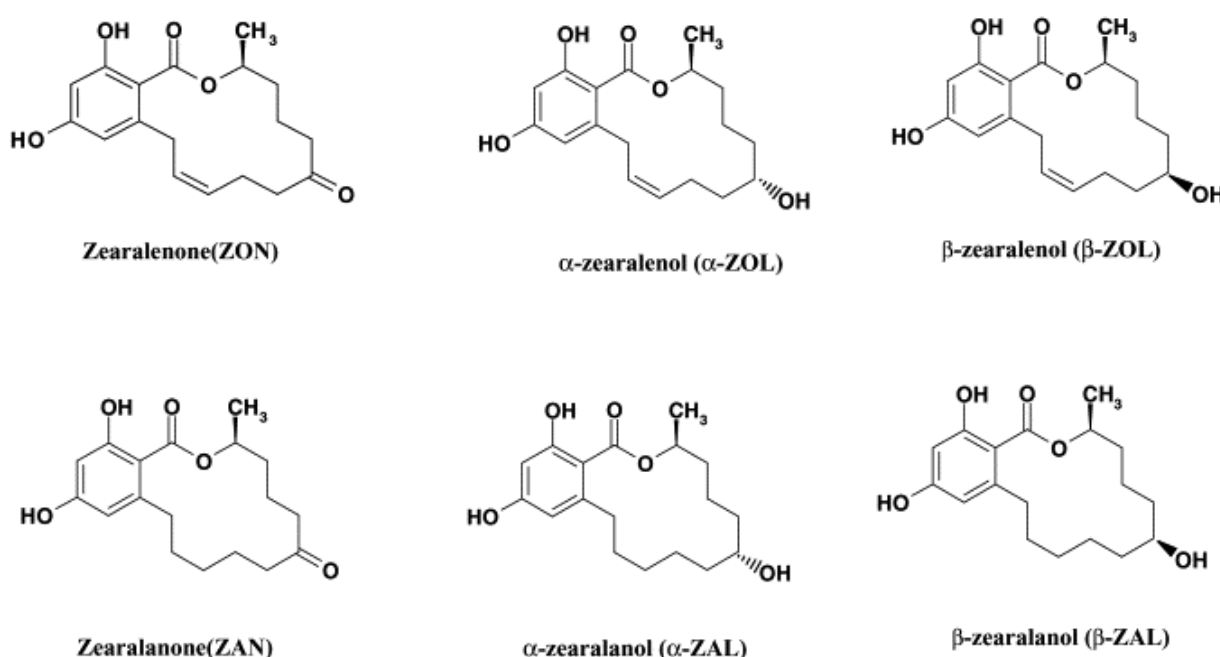


Figure 19 : Structures chimiques de la zéaralénone et de ses principaux métabolites (Merck Index, 1996).

- Moisissures productrices et toxinogénèse

La ZEA est principalement produite par des moisissures du genre *Fusarium*, et particulièrement par *F. graminearum* (Stob *et al.*, 1962). D'autres espèces sont aussi capables de la synthétiser, c'est

le cas de *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. culmorum* (IARC, 1999). Il a été montré que, dans des conditions d'humidité importante, *Aspergillus oryzae*, *A. parasiticus* et *A. versicolor* étaient également capables de synthétiser de la ZEA (Atalla *et al.*, 2003).

Les moisissures productrices de ZEA infectent le plus souvent les céréales avant la récolte, notamment lors de la floraison. La croissance fongique et la toxinogénèse peuvent aussi se produire dans des conditions médiocres de stockage. Les *Fusaria* sont omniprésentes sur le globe terrestre (Pfohl-Leszkowicz, 1999) ; on les retrouve surtout dans les zones climatiques tempérées et chaudes (États-Unis, Amérique du Sud, Océanie, Japon, ...). Elles contaminent de préférence les céréales comme le blé, l'avoine, l'orge, le riz et le maïs, mais aussi les cultures maraîchères et fruitières. Par ailleurs, il n'est pas rare de rencontrer dans les denrées contaminées par la ZEA des trichothécènes (DON) également produites par le genre *Fusarium* (Callebout *et al.*, 2016). La contamination fongique se produit par dissémination des spores au niveau des feuilles, des tiges, des graines et des racines.

La croissance du champignon varie en fonction des conditions de récolte (récolte tardive, mauvaises conditions climatiques) et de stockage (humidité excessive). La production des *Fusaria* est favorisée par les basses températures situées entre 10 à 15°C (Caldwell *et al.*, 1968). La toxinogénèse est facilitée par la nature du substrat, pour lequel le rapport glucides/protéines doit être élevé, et par l'activité de l'eau qui doit être comprise entre 0,95 et 0,97 (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

✓ Patuline

La patuline a été identifiée pour la première fois en 1943 dans des cultures d'*Aspergillus clavatus* (Waksmann *et al.*, 1943), puis isolée pour la première fois à partir de colonies de *Penicillium griseofulvum* (aussi nommé *Penicillium patalum*) et de *Penicillium expansum* (Birkinshaw *et al.*, 1943). Elle a reçu pour cette raison plusieurs dénominations : clavacine, claviformine, clavatine, expansine, pénicidine, ...

Ses propriétés antibiotiques envers les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Katzman *et al.*, 1944) ont conduit la patuline à être utilisée initialement en médecine humaine et vétérinaire. Son utilisation est aujourd'hui suspendue en raison de sa neurotoxicité.

- Structure

La patuline est une lactone hétérocyclique insaturée, de masse molaire égale à 154,1 g/mol. Sa formule brute est $C_7H_6O_4$ (figure 20). Sa biosynthèse découle de la condensation d'une molécule d'Acétyl-coenzyme A et de trois molécules de malonyl-coenzyme A.

- Moisissures productrices et toxinogénèse

La patuline est issue du métabolisme secondaire de plusieurs champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* et *Byssoschlamys*. On recense une quarantaine d'espèces productrices de patuline, dont quatorze appartenant au seul genre *Penicillium*. *Penicillium griseofulvum*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. vulpinum* (aussi nommée *P. claviforme*), *P. paneum*, *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. gladioli*, *P. marinum* et *P. sclerotigenum* sont les principaux *Penicillia* responsables de la sécrétion de patuline.

Chez les *Aspergilli*, *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus* et *A. longivesiva* sont aussi producteurs de patuline. Chez le genre *Byssoschlamys*, c'est *B. nivea* qui est responsable de la production de patuline dans le maïs (Maison Alfort, AFSSA, 2009).

La présence de «pourriture bleue», provoquée par *Penicillium expansum* sur les fruits, ne traduit pas obligatoirement la présence de patuline. Elle a tout de même été détectée dans de nombreux fruits, et notamment ceux de la sous-famille des Maloideae (pomme, poire, coing, ...). On la retrouve aussi dans les produits transformés de ces fruits (jus de pomme, cidre, ...) et dans beaucoup d'autres fruits comme les abricots, les bananes ou encore les pêches (Neri *et al.*, 2010). Les produits céréaliers sont eux aussi touchés par la production de patuline. (Bouafifssa *et al.*, 2018). La toxinogenèse de la patuline, sur des substrats riches en glucides (fruits), est favorisée par des températures comprises entre 20 et 25°C. L'intervalle de températures idéales de production de patuline est plutôt mince en comparaison de celui nécessaire à la croissance fongique, qui lui est compris entre 0 et 30°C (McCallum *et al.*, 2002).

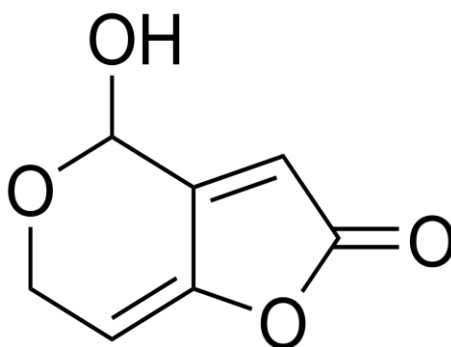


Figure 20 : Structure chimique de la patuline (Istockphoto, 2018).

1.3.3 LES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS

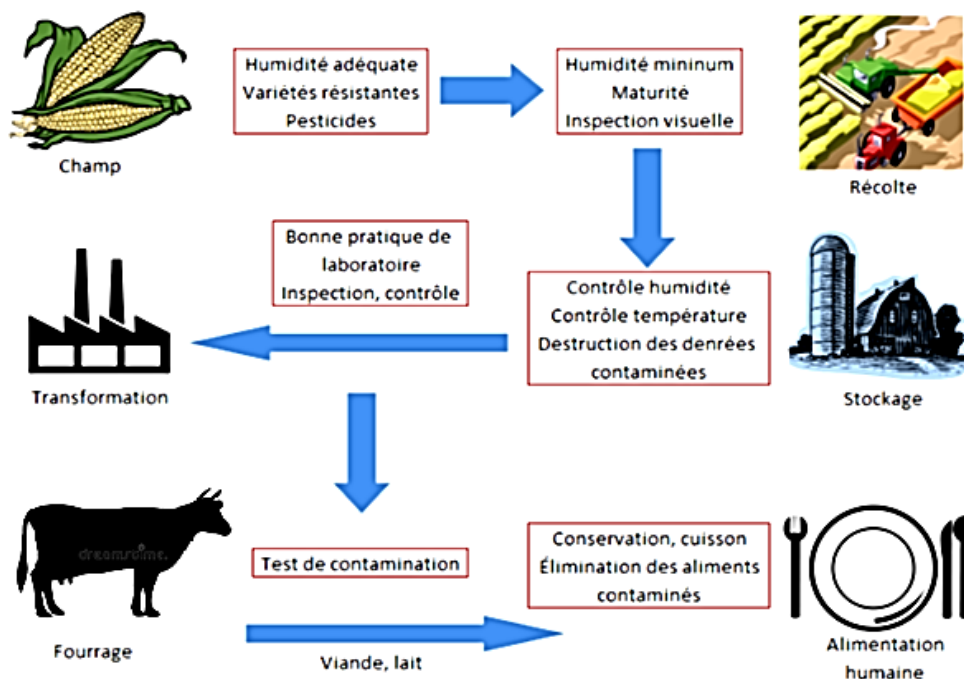
- Conditions de contamination

Du champ jusqu' à l'assiette, de nombreuses espèces de moisissures sont susceptibles de se développer et de sécréter des toxines si les conditions environnementales sont favorables. L'infestation peut avoir lieu avant ou pendant le stockage (figure 21). Étant peu métabolisées par les organismes vivants, les toxines fongiques peuvent également se propager via les produits alimentaires d'origine animale (produits laitiers, viandes, ...), si l'animal a consommé auparavant un aliment lui-même contaminé (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Comme précisé dans la Partie 1, les toxines fongiques sont principalement produites par cinq genres de champignons : *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Claviceps* et *Alternaria*. Elles sont classées en quatre groupes, selon le lieu où elles se développent (Pfohl-Leskowicz, 1999) :

-Les mycètes dont la croissance se produit sur des plantes sénescents ou stressées. C'est par exemple le cas de *Fusarium moniliforme* (fumonisines) et *Aspergillus flavus* (aflatoxines).

-Les champignons directement pathogènes pour la plante comme *Fusarium graminearum* (zéaralénone).



-Les champignons présents dans le sol et dans les débris putréfiés, et qui proliféreront lors du stockage (*Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum*).

-Les mycètes colonisant initialement la plante et prédisposant celle-ci à la propagation de la toxine lors de la récolte. C'est le cas de *Fusarium roseum*, producteur de trichothécènes.

Figure 21 : Contamination par les moisissures le long de la chaîne alimentaire et des moyens de prévention (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

- Répartition géographique des principales mycotoxines

L'apparition des mycotoxines dans un milieu résulte d'un processus complexe. La toxigenèse ne peut pas s'expliquer uniquement par l'apparition de conditions environnementales favorables. Elle est avant tout soumise aux conditions de croissance fongique (cf Partie 1-Mycotoxinogenèse). C'est pourquoi la cartographie de la répartition des toxines à travers le monde est peu précise. La société BIOMIN a dressé en 2013 la carte des taux de contamination des mycotoxines dans différentes régions du monde (figure 22). (Nährer *et al.*, 1981 ; Kovalsky, 2014).

- Les principales denrées concernées

- Les céréales

Les céréales sont des vecteurs importants de dissémination des toxines fongiques, car elles sont universellement consommées par les animaux et les humains. Elles sont contaminées soit au champ, soit au moment du stockage, principalement par l'intermédiaire des insectes.

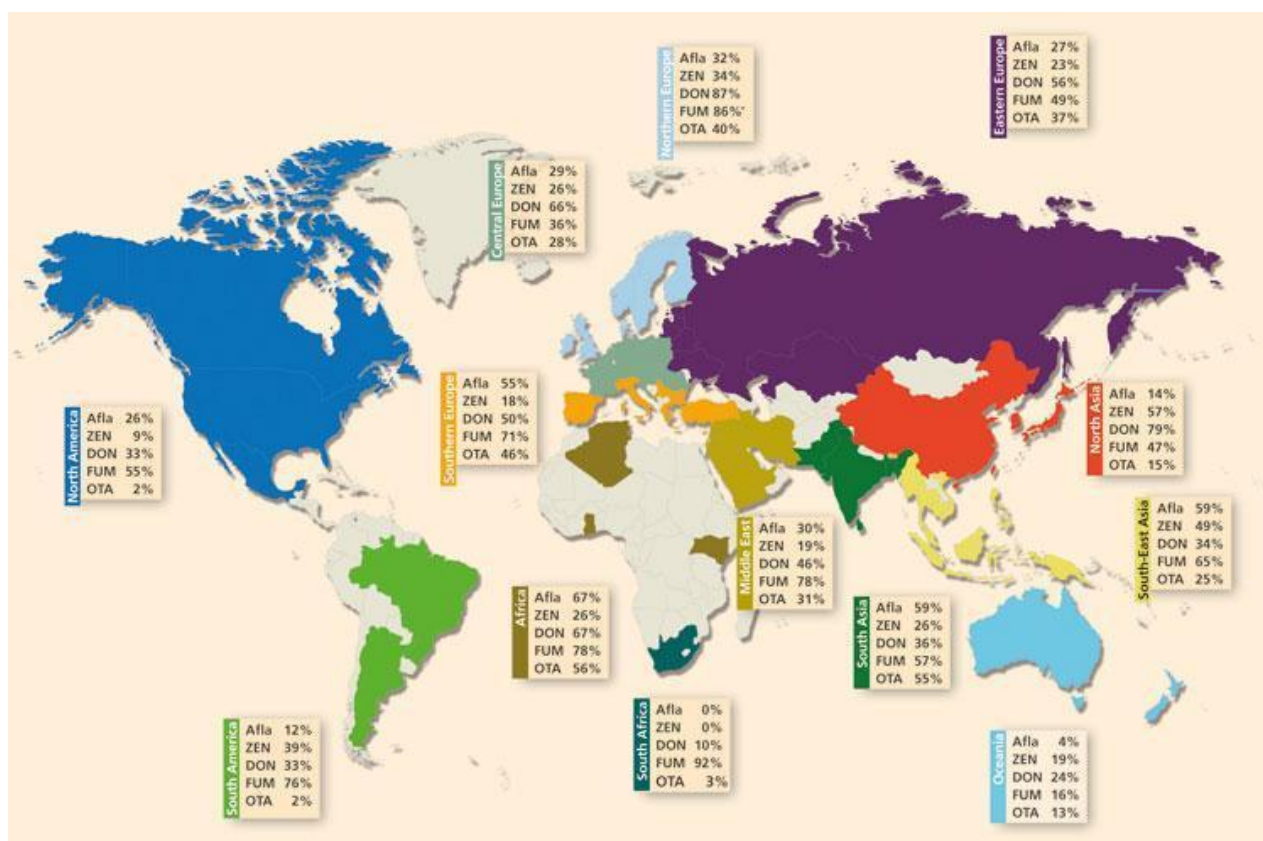


Figure 22 : Taux de contamination alimentaire par les principales mycotoxines dans différentes régions du monde (Kovalsky, 2014).

L'infestation des céréales par les moisissures est favorisée dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides tels que l'Asie du Sud-Est, les pays d'Afrique et d'Amérique du Sud. Dans ces pays, les aflatoxines sont les contaminants les plus fréquents du maïs, du millet, du sorgho, du riz, etc. En Europe, c'est l'OTA qui prédomine dans les céréales. En effet, les *Penicillia* produisant l'OTA se développent de préférence dans les régions tempérées ou froides. Chaque année dans le monde, les pertes de céréales dues aux mycotoxines sont estimées à 55 millions de tonnes (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les dernières prévisions de la FAO ont indiqué que la production céréalière mondiale a augmenté en 2011 de 3,3% par rapport à 2010 pour atteindre 2313 millions de tonnes (FAO, 2011). Dans les pays de l'Union Européenne, la production totale des céréales a été estimée à 283 et 272 millions de tonnes respectivement pendant 2011 et 2012 (COCERAL, 2013). Bien évidemment, cette production élevée doit être conforme aux normes de sécurité des aliments destinés à l'Homme et l'animal vue l'impact économique et sanitaire de ce type d'aliments. Les céréales sont probablement la source la plus importante d'apport en mycotoxines. Devegowda *et al.* (1998) ont indiqué qu'environ 25% des céréales consommées dans le monde sont contaminées par les mycotoxines. Le blé est souvent contaminé par le DON et la zéaralénone, alors que le maïs est principalement contaminé par le DON puis les fumonisines (Rodrigues et Naehrer, 2012). Des teneurs élevées d'aflatoxines peuvent se retrouver dans le sorgho (Da Silva *et al.*, 2000).

- Les fruits et légumes

Les fruits et légumes sont recouverts d'une multitude de moisissures à l'état de spores, capables de proliférer facilement si les conditions de stockage sont mauvaises. Le genre *Penicillium* est le contaminant majoritaire des fruits : *Penicillium digitatum* pousse sur les agrumes, *P. expansum*, quant à lui, prolifère préférentiellement sur les fruits des arbres du genre *Malus* (pommes) et dans les dérivés transformés de ces fruits (jus, compotes). Les jus de fruits insuffisamment stérilisés peuvent être contaminés par *Byssochlamys* spp et *Humicola* spp, dont les spores résistent aux fortes températures (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

- Les produits laitiers

Un grand nombre de micromycètes est utilisé dans la fermentation des fromages. Dans ce cas, les champignons ont été ajoutés intentionnellement (« moisissures nobles ») : on parle alors de contamination endogène (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, ...).

Dans le cas contraire, on parle de contamination exogène. De nombreuses souches sont responsables d'une contamination exogène des produits laitiers, les individus du genre *Penicillium* étant les plus fréquents. Le lait en poudre et les yaourts sont aussi concernés par la contamination de moisissures appartenant aux genres *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* et *Rhizopus*. D'autres produits laitiers sont aussi touchés : le beurre rancit sous l'action d'*Aspergillus repens* et le lait peut être contaminé par l'AFM1, produite par *Aspergillus flavus* (figure 23).

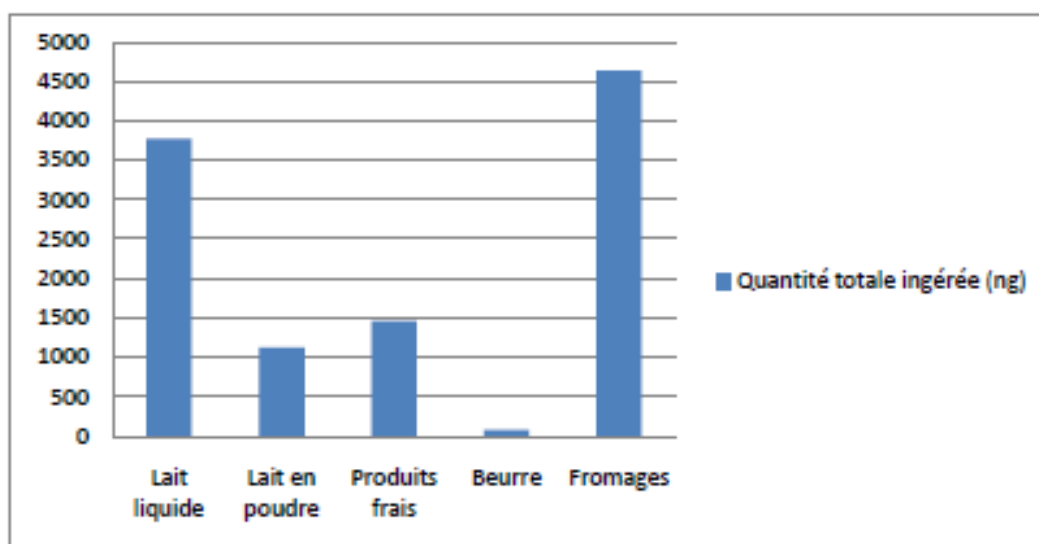


Figure 23 : Estimation des apports d'AFM1, en nanogrammes (ng), par individu et par an, selon le type de produit laitier consommé (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

- Les oléagineux

Les genres *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* sont couramment retrouvés dans les graines et les tourteaux (résidus obtenus après extraction des huiles). Les noix et les oléagineux sont les substrats privilégiés d'*Aspergillus flavus*, sous les climats chauds et humides. Par conséquent, les arachides, le colza, le coton et les huiles contiennent souvent des quantités importantes d'aflatoxines (Groopman *et al.*, 1981). Toutefois, les toxines sont en grande partie éliminées lors de l'extraction des huiles et de l'étape de purification (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

- La viande et les charcuteries

Les charcuteries ne sont pas des substrats naturels favorables aux champignons toxinogènes. Néanmoins, des moisissures peuvent se multiplier, comme *Wallemia sebi*, qui produit le walleminol A (Pfohl-Leszkowicz, 1999). La contamination des viandes résulte plutôt de la transmission des toxines par le biais de la chaîne alimentaire. L'OTA est ainsi couramment retrouvée dans les muscles de porc et de volailles, et dans les abats (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

- La filière viticole

Les vins et jus de raisin sont considérés, après les céréales, comme la deuxième source de contamination en OTA (Cabanès *et al.*, 2002). Cette contamination du vin s'explique par la présence, au vignoble, de nombreux champignons producteurs d'ochratoxines. La concentration d'OTA croît de plus en plus avec les étapes de la maturation du raisin. Les dates des vendanges ont donc une incidence directe sur la teneur en OTA dans le vin (Cabanès *et al.*, 2002).

1.3.4 IMPACT ÉCONOMIQUE DE LA CONTAMINATION DES ALIMENTS PAR LES MYCOTOXINES ET RÉPERCUSSION SUR LA SANTÉ HUMAINE

1.3.4.1 Voie de contamination

L'exposition de l'Homme aux mycotoxines et aux champignons s'effectue essentiellement par ingestion d'aliments contaminés. Néanmoins, une exposition par inhalation ou par voie cutanée demeure possible. Les mycotoxines n'étant pas volatiles aux basses températures, une contamination par voie respiratoire peut se produire lors de l'inhalation de particules contenant des toxines (conidies, poussière de substrat, fragments microscopiques de mycélium, ...). En milieu de travail, les voies respiratoires et cutanées sont souvent atteintes par des mycotoxicoses et des mycoses (Brochard *et al.*, 2009).

1.3.4.2 Un impact économique flagrant

a. Sur l'agriculture

Il est très difficile d'évaluer avec certitude les pertes économiques dues aux toxines fongiques. La Food and Drug Administration (FDA) a estimé la perte due aux aflatoxines, aux TCT et aux fumonisines, à 392 millions de dollars en 2003 aux États-Unis (CAST, 2003). Toujours d'après la FAO, 25 % des cultures vivrières mondiales seraient atteintes chaque année par des moisissures toxinogènes, ce qui engendrerait une perte de près de un milliard de tonnes par an (FAO, 2003). Ces pertes viennent amplifier le problème lié à une production insuffisante, ne permettant

pas de répondre à la demande de l'ensemble de la population mondiale. Les pertes financières ne sont pas uniquement dues aux dommages subits par les cultures et les élevages, mais aussi aux retraits du marché de lots d'aliments contaminés et à l'application de CMA exigeantes. Une étude du JEFCA estime que l'application, par l'Union Européenne, de CMA trop basses d'aflatoxines (4 µg/kg) sur les fruits secs (amandes, noisettes, ...) causerait une perte de 9 millions d'euros dans le monde (Mycored, 2016). Dans ce cas là, le pays exportateur de matières premières est le plus touché. Afin de limiter les pertes dues à une réglementation trop stricte, les CMA sont en constante évolution. Ainsi en 2007, l'EFSA a conclu que l'augmentation à 10 µg/kg des CMA d'aflatoxines dans les fruits secs n'avait aucune conséquence sur le risque cancérigène induit par les aflatoxines (Hadjeba-Medjdoub, 2012).

b. Sur l'élevage

Dans les pays d'Amérique du Nord, la production animale connaît des pertes énormes, estimées à des milliards de dollars chaque année (Hadjeba-Medjdoub, 2012). La contamination des aliments destinés aux animaux est à l'origine d'une réduction de performance de production, d'effets délétères sur la santé de l'élevage, de troubles de la reproduction (ZEA) et d'un éventuel transfert de toxines dans les tissus comestibles de l'animal (ATS, 1998). Tous ces facteurs ont un impact direct sur les pertes économiques liées aux moisissures.

1.3.4.3 Les risques sanitaires

La contamination des aliments destinés à l'Homme ou à l'animal peut provoquer un certain nombre de maladies. On peut distinguer, en médecine humaine et vétérinaire, quatre types d'affections dues aux champignons au sens large (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

1. Allergies

Les allergies dues aux champignons répondent aux caractères généraux de ce type d'affections : rhinite, conjonctivite, bronchite, toux, ... Le vecteur de ces allergies est le plus souvent l'air ambiant, mais il semblerait que les aliments puissent aussi y contribuer (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Chez l'Homme, l'inhalation d'éléments mycéliens (ou de spores) émis dans l'air entraîne des pathologies respiratoires caractérisées par des altérations du système immunitaire, une inflammation des voies respiratoires, de l'asthme et des mycoses allergiques pulmonaires. Les allergies aux champignons peuvent aussi se traduire par des signes cutanéomuqueux comme des dermatites, de l'eczéma ou de l'urticaire. Les professions les plus touchées sont du milieu agricole (ATS, 1998). Le genre de moisissures les plus allergènes sont *Penicillia* et *Aspergilli* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

2. Mycoses

Les mycoses sont des infections parasitaires provoquées par des champignons microscopiques qui pénètrent dans les tissus et s'y développent. Ce phénomène est dû à un champignon pathogène pour l'Homme qui s'adapte aux paramètres physiologiques de l'hôte (température d'environ 37°C).

3. Mycotoxicooses

Les mycotoxicooses sont provoquées par l'absorption unique, ou répétée, d'aliments contaminés par des exotoxines de moisissures. Les cas d'intoxication aiguë sont rares chez l'Homme. Ce sont généralement les ingestions répétées dans le temps qui engendrent des intoxications chroniques. Le caractère insidieux des mycotoxines fait qu'elles sont difficilement détectables et qu'il est difficile de leur imputer la survenue de tel ou tel symptôme.

Pour qu'un composé soit considéré comme responsable de mycotoxicoose, cinq critères doivent être remplis :

- La présence de la toxine dans les denrées doit être établie.
- L'exposition de l'Homme à cette toxine doit être mise en évidence.
- Il doit y avoir corrélation entre une éventuelle exposition et l'incidence de la maladie. Cette corrélation ne peut être mise en évidence que par des études épidémiologiques.
- Les signes observés doivent être reproductibles chez l'animal.
- La toxine doit présenter un mode d'action similaire chez l'Homme et l'animal. La détermination d'exposition chez l'homme se fait par l'analyse de biomarqueurs, mais l'absence de marqueurs biologiques ne traduit pas nécessairement une absence de contamination (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

1.3.4.4 Manifestations cliniques

1.3.4.4.1 Lésions causées par les mycotoxines

La toxicité des mycotoxines peut s'exprimer de façon aiguë ou chronique chez les organismes ingérant des produits alimentaires contaminés. Les intoxications aiguës, faisant suite à une ingestion unique de doses massives de toxines, sont très marquées mais demeurent heureusement exceptionnelles. Les expositions chroniques (expositions répétées à de faibles doses) sont plus à craindre en raison de leur caractère insidieux et du pouvoir de rémanence des mycotoxines. Bien que le risque existe, les intoxications aiguës et chroniques restent rares chez l'Homme alors que les animaux, notamment d'élevage, sont particulièrement exposés aux mycotoxicooses du fait de l'importance des céréales dans leur alimentation (AFSSA, 2009 ; tableau 12).

Tableau 12 : Modes d'action et manifestation clinique chez l'humain des principales mycotoxines (Anses, 2012).

Toxines	Toxicité	Mécanismes d'action
Aflatoxines	Hépatotoxicité, Génotoxicité Immunotoxicité Cancérogénicité	Formation d'adduits à l'ADN Peroxydation lipidique Conjugaison à la Glutathion-transférase
Ochratoxines	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Modification de la synthèse protéique Inhibition de la production d'ATP Détoxification par les peptidases
Fumonisines	Neurotoxicité Hépatotoxicité, Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse des céramides Altération du cycle cellulaire Action sur le rapport Sphingosine/Sphinganine
Zéaralénone	Toxique pour la reproduction Toxique pour la fertilité	Action œstrogénique Conjugaison à la glucuronyltransférase Bio-activation par des déshydrogénases
Alcaloïdes de l'ergot	Cancérogénicité Génotoxicité Toxicité vasculaire	Action dopaminergique Effets vasoconstricteurs Effets ocytotiques
Trichothécènes	Hématotoxicité Toxicité cutanée Immunomodulation	Altération des immunoglobulines Modification de la synthèse protéique Induction de l'apoptose des cellules immunitaires
Patuline	Mutagenèse Immunotoxique Neurotoxique	Inhibition indirecte de nombreuses enzymes (ADN et ARN polymérases)

1.3.4.4.2 Implication avérée des mycotoxines dans des épidémies humaines

✓ Néphropathie Endémique des Balkans :

a. Origine et causes

La Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) est une néphrite tubulo-interstitielle chronique. Son étiologie est mal connue, mais il semblerait que la consommation répétée de céréales contaminées par l'OTA soit l'un des facteurs favorisant son apparition. Elle est endémique de certains pays du Sud-Est de l'Europe. Une augmentation inhabituelle du nombre d'insuffisances rénales chroniques y a été observée depuis 1956 (AFSSA, 2009), et concernerait 10 à 30 % des populations rurales (AFSSA, 2009).

b. Symptomatologie

La NEB débute par une anémie et une légère protéinurie, sans hypertension ni oedème. Le tableau clinique est ensuite complété par une acidose tubulaire, une hyperuricémie, une glycosurie, une créatininémie, une urémie, une enzymurie (augmentation de l'élimination urinaire de la γ -glutamyl-transférase, de la phosphatase alcaline et de la lactatedéshydrogénase), ainsi que par une augmentation des immunoglobulines G et M dans le sang (Radonic et Radosevic, 1992 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999).

La maladie évolue sur 2 à 10 ans jusqu'à l'atrophie du rein, une fibrose corticale sans inflammation et une nécrose des tubules proximaux des reins. On observe la survenue progressive d'une perte d'élasticité des tissus interstitiels situés entre les néphrons aboutissant l'atrophie des reins. La NEB peut évoluer ainsi jusqu'à l'apparition de cancers des voies urinaires supérieures

(bassinets, uretères) (Radonic et Radosevic, 1992 ; Hadjeba-Medjdoub, 2012). Toutes ces atteintes sont accompagnées de symptômes plus généraux tels que des céphalées fréquentes, une asthénie, des douleurs lombaires et un amaigrissement (Creppy *et al.*, 1995 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999) (Tableau 13).

Tableau 13 : Récapitulatif des signes de la maladie NEB chez l'Homme. (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Signes cliniques	Anémie, asthénie, migraine, polyurie douleurs lombaires, dysgueusie insuffisance rénale, amaigrissement
Signes biochimiques	Urémie, protéinurie, acidose, glycosurie microglobulinémie, enzymurie
Signes immunologiques	Augmentation des immunoglobulines G et M
Signes anatomo-pathologiques	Fibrose interstitielle, hyalinisation glomérulaire nécrose tubulaire, atrophie rénale, œdèmes interstitiels, dégénérescence des tubules proximaux

✓ Aleucie Toxique Alimentaire :

a. Origine et causes

L'Aleucie Toxique Alimentaire (ATA) a été décrite pour la première fois en Russie en 1913. Durant la Seconde Guerre Mondiale, plusieurs épidémies ont eu lieu en Sibérie. C'est en 1970 que la Toxine T-2, isolée de *Fusarium sporotrichoides* et de *Fusarium poae*, a été identifiée comme agent responsable de l'ATA (Lafont *et al.*, 1977). Les études épidémiologiques révèlent une saisonnalité de la maladie : elle n'affecterait que les individus ayant consommé des grains contaminés durant l'hiver (Joffe, 1978).

✓ Hépatocarcinome

a. Origine et causes

L'hépatocarcinome, ou cancer hépatocellulaire, constitue la tumeur la plus fréquente des cancers primitifs du foie. C'est le 8ème cancer au monde par ordre de fréquence. Il se développe au départ des hépatocytes et est souvent confondu avec des lésions métastatiques de tumeurs primitives d'autres organes. On parle dans ce cas de cancers secondaires du foie. Son pronostic est sévère, avec une survie moyenne de 3 mois à 1 an à dater du diagnostic.

1.3.4.4.3 Implication supposée des mycotoxines dans des maladies humaines

✓ Maladie de Kaschin-Beck :

a. Origine et causes

La maladie de Kashin-Beck (MKB), également connue sous le nom de «Maladie des gros os», est une affection de l'os et du cartilage, entraînant des retards de croissance ainsi que des déformations articulaires. Cette maladie semble être causée par une exposition aux *Alternaria* spp et *Fusarium* spp, productrices de TCT. Elle est endémique des populations rurales pauvres de la Chine, de la Corée du Nord et de la Sibérie (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

1.3.5 CONTROLE ET PREVENTION DES MYCOTOXINES DANS LES GRAINS

La prévention consiste d'abord à empêcher l'apparition des moisissures aux champs en recourant à de bonnes pratiques culturales (rotation des cultures, variétés adaptées), ou à l'application des fongicides. La sélection et manipulation génétique de semences résistantes sont à l'étude.

Les professionnels limitent le développement des mycotoxines au stockage par une bonne ventilation des stocks, un contrôle de la température, de l'humidité et de l'oxygénation dans les silos. Les scientifiques étudient le recours à des substances antioxydantes (par exemple, les huiles essentielles) qui freinent la formation de mycotoxines. Autre type de solution à considérer la lutte biologique, c'est-à-dire l'implantation d'un champignon inoffensif limitant l'apparition des champignons nuisibles.

1.3.5.1 Norme et législation

Les mycotoxines, véritable problème de santé publique, font l'objet d'une attention croissante de la part des chercheurs et des pouvoirs publics. Un plan de surveillance relatif aux mycotoxines dans les céréales évalue le niveau de contamination des céréales et établit des limites maximales et des bonnes pratiques agricoles.

Une réglementation européenne s'applique dans plusieurs domaines : aflatoxine, ochratoxine A, fusariotoxines (DON, fumonisines B1 et B2, T2 et HT2, zéaralénone), patuline, toxines). L'alimentation animale est également sous surveillance.

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

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'élaboration des réglementations concernant les mycotoxines, y compris la disponibilité des données toxicologiques, la disponibilité des données de l'incidence des mycotoxines dans les différents produits, la législation dans d'autres pays avec lesquels des échanges commerciaux existent pour assurer une alimentation suffisante et les caractéristiques socio-économiques des peuples du monde (Van Egmond *et al.*, 2007). La stratégie intégrée de l'Union Européenne (EU) vise à assurer un niveau élevé de sécurité alimentaire, de préserver la santé des animaux et la lutte contre les pathologies des plantes au sein des pays de l'EU par des mesures cohérentes et une surveillance adéquate, tout en gardant la production élevée et en assurant le fonctionnement du marché intérieur. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) est la structure de l'EU responsable de l'évaluation des risques relatifs à la sécurité des aliments destinés à la consommation humaine et animale. L'évaluation du risque se fait à deux niveaux (Van Egmond *et al.*, 2007) :

-Au niveau européen, cette évaluation est réalisée par le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH) afin d'établir la toxicité des mycotoxines, des facteurs de sécurité et émettre les avis qui serviront pour les législations applicables en Europe.

-Au niveau international, cette évaluation est réalisée par JECFA (joint expert committee of food and additives) qui analyse également la toxicité des mycotoxines et élabore les recommandations au niveau du Codex Alimentarius.

Les législations européennes et les normes du Codex Alimentarius ne sont pas forcément identiques. Dans le cas des mycotoxines, la législation européenne est souvent plus sévère que les normes du codex. La réglementation et les recommandations de l'EU liées au contrôle des céréales sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme (European Commission, 2002 ; 2006b ; 2007 ; 2010) et l'animal (The European Parliament and Council, 2002 ; European Commission, 2006a)

Mycotoxines	Aliment	Teneurs maximales (µg/kg)
Aflatoxine B1	Toutes les céréales et leurs dérivés destinés à l'alimentation humaine	2
	Maïs et riz avant tout traitement physique et destinés à la consommation humaine	5
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Toutes les céréales et leurs dérivés destinés à l'alimentation humaine	4
	Maïs et riz avant tout traitement physique et destinés à la consommation humaine	10
Déoxynivalénol	Céréales non transformées autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1250
	Blé dur et avoine non transformées	1750
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine, son et germe en forme de produit fini pour consommation humaine directe	750
	Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500
	Aliments transformés à base de céréales et les aliments destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	250
	Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux	8000
	Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux	12000
	Céréales non transformées autres que le maïs	100
Zéaralénone	Maïs non transformé	350
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine, son et germe en forme de produit fini pour consommation humaine directe	75

	Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner à l'exception aux produits à base de maïs	50
	Maïs destiné à la consommation humaine directe, collations à base de maïs et de céréales pour petit déjeuner à base de maïs	100
	Aliments transformés à base de céréales et les aliments destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	20
	Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux	2000
	Produits à base de maïs destinés aux animaux	3000
Fumonisine B1 + B2	Maïs destiné à la consommation humaine directe, aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe	1000
	Céréales pour petit déjeuner à base de maïs et de collations à base de maïs	800
	Aliments transformés à base de maïs destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	200
	maïs et aliments à base de maïs destinés aux animaux	60
Ochratoxine A	Céréales non transformées	5
	Produits dérivés de céréales non transformés et céréales transformées et produits destinés à la consommation humaine directe	3
	Aliments transformés à base de céréales et les aliments destinés aux nourrissons et les jeunes enfants	0, 05
	Céréales et aliments à base de céréales destinés aux animaux	250

Par rapport aux années 90, plusieurs pays ont établi des législations pour de nombreuses mycotoxines et pour plus de produits jusqu'à 2002. En Afrique, quinze pays sont connus pour avoir des réglementations spécifiques de mycotoxines dont la plupart concernent les aflatoxines. La Tunisie a mis en place un niveau maximal tolérable d'aflatoxines dans diverses denrées alimentaires et qui correspond à 2 ng/g (INNORPI, 1983). En Egypte, la limite tolérable pour l'AFB1 a été fixée à 5 µg/kg dans les céréales (sauf le maïs) et 10 µg/kg dans le maïs, alors que pour les aflatoxines

totales, la limite tolérable a été fixée à 10 µg/kg pour toutes les céréales à l'exception du maïs dont la teneur maximale tolérable a été fixée à 20 µg/kg. La teneur maximale en AFB1 tolérée en Algérie est 10 µg/kg (FAO, 2004).

Le Maroc semble avoir la réglementation la plus détaillée sur les mycotoxines en Afrique (FAO, 2004). Des règlements ont été établis par le Comité Interministériel pour le contrôle des aliments et la répression des fraudes (CIPCARF) sur les limites de l'AFB1, l'OTA et la ZEN dans les céréales destinées à la consommation humaine, de l'AFM1 dans le lait et dérivés pour les enfants et les adultes et la limite maximale de la patuline dans les fruits et les jus.

Le Maroc a fixé aussi des législations concernant les contaminants alimentaires avec l'arrêté n°1643-16 du 23 chaabane 1437 (30 mai 2016) publier dans le bulletin officiel en fixant les limites maximales autorisées des contaminants dans les produits primaires et les produits alimentaires.

Le tableau 15 montre des limites pour les mycotoxines dans les denrées alimentaires et les matières premières dans les pays de l'Afrique du Nord.

Tableau 15: Teneurs maximales (µg/kg) en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord (INNORPI, 1983 ; FAO, 2004 ; Zinedine *et al.*, 2006. Arrêté n°1643-16)

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Maroc	Tunisie	Algérie
AFB1	Farine de blé	2		
	Céréales	5	2	10
	Maïs	5		
	Arachides, pistaches, noix et amandes	8		
	Arachides et graines	12		
	Oléagineuses	8		
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Céréales sauf maïs	4		
	Maïs	4		
	Arachides et graines	15		
	Oléagineuses	15		
Aflatoxine M1	Lait destiné aux adultes	0, 05		
	Lait destiné aux enfants	0, 03		
Ochratoxine A	Céréales	5		
	Café	5		
Zéaralénone	Céréales	100		
Déoxynivalénol	Blé et farine de blé	1750		
	Orge et farine d'orge	750		

1.3.5.2 Lutte contre les moisissures

- Avant la récolte

a. Choix du cultivar

La lutte contre l'apparition de moisissures au champ repose sur le choix de la variété de la plante cultivée. Période de floraison, vitesse de floraison, hauteur des tiges, résistance naturelle aux micromycètes, et adaptation aux conditions climatiques sont autant de facteurs permettant de prévenir une contamination fongique au champ.

En effet, les cultivars arrivant rapidement à maturité permettront une récolte plus rapide. Cette récolte aura pour conséquence de diminuer l'humidité des grains, ainsi que d'éviter la progression d'une éventuelle maladie et une trop importante production de toxines. La variété de seigle Gazelle est par exemple moins contaminée par *Claviceps* spp, du fait de sa floraison rapide qui survient au printemps (Boudra *et al.* 2007).

D'autre part, certaines variétés présentent des résistances naturelles vis-à-vis des moisissures de champs. Ces résistantes s'expriment de différentes façons, résistance à l'infestation par le champignon, résistance à la propagation de la maladie et dégradation des toxines, évitant ainsi leur accumulation dans la plante. Il convient de citer en exemple les variétés de blé Fundulea et d'orge Winthrop qui sont des cultivars résistants au micromycètes du genre *Fusarium* (Jeunot, 2005).

b. Modifications génétiques

Elles permettent d'obtenir ou de sélectionner des plantes naturellement résistantes aux maladies fongiques, on parle alors d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Ces manipulations génétiques ont surtout pour ambition de modifier les gènes codant les enzymes impliquées dans la dégradation des parois cellulaires des champignons, à savoir les chitinases et glucanases.

Le second intérêt des manipulations génétiques est de permettre l'obtention de plantes résistantes aux insectes nuisibles. Le but est de diminuer les dommages engendrés par les nuisibles. En effet, les lésions créées par les insectes sont l'un des facteurs favorisant l'introduction et la croissance fongiques dans les grains. Le maïs Bt est un OGM obtenu par addition à son génome d'un gène, nommé cry1Ab, tiré du patrimoine génétique d'une bactérie: *Bacillus thuringiensis* (Bt). Ce gène code pour une protéine cristalline, toxique envers certains lépidoptères nuisibles (pyrales). Ces maïs Bt présenteraient des taux moins importants de fumonisines que les maïs non Bt. Le genre *Fusarium* serait le plus atteint par cette manipulation. En ce qui concerne les aflatoxines, les résultats sont plus contrastés (Boudra *et al.*, 1994).

c. Utilisation de fongicides

Il est également possible d'avoir recours à des traitements fongicides pour prévenir l'apparition de moisissures. Toutefois, leur utilisation est délicate et leurs résultats sont aléatoires. En effet, les champignons vivant en symbiose avec la plante, la disparition d'une moisissure peut permettre le développement d'une autre moisissure insensible au fongicide utilisé. Par exemple : les Fusaria sont les micromycètes les plus ciblés par les fongicides, car les plus présents dans les cultures avant la récolte. Les pesticides les plus efficaces contre *Fusarium* spp sont les Triazoles, comme le Tébuconazole ou le Metconazole. *Microdochium nivale* est quant à lui contrôlé par les composés de la famille des Strobilurines (Azostrobine). Lorsque qu'une culture est traitée contre *M. nivale* à l'aide de Strobilurines, ce dernier laisse alors place aux autres Fusaria toxigènes non contrôlés par ces composés (Jeunot, 2005).

La bonne utilisation des fongicides passe donc par l'alternance, l'association et la diversification des composés employés. Leur utilisation doit avoir lieu entre l'épiaison et la floraison de la plante. Par ailleurs, aucun fongicide ne permet une éradication totale du champignon.

d. Utilisation de souches fongiques moins toxigènes

Le principe c'est de la compétition entre les moisissures de champs et d'autres micro-organismes peu, voire non toxigènes. Ces derniers, introduits dans le sol, vont pouvoir se développer grâce aux nutriments présents, au détriment des moisissures toxigènes. On parle de phénomène d'exclusion compétitive. Aux États-Unis, le procédé est mis en oeuvre en inoculant des souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* dans des champs de coton et d'arachide. Une baisse significative des teneurs en aflatoxines a été observée par rapport aux champs témoins non traités. Ces souches, labellisées biopesticides, prolongeraient aussi leur action au stockage (Galtier *et al.*, 2011). Il est possible d'optimiser la lutte contre la prolifération fongique en associant ces souches à des fongicides auxquels elles sont insensibles (Galtier *et al.*, 2011).

e. Bonnes pratiques culturales

i. Traitements des semences

Certains procédés thermiques ont fait leur preuve. Le traitement des grains de blé à la chaleur (5 jours à 80°C) permet de détruire *Fusarium graminearum*, sans pour autant altérer les capacités de germination des grains (Jeunot, 2005).

D'autres méthodes mettent en oeuvre des techniques mécaniques de séparation des grains sains des grains contaminés comme l'utilisation de tamis, la séparation par gravité et la flottation dans des solutions de chlorure de sodium à 20 %. Ces techniques sont surtout utilisées pour l'élimination des sclérotés de l'ergot dont l'aspect macroscopique est un avantage (Caulin, 2012).

En ce qui concerne les traitements fongicides des semences de blé, ils ont aussi prouvé leur efficacité dans la lutte contre les sclérotés de *Claviceps* spp.

ii. Période de semaison-Choix de la date des semis

Pour le maïs, le choix de la date des semis (et de la récolte) doit être le plus précoce possible. Il est nécessaire de prédire la période de floraison (phase la plus sensible à la contamination) afin d'esquiver le stress causé par les périodes de chaleur et de pluies, tels que les mois de juin et juillet (Delos *et al.*, 2014).

iii. Cultures intercalaires

De bons résultats ont été remarqués en semant du trèfle entre les rangs de semis de céréales: le trèfle empêcherait les spores de *Fusarium* d'atteindre les épis (Pageau *et al.*, 2016).

iv. Rotation des cultures-Assolement

L'assolement est une technique culturale qui consiste à alterner, sur plusieurs années biennale, (triennale ou quadriennale) et sur plusieurs parcelles cultivables (soles), différentes cultures (légumineuses, céréales, ...) en fonction de leurs besoins spécifiques (figure 24).

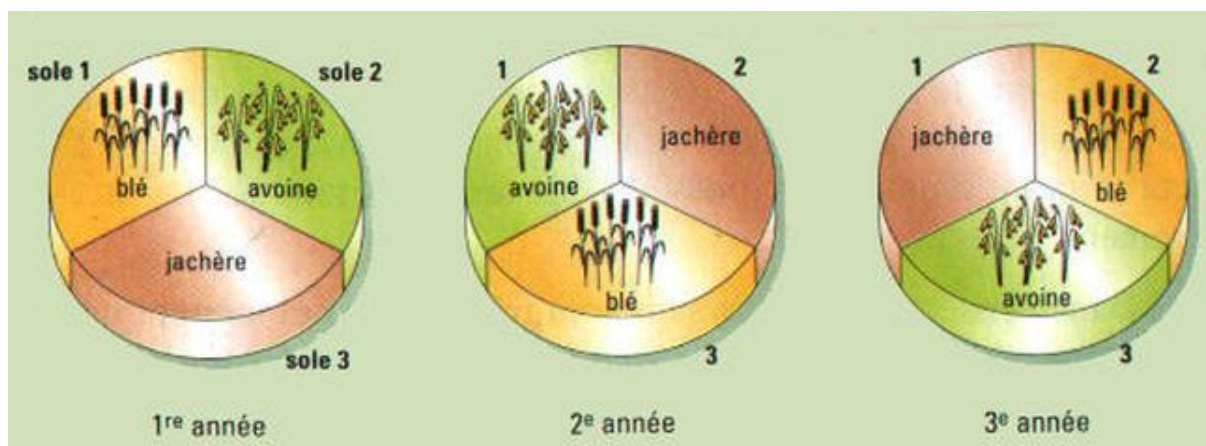


Figure 24: Rotation triennale des cultures (Heleneseguin 2018).

Cette technique a plusieurs avantages :

- Elle rompt le cycle de vie des organismes nuisibles.
- Elle rompt le cycle de développement des plantes adventices («mauvaises herbes»).
- Elle permet d'alterner l'utilisation des fongicides, herbicides et insecticides, réduisant ainsi le risque d'apparition de résistances.
- Elle maintient, ou améliore, la qualité et la composition du sol.

Ainsi les cultures de betteraves, légumineuses et tournesol sont à privilégier avant la culture de blé pour réduire l'incidence des cas de fusarioses. Néanmoins, la rotation peut avoir des effets paradoxaux sur la culture des céréales à paille. En effet, les cultures précédentes de maïs et de sorgho augmentent le risque de fusarioses sur le blé, alors qu'elles sont recommandées pour prévenir l'apparition de *Claviceps* spp (Delos *et al.*, 2014).

v. Gestion des résidus

Pour empêcher la contamination des cultures suivantes, il convient d'éliminer les résidus des végétaux récoltés.

Le labour est la méthode la plus couramment utilisée. Elle permet l'enfouissement des débris (à 10 ou 30 centimètres de la surface), limitant ainsi leur contact avec les futurs végétaux cultivés. Toutefois, comme la décomposition est restreinte, les débris peuvent remonter à la surface au moment du labour de l'année suivante. C'est une méthode qui a démontré son efficacité pour lutter contre les sclérotés de *Claviceps* spp et pour limiter les fusarioses du blé.

La méthode du brûlage est une technique de régénération des sols qui consiste à détruire par le feu les éventuels résidus de végétaux cultivés ou de végétaux adventices (destruction des sclérotés). Pour des raisons évidentes, c'est une méthode très réglementée et peu utilisée en France (Cornière, 2014).

vi. Irrigation-Fertilisation du sol

La fertilisation des champs de culture, via les engrais, permet un apport en minéraux (N, C, O, P, K, ...) indispensables au bon développement de la plante. Une irrigation et une nutrition minérale adaptées assurent une protection optimale contre les situations de stress que subit la plante (insectes, sécheresse, ...). L'irrigation reste le meilleur moyen pour la plante de se prémunir contre

les attaques d'Aspergilli, qui affectionnent particulièrement les temps chauds et secs (Delos *et al.*, 2014).

vii. Gestion des ravageurs

On entend par ravageur tout organisme animal (oiseaux, rongeurs, insectes, ...) susceptible de s'attaquer aux plantes cultivées ou aux récoltes stockées, et entraînant un préjudice économique. Leur présence au champ peut être à l'origine de blessures infligées aux plantes, facteurs favorisant la croissance fongique. La réduction des pertes agricoles s'appuie donc également sur la lutte contre ces nuisibles. Elle est fondée sur l'usage de pièges, de filets à arbres fruitiers, de canons agricoles ou encore d'insecticides.

- Pendant la récolte

Le choix de la période de récolte est primordial. Elle doit être effectuée le plus tôt possible lors des périodes pluvieuses, de manière à éviter une éventuelle apparition de *Fusaria* qui se développent assez rapidement dans des conditions de forte humidité. Par ailleurs, la récolte devra être réalisée à maturité ou à prématurité afin de maintenir la récolte sèche. Ainsi, le meilleur moment pour la récolte de blé survient lorsque les grains contiennent entre 14 et 19 % d'humidité (Pageau *et al.*, 2016).

Du reste, un réglage correct des machines permet d'épargner l'intégrité des grains récoltés. Il est conseillé de régler les moissonneuses-batteuses de façon à éliminer, par ventilation, les grains contaminés qui sont moins denses et plus légers que les grains sains. En revanche, ce procédé contribue à la contamination du champ. De plus, le nettoyage des machines limite la contamination du grain par les insectes et moisissures (Delos *et al.*, 2014).

- Après la récolte

a. Triage

Dans un premier temps, il est recommandé de nettoyer les grains récoltés avant la phase de stockage. Un lavage à l'eau permet d'éliminer grossièrement les débris de moisissures et les mycotoxines. Le nettoyage peut être complété par des méthodes de séparation des grains et corps étrangers divers (cailloux, terre, insectes, ...). La séparation (Galtier *et al.*, 2011) peut être manuelle (maïs au Népal) ou mécanisée (arachide aux États-Unis). Pour cette dernière, l'opération est basée sur la différence de taille et de densité des débris (tamisage). Ces procédés sont généralement non-invasifs ; ils ne changent ni l'aspect ni la valeur nutritionnelle des produits manipulés.

b. Séchage

C'est une étape primordiale pour lutter contre les micromycètes. Le but est de maintenir un faible taux d'humidité dans les produits récoltés. Pour le blé, la teneur en eau doit être inférieure à 14 % (Pageau *et al.*, 2016).

L'étape de séchage est réalisée soit par ventilation sèche soit par ventilation de refroidissement, ce qui permet le ralentissement de la croissance des organismes fongiques.

L'étape du séchage s'effectue à l'aide de séchoirs munis de ventilateurs. Cette étape peut être complétée par une maîtrise de l'atmosphère de séchage. Ainsi, une diminution des taux d'oxygène et d'azote, et une augmentation du taux de dioxyde de carbone auront pour conséquence un arrêt de la croissance fongique.

c. Stockage

Un bon stockage passe par le maintien d'une faible température ainsi que d'une faible humidité, impropres au cycle de vie de la plupart des moisissures et insectes. Comme pour le

séchage, le stockage sous atmosphère contrôlée permet de réduire le développement des moisissures.

Les récoltes peuvent être stockées de deux manières :

-Dans des sacs, à l'air libre, ou entreposés à l'abri des conditions climatiques.

-En vrac dans des silos ou des cellules, préalablement nettoyés et désinfectés. Les silos doivent être étanches à l'humidité extérieure, et ventilés.

Des traitements antifongiques et des agents conservateurs peuvent être utilisés à ce stade, comme les acides organiques (acétique, propionique ou benzoïque). De par leur activité biostatique, ils n'ont d'action que sur les moisissures et non sur les toxines fongiques (Jeunot, 2005).

1. 3. 5. 3. Méthodes de détoxification ou de décontamination des aliments

▪ Traitements chimiques

Les méthodes chimiques ont à l'origine été développées surtout pour lutter contre les aflatoxines. Utilisées seules, elles ne sont pas suffisamment efficaces. Elles ne sont que complémentaires des bonnes pratiques de culture et de stockage, ainsi que des méthodes de décontamination physiques. Elles sont principalement mises en oeuvre, après la récolte, dans la décontamination des denrées destinées à l'alimentation animale.

L'ammonisation ou ammoniation est le procédé le plus utilisé pour la détoxification des denrées contaminées (en particulier le maïs) par les aflatoxines et les fumonisines, notamment la FB1. Son effet est potentialisé par les hautes températures et hautes pressions (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Il existe de nombreux autres procédés de décontamination chimique faisant intervenir des réactions acido-basiques (soude), d'oxydation (ozone, peroxyde d'hydrogène), de réduction (bisulfites), etc. (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

▪ Traitements physiques

a. Irradiation-ionisation

L'irradiation consiste à soumettre l'aliment à des rayonnements ionisants (faisceaux d'électrons, rayons γ) dans le but de dénaturer les toxines et micro-organismes qu'il contient. Bien qu'elle améliore nettement la durée de conservation, elle a comme inconvénient majeur de détruire les nutriments et vitamines contenus dans les denrées. Par ailleurs, c'est une méthode controversée à cause de la création de radicaux libres qu'elle implique (les radicaux libres, ou DRO, sont soupçonnés être cancérogènes et accélérateurs du vieillissement cellulaire).

b. Inactivation thermique

En raison de la thermorésistance des mycotoxines, les procédés thermiques ne suffisent pas à les détruire totalement. La désactivation thermique peut être améliorée par l'ajout d'éléments permettant la dégradation chimique d'une toxine, ou par la modification de certains facteurs tels que le pH et l'humidité (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Le traitement par la chaleur est surtout efficace sur la prolifération fongique, mais peu sur les mycotoxines. Par exemple, pour diminuer de 76 % le taux d'OTA contenue dans de la farine blanche, celle-ci doit être soumise pendant 40 minutes à une température de 250°C (Scott, 1984). L'OTA résiste donc très bien à la cuisson du pain.

c. Adsorption

C'est une technique qui consiste à incorporer des agents adsorbants dans les rations alimentaires des animaux, suspectées d'être contaminées. Ce sont des composés inertes d'un point de vue nutritionnel et chimique. Ils agissent en fixant et en séquestrant les mycotoxines dans la lumière intestinale, réduisant par conséquent leur biodisponibilité. Ils sont surtout utilisés dans l'alimentation des bovins, porcins et volailles. Il en existe plusieurs types (Guerre, 2000 ; David, 2001) :

- Les argiles simples sont des adsorbants minéraux non spécifiques. En font partie, les bentonites, la zéolite ou encore le kaolin. La bentonite serait efficace sur les aflatoxines et la toxine T-2.

- Les argiles complexes sont particulièrement actives sur les aflatoxines, et inopérantes sur les TCT. Les aluminosilicates sont les chefs de file de ce groupe.

- Le charbon actif est utilisé pour la décontamination des AF, de la patuline et de la toxine T-2.

- Les résines échangeuses d'ions sont intéressantes pour les AF, la ZEA, la toxine T-2 et l'OTA.

Mais par leur manque de sélectivité, les charbons et argiles sont à même de réduire aussi les fractions biodisponibles de nutriments, minéraux et vitamines.

▪ Traitements biologiques

La décontamination biologique est la transformation enzymatique des mycotoxines en métabolites moins toxiques, par l'intermédiaire de nombreux micro-organismes (levures, champignons, bactéries). Ainsi, il a été observé que des souches de *Bacillus* et de *Lactobacillus* étaient en mesure de détoxifier partiellement les aliments contaminés par l'OTA (Bohm *et al.*, 2000). En ce qui concerne la fermentation, le procédé permettrait de décontaminer la bière (malt) en AFB1 à hauteur de 80 à 82 % (Chu *et al.*, 1975).

1.3.6 MYCOTOXINOGENÈSE

La mycotoxinogénèse correspond à l'ensemble des conditions nécessaires au processus de synthèse et de sécrétion des toxines fongiques dans l'environnement. La production de toxines et le développement fongique sont intimement liés. Dès lors, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique joueront aussi un rôle sur la toxino-génèse. En revanche, les conditions idéales de toxino-génèse sont plus étroites que celles favorisant le développement fongique (Moreau, 1994).

L'apparition de toxines fongiques dans un milieu est d'autant plus complexe qu'une même espèce de moisissure qui a la faculté de synthétiser plusieurs substances différentes selon les conditions environnementales. C'est le cas d'*A. flavus* qui peut sécréter, entre autres, des aflatoxines, de l'acide cyclopiazonique (CPA) et de l'acide kojique. Inversement, une même toxine peut être produite par des espèces de moisissures différentes :

L'ochratoxine A est à la fois produite par *Penicillium verrucosum* et *Aspergillus ochraceus*. La synthèse des mycotoxines n'est donc pas seulement influencée par des paramètres environnementaux mais aussi par la croissance d'une moisissure spécifique. Par conséquent, l'identification d'une espèce de moisissure sur un substrat ne permet pas de prédire avec certitude la présence d'une mycotoxine dans ce substrat. D'autre part, la résistance des toxines aux facteurs

physiques est telle que l'absence de moisissures sur une denrée ne signifie pas obligatoirement que celle-ci est dépourvue de mycotoxines.

La toxinogénèse est un processus complexe qui n'est pas intégralement connu. La synthèse des toxines fongiques et la croissance fongique sont donc conditionnées par divers facteurs d'ordre physiques, chimiques et biologiques (D'Mello *et al.*, 1997).

1.3.6.1 Facteurs physiques

1.3.6.1.1 Activité de l'eau

L'activité de l'eau (A_w) est définie comme le rapport de la pression de vapeur d'eau d'un produit (p) sur la pression de vapeur de l'eau pure (p_0), à une température donnée (Pitt *et al.*, 1985). Elle est à différencier de l'humidité absolue (teneur en eau) qui correspond à la masse d'eau du produit rapportée à la masse totale du produit.

En pratique, l'activité de l'eau reflète la quantité d'eau disponible dans une substance liquide ou solide. Elle permet de rendre compte de la quantité d'eau « libre », indispensable aux réactions biochimiques d'un micro-organisme. L' A_w permet de donner des informations importantes sur la stabilité physico-chimique d'un produit et sur son innocuité microbiologique.

La valeur de l'activité de l'eau s'établit de 0 à 1. Plus l' A_w est grand, plus la quantité d'eau disponible pour la croissance d'un micro-organisme est importante (tableau 16).

L' A_w requis pour la croissance d'une moisissure est inférieur à celui requis pour la mycotoxinogénèse, alors la présence d'une moisissure dans un aliment ne signifie donc pas obligatoirement qu'on y retrouvera des toxines fongiques (Pfohl-Leskowicz, 1999).

L'activité de l'eau optimale pour la plupart des espèces fongiques est comprise entre 0,85 et 0,99. Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont la capacité de se multiplier à des A_w inférieurs à 0,75 et pour une température de 25°C (Lesage-Meesen *et al.*, 1998). Elles font partie des espèces xérophiles que l'on retrouve dans les produits pauvres en eau (céréales, fruits secs, ...), notamment au moment de la phase de stockage. En revanche, quelques espèces de *Fusarium* exigent un A_w supérieur à 0,98 (Castegnaro *et al.*, 2002). Il s'agit de moisissures de champs qui se développent sur les plantes endommagées ainsi que dans les milieux riches en eau.

Tableau 16 : A_w minimale et maximale de plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (Pitt *et al.*, 1987).

Champignons	A_w minimum	A_w maximum
<i>Aspergillus niger</i>	0,90	0,98
<i>Aspergillus japonicus</i>	0,98	0,98
<i>Aspergillus flavus</i>	0,84	0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,83	0,87
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,82	0,98
<i>Penicillium viridicatum</i>	0,83	0,86
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,82	0,86

1.3.6.1.2 Température

La température est un facteur prépondérant de la croissance des micromycètes et donc de la production de toxines. Elle est intimement liée à l'activité de l'eau. De même que pour l' A_w , la température idéale de croissance d'un champignon ne correspond pas à celle de la production de la toxine.

De manière générale, la température de croissance est supérieure à la température optimale de la toxinogénèse. Pour *Penicillium viridicatum* (producteur d'OTA), la croissance a lieu pour une température comprise entre 0 et 31°C et pour un A_w de 0,95, alors que la synthèse d'OTA n'est possible qu'à une température comprise entre 12 et 24°C (Norholt *et al.*, 1990) (tableau 17).

Tableau 17 : Températures de croissance de quelques espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Champignons	Tmin (°C)	Topt (°C)	Tmax (°C)
<i>Aspergillus flavus</i>	15	35	44
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	25	37
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	8	24	28
<i>Penicillium purpurogenum</i>	12	28	35
<i>Fusarium tricinctum</i>	5	25	35

Trois types de moisissures se distinguent suivant leur température optimale de croissance :

-**Les espèces cryophiles**, ou psychrophiles, se développent à des températures relativement basses, inférieures à 5°C. C'est le cas de *Cladosporium herbarum* qui peut se développer à des températures négatives.

-**Les espèces mésophiles** privilégient les températures allant de 5 à 35°C. La plupart des moisissures sont mésophiles, avec des températures idéales de croissance allant de 20 à 25°C. C'est notamment le cas de plusieurs espèces d'*Aspergillus* (Botton *et al.*, 1990).

-**Les espèces thermophiles** : dont la croissance est optimale aux alentours de 35°C. Par exemple : *A. flavus* peut continuer de se multiplier au-delà de 50°C (Castegnaro *et al.*, 2002).

Il convient de souligner que la grande majorité des moisissures est sensible aux traitements thermiques (pasteurisation, cuisson), contrairement aux mycotoxines qui sont thermorésistantes. De plus, la température interfère sur l'intégrité et la conservation de la denrée, favorisant alors l'apparition de moisissures.

1.3.6.1.3 Lumière

Bien que l'impact de la lumière n'ait pas été démontré sur la croissance des moisissures, il semblerait tout de même qu'elle intervienne sur la germination des spores, favorisant de ce fait la dissémination fongique (Tabuc, 2007). Certaines espèces ne peuvent pas se passer de lumière tandis que d'autres la fuient : chez *Verticillium agrinum*, l'exposition prolongée aux rayons ultraviolets peut limiter la croissance voire provoquer la mort du mycélium.

1.3.6.2 Facteurs chimiques

1.3.6.2.1 Acidité du milieu (pH)

Les moisissures peuvent croître dans une gamme de pH allant de 3 à 8, leur pH optimal de croissance étant plutôt situé entre 5 et 6. Les aliments (en particulier les fruits et les légumes) ayant un pH inférieur à 6, se trouvent être des cibles privilégiées de l'infestation fongique.

À l'instar du couple température/ A_w , l'intervalle de pH permettant une croissance fongique optimale est plus étendu que celui permettant la synthèse de toxines. Ainsi, la fumonisine B1 est la plus produite à pH = 3,7, tandis que la croissance de sa moisissure productrice, *Fusarium proliferatum*, s'effectue préférentiellement à pH = 5,6 (Blackwell *et al.*, 1994).

1.3.6.2.2 Composition gazeuse

L' O_2/CO_2 est une ressource sélective pour la croissance fongique. La majeure partie des micromycètes est aérobie, cependant certains champignons peuvent vivre en anaérobiose, comme *Byssoschlamys nivea*, que l'on retrouvera plus en profondeur dans les denrées car moins exigeante (Paster *et al.*, 1988).

La production de toxines fongiques est plus sensible à la variation de composition gazeuse que la croissance fongique. Une concentration en oxygène inférieure à 1 % et des concentrations élevées de dioxyde de carbone empêchent la synthèse de toxines (tableau 18).

Tableau 18 : Impact de la restriction d' O_2 sur *Fusarium proliferatum* et la production de FB1 (Keller *et al.*, 1997).

	Biomasse (g/l)	FB1 (μ g/g)
Présence d' O_2	14,1 $\pm$ 0,5	533 $\pm$ 88,4
Absence d' O_2	4,3 $\pm$ 0,3	Non décelable

En plus de diminuer la synthèse de FB1, le taux d' O_2 affecte également la croissance de *Fusarium proliferatum*. Ainsi, l'absence de dioxygène rend indécelable la synthèse de fumonisine B1 (Keller *et al.*, 1997).

1.3.6.2.3 Nature du substrat

Les nutriments, dont les champignons ont besoin pour pousser, sont élémentaires et proviennent de matières organiques en décomposition. Les enzymes catabolisent le substrat pour former les nutriments requis, qui seront ensuite absorbés au travers des membranes cellulaires des moisissures. Ces molécules sont des sucres simples, des fractions d'amidon, des peptides et des substances carbonées (comme les acides aminés). Les moisissures ne sont pas capables de proliférer sur n'importe quel substrat (Madhyastha *et al.*, 1990). Dans certaines conditions, elles peuvent se développer sur des matières inorganiques (polymères, métaux), à condition que celles-ci présentent des résidus de matières organiques.

La toxinogénèse dépend fortement de la composition chimique du substrat sur lequel le champignon prolifère. Par exemple, l'acide phytique (souvent présent dans les céréales) diminue la synthèse d'aflatoxines par *A. parasiticus* et *A. flavus*. À l'inverse, certains acides aminés (comme la proline) stimulent cette production (Payne *et al.*, 1983).

1.3.6.2.4 Traitement chimique du milieu

L'action des pesticides est intéressante puisqu'ils sont abondamment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation des aliments et le contrôle de l'apparition de maladies végétales. S'ils sont utilisés avec succès, le risque d'apparition de mycotoxines est faible. Cependant, il a été démontré qu'à des concentrations sub-létales (proches de celles qui provoquent la mort), la synthèse de certaines mycotoxines est facilitée (Moss *et al.*, 1987). Par exemple, la mauvaise maîtrise de l'utilisation d'acide propionique dans l'orge entraîne une augmentation de la production d'aflatoxine B1, tandis que la croissance d'*A. flavus* est réduite (Al-Hilli *et al.*, 1979). L'utilisation de fongicides doit donc être judicieuse.

1.3.6.3 Facteurs biologiques

1.3.6.3.1 Facteurs intrinsèques

Ce sont l'ensemble des facteurs qui sont directement liés à la souche elle-même, comme la vitesse de croissance, la capacité de dissémination, la dispersion des spores ou encore la longévité des spores. Ce sont tous les facteurs qui constituent le potentiel infectieux fongique influençant la synthèse de toxines dans un milieu déterminé (Moreau, 1994).

1.3.6.3.2 Interactions entre micro-organismes

La présence simultanée, dans le même milieu, de micro-organismes dits de «concurrence» (bactéries ou champignons) perturbe le développement fongique et la synthèse de toxines. Cela s'explique par la possible destruction de la toxine par une autre souche et par la compétition pour le substrat. Certains micro-organismes peuvent aussi modifier les conditions environnementales, les rendant ainsi défavorables pour la toxinogénèse (Lacey, 1986).

De cette manière, il existe une compétition entre *A. ochraceus* et *A. flavus*. Lorsque ces deux moisissures sont en présence, on observe une augmentation de la production d'aflatoxines, tandis que les ochratoxines sont peu sécrétées voire totalement absentes. Ce phénomène s'explique par la monopolisation de la source de phénylalanine par *A. flavus*. L'OTA étant un analogue structural de cet acide aminé, elle ne peut alors plus être synthétisée (Bouraima *et al.*, 1993).

1.3.6.3.3 Présence d'acariens et insectes

Insectes et acariens sont des vecteurs de dissémination de spores de moisissures, qu'ils introduisent à l'intérieur du grain par les dommages qu'ils créent. Une infestation par les insectes (asticots, larves de Coléoptères) favorise la prolifération de micromycètes ainsi que la production de toxines (Farrar *et al.*, 1991). Les insectes détruisent l'enveloppe extérieure des grains, facilitant ainsi la pénétration de la moisissure à l'intérieur de la graine. Les acariens, vivant sur les céréales atteintes, récupèrent et transportent les spores de champignons sur leur corps et également dans leur tube digestif et déjections. Par conséquent, la contamination des grains sains se produit lorsque des acariens arrivent en contact avec ces grains. Ils interviennent aussi bien avant la récolte qu'au cours de la conservation. Il convient de noter que les oiseaux et les rongeurs interfèrent de manière similaire. Ainsi, l'infestation de l'arachide, du coton et du maïs, par *A. flavus* avant la récolte, est souvent liée à l'agression du végétal par des insectes (Le Bars, 1988).

1.3.6.3.4 Pratiques agricoles

Les pratiques telles que le labourage, la rotation des cultures et l'alternance de fongicides participent à rompre le cycle de vie des organismes nuisibles, souvent très spécifiques (Lipps *et al.*, 1991). Les mesures de stockage jouent également un rôle dans le possible développement des toxines fongiques.

CHAPITRE II

Présence du déoxynivalénol dans le blé dur

II. 1. INTRODUCTION

Les céréales et leurs dérivés constituent la base de l'alimentation humaine au Maroc. Cependant, la présence des moisissures dans ces produits peut affecter leur qualité sanitaire et causer des pertes économiques considérables. Les mycotoxines sont des contaminants naturels produits par une variété d'espèces de moisissures. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime que 25% des cultures vivrières mondiales, y compris de nombreux aliments de base, sont affectés par les champignons producteurs de mycotoxines (Köppen *et al.*, 2010).

En effet, la contamination des cultures agricoles par les mycotoxines telles que les trichothécènes est considérée comme une source majeure qui peut affecter la santé humaine et animale. Ces métabolites secondaires sont produits par des espèces fongiques appartenant aux genres *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachyobotris*, *Trichoderma* et *Trichothecium* (Sharma et Kim, 1991; Jarvis, 1992 ; Köppen *et al.*, 2010).

La présence du déoxynivalénol (DON) appelée encore vomitoxine dans les aliments peut provoquer des manifestations cliniques chez les humains et les animaux. Une relation directe entre l'incidence de la fusariose de l'épi et la contamination du blé par le DON a été établie. Selon Pestka (2010), L'incidence de la fusariose de l'épi du blé est fortement associée à l'humidité au moment de la flottation (Méthode de séparation des mélanges de particules solides).

II. 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II. 2. 1. ECHANTILLONNAGE

Quatre-vingts et un (81) échantillons de blé dur ont été prélevés au hasard sur différents marchés traditionnels, dans des fermes ou dans des établissements du Ministère de l'Agriculture (ONICL : Office National Interprofessionnel des Céréales et des Légumineuses et ONSSA : Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires) dans sept régions du Maroc : Khémiset (n=12), Béni Méllal (n=10), Séttat (n=11), Fès-Meknès (n=13), Skhirat-Témara (n=10), Tansift-El Haouz (n=12) et Rabat-Salé (n=13). Les échantillons de 200 g étaient emballés dans des sacs en plastique, puis stockés à 4 °C avant leur analyse par HPLC.

II. 2. 2. PRODUITS CHIMIQUES

La solution standard du DON a été achetée chez Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Espagne). L'acétonitrile et le méthanol ont été achetés chez J. T. Baker (Deventer, Pays-Bas). Tous les solvants étaient de qualité LC. L'eau pure a été obtenue à l'aide d'un appareil Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, États-Unis).

II. 2. 3. EQUIPEMENTS

Pour l'analyse des mycotoxines dans les aliments, le travail a été réalisé dans un laboratoire équipé en appareils suivants : un spectrophotomètre, une hotte à flux laminaire, un agitateur magnétique, un vortex, un moulin à grains, une balance de précision, un évaporateur rotatif, un système d'évaporation sous jet d'azote, un appareillage pour HPLC, des réfrigérateurs et toute la

verrerie nécessaire (erlenmeyers, vials ou tubes à vis, micropipettes, béchers, ampoules de décantation, ballons à col rodé, entonnoirs, ...).

II. 2. 4. ANALYSE DU DÉOXYNIVALÉNOL

L'extraction du DON a été effectuée avec une méthode interne validée au Laboratoire de Mycologie Appliquée du Département de Technologie Alimentaire de l'Université de Lleida, Espagne. Brièvement, les échantillons ont été broyés au préalable et 10 g de chaque échantillon ont été extraits avec 40 mL d'eau MilliQ en agitant sur un agitateur magnétique (multipoint SBS) à 700 tr/min pendant 10 minutes. Les échantillons ont été centrifugés (Hettich zentrifugen EBA12) à 6000 tr/min pendant 5 min. Quatre mL du surnageant ont été recueillis et passés à travers une colonne d'immuno-affinité (DONPREP, R-Biopharm, Rhone Ltd). La colonne a ensuite été lavée avec 10 ml d'eau MilliQ, la toxine a finalement été éluée avec 3 ml de méthanol. L'éluat collecté a été évaporé à sec sous un courant d'azote à 40 °C, puis dissous dans 500 µl de la phase mobile pour l'analyse HPLC.

II. 2. 5. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Le DON a été détecté et quantifié en utilisant un système LC (Waters 2695, module de séparation, Waters, Milford, États-Unis) et une colonne (colonne analytique Waters Spherisorb 5µm, 4, 6 x 150 mm). La phase mobile (eau/acétonitrile/méthanol : 94/3/3, v/v/v) a été pompée à 1,2 mL/min. La température de la colonne était de 35 °C. Le détecteur d'absorbance 2487 (Waters, Milford, États-Unis) a été réglé à 220 nm. Le temps de rétention du DON dans ces conditions était de 16 min. La limite de détection était de 62,5 µg/Kg. La quantification a été toujours réalisée avec un logiciel (Empower, Milford, MA, USA).

II. 2. 6. VALIDATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

1-Introduction

Le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. Elle se compose d'un ensemble d'opérations nécessaires pour vérifier que le protocole est suffisamment exact pour obtenir un résultat fiable (figure 25).

2-Performances et critères de choix d'une méthode d'analyse

Les méthodes doivent être choisies sur la base de leurs performances compte tenu des spécifications convenues. Les principales spécifications techniques sont les suivantes :

- Limites de détection et de quantification,
- Justesse et fidélité (répétabilité),
- Exactitude et reproductibilité,
- Domaine de linéarité et sensibilité,
- Robustesse,
- Spécificité,
- Rapidité et aptitude à l'automatisation,
- Coût (investissement et fonctionnement).

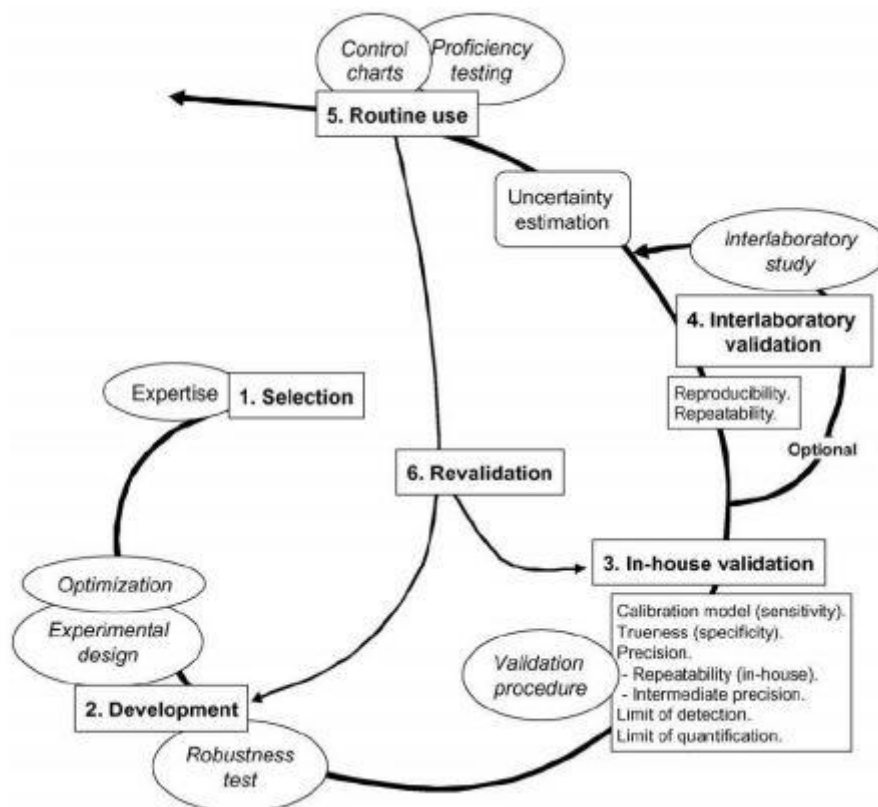


Figure 25 : Cycle de vie d'une méthode analytique (agroparistech., 2018).

3-Validation d'une méthode d'analyse

La validation d'une méthode d'analyse correspond à une reconnaissance de son aptitude à satisfaire à l'usage attendu en routine. Elle s'effectue en confrontant des valeurs observées de ses caractéristiques de performance avec les valeurs des critères de validation pour les conditions dans lesquelles la méthode est utilisée. Le cas échéant, les caractéristiques de mise en œuvre pourront également être prises en compte pour la validation d'une méthode. La démarche de validation repose donc sur 3 grandes étapes :

- La définition des critères de validation, ou caractéristiques de performance ciblées, en tant que traduction de l'expression des besoins du client/prescripteur
- La caractérisation de la méthode ;
- La validation *stricto sensu* par comparaison des valeurs des caractéristiques de performance aux critères cibles prédéterminés (ou valeurs d'acceptabilité) (Anses, 2019).

a) Méthode d'analyse du DON et validation de la méthode

La méthode analytique utilisée pour la toxine DON a été évaluée en fonction de la sélectivité, de la linéarité et de la précision. La sélectivité a été vérifiée en injectant trois fois 100 µl de solutions standard DON avant d'injecter les échantillons extraits et en comparant les temps de rétention maximale et les spectres UV des substances qui produisent ces pics. La linéarité a été évaluée en effectuant des injections en triple de ses solutions standard à des concentrations de 0,02, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 et 1,0 pg du DON/ml. Les courbes standard ont été générées par régression linéaire des

zones de pointe contre les concentrations. Les courbes d'étalonnage ont montré une bonne linéarité avec des coefficients de corrélation R^2 allant de 0,9799 à 0,9994.

La précision et la récupération (rendement) ont été établies par la détermination de la toxine DON dans des échantillons dilués au blé à 0,05, 0,2 et 1,0 $\mu\text{g/g}$ ($n = 3$). Les valeurs de récupération variaient de 76 à 110%, tandis que RSDr variait de 6 à 18%. La limite de détection (LOD) a été considérée comme la concentration du DON qui fournit un signal égal à $b + 3S_b$, où b est l'interception de la courbe d'étalonnage et S_b est l'erreur standard de l'estimation en supposant être le blanc et la limite de quantification (LOQ) a été considérée égale à $3 \times \text{LOD}$. La limite de quantification pour la toxine DON était de 0,04 $\mu\text{g/g}$.

II. 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de cette étude ont été obtenus selon une méthode validée au laboratoire de l'Université de Lerida en Espagne. La toxine DON a été quantifiée sur la base de la réponse d'absorbance HPLC par rapport à celle d'une gamme d'étalons analytiques. Les concentrations injectées sont les suivantes : 0,1 $\mu\text{g/kg}$; 0,3 $\mu\text{g/kg}$; 0,5 $\mu\text{g/kg}$ et 1 $\mu\text{g/kg}$. La courbe est linéaire. Ci-après la courbe de calibration de la toxine DON (figure 26).

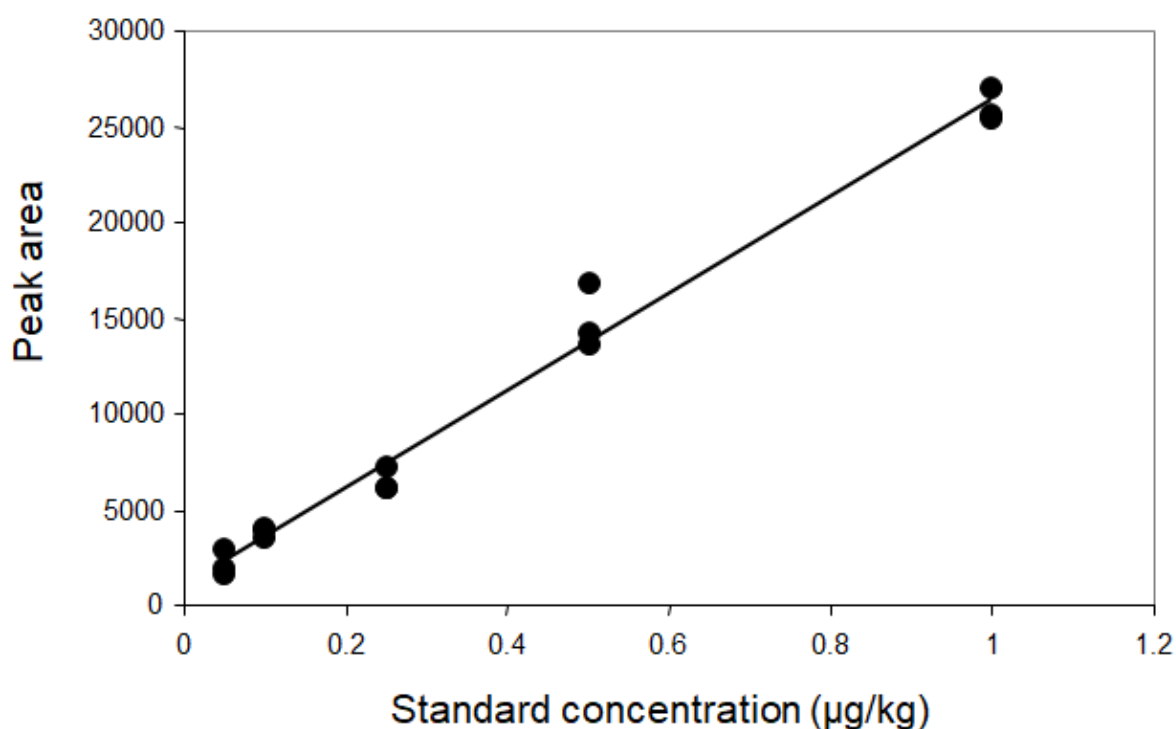


Figure 26: courbe d'étalonnage de la toxine DON pour l'analyse HPLC.

La présence de la toxine DON dans les échantillons de blé dur est résumée dans le (tableau 19). Sur l'ensemble des échantillons totaux, 11,1% des échantillons étaient contaminés par cette toxine. Les niveaux de la toxine dans les échantillons positifs variaient de 60 à 1310 $\mu\text{g/Kg}$. La concentration maximale la toxine DON (1310 $\mu\text{g/Kg}$) a été retrouvée dans un échantillon de blé dur

provenant de la région de Rabat-Salé, tandis que la valeur minimale (60 µg/Kg) a été enregistrée dans un échantillon de Béni Méllal.

Le niveau de contamination moyen la toxine DON dans les échantillons positifs était de $502,1 \pm 40,5$ µg/Kg. La figure 27 montre un échantillon positif de blé contaminé avec un niveau de DON de 319 µg/Kg. Les fréquences de contamination des échantillons de blé dur par DON étaient respectivement de 40, 27,2, 7,6 et 7,6% pour les zones de Béni Méllal, Séttat, Fès-Meknès et Rabat-Salé. Aucun échantillon n'a dépassé la limite maximale fixée pour le DON (1750 µg/Kg) par les autorités européennes dans le secteur des céréales (CE, 2007). Selon la nouvelle réglementation marocaine tous les échantillons sont en dessous du seuil d'alerte qui est de 1750 µg/Kg (NM. 2016) (voir annexe 2).

Tableau 19: Niveaux de DON dans des échantillons de blé dur au Maroc.

Zone	Échantillons positifs et (fréquence)	Limite basse et haute (µg/Kg)	Moyenne±RSD ^b (µg/Kg)	Niveau maximum de (µg/Kg)
Khémisset	Nd	Nd ^a	Nd	Nd
Béni-Méllal	4 (40)	0-632	$336,5 \pm 231,9$	632
Settat	3 (27,2)	0-321	$283,6 \pm 62,9$	321
Fès-Meknès	1 (7,6)	0 – 1012	1012	1012
Skhirat-Témara	Nd	Nd	Nd	Nd
Tansift-El Haouz	Nd	Nd	Nd	Nd
Rabat-Salé	1 (7,6)	0-1310	655	1310
Total	9 (11,1)	0-1310	$502,1 \pm 408,4$	1310

a: Nd: non détecté.

b: RSD: *Relative standard deviation* (=Ecart-type).

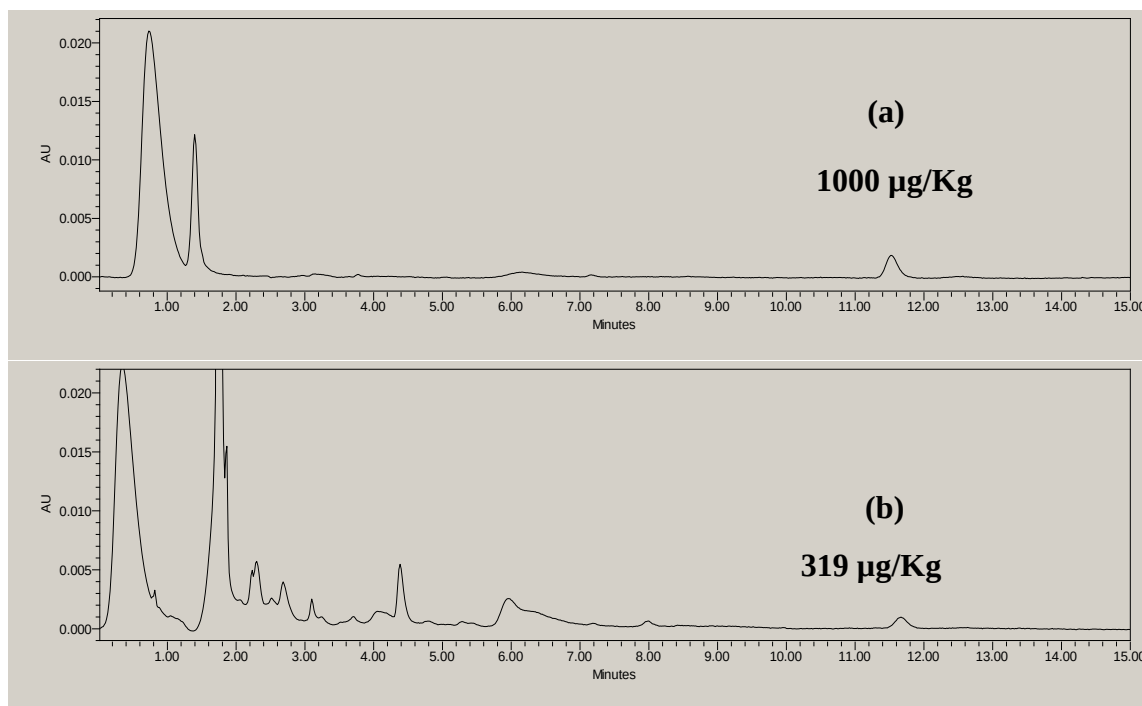


Figure 27 : Chromatogramme LC de séparation de déoxynivalénol: (a) standard de DON (1000 µg / kg), (b) une contamination de DON (319 µg / kg).

Les résultats que nous avons obtenus sont similaires à ceux rapportés par Hajjaji *et al.* (2006). En effet, ces auteurs ont signalé la présence de la toxine DON dans 7 échantillons sur 17 (41,17%) de grains de blé entreposés dans la zone de Béni Méllal, avec un niveau maximal de 128 µg/Kg. En outre, ces résultats ont montré la présence de la toxine DON à des niveaux inférieurs à celles décrites par des études similaires à l'échelle internationale, notamment dans les pays de la région méditerranéenne.

En effet, Bensassi *et al.* (2010) ont signalé un pourcentage global de contamination d'environ 83% du blé dur en Tunisie par la toxine DON. Binder *et al.* (2007) ont signalé une incidence de la toxine DON de 71% dans les grains de blé dans le Nord de l'Asie. En Argentine, Lori *et al.* (2003) ont montré que les fréquences de la toxine DON dans le blé dur contaminé lors de la première et de la deuxième récolte étaient respectivement de 55 et 78%.

Les niveaux la toxine DON retrouvés dans la présente étude sont inférieurs aux niveaux de DON rapportés dans d'autres pays. En effet, Pan *et al.* (2007) ont signalé que la toxine DON variait de 500 à 10 000 µg/Kg dans le blé d'Uruguay. Bensassi *et al.* (2010) ont constaté que les niveaux de DON variaient de 7200 à 54000 µg/Kg dans les échantillons de blé de Tunisie. En Arabie Saoudite, Al-Julaifi et Al-Falih (2001) ont rapporté que les concentrations de DON variaient entre 2 et 4000 µg/Kg dans les échantillons de blé. Al-Hazmi (2011) a montré que les niveaux de DON variaient entre 15,24 et 803,22 µg/Kg dans les échantillons de blé en Arabie Saoudite.

En Europe, la toxine DON a été détectée comme un contaminant fréquent (57%) des grains de blé (11 444 échantillons au total) avec un niveau maximal de 1 à 5700 µg/Kg (JECFA, 2001). Une étude européenne globale sur la présence de toxines de *Fusarium* dans des échantillons

provenant de 11 pays (11 022 échantillons) a révélé que 57% des échantillons totaux étaient positifs pour le DON, une fréquence élevée de DON dans le maïs et le blé et la farine de blé (Gareis *et al.*, 2003). En Russie, les niveaux de DON variaient entre 50 et 8600 µg/Kg dans les échantillons de blé (Tutelyan, 2004).

La présence de la toxine DON dans les échantillons de blé analysés dans le cadre de la présente étude a montré une variabilité entre les régions. En effet, le DON a été trouvé dans quatre (4) sur les sept (7) régions étudiées. Ces résultats pourraient être expliqués par l'influence des facteurs environnementaux, principalement la température, l'humidité relative, les attaques d'insectes, la sécheresse et les conditions de stockage.

Selon l'étude de Champeil *et al.* (2004), comme pour l'étude menée en Chine par (Palacios *et al.*, 2017) où ils ont trouvé que tous les échantillons ont été contaminés par la toxine DON avec une concentration qui passait de moins de 300 à 9480 µg/kg ; dans le travail réalisé par Zhao Jin *et al.* (2018), ils ont trouvé que 75 des résultats sont positifs allant de moins de 300 µg/kg jusqu'à $10,13 \times 10^6$ µg/kg ce qui est relativement élevé.

Les niveaux de contamination par les mycotoxines produites par les espèces de *Fusarium* telles que le DON, le nivalénol et la zéaralénone dans les cultures de blé ont une relation directe avec l'année et le système de culture, y compris l'utilisation d'engrais dont la quantité et le type sont régis par les changements climatiques. Sur le plan microbiologique, les différences de fréquence et de niveaux de contamination peuvent être attribuées principalement à la variation du rapport entre les espèces productrices et celles non productrices de la toxine DON (Beyer *et al.*, 2007) et au rôle du type de spore dans les grains de blé sur le niveau de production toxine DON (Beyer *et al.*, 2005) ainsi qu'à la résistance du grain de blé à différentes espèces de *Fusarium* en interaction avec les facteurs climatiques (Jajic *et al.*, 2008 ; Blesa *et al.*, 2014).

II. 4. CONCLUSION

En conclusion de cette partie, les résultats de la présente étude nous ont permis de conclure, que le blé dur commercialisé au Maroc est contaminé par la toxine DON. Ces résultats ont révélé que le blé dur produit et consommé au Maroc et analysé dans le cadre de cette étude est peu contaminé par cette toxine en comparaison avec d'autres études réalisées à l'échelle internationale.

A notre connaissance, c'est la première investigation réalisée sur la présence de la toxine DON dans les grains de blé disponibles dans plusieurs régions du Maroc. Nous avons constaté aussi que les fréquences et les niveaux de contamination varient d'une zone à une autre. D'autres recherches sont nécessaires pour compléter cette étude notamment l'augmentation du nombre des échantillons étudiés, l'investigation d'autres matrices céréalières (maïs, orge, produits céréaliers, etc.).

Il serait intéressant aussi de mener des investigations microbiologiques pour isoler et identifier sur le plan moléculaire les champignons producteurs de la toxine DON dans ces produits alimentaires disponibles notre pays, et aussi pour étudier les facteurs environnementaux qui déterminent la production de cette mycotoxine.

CHAPITRE III

Isolement et identification des moisissures productrices de mycotoxines dans le blé dur au Maroc

III. 1. INTRODUCTION

L'importance du blé dur dans l'alimentation humaine à l'échelle mondiale et le risque de contamination de cette denrée par les mycotoxines ont poussé la Commission du *Codex Alimentarius* à demander des études pour obtenir d'avantage de données sur la présence de mycotoxines dans le blé. L'objectif principal est de diminuer les contaminations des céréales par ces toxines et de trouver des solutions pour la lutte contre ce fléau dans le monde (*Commission du Codex Alimentarius*, 2012).

Plusieurs espèces fongiques, appartenant principalement aux genres *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. graminearum* et *F. equiseti*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Aspergillus* (*A. flavus*), et *Penicillium* (*P. funiculosum*), *Cladosporium* et *Curvularia*, envahissent les grains de blé et y produisent des mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 1999; Clear, 2000). Ces champignons ont des exigences différentes vis-à-vis de l'humidité et de la température.

Ainsi, en fonction de ces facteurs, les champignons peuvent contaminer les grains au cours de la culture dans le champ, au moment de la récolte, au cours de la fabrication et la transformation et pendant le transport et le stockage. Ensuite, si les conditions dans le milieu environnant sont favorables, ces champignons peuvent proliférer et produire des mycotoxines. Par conséquent, la prévention de la croissance fongique conduit efficacement à la prévention de l'accumulation des mycotoxines.

Au cours de ce travail, les différentes espèces fongiques contaminant le blé ont été déterminées selon les critères morphologiques puis leur identité a été confirmée par des outils moléculaires. Enfin, la capacité de production des mycotoxines des isolats appartenant aux genres *Fusarium* et *Aspergillus* a été testée.

III. 2. MATERIEL ET MÉTHODES

III. 2. 1 ECHANTILLONNAGE

Les quatre-vingt et un échantillons de blé dur qui ont été utilisés dans la première partie pour la détermination du taux de contamination en toxine DON ont été réutilisés pour l'étude de la mycoflore. Les échantillons sont répartis comme suit: Khémiset (12), Béni Méllal (10), Séttat (11), Fès-Meknès (13), Skhirat-Témara (10), Tansift-El Haouz (12) et Rabat-Salé (13).

III. 2. 2. ANALYSE DE LA MYCOFLORE

Un échantillon total de 100 grains a été analysé pour chaque milieu de culture utilisé. Tout d'abord, les grains de blé ont été désinfectés en surface avec de l'hypochlorite de sodium à 3% et ont été lavés deux fois avec de l'eau stérile (2 min pour chaque étape) pour éliminer les micromycètes à la surface des grains. Ensuite, les grains de blé ont été placés dans trois milieux (5 grains/boîte de Petri de 90 mm) sous une hotte à flux laminaire. Les milieux de culture utilisés pour cette étude sont

le milieu gélosé à base d'extrait de pommes de terre (PDA), le milieu Czapek solide (Cz) et le milieu gélosé au vert malachite.

Les résultats ont été évalués après 7 jours d'incubation à une température de 25 °C pour le PDA et le Czapek agar (Cz) et 10 jours pour la gélose au vert malachite.

Le PDA a été utilisé pour l'énumération des champignons appartenant aux genres *Alternaria* et *Fusarium* et d'autres espèces (Ackermann, 1998). Les isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont été cultivés sur le milieu Czapek gélosé additionné d'extrait de levure (CYA) (Pitt et Hocking, 2009). Dans d'autres travaux, le vert de malachite a été utilisé pour détecter et isoler les espèces de *Fusarium* (Castellá *et al.*, 1997).

Après l'incubation, les souches de *Fusarium* ont été isolées sur le milieu Czapek gélosé additionné d'extrait de levure (CYA) pour étudier leur capacité de production de la toxine DON et ont été regroupées selon leurs caractéristiques morphologiques et culturelles. Les souches ont été également cultivées sur le milieu CLA (Carnation Leaf Agar) pour leur description microscopique (Pitt et Hocking, 2009).

En ce qui concerne les souches d'*Aspergillus*, l'isolement a été effectué sur le PDA, Cz et CYA pour la détermination de la capacité de ces souches à produire l'OTA. Les champignons ont été identifiés selon leurs critères morphologiques à l'aide du guide de Pitt et Hocking (1997). Tous les isolats sont conservés dans des cultures sur PDA. Les résultats de l'identification des espèces fongiques contaminant le blé dur sont exprimés en pourcentage de grains infectés dans chaque échantillon. La fréquence et la densité relative des genres et des espèces sont calculées selon les formules de Marasas *et al.* (1988a).

$$\text{Moyenne (\%)} = \frac{\text{Nombre de grains infectés par un genre ou une espèce} \times 100}{\text{Nombre total de grain}}$$

$$\text{Fréquence (\%)} = \frac{\text{Nombre d'échantillons contaminés par un genre ou une espèce} \times 100}{\text{Nombre total d'échantillon}}$$

$$\text{Densité relative (\%)} = \frac{\text{Nombre d'isolats d'un genre ou d'une espèce} \times 100}{\text{Nombre total des genres ou espèces isolés}}$$

III. 2. 3. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES FONGIQUES

La détermination des genres de chaque souche fongique isolée du blé a été d'abord réalisée d'après les caractères morphologiques de la souche. Ensuite, l'identification des espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Aspergillus* présents dans les échantillons de blé a été confirmée par des outils moléculaires.

III. 2. 3. 1. Extraction de l'ADN

Des amorces spécifiques (tableau 20) ont été utilisées pour l'identification des espèces appartenant aux sections *Flavi* et *Nigri* du genre *Aspergillus*.

L'identification des espèces appartenant au genre *Fusarium* se fait par séquençage partiel de la transcription du gène du facteur d'élongation (TEF-1 α) et du gène de la beta-tubuline (β -tubuline)

en utilisant, respectivement, les paires d'amorces BT2A/BT2B et EF-1/EF-2. En outre, l'identification d'autres espèces potentielles toxigènes est réalisée par séquençage partiel de la région ITS et du gène de la β -tubuline (tableau 20).

Pour identifier les espèces appartenant à la section *Nigri*, une PCR multiplex avec les couples d'amorces spécifiques à *A. niger*/*A. awamori*, *A. carbonarius* et *A. tubingensis* est réalisée (tableau 20). Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 10 μ l contenant 1 μ l du tampon 10 x, 0,25 μ l de dNTP (10 mM), 0,5 μ l de chaque amorce (10 mM), 0,1 μ l d'ADN polymérase (5U/ μ l) (DFS-Taq ADN polymerase, Bioron, Allemagne), 4,65 μ l d'eau et 1 μ l de l'échantillon d'ADN (10ng/ μ l). Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur pendant 35 cycles consistant en 30 s à 95°C, 45 s à 60°C et 1 min à 72°C.

L'identification des espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* a été effectuée en utilisant le couple d'amorces AfAflT-F, AfAflT-R. Deux extraits d'ADN d'*A. flavus* CECT 2695 et d'*A. parasiticus* CECT 2681 ont été utilisés comme référence. Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 10 μ l contenant 1 μ l du tampon 10x, 0,25 μ l du dNTP (10 mM), 0,5 μ l de chaque amorce (10 μ M), 0,1 μ l du taq (d'ADN polymérase) (5 U/ μ l), 5,65 μ l de l'eau et 1 μ l de l'échantillon de l'ADN (une dilution de concentration= 10 ng/ μ l). Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur pendant 35 cycles consistant en 30 s à 95°C, 45 s à 70°C et 1 min à 72°C.

Pour l'identification des espèces de *Fusarium*, un séquençage partiel des gènes du facteur d'élongation ef-1 alpha et de la β -tubuline est effectué après la réalisation des réactions de PCR dans un volume final de 50 μ l contenant 5 μ l du tampon 10 x, 1 μ l de dNTP (10 mM), 2 μ l de chaque amorce (10 μ M), 0,5 μ l d'ADN polymérase (5 U/ μ l) (DFS-Taq ADN polymerase, Bioron, Allemagne), 37,5 μ l d'eau et 2 μ l de l'échantillon d'ADN (10 ng/ μ l). Les mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur pendant 35 cycles consistant en 30 s à 95°C, 45 s à 60°C et 1 min à 72°C si on utilise le couple d'amorces spécifiques au gène de β -tubuline ou 30 s à 95°C, 30 s à 53°C et 0,45 s à 72°C si la séquence amplifiée est le facteur d'élongation.

Les produits de PCR qui se sont révélés positifs sont nettoyés par un kit de nettoyage et de purification de l'ADN (Ultra Clear PCR kit, Mobio, USA). Le séquençage a été réalisé par la société Macrogen (Corée du Sud). La recherche des similarités des séquences avec des bases de données publiques est réalisée en utilisant BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Tableau 20: Paires d'amorces utilisées dans l'identification des espèces fongiques.

Espèces	Paires d'amorces	Amorce sens	Amorce anti-sens	Réf
<i>Fusarium spp.</i>	BT2A, BT2B	5'- GGTAACCAAATCGGTGCTG CTTTC-3'	5'- ACCTCAGTGTAGTGACCC TTG GC-3'	N. Sardiñas. <i>et al.</i> , 2010; H. Ok, <i>et al.</i> 2014.
<i>A. niger</i>	NIG1, NIG2	5'- GATTTCGACAGCATT(CT/ TC)CAGAA-3	5'- AAAGTCAATCACAATCCA GCCC-3'	Susca <i>et al.</i> , 2007
<i>A. carbonarius</i>	AckS10R, AckS10L	5'- CCCTGATCCTCGTATGATA GCG-3'	5'- CCGGCCTTAGATTCTCTC ACC-3'	Selma <i>et al.</i> , 2008
<i>A. tubingensis</i>	TUB1, TUB2	5'- TCGACAGCTATTCCCCCT T-3'	5'- TAGCATGTCATATCACGGG CAT-3'	Susca <i>et al.</i> , 2007
<i>A. flavus</i>	FLAVIQ1, FLAQ2	5'-GTCGTCCCCTCTCCGG 3'	5'- CTGGAAAAAGATTGATTG CG 3'	Sardiñas <i>et al.</i> , 2011
<i>A. parasiticus</i>	PAR1, PAR2	5'- GTCATGGCCGCCGGGGGC GTC 3'	5 '- CCTGGAAAAAATGGTTGTT TTGCG 3'	Sardiñas <i>et al.</i> , 2010; H. Ok, <i>et al.</i> , 2014.

III. 2. 4. CAPACITÉ DE PRODUCTION DES TOXINES OTA ET DON

III. 2. 4. 1. Production de l'ochratoxine A

L'OTA est une mycotoxine synthétisée principalement par des moisissures du genre *Aspergillus* et *Penicillium*. Cette toxine a été décelée dans plusieurs matrices comme l'orge, le maïs, l'avoine, le seigle, le blé et les oléagineux suite à un mauvais séchage avant le stockage (Yiannikouris et Jouany, 2002). Dans cette étude, les isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été évalués pour leur capacité de production d'OTA en utilisant une méthode de dépistage par HPLC précédemment décrite (Bragulat *et al.*, 2001).

En bref, les 73 isolats ont été cultivés dans des boîtes de Petri contenant le milieu Czapek gélosé additionné d'extrait de levure (CYA) (Pitt, 1997) et incubés à 25°C pendant 7 jours. De chaque culture, trois rondelles de 6 mm de diamètre d'agar ont été retirées de différents points de la colonie et extraits avec 1 ml de méthanol.

Les extraits obtenus ont été filtrés et analysés par HPLC. L'OTA a été quantifiée sur la base de la réponse fluorimétrique HPLC par rapport à celle du standard (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La limite de détection pour l'OTA est de 0,21 µg/Kg.

III. 2. 4. 2. Production du déoxynivalénol

Le DON appartient à la famille des trichothécènes. Il est produit par *Fusarium graminearum* et *F. culmorum* (Sobrova *et al.*, 2010). Cette mycotoxine figure parmi celles qui sont les plus communément détectées dans les aliments dans le monde (Vesonder *et al.*, 1973). Des enquêtes ont démontré que le DON était largement présent dans les céréales en tant que contaminant naturel (Liu *et al.*, 2012).

Dans le cadre de ce travail, les isolats appartenant au genre *Fusarium* ont été évalués pour tester leur capacité de production de DON. Ainsi, 980 isolats de *Fusarium* ont été inoculés sur le milieu Czapek gélosé additionné d'extrait de levure (CYA) et incubés à 25°C pendant 7 jours.

Le DON a été extrait par une variante d'une méthode simple (Bragulat *et al.*, 2001). En bref, trois rondelles d'agar de 6 mm de diamètre ont été obtenues à partir de la zone centrale, intermédiaire et périphérique de chaque colonie de producteurs potentiels du DON cultivés dans des boîtes de Petri (CYA) et ont été introduits dans un flacon contenant 1 ml de la phase mobile (94% d'eau, 3% d'acétonitrile, 3% de méthanol). Après une agitation et un repos de 60 min à température ambiante, l'extrait a été analysé par HPLC après agitation et filtration avec un filtre hydrophile (0,45 µm).

III. 2. 5. ACTIVITÉ DE L'EAU (AW)

La série AquaLab 3 (dispositifs Decagon Inc., WA, États-Unis) a été utilisée pour déterminer l'activité de l'eau dans les échantillons de blé. Le capteur de point de rosée glacé breveté mesure l'activité de l'eau entre 0,030-1,000 aw avec une précision de ± 0,003 en moins de cinq minutes. L'aw a été mesuré pour tous les échantillons des sept zones.

III. 2. 6. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

III. 2. 6. 1. Déoxynivalénol (DON)

Le DON appartient au groupe des sesquiterpénoides qui sont dotés d'un squelette tricyclique (trichothécane) formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons oxygénés et quatre groupements méthyles (Vidal, 1990 ;Tazerout, 2016).

Le DON a été détecté et quantifié en utilisant un système HPLC (Waters 2695, module de séparation, Waters, Milford, États-Unis) et une colonne (colonne analytique Waters Spherisorb 5 µm 4,6 x 150 mm). La phase mobile (eau/acétonitrile/méthanol, 94/3/3, v/v/v) a été pompée à 1,2 ml/min. La température du four contenant la colonne était de 35 °C. Le détecteur d'absorbance 2487 (Waters, Milford, États-Unis) a été réglé à 220 nm. Le temps de rétention du DON dans ces conditions était de 16 min. La limite de détection était de 62,5 µg/Kg. La quantification a toujours été réalisée avec un intégrateur de logiciel (Empower, Milford, MA, USA). Le DON a été quantifié sur la base de la réponse d'absorbance (HPLC) par rapport à celle d'une gamme de normes analytiques de cette mycotoxine (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Espagne).

III. 2. 6. 2. Ochratoxine A

L'OTA est formée par un groupement isocoumarine substitué (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3, 4-dihydro-3R-méthylisocoumarine (O α)) lié à la L- β -phénylalanine par une liaison amide (Abarca *et al.*, 2001). L'équipement utilisé pour la détection était une unité de séparation Alliance 2695 Waters, une colonne analytique Water Spherisorb 5 mm ODS2, 4,6 x 250 mm et un Multi k Fluorescence Detector Waters 2475. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été fixées à 333 et 463 nm pour l'OTA pour un temps de rétention de 16 à 25 min. La dérivation des aflatoxines a été obtenue à l'aide d'un dispositif de dérivation photochimique post-colonne (UVETM Derivatizer LC Tech, Allemagne). La phase mobile consistait en méthanol, acétonitrile et acide acétique à 0,1%, en utilisant les proportions suivantes: 27% de méthanol, 14% d'acétonitrile et 59% d'acide acétique à 0, 1%, jusqu'à la minute 16, puis 50% de méthanol et 50% de l'acétonitrile jusqu'à la fin du test. Le débit de phase mobile était de 0,8 ml/min. Le volume d'injection était de 100 μ l.

III. 2. 7. VALIDATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

Les méthodes analytiques utilisées ont été évaluées en fonction de la sélectivité, de la linéarité et de la précision.

La sélectivité a été vérifiée par injection de 100 μ l de solution standard de mycotoxines trois fois avant d'injecter des échantillons extraits et en comparant les temps de rétention des pics et les spectres de fluorescence des substances qui ont produit ces pics. Les courbes standards ont été générées par régression linéaire des zones de pointe contre les concentrations.

La précision a été établie en déterminant (OTA, DON), dans le blé broyé et les échantillons de souches positives au moins par triplicat, dans ces échantillons (échantillons vides) fortifiés afin de calculer les taux de récupération.

La limite de détection (LOD) a été considérée comme trois fois le signal du bruit blanc, et la limite de quantification (LOQ) a été calculée comme 3 x LOD. Les caractéristiques de performance de la méthode pour DON et OTA sont résumées dans (tableau 21).

Ces valeurs sont conformes aux critères de performance établis par le règlement (CE) n ° 401/2006 de la Commission européenne (EC. 2006).

Tableau 21: Méthodes de performance de détection du DON et d'OTA dans un milieu de culture.

	LOD ^a (µg/kg)	LOQ ^b (µg/kg)	n	Pointes de concentrations (µg/kg)	Récupération (%)	RSDr ^c (%)
OTA	0,2	0,6	5	2,5	74 ± 16	21
			5	5,0	103 ± 13	13
			5	7,5	95 ± 12	13
			5	100	124 ± 8	6
DON	100	300	5	500	86 ± 10	12
			5	1000	99 ± 3	3

a LOD = Limite de detection.

b LOQ = Limite de quantification.

c RSDr = écart type relatif.

III. 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III. 3. 1. TRAITEMENT DES DONNÉES DE LA BIODIVERSITÉ FONGIQUE

Les résultats de la flore fongique associée aux grains de blé dur recueillis sur les marchés et les fermes marocains sont présentés dans le tableau 22.

L'identification macroscopique et microscopique a montré la dominance des genres suivants par ordre décroissant : *Alternaria* (86,2%), *Fusarium* (71,1%), *Rhizopus* (8,06%), *Epicoccum* (6,97%), *Penicillium* (6,38%), *Cladosporium* (4,68%), *Aspergillus* section Nigri (4,04%), *Ulocladium* (2,22%), *Aspergillus* section Flavi (2%), *Drechslera* (1,77%), *Mucor* (1,28%), *Curvularia* (0,45%) et d'autres genres non identifiés (7,32%).

Selon les résultats obtenus dans notre étude sur les genres productifs de mycotoxines, *Fusarium* était présent dans tous les échantillons prélevés sur les sept zones ; les zones les plus infectées étant Skhirat-Témara, Khémiset et Béni Méllal ; les valeurs étaient respectivement de 86%, 84% et 76,25%.

Le deuxième genre d'intérêt en pourcentage d'échantillons contaminés était *Aspergillus*, en particulier les sections d'*Aspergillus* Nigri et *Aspergillus* Flavi. Sa présence a été détectée dans tous les échantillons, bien que le niveau d'infection n'était pas très élevé. Les zones les plus contaminées par la section d'*Aspergillus* Nigri étaient Skhirat-Témara, Meknès-Fès et Rabat-salé. Les valeurs étaient respectivement de 10,5%, 8,85% et 2,69% (tableau 22). Concernant *Aspergillus flavus*, nous avons trouvé une forte présence dans le grain de Méknès-Fès (6,92%) et Skhirat-Témara (3,5%).

Tableau 22 : Mycobiotes internes d'échantillons de blé provenant de différentes régions du Maroc.

	Rabat-Salé			Marrakech			Skhirat-Témara			Méknès-Fès			Séttat			Khémiset			Béni Méllal		
	(n= 13) a			(n= 12)			(n= 10)			(n= 13)			(n= 11)			(n= 12)			(n= 10)		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<i>Fusarium</i>	64,62	11,98	4,01	52,08	9,66	3,23	86,00	19,32	6,47	61,92	13,27	4,44	72,73	11,95	4,00	76,25	19,25	6,44	84,00	14,56	4,88
<i>Alternaria</i>	77,31	12,8	8,43	79,17	15,52	10,22	78,5	8,92	5,88	82,31	13,64	8,99	95,91	16,77	11,05	90	19,04	12,54	100	13,31	8,77
<i>Epicoccum</i>	1,92	6,61	0,1	5,42	12,4	0,19	2	4,13	0,06	2,69	7,44	0,11	3,18	5,79	0,09	19,58	41,32	0,62	14	22,31	0,33
<i>Cladosporium</i>	5	15,91	0,17	2,92	13,64	0,15	4,5	13,64	0,15	12,31	42,05	0,46	1,82	4,55	0,05	3,75	3,41	0,04	2,5	6,82	0,07
<i>Curvularia</i>	0,38	28,57	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,91	28,57	0,02	0,83	28,57	0,02	1	14,29	0,01
<i>Drechslera</i>	0	0	0	2,08	19,35	0,07	4	29,03	0,11	2,69	25,81	0,1	2,27	16,13	0,06	0,83	6,45	0,02	0,5	3,23	0,01
<i>Rhizopus</i>	8,46	17,56	0,28	21,67	38,93	0,63	3,5	5,34	0,09	4,23	8,4	0,14	4,55	7,63	0,12	2,5	4,58	0,07	11,5	17,56	0,28
<i>Ulocladium</i>	1,92	19,23	0,06	4,17	19,23	0,06	1,5	0	0	1,92	19,23	0,06	0,91	7,69	0,02	2,08	15,38	0,05	3	19,23	0,06
<i>Aspergillus section Flavi</i>	1,15	10	0,05	0	0	0	3,5	20	0,1	6,92	55	0,27	0,91	7,5	0,04	0	5	0,02	1,5	2,5	0,01
<i>Aspergillus section Nigri</i>	2,69	11,48	0,09	0,42	1,64	0,01	10,5	37,7	0,28	8,85	36,07	0,27	1,82	4,92	0,04	2,5	4,92	0,04	1,5	3,28	0,02
<i>Penicillium</i>	12,69	25,5	0,63	1,67	4,5	0,11	11	33	0,81	15,77	34	0,84	2,73	1	0,02	0,83	2	0,05	0	0	0
<i>Mucor</i>	0,77	80	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,45	20	0,01	6,25	0	0	1,5	0	0
Autres genres	11,15	27,33	0,51	4,58	8,67	0,16	14,50	25,33	0,47	4,62	12,67	0,23	5,45	8,67	0,16	5,42	11,33	0,21	5,50	6,00	0,11

a: Fréquence (%) = nombre d'échantillons contaminés par un genre ou une espèce x 100/Nombre total d'échantillon

b : Densité relative (%) = nombre d'isolats d'un genre ou d'une espèce x 100/ Nombre total des genres ou espèces isolés

c : Moyenne (%) = nombre de grains infectés par un genre ou une espèce x 100/Nombre total de grain C

Nous avons également noté une différence dans la présence de *Fusarium* et d'*Aspergillus* dans les sept régions du Royaume. Cette différence peut être due aux conditions climatiques (température, précipitations, etc.) qui changent d'une région à l'autre et de plusieurs facteurs liés aux paramètres de stockage tels que la température et l'humidité. Les céréales sont des substrats hautement nutritifs riches en amidon et en protéines, favorisant l'invasion des champignons, en fournissant des hydrates de carbone et l'azote nécessaires pour le développement des micromycètes (Badillet *et al.*, 1987). Selon les résultats obtenus sur la biodiversité des champignons de blé, on constate que les moisissures de terrain et de stockage sont présentes. La même conclusion résulte de l'étude de Meyer *et al.* (2004). Le résultat correspondant est dû à la similitude des conditions climatiques entre le Maroc et la Tunisie. D'autres études similaires ont remarqué la même origine de prédominance des genres de champignons (Campbell *et al.*, 1996).

III. 3. 2. TENEUR EN HUMIDITÉ ET ACTIVITÉ DE L'EAU

Parmi les paramètres qui aident une moisissure à proliférer et à produire des mycotoxines, il y a l'activité de l'eau. En dessous d'une certaine disponibilité d'eau (A_w), elles ne peuvent pas pousser ou produire des mycotoxines, même si certaines spores survivent et peuvent être activées lorsque ces conditions seront favorables. Selon Campbell *et al.* (1996), les conditions optimales d'activité de l'eau pour plusieurs espèces de champignons sont:

- ✓ $a_w > 0,95-0,90$: *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma* sp., *Stachybotrys chartarum*, *Phialophora* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. et *Phoma* sp.
- ✓ a_w de 0,90 à 0,85: *Aspergillus versicolor*, *A. sydowii* et *A. nidulans*.
- ✓ $a_w < 0,85$: *A. versicolor*, *A. glaucus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. aurantiogriseum*.

Selon les résultats obtenus (tableau 23), les valeurs d'activité de l'eau sont comprises entre 0,511 (Méknès-Fès) et 0,635 (Khémiset). Ces valeurs sont dans la gamme proposée pour prévenir la croissance des champignons pendant le stockage et la commercialisation du blé (Pitt *et al.*, 1987). Cependant, le blé est dans les conditions d'activité de l'eau permettant un stockage sans croissance fongique ni production de mycotoxine. Ainsi, ces mycotoxines ont été produites à la fois au champ ou pendant le séchage du grain. Pour tout cela, il est nécessaire de connaître la mycoflore présente dans les grains de blé, capable de produire du DON et de l'OTA.

Tableau 23: Activité hydrique des grains de blé marocain

Zones marocaines	a_w (moyenne $\pm$ écart type)
Méknès-Fès	0,511 $\pm$ 0,034
Skhirat-Témara	0,538 $\pm$ 0,067
Séttat	0,556 $\pm$ 0,047
Marrakech	0,566 $\pm$ 0,064
Rabat-Salé	0,589 $\pm$ 0,054
Béni Méllal	0,592 $\pm$ 0,0168
Khémiset	0,635 $\pm$ 0,053

III. 3. 3. CAPACITÉ DE PRODUCTION DES MYCOTOXINES ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES DE FUSARIUM ET D'ASPERGILLUS

L'identification correcte de l'espèce est nécessaire pour évaluer le risque de contamination des aliments par les mycotoxines. Toutes les espèces d'un genre ne sont pas capables de produire des mycotoxines et leur niveau de production est différent. Nous avons noté que les deux mycotoxines (OTA et aflatoxine) sont présentes dans plusieurs céréales (WHO, 2018).

Seulement 27 des souches analysées (980 souches au total) sont capables de produire du DON avec une concentration minimale $< 15,6 \mu\text{g/Kg}$ pour la région de Marrakech et un niveau de concentration maximale de $5222 \mu\text{g/Kg}$ dans des échantillons de Séttat (tableau 24).

Parmi les espèces identifiées, les producteurs du DON sont principalement *Fusarium graminearum* et *F. coeruleum* (Bennett *et al.*, 2003). La présence de ces moisissures a été observée dans deux régions (Rabat-Salé et Skhirat-Témara).

Les espèces d'*Aspergillus* isolées et identifiées à partir de 81 échantillons provenant de sept régions du Maroc sont *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. Niger aggregate* et *A. flavus*.

L'espèce la plus abondante est *A. flavus* (30 isolats), suivi d'*A. niger* (26 isolats), *A. tubingensis* (11 isolats) et de l'agrégat *A. Niger* (6 isolats) (tableau 24). Parmi les souches identifiées, il existe des souches productrices d'ochratoxine et/ou d'aflatoxine.

L'OTA est principalement produite par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, en particulier *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* et *P. verrucosum* principalement trouvés dans le blé. Les produits à base de blé sont le principal groupe de denrées alimentaires où cette toxine a un impact élevé, en raison de son utilisation comme aliment de base par la majorité de la population mondiale (Hennequin *et al.*, 1998).

Nous avons aussi remarqué qu'une activité de production d'OTA parmi les souches recueillies à partir de cultures d'échantillons de Skhirat-Témara, Méknès-Fès et Séttat dont les valeurs maximales sont respectivement de $0,57 \mu\text{g/Kg}$, $0,635 \mu\text{g/Kg}$ et $0,727 \mu\text{g/Kg}$. L'OTA a été produit par 4 souches sur 11 *A. tubingensis* (36,36%) et 3 souches sur 26 *A. niger* (11,5%). Les pourcentages rapportés d'isolats ochratoxigéniques d'*A. niger* sont assez variables en fonction du nombre d'isolats étudiés et de l'origine géographique (Gams *et al.*, 1986 ; Rosenthal

et al., 2000). *A. tubingensis* a été détecté pour la première fois en tant que producteur d'OTA dans le raisin (Raper *et al.*, 1965).

Le faible niveau de production d'OTA par la souche isolée *A. tubingensis* est dû aux conditions de stockage plus ou moins respectées par rapport aux résultats obtenus par d'autres chercheurs (Gams *et al.*, 1986 ; Pitt *et al.*, 1987 ; Tabuc *et al.*, 2007). Cette espèce produit une faible quantité d'OTA (Morin, 1994).

Tableau 24: Identification moléculaire des espèces fongiques présentes dans le blé dur.

	Rabat-Salé	Marrakech	Skhirat-Témara	Méknès-Fès	Séttat	Khémiset	Béni Méllal
<i>F. graminearum</i>	1	1	-	-	-	-	-
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. equiseti</i>	2	2	-	1	2	-	4
<i>F. langsethiae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. acuminatum</i>	-	-	-	-	-	-	1
<i>F. sporotrichioides</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>F. verticillioides</i>	-	-	-	-	-	-	2
<i>F. coeruleum</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>F. avenaceum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tubingensis</i>	1	-	3	6	1	-	-
<i>A. niger</i>	3	-	17	6	-	-	-
<i>A. niger aggregate</i>	-	-	1	5	-	-	-
<i>A. flavus</i>	2	4	7	13	2	1	1

Tableau 25: Production de DON et d'OTA par les isolats fongiques.

Zones	<u>Déoxynivalénol</u>				<u>Ochratoxine A</u>			
	Souches positives (fréquence %)	Gamme (µg / Kg)	Moyenne ± RSD ** (µg / Kg)	<u>Niveau maximum</u> (µg / Kg)	Souches positives (fréquence %)	Gamme (µg / Kg)	Moyenne ± RSD ** (µg / Kg)	<u>Niveau maximum</u> (µg / Kg)
Rabat-Salé	3 (0,30)	33,3-122	74,16±44,75	122	Nd	Nd	Nd	Nd
Marrakech	5 (0,51)	<15,6-332	92,26±135,62	332	Nd	Nd	Nd	Nd
Skhirat-Témara	Nd	Nd	Nd	Nd	1 (2,4)	0-0,57	0,285±0,403	0,57
Méknès-Fès	Nd	Nd	Nd	Nd	3 (7,1)	0,081-0,635	0,269±0,316	0,635
Séttat	5 (0,51)	45-5222	1232,2±2239,11	5222	3 (7,1)	0,123-0,727	0,353±0,326	0,727
Khémiset	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Béni Mellal	5 (0,51)	23,3-332	109,86±126,40	332	Nd	Nd	Nd	Nd

III. 4. CONCLUSION

Les résultats des études sur la mycoflore ont révélé la prédominance des genres *Alternaria* et *Fusarium* dans les échantillons de blé analysés.

Nous avons remarqué qu'aucune différence de mycoflore n'a été observée entre les échantillons provenant des sept zones étudiées, à l'exception du genre *Penicillium* qui a montré des niveaux de contamination relativement élevés dans les régions de Méknès-Fès, Skhirat-Témara et Rabat-Salé qui sont probablement dus à des niveaux d'humidité plus élevés au cours de l'année.

Suivant les résultats de l'évaluation de la capacité de production des souches isolées des genres *Fusarium* et *Aspergillus*. Nous avons remarqué que seul 27 sur 980 des *Fusaria* isolés sont capables de produire le DON et que L'OTA a été produite par 4 souches sur 11 (*A. tubingensis* et 3 souches sur 26 *A. niger*).

Selon les résultats de la présente étude, il est recommandé de surveiller la qualité du blé en pré et post-récolte dans le but de réduire la contamination par les moisissures et les mycotoxines au niveau du produit fini.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre du présent travail, nous avons montré la présence du DON dans le blé dur provenant de plusieurs régions au Maroc. Nous avons aussi déterminé la mycoflore du blé dur et caractérisé les espèces fongiques responsables de l'accumulation des mycotoxines dans cette céréale, puis nous avons évalué la capacité de production des mycotoxines par les espèces toxigènes.

L'identification de la mycoflore interne a montré la prédominance des genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Alternaria*. L'incidence élevée des moisissures de stockage comme *Aspergillus* et *Penicillium* est due au fait que les échantillons ne sont pas fraîchement récoltés.

Parmi les isolats appartenant au genre *Aspergillus*, *Aspergillus* section Flavi et section Nigri sont les plus rencontrés dans cette étude. *A. flavus* est l'espèce la plus courante parmi la section Flavi dans les grains de blé, alors que les souches dominantes isolées de la section Nigri sont respectivement : *Aspergillus niger*, *A. tubingensis* et *A. niger aggregate*.

Parmi les espèces appartenant au genre *Fusarium*, *F. equiseti* est le plus dominant. La présence des espèces de *Fusarium* sections *graminearum* et *culmorum* dans le blé nous pousse à contrôler la contamination de cette céréale par les trichothécènes.

L'évaluation de la capacité de production des mycotoxines par les champignons a montré que 27 souches analysées sur un total de 980 souches de *Fusarium* sont capables de produire du DON avec une concentration minimale $< 15,6 \mu\text{g/Kg}$ pour la région de Marrakech et une concentration maximale de $5222 \mu\text{g/Kg}$ dans des échantillons de Settât. D'autre part, la production de l'OTA a été évaluée sur 43 souches d'*Aspergillus* dont six souches productrices de cette toxine avec un minimum de $0,081 \mu\text{g/Kg}$ dans les échantillons de la région de Méknès-Fès et un maximum de $0,727 \mu\text{g/Kg}$ dont la zone de Settât.

Les espèces d'*Aspergillus* isolées et identifiées à partir de 81 échantillons de sept régions du Maroc sont *A. tubingensis*, *A. niger* et *A. flavus*. Le plus abondant est *A. flavus* (30 isolats), suivi par *A. niger* (26 isolats), *A. tubingensis* (11 isolats) et *A. niger aggregate* (6 isolats).

Nous n'avons trouvé aucune correspondance entre l'incidence des mycotoxines et celle des espèces toxigènes ainsi que le pourcentage des isolats prouvés producteurs de toxines. Ceci peut être expliqué par :

- ✓ Le faible nombre de grains isolés sur vert de malachite (200 graines) qui peuvent ne pas contenir toutes les espèces productrices,
- ✓ La compétition entre les isolats émergeant d'un grain quelconque sur le milieu de culture (généralement, à partir d'un grain, un maximum de trois colonies peuvent proliférer),
- ✓ La désinfection partielle des grains peut éliminer quelques souches productrices,
- ✓ Les champignons peuvent disparaître alors que la mycotoxine persiste à cause de sa stabilité.

Parmi les paramètres qui aident les moisissures à proliférer et à produire des mycotoxines, il y'a l'activité de l'eau. Selon une certaine disponibilité en eau (A_w), elles ne peuvent pas se développer ou produire des mycotoxines, bien que certaines spores survivent et puissent être activées lorsque ces conditions sont favorables.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de :

- Entreprendre des travaux sur l'ecophysiologie des souches fongiques isolées du blé ;
- Elargir la gamme de matrices à d'autres céréales notamment le blé tendre, l'orge et le maïs et rechercher d'autres mycotoxines ;
- Etudier l'influence des facteurs climatiques sur l'accumulation des mycotoxines dans le blé
- Investiguer des solutions innovantes pour réduire la croissance des moisissures et la production des mycotoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Agroparistech.** (2018). [online] Available at: http://www2.agroparistech.r/IMG/pdf/Choix_et_Validation_Methode-2.pdf 2018.
- Al-Hilli A. L. & Smith J. E.** (1979). Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. FEMS Microbiol. Lett, 6, pp. 367-370.
- Al hamzi. (2011)** . Fungal flora and deoxynivalenol (DON) level in wheat from Jeddah market, Saudi Arabia. African Journal of Biotechnology. Vol (10) 168-173.
- ANSES, (2012).** *Aspergillus flavus* et autres moisissures productrices d'aflatoxines, ANSES, 3p.
- ANSES. (2018).** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. [online] <https://www.anses.fr>. (Consulté en 2018).
- ANSES. (2019).** [online] Available at: https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf [Accessed 26 Oct. 2019].
- Antoine, C., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J. & Rouau, X.** (2002). Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. Sciences Des Aliments 22, 545-556.
- Asao T, Buchi G. & Abdelkader M. M.** (1963). Aflatoxins B and G. Am Chem. Soc. 85, 1706-1707.
- Atalla M. M, Hassanein N. M. & El-Beih A. A.** (2003). Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. Nahrung 47(1), 6-10.
- Azemar B.** (2001). Etude du rôle de l'Ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanismes moléculaire impliqué. Thèse universitaire, universitaire Toulouse. France.

-B-

- Baculard A. & Tournier G.** (1995). Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, Rev. Pneumol. Clin, 51, 159-162.
- Badillet G, de Briève C. & Guého E.** (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, dans : Atlas clinique et biologique, volume II. Paris : Edition VARIA.
- Balzer A, Tardieu D. & Bailly J-D.** (2004). Les Trichothécènes : Nature des toxines présence dans les aliments et moyens de lutte. Unité de mycotoxicologie, E. N. V. T. Toulouse. Revue Mèd. Vét.
- Battais F., Richard C. & Leduc V.** (2007). Les allergènes du grain de blé. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 47, 171-174.
- Bennett J. W. & Klich M.** (2003). Mycotoxins, Clinical Microbiology Reviews, 16(3):497-516.
- Bensassi, F., Zaied, C., Abid, S., Hajlaoui, M.R. & Bacha H.** (2010). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. Food control, 21, 281-285.
- Berhaut P., Le Bras A., Niquet G. & Griaud P.** (2003). Stockage et conservation des grains à la ferme, ARVALIS, Institut du végétale, Ed. Tec et Doc, Paris, 108 P.
- Bezuidenhout S. C, Gelderblom W. C. A. & Gorst-Allman C. P** (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Commun. 11, 743-745.
- Birkinshaw J. h, Bracken A. & Raistrick H.** (1943). Studies in the biochemistry of micro-organism : *Biochemical Journal*, 37(6), pp. 726-728.
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J. & Richard, J.** (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, animal feed and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology, 137, 265-282.
- Blackwell B. A, Miller J. D. & Savard M. E.** (1994). Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. J Assoc. Off. Anal. Chem. Int, pp. 506-511.
- Blesa, J., Juan-Carlos Moltó, Samira El Akhdari; Jordi Mañes & Zinedine A.** (2014). Simultaneous determination of *Fusarium* mycotoxins in wheat grain from Morocco by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Food Control 46:1-5.
- Bohm J, Grajewski J. & Asperger H.** (2000). Study on biodegradation of some A-and B trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. Mycotoxin Res. 16.

- Bondy G. S. & Pestka J. J.** (1991). Dietary exposure to the trichothecene vomitoxin stimulates terminal differentiation of Peyer's patch B cells to IgA secreting plasma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(3), pp. 520-530.
- Bottalico A. & Logrieco A.** (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance, in: Sinha K. K, Bhatnagar D. (Eds.) *Mycotoxins in agriculture and food safety*. New-York, Marcel Dekker Inc.
- Botton B, Breton A. & Fèvre M.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Paris. Masson 2ème édition, 442p.
- Bouchet P, Guignard J-L. & Pouchus Y-V.** (2005). Les champignons, mycologie fondamentale et appliquée. Paris : Masson 2ème édition.
- Boudra H, Barnouin J ; & Dragacci S.** (2007). Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in raw bulk milk from french dairy herds. *J. of Dairy Science* 90, 3197-3201.
- Bougnoux ME. & Espinasse F.** (2003) Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue française des laboratoires*. (351):67-71.
- Bouraima Y, Ayi-Fanou L. & Kora I.** (1993). Mise en évidence de la contamination des céréales par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Bénin, dans : Creppy E. E, Castegnaro M, Dirheimer G. (Eds) *Human ochratoxicosis and its pathologies*, 231. pp. 101-110.
- Bragulat M. R., M. L, Abarca & F. J. Cabañes.** (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *J. Food Microbiol.* 71 139-144.
- Branham R. D. A. & Plattner R. D.** (1993). Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid culture of *Fusarium moniliforme*. *J. Nat. Prod.* 56, 1630-1633.
- Bouafifssa, Y., Manyes, I., Rahouti, M., Mañes, J., Berrada, H., Zinedine A. & Fernández-Franzón. M.,** Multi-occurrence of twenty mycotoxins in pasta and risk assessment in Moroccan population. *Toxins*, 2018, 10 (11), 432; doi:10.3390/toxins10110432.

-C-

- Cabanes F. J, Accensi F. & Bragulat M.** (2002). What is the source of ochratoxin A in wine ? *Inter. J. of Food Microbiol.* 79, 213-215.
- Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D.** (1995). Growth of *F. moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Appl. Microbiol* 20(4), pp.247-251.
- Cahagnier B.** (1998). Céréales et produits dérivés. In : Bourgeois C. M., Mescle J. -F., Zucca J. (coord.). *Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Ed. Tec et Doc, Paris, pp. 392-414.
- Cahagnier B. & Richard-Molard D.** (1998). Analyse mycologique in moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec et Doc, p 140-158
- Caldwell R. W. & Tuite J.** (1968). Zearalenone production among *Fusarium* species. *Physiopathologia* 58, 1046.
- Callebout A, Debongnie P. & Tangni E.** (2016). Zéaralénone. Centre d'Etude et de Recherche Vétérinaires et Agrochimiques. Disponible sur www.coda-cerva.be (consulté le 02/01/2016).
- Campbell C. K., Johnson E. M., Philpot C. M. & Warnock D. W.** (1996). Identification of pathogenic fungi, Public Health Laboratory Service, London.
- Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S. & Planard C.** (2011). Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 6(12):e28425
- CAST.** (1989). Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Task Force Report, 116, 37.
- CAST.** (2003). *Mycotoxins : risks in plant, animal, and human systems*. Ames IOWA. Rep. 139.
- Castegnaro M. & Pfohl-Leszkowicz A.** (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*. Lavoisier, Tec et Doc.
- Caulin C.** (2012). *Recommandations en pratique. 165 stratégies thérapeutiques*. Vidal Recos.
- CDC.** (2004). (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of aflatoxin poisoning Eastern and Central Provinces, Kenya. 53, 790-793.
- Chabasse, D., Bouchara, J. P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B. & Penn, P.** (2002). Les moisissures à intérêt médical. *Cahier de formation N° 25*. Bioforma 230 bd Raspail 75014 Paris.

- Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noël T. & Villard J.** (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Francophone des Laboratoires*, N°373 :61-66. 6
- Chen C, Pearson A. M. & Coleman T. H.** (1984). Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet. *Food. Chem. Toxic*, 22, 447-451.
- Chermette R. & Bussieras J.** (1977). *Parasitologie vétérinaire. Mycologie*, Edité par le Service de Chernozemsky I. N, Stoyanov I. S, Petkova-Bocharova T. K, et al. Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratza district, Bulgaria. *International Of Cancer*, 19, 1-11.
- Chu F. S, Fang C. C. & Ashoor S. H.** (1975). Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. *Appl. Microbiol.* 29, 313-316.
- Clark H. A. & Snedeker S. M.** (2006). Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure. In *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 9, 2006, p. 265–296.
- Clear, R. M. & Patrick, S. K.** (2000). *Fusarium* head blight pathogens isolated from *Fusarium* damaged kernels of wheat in western Canada, 1993 to 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 51-60.
- COCERAL**, (2013). Balance sheet for cereals 2012/13-2011/12. Available at <http://www.coceral.com/web/march%202013/1011306087/list1187970368/f1.html> Accessed 13. 05. 13
- Codex Alimentarius Commission.** (2012). Discussion paper on mycotoxins in Sorghum. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on contaminants in foods' 6th Session held in The Hague, The Netherlands on 26-30 March 2012.
- Commission of the European Communities (CEC).** (2002). Commission Regulation (EC) No. 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L75, 18-20.
- Commission of the European Communities (CEC).** (2006a). Commission Recommendation No 2006/576 of 17 August 2006 on the presence of déoxynivalénol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, L 229, 7-9.
- Commission of the European Communities (CEC).** (2006b). Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 364, 5-24.
- Commission of the European Communities (CEC).** (2007). 1126/2007 of 28 September 2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Journal L* 255, 14-17.
- Commission of the European Communities (CEC).** (2010). Commission Regulation No 165/2010 of February 26 amending regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union L* 50, 8-10.
- Coppock W. R. & Christian R. G.** (2007). Aflatoxins, In: *Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles*, R. C. Gupta; pp. 939-950, Academic Press, ISBN 0123704677, San Diego.
- Creppy E. E, Baudrimont I. & Betbeder A. M.** (1995). Ochratoxines et conséquences en toxicologie. *Cryptogamie Mycol.* 16(3), 195-221.
- Creppy E. E, Kern D ; & Steyn P. S.** (1983). Comparative study of the effect of ochratoxin a Analogues on yeast aminoacyl-tRNA, synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicology Letters* 19, 217-224.
- Cuero R. G, Smith J. E. & Lacey J.** (1987). Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. *Applied And Environmental Microbiology* 53, 1142-1146.

-D-

- D'Mello J. P, Porter J. K. & Mc Donald.** (1997). *Fusarium* Toxins. Boca Raton : CRC Press, pp. 287-301.
- D'Mello, J. P. F. & MacDonald, A. M. C.** (1997). Mycotoxins; *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- Da Silva, J. B., Pozzi, C. R., Mallozzi, M. A. B., Ortega, E. M. & Correa, B.** (2000). Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 4352-4356.

- David A.** (2001). Aliments fermiers et mycotoxines : évaluation et maîtrise de risque. Revue bibliographique. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, 183p.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Florl C, Vella A, Florio AR. & Torelli R.** (2012). Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 18(5):475-84.
- De Hoog G. S. & Guarro J.,** (1995), Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas
- De Valk HA, Klaassen CH. & Meis JF.** (2008). Molecular typing of *Aspergillus* species. Mycoses. 51(6):463-76.
- Delarras,** 2007 incomplet demand brief. In FAO cereal supply and demand situation. (July 2011).
- Delos M, Regnault C. & Joudrier P.** (2014). Les mycotoxines dans les récoltes de céréales. Quelle gestion en 2013, Qu'attendre des biotechnologies contre ces fléaux ? Académie d'Agriculture de France.
- Desjardins, A. E.** (2006). *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics, and biology. St Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Desjardins, A. E. & Proctor, R. H.** (2001). Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. In B. A.
- Devegowda, G., Raju, M. & Swang, H.** (1998). Mycotoxins: novel solutions for their counteraction. 70(50):12-13
- Dorner J. W, Cole R. J. & Diener U. L.** (1984). The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* will reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. Mycopathologia, 87, 13-15.
- Duran J. A, Malvar A, Pereiro M. & Pereiro Jr. M.** (1989). *Fusarium moniliforme* keratitis, Acta ophthalmol, Scand. 67, pp. 710-713.
- Dutton M. F, Ehrlich K. & Bennett, J. W.** (1985). Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. Appl Environ Microbiol. 1985 Jun; 49(6): 1392–1395.

-E-

- Ehrlich K. C. & Daigle K. W.** (1983). Protein synthesis inhibition by oxo-8-12,13-epoxytrichothecenes. Biochim. Biophys. Acta. 923, 206-213.
- El Khilifi O. K., H. Sharma, C. Harna & O. Benlhabib.** (2003). Introgression de la résistance à la cécidomyie chez le Blé par croisement avec une souche d'*Aegilops ventricosa* marocaine -.12, p. 411- 419 - Départ./Région : , Acta Botanica Gallica, 1, Tome 150 - Fascicule 4
- Eriksen, G. S. & Pettersson, H.** (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. Animal Feed Science and Technology 114, 205-239.
- European Parliament and Council.** (2002). Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7May 2002 on undesirable substances in animal feed. Official Journal of the European Union, L 140, 10-22.
- Evers, A. D. & Bechtel, D. B.** (1988). Microscopic structure of the wheat grain. Wheat: chemistry and technology. Volume I., 47-95.
- Evers, A. D., Blakeney, A. B. & O'Brien, L.** (1999). Cereal structure and composition. Australian Journal of Agricultural Research 50, 629-650.
- Evers, T. & Millar, S.** (2002). Cereal grain structure and development: some implication for quality. Journal of Cereal Science 36, 261-284.

-F-

- FAO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004. Woldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper, Vol. 81. FAO, Rome, Italy.
- FAO.** Étude FAO Alimentation et Nutrition. Réglementation relative aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003. 188p.
- FAO.** (2018). Guide pratique-Stockage et conservation des grains la ferme-Tables des matières. <http://www.fao.org/wairdocs/x5163f/X5163f00.htm>. (Consulté en 2019)
- Farrar J. J. & Davis R. M.** (1991). Relationship among ear morphology, western flowers thrips and *Fusarium* ear rot of corn. Physiopathology, 81, pp. 661-666.
- Faucet V, Pont F, Størmer F. C,** (2006). Evidence of a new dechlorinated ochratoxin A derivative formed in opossum kidney cell cultures after pretreatment by modulators of glutathione pathways : Correlation with DNA-adduct formation. Molecular Nutrition and Food Research, 50, 530-542.

Faucet-Marquis V. (2005). L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de postmarquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 285p.

Feillet P. (2000). Le grain de blé : Composition et utilisation. Ed. INRA, Paris, 154p

Flickr. (2018). Images libres de droits, [online]: <http://www.flickr.com>. (consulté en 2018).

Fredot E., (2012). Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. 3ème édition, Lavoisier, Tec et Doc, Paris, 613p.

Fulcher, R. G. & Wong, S. I. (1980). Inside Cereals — a fluorescence microchemical view. In cereals for food and beverages, Inglett GE, Munck L (eds) New York, Academic Press pp 1-26.

-G-

Galtier P. & Draggaci S. Danger dans l'assiette. Quae Éditions, 2011. 184p.

Galtier P., N. Loiseau, I. Paule Oswald & O. Puel. (2005) Toxicology of mycotoxins, hazards and risks in human and animal food [online]. Bull. Acad. Vét. France — 2006 - Tome 159 - N°1 www.academie-veterinaire-france.fr 1. (consulté en 2018)

Gams W, Christensen M. & Onions A. H. S. (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*, in : Samson R. A. Pitt J. I. Advances of *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. London et New-York, Plenum Publi.

Geisen R, Cantor MD, Hansen TK, Holzapfel WH. & Jakobsen M. (2001). Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. Int J Food Microbiol. 10;65(3):183-91.

Gelderblom W. C. A, Marasas W. F. O. & Vleggaar R. (1992). Fumonisins : isolation, chemical characterization and biological effects. Mycopathologia 117, 11-16.

Gourama H, Tantaoui-Elaraki A et Fares M (1985). Toxinogénèse et activité lipolytique de souches d'*Aspergillus flavus* et d'*A. ochraceus* isolées des olives. Actes Ins Agr Vét, 5: 51-57.

Groopman J. D, Croy R. G. & Wogan G. M. (2000). *In vitro* reactions of aflatoxin B1-adducted DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Sep; 78(9): 5445–5449.

Guarro J. & Gene J. (1992). *Fusarium* infections, Criteria for the identification of the responsible species, Mycoses, 35, pp. 109-114.

Guerre P. (2000). Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination du bétail par des mycotoxines. Revue Méd. Vét. 151, 1095-1106.

Guerre P., Galtier P. et Burgat., V. (1996). Le métabolisme un facteur de susceptibilité à la toxicité des aflatoxines, Revue de Médecine Vétérinaire, 147, 12: 879-892.

Gupta A. K, Baran R. & Summerbell R. C. (2000). *Fusarium* infections of the skin. Curr Opin Infect. Dis. 13[2], pp. 121-128.

-H-

Hajjaji, A., El Otmani, M., Bouya, D., Bousseta, A., Mathieu, F., Collin, S. & Lebrihi, A. (2006). Occurrence of mycotoxins (ochratoxine A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. Molecular Nutrition and Food Research, 50, 494-499.

H. Ok, D., Kim, D., Kim, S., Chung, M., Chung, K. Park. & H. Chun. (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxine, deoxynivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in south Korea, *Food Control*, 37 284-291.

Hadjeba-Medjdoub K. (2012). Risque de multi-contaminations en mycotoxines et moyens de désactivation par les parois de levures et levures enrichies en glutathion ou sélénométhionine. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse (INP). 328p.

Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (1986). Free radicals and antioxydant protection, mechanisms and significance in toxicology and disease. Hum. Toxicol. 7, 7-13.

Helenesguin. (2018). Images libres de droits, [online]: <http://www.helenesguin.net>. (consulté en 2018).

Hennequin C, Lavarde V. (1998). Infections à *Penicillium*, Encycl. Méd. Chir. Paris : Elsevier.

Hermet, A., Meheust, D., Mounier, J., Barbier, G. & Jany, J. L. (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. Fungal Biol 116, 692-705.

Hinton J. J. C. (1955). Resistance of the testa to entry of water into wheat kernel. Cereal Chemistry 32, 296-306.

- Houbraken, J. & Samson, R. A.** (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Stud Mycol* 70, 1-51.
- Hradil C. M, Hallock Y. F, Jon Clardy, Doug S. Kenfield & Gary Strobel.** (1989). Phytotoxins of *Alternaria cassiae*. *Phytochemistry* 28, (1), 73-75.
- Huff, W. E., Chang, C. F., Warren, M. F. & Hamilton. P. B.** (1979). Ochratoxine A- induced iron deficiency anemia. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 :601-604.

-I-

- IARC.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 31 : Some food additives, feed additives and naturally occurring substances. IARC, Lyon, 1993.
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W. & Subbarao, K. V.** (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS One* 6, e28341.
- INNORPI.** (1983). List of maximum concentrations of contaminants and undesirable substances. Tunisian Standard NT 117. 02.
- International Agency for Research on Cancer, IARC.** (1999). Monographs on the overall evaluations of carcinogenicity to humans. IARC monographs, Vols. 1-73 Lyon, France, 1-36.
- International Agency for Research on Cancer. IARC,** (1993) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic. Risks to human, some naturally occurring substances : food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume 56. Lyon.
- IPCS.** Selected Mycotoxins : Ochratoxins, Trichothecenes, ergot. *Environ. Health. Criteria* 105. Genève, W. H. O, 1990. 263p.
- Istockphoto.** Images libres de droits, [online] : <https://www.istockphoto.com/fr/photos/moisissure?sort=mostpopular&mediatype=photography&phrase=moisissure>. (Consulté en 2018).

-J-

- Jaskiewicz K, Van Rensburg S. J. & Marasas W. F.** (1987). Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. *J. Nat. Cancer Inst.* 78, 321-325.
- Jeunot B.** (2005). Les fusariotoxines sur céréales, détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, 125p.
- Joffe A. Z.** (1978). *Fusarium poae*, and *F. sporotrichoides* as principal agents of alimentary toxic aleukia. Marcel Dekker, New-York, 21-86.
- Johanning, E., Gareis, M., Nielsen, K., Dietrich, R. & Martlbauer, E.** (2002). Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis. Rotterdam (Netherlands). Indoor Air 2002-9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate. In-house publishing, p: 1-6.
- Joubrane Karine.** (2011). Evaluation du risque lié aux champignons pathogènes producteurs d'Ochratoxine A et Aflatoxine B1 au niveau de la production de blé au Liban. Thèse de doctorat de l'Université Saint Joseph de Beyrouth, 231p. Disponible sur : [www. fs. usj. edu. lb](http://www.fs.usj.edu.lb).

-K-

- Kavanagh, K.** (2017). *Fungi Biology and Applications*. Third Edition. Ireland : Hoboken, NJ : Wiley, ,412.
- Kane A, Creppy E. E. & Roth A.** (1986). Distribution of the [3H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Archives of Toxicology* 58, 219-224.
- Katzman P. A, Hays E. E. & Cain C. K.** (1944). Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* 154(2), 475-486.
- Keller S. E, Sullivan T. M. & Chirtel S.** (1997). Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1 : oxygen and pH. *J. Indust. Microbiol Biotechnology*, n°19, pp. 305-309.
- Kinoshita T, Renbutsu Y. & Khan I.** (1972). Distribution of tenuazonic acid production in the genus *Alternaria* and its phytopathological evaluation. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 38, pp. 397-404.
- Kovalsky P.** (2014). Climate change and mycotoxin prevalence. *Broadening Horizons* n° 7.

- Kumagai S. & Aibara K.** (1982). Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 64, . 94-102.
- Kumagai S.** (1989). Intestinal absorption and excretion of aflatoxins in rats. *Toxicol. Applic. Pharmacol*, 97, pp. 88-97.
- Kirk, P. & Andrianova, T.** (2008). Dictionary of the fungi. Oxon: Cabi.

-L-

- Lacey J.** (1986). Factors affecting mycotoxin production, in : Steyn P. S, Vleeghaar R, Mycotoxins and phycotoxins. Pretoria, South Africa : 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins.
- Lafont P, Lafarge-Frayssinet C. & Lafont J.** (1977). Métabolites toxiques de *Fusarium*, agents de l'aleucie toxique alimentaire. *Ann. Microbiol.* 128(B), 215-220.
- Larone D. H.** (1987). Medically important fungi. A guide to identification, 2nd edition. New-York, London, Amsterdam : Elsevier Science Publishing, 230p.
- Lawrie J, Down V. M. & Greaves M. P.** (2000). Factors Influencing the Efficacy of the Potential Microbial Herbicide *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on *Amaranthus retroflexus*. *Biocontrol Science and Technology* 10, pp. 81-87.
- Le Bars J.** (1988). Toxinogenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms systems, in : Multon J. L. Preservation and storage of grains. Seeds and their by-products. New-York : Lavoisier Publishing, pp. 347-366.
- Lea T, Steien K. & Stormer C.** (1989) Mechanisms of Ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia* 107, 153-159.
- Lesage-Meesen L. & Cahagnier B.** (1989). Mécanisme d'adaptation des micromycètes aux activités de l'eau réduite, dans : Cahagnier B. Moisissures des aliments peu hydratés. Paris, Londres, New-York.
- Leslie J. F., Summerell B. A.** (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing.
- Lipps P. E. & Deep I. W.** (1991). Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and the recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp in corn. *Plant Disease* 75. 828-833.

-M-

- Madhyastha S. M, Marquadt R. R, Frolich A. A.** (1985). Effects of different cereal and oil seed management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. Formington, Markovic B. Néphropathie des Balkans et carcinomes à cellules transitionnelles. *Journal d'Urologie*, 91, 215-220.
- MAPMDREF.** 2018 Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts. [online] <http://www.agriculture.gov.ma>. (Consulté en 2018).
- MAPMDREF.** 2014 Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts. [online] <http://www.agriculture.gov.ma>. (Consulté en 2018).
- Marasas, W. F. O., Burgess, L. W., Anelich, R. Y., Lamprecht, S. C. & van Schalkwyk, D. J.** (1988). Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *South African Journal of Botany* 54, 63-71
- Marvin LF, Roberts MA & Fay LB.** (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta.* 337(1-2):11-21.
- McCallum J. L, Tsao R. & Zhou T.** (2002). Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *J. of Food Protection*, 65(12), 1937-1942.
- McCormick, S., Stanley, A., Stover, N. & Alexander, N.** (2011). Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3(7), pp. 802-814.
- McKeith, B.** (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* 29, 111-142.
- Mediatheque.accesmad.** (2018). Images libres de droits, [online]. <http://mediatheque.accesmad.org> (consulté en 2018).
- Meisner H. & Cimbala M.** (1986). Effect of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys. *Developments In Toxicology And Environmental Science* 12, 261-271.
- Meky F. A, Turner P. C, Ashcroft A. E.** (2003). Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food Chem. Toxicol.* 42(1), 265-273.
- Merck Index.** Twelfth Edition, 1996. 1730-1731.

- Messiaen C. M. & Cassini R.** (1968). Recherche sur les Fusarioses. IV La systématique des *Fusarium*. Ann. Epiphyties 19, pp. 387-454.
- Meyer A, Deiana J. & Bernard A.** (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. France : Doin 2ème édition. .
- Miller J. D. & Trenholm H. L.** (1994). Mycotoxins in grain, compounds other than aflatoxins. Saint Paul, Minnesota : Egan Press,
- Miller Vincent, R.** (2001). Mycotoxins in Mold-Colonized Drywall Obtained from a Field Investigation. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona.
- Miller, J. D.** (1992). Fungi as contaminants in indoor air. Atmospheric Environment journal, 26, 2163-2172
- Mislivec P. B. & Tuite J.** (1970). Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dentcorn kernels. Mycologia 62, 75-88.
- Molinié A.** (2004). Qualité sanitaire des blés en région Midi-pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines (ochratoxine A et citrinine). Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse., 231p.
- Moreau C.** (1994). Moisissures toxiques dans l'alimentation. Pologne : Masson Et Cie, 322p.
- Morin O.** (1994). . *Aspergillus* et aspergilloses : biologie, Ed. Techniques, Encyl. Mèd. Chir. Paris : Elsevier, Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- Moss M. O, Franck M.** (1987). Prevention effects of biocides and other agents on mycotoxin production, in Toxicants in foods. Chichester : Ellis Horwood, pp. 231-251.
- Müller H. M.** (1982). Decontamination of mycotoxins. I. Physical process. Übersicht. Tierernähr, 10, 96 : Castegnaro M, Barek J, Frémy J. M, et al. Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some Mycotoxins. Lyon : IARC, SCI. Publ 113, 1991. p. 63.
- Müller N. & Petzinger E.** (1988). Hepatocellular uptake of aflatoxins B1 by non-ionic diffusion. Inhibition of bile acid transport by interference with membrane lipids. Biochem. Biophys. Acta, 938.
- Mycored.** Mycotoxins. International Society for Mycotoxicology. Consulté le 07/02/2016. Disponible sur : www.mycored.eu.

-N-

- Nährer K. & Kovalsky P.** (1981). Surveying the mycotoxin threat. The where and what of mycotoxin. Natl. Acad. Sci. 78. USA.
- Nelson P. E.** (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 117.
- Neri F, Donati I. & Veronesi F.** (2010). Evaluation of *Penicillium expansum* in usual and less common fruit hosts. Int. J. of Food Microbiol. 143(3), 109-117.
- Norholt M. D, Van Egmond H. P. & Paulsch W. E.** (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. Journal of Food Protection, pp. 485-490.
- Normand AC, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P. & Roesems S.** (2013). Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. BMC Microbiol.

-O-

- Ozonesolutions.** (2018). Images libres de droits, [online]: [http:// www. ozonesolutions. com](http://www.ozonesolutions.com). (consulté en 2018).

-P-

- Pageau D. & Fillion P.** (2016). Fusariose : réduire les risques aux champs ! Journée d'informations sur les mycotoxines. Consulté le 21/01/16. Disponible sur www.symposium-mycotoxines.ca.
- Papp B., Ódor P., & Szurdoki E.** (2002). An overview of options and limitations in the monitoring of endangered bryophytes in Hungary. Novitates Botanicae Universitatis Carolinae, Praha, 15/2001: 45-58
- Paster N. & Bullerman L. B.** (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grain as controlled by physical means. Int. J. Food. Microbiol 7, pp. 257-265.
- Payne G. A. & Hagler W. M.** (1983). Effect of specific amino acids on *Aspergillus flavus* in defined media. Appl. Environ. Microbiol 46, pp. 805-812.

- Pena, A., Seifrtova, M., Lino, C., Silveira, I. & Solich, P.** (2006). Estimation of ochratoxin A in Portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1449-1454.
- Perrone G, Susca A, Epifani F. & Mule G.** (2006). AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section Nigri from grapes. *Int J Food Microbiol.* 111 Suppl 1:S22-7.
- Pestka, J. J.** (2007). Deoxynivalénol: toxicity, mechanisms and health risks *Fusarium* In D. P. Morgavi et R. T. Riley (Eds.), toxins: Mycology, occurrence toxicity, control and economic impact. *Animal feed science and technology*. 137, 283-298.
- Petrova-Bocharova T., Chernozemsky I. N. & Castegnaro M.** (1988). Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria, *Food additives and Contaminants* 5, 299-301.
- Pfohl-Leszkowicz A. & Manderville R.** (2007). Review on Ochratoxin A : an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Food. Res*, 51, 61-99.
- Pfohl-Leszkowicz A.** (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Paris : Tec et Doc, 478p.
- Pfohl-leszkowicz A.** (2009). Mycotoxines : facteur de risque de cancers. *Mycotoxins: a cancer risk factor*. J. Afr. Cancer 1: 42-55 pp.
- Pierre GALTIER, Nicolas LOISEAU, Isabelle Paule OSWALD et Olivier PUEL.** (2005) Toxicology of mycotoxins, hazards and risks in human and animal food [online]. *Bull. Acad. Vét. France* — 2006 - Tome 159 - N°1 www.academie-veterinaire-france.fr 1. (consulté en 2018)
- Pinterest.** (2018). Images libres de droits, [online]: <http://www.pinterest.com>. (consulté en 2018).
- Pitt J. I. & Hocking A. D.** (1985). *Fungi and food spoilage*. Sydney : Academic Press.
- Pitt J. I.** (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull*, 56 (1). pp. 184-192
- Pitt J. I. & Hocking A. D.** (1997). *Food and Fungi Spoilage*, 2nd edition, Blackie Academic et Professional, London, UK, 593 pp.
- Pitt, D. B., Plestina. J. I, Shepard, R., Solfrizzo, G., Verger, M. & Walker, P. J. P.** (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Rome: Food and Agriculture Organization, pp. 281.
- Pitt, J. I., Basilico, J. C., Abarca, M. L. & Lopez, C.** (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*. 38, 41-46.
- Pohland A. E, Nesheim S. & Friedman L.** (1992). Ochratoxin A : A review. *Pure and Appl. Chem.* 64. Issue 7, Pages 1029–1046.
- Pohland A. E, Schüller P. L. & Steyn P. S.** (1982). Physico-chemical data for selected mycotoxins. *Pure Appl. Chem*, 54, 2219-2284.
- Pomeranz, Y.,** (1988). Chemical composition of kernel structures. *Wheat: chemistry and technology*. Volume I., 97-158.

-R-

- Radonic M. & Radosevic Z.** (1992). Clinical feature of Balkan Endemic Nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* 30, 189-192.
- Raper K. B. & Fennel D. I.** (1965). *The genus Aspergillus*. New-York, USA, William et Wilkinson.
- Reboux & Millon,** (2008). Microorganismes environnementaux en milieu agricole. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 69(2), pp. 286-288.
- Rodrigues, I. & Naehrer, K.** (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4, 663-675.
- Rosenthal E, Marty P. & Ferrero C.** (2000). Infections à *Penicillium marneffei* chez un patient infecté par le HIV. *Press Méd*, pp. 363-364.
- Rotem J.** (1994). *The genus Alternaria : biology, epidemiology, and pathogenicity*. Saint Paul.; APS Press, 344p.

-S-

- Sardiñas N., C., Vázquez, J., Gil-Serna, M. T., González-Jaén & B., Patiño.** (2011). Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR green quantitative PCR. *Int. Food Microbiol.* 145, 121-125.

- Sardiñas N., C., Vázquez, J., Gil-Serna, M. T., González-Jaén & B., Patiño.** (2010) Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by a highly sensitive PCR assay. *Food Add. Contam.* 27, 853-858.
- Schlatter C, Studer-Rohr J, Rasonyl T.** (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit. Contamin.* 13, 43-44.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J. C, et al.** (2002). On the safety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* ;59(4-5):426-35
- Scott P. M.** (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Prot.* 47, 489-499.
- Scudamore, K. A., Livesey, C. T.** (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *Journal of Science of Food and Agriculture* 77, 1-7.
- Selma M. V., P. V., Martinez-Culebras & R., Aznar.** (2008). Real time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 122 126-134.
- Sidhu, G. S.** (2002). Mycotoxin genetics and genes clusters. *European Journal of Plant Pathology* 108, 705-711.
- Singh G. S, Chauhan H. V. & Jha G. J.** (1992). Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *Pathol* 103, 399-340.
- Sinha A. K.** (1994). The impact of insect pests on a toxin contaminant of stored wheat and maize in : Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection. UK.
- Sokol P. P, Ripich G. & Holohan P. D.** (1988). Mechanism of ochratoxin A transport in kidney. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 246, 460-465.
- Steyn, P. S.** (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*, 82-83, pp.843-851.
- Stob M, Baldwin R. S. & Tuite J.** (1962). Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infested with *Gibberella zeae*. *Nature* 196, 1318.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J. & Dietrich, D.** (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* 74, 499-510.
- Surget, A. & Barron, C.,** (2005). Histologie du grain de blé, *Industrie des céréales* 145, 4-7.
- Susca, A., Stea, G. & Perrone, G.** (2007). Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section Nigri species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Add. Contam.* 24 1148-1153.

-T-

- Tabuc C.** (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 190p. Ressource numérique disponible sur : oatao.univ-toulouse.fr/7652/.
- Tantaoui-Elaraki A.** (1977). Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* au Maroc, homme, terre et eaux, 6 (24), 79-86.
- Tantaoui-Elaraki A., & Bartine H.** (1994). Fungal load of selected spices and their contamination by toxigenic *Aspergillus* species, *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 12, 231-236.
- Tazerout, N.** (2016). Détermination des concentrations du déoxynivalénol et zéaralénone associées à des maladies chez les vaches laitières.
- Techmicrobio.** (2018). Images libres de droits, [online]: <http://www.techmicrobio.eu>. (consulté en 2018). [techmicrobio.eu](http://www.techmicrobio.eu)
- Trenholm H. L, Prelusky D. B, Young J. C. & Miller J. D.** (1988). Reducing Mycotoxins in Animal Feeds, *Agriculture Canada*, A63.
- Trenk H. L, Butz M. E. & Chu F. S.** (2001). Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus* *Appl Microbiol.* 1971 Jun; 21(6): 1032-1035..

-U-

- Ueno Y.** (1980). Trichothecene mycotoxins. In Draper H. *Advances in nutritional research*, vol 3.

-V-

- Van der merwe K. J Steyn P. S. & Fourie L.** (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature (London)* 205. pp.1112-1113.

- Van Der Merwe K. J., Steyn P. S., & Fourrie L.** (1965a). Mycotoxins, Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolite of *Aspergillus ochraceus*, Nature, 205, 1112-1113
- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C. & Jonker, M. A.** (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 147-157.
- Verscheure M, Lognay G. & Marlier M.** (2002). Revue bibliographique: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Biotechnol Agron Soc Environ. 6:131–42.
- Vitale, R. G., de Hoog, G. S., Schwarz, P., Dannaoui, E., Deng, S., Machouart, M., Voigt, K., van de Sande, W. W., Dolatabadi, S., Meis, J. F. a Walther, G.** (2011). Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the order mucorales. J Clin Microbiol 50, 66-75.

-W-

- Watkinson, S., Boddy, L., Money, N. & Carlile, M.** (2016). The fungi. 3rd ed.
- Waffa E. W., Yahya R. S., Sobh M. A., Eraky I., El Baz M., El Gayar H. A. M., Betbeder., A. M., & Creppy E. E.** (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study, Human Experimental Toxicology, 17, 124-129.
- Wagacha J. M. & Muthomi J. W.** (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies, International Journal of Food Microbiology. 124, 1, 1-12
- Waksman S. A. & Horning E. S.** (1943). Distribution of antagonist fungi in nature and their antibiotic. Mycologia Vol. 35, No.1, 47-65
- Wang, Y., Geng, Y., Ma, J., Wang, Q. & Zhang, X. G.** (2012). Sinomyces: a new genus of anamorphic Pleosporaceae. Fungal Biol 115, 188-195.
- Wei Y, Lu C, Lin T. N.** (1985). Effect of Ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxydative phosphorylation. Toxicology 36, 119-130.
- Weidenburner M.** (2001). Encyclopedia of food mycotoxins. Berlin : Edition Springer, 296p.
- WHO.** 1990. Environmental health criteria 105 selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot, trichothecenes. International Programme on Chemical Safety (IPCS) Geneva, World Health Organization. 71-154.
- WHO.** 2018. World health organization. [online] <https://www.who.int>. (Consulté en 2018).
- WHO,** 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in foods. WHO Food Additives Series, 47. Disponible sur : www.inchem.org. (Consulté en 2018).
- Wicklow D. T. & Shotwell O. L.** (1983). Intrafungal distribution of aflatoxins among conidies and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Can. J. Microbiol, 29, p. 135.
- Wogan, G. N.** (2000). Impacts of chemicals on liver cancer risk. Seminars in Cancer Biology, 10(3).
- Wong Z. A. & Hiesh D. P. H.** (1980). The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxins B1 in the monkey, rat and mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol, 55, 115-125.

-Z-

- Zhang G. & Liu J.** (1989). An experimental animal model of Kaschin-Beck disease. Ann Rheum. Dis. 48.
- Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L. & Hyde, K. D.** (2012). Pleosporales. Fungal Divers 53, 1-221
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V. & Miraglia, M.** (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. Food Control 17, 868-874.
- Zinedine A. & J. Mañes,** Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. Food Control, 20 (2009) 334–344
- Zinedine A, Fernández-Franzón M., Mañes J. & Manyes, L.** (2017). Multi-mycotoxin contamination of couscous semolina commercialized in Morocco. Food Chemistry 214 440–446

ANNEXES

Annexe 1 : Les différentes méthodes de réduction de contamination par les mycotoxines, leurs avantages et inconvénients (WHO, 2018).

MÉTHODES	AVANTAGES	INCONVENIENTS
Maitrise des matières premières lors de la croissance	Risque mycotoxine connu et maîtrisé. Peu ou pas de contamination en mycotoxines des matières premières	Pas de maîtrise possible de la part du fabricant d'aliment du bétail à cette étape de la production
Maitrise des matières premières au moment de la récolte et du stockage	Risque mycotoxine connu et maîtrisé. Peu ou pas de contamination en mycotoxines des matières premières. Éviter une surcontamination des matières premières	
Contrôle des matières premières	Connaître les taux de contamination par mycotoxines et par matrices	Représentativité de l'échantillon
Contrôle des Produit fini	Vérifier l'efficacité des actions entreprises. Garantir la sécurité de l'aliment	Représentativité du Taux de contamination du produit élevé, plus d'action possible => destruction de l'aliment
Dilution des matières premières	Réduire la concentration en mycotoxines dans un lot de matières premières. Permettre l'utilisation de matières premières initialement contaminées par une forte teneur en mycotoxine	Si toutes les matières premières ou beaucoup des matières premières sont contaminées, peu de possibilité de dilution des matières premières contaminées avec des matières premières peu contaminées
Sélection des matières premières en fonction de l'espèce	Éviter les matières premières à risque pour les espèces les plus sensibles	Limitée par :-le nombre d'espèce-les cahiers des charges et référentiels-la composition des formules-les quantités et variétés de matières premières
Formulation en tenant compte du taux de contamination initial des matières premières	Pas de perte de matières premières. Pas de sélection des matières premières	Connaître les taux de contamination de toutes les matières premières.
Utilisation de levures	Taux d'incorporation faible 0,1 à 0,2%. Capte le DON et la ZEA, et en petite quantité l'OTA. Couple mycotoxine-levure éliminé des organismes et biodégradable	Non autorisée par la réglementation européenne. Ne capte pas toutes les mycotoxines
Utilisation d'argile	Autorisée dans l'alimentation du bétail. Capte toutes les mycotoxines	Taux d'incorporation des argiles pour une efficacité importante conduisant à une diminution de la valeur alimentaire de la ration. Fixation des argiles avec d'autres éléments que les mycotoxines (acides aminés)
Utilisation d'un biocapteur	Inhiber les actions des mycotoxines. Biocapteur enrichi en extrait végétal => effets positifs sur les organismes	Coût du biocapteur. Action limitée (n'agit pas sur toutes les mycotoxines). Choix des capteurs

Arrêté conjoint du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime et du ministre de la santé n°1643-16 du 23 chaabane 1437 (30 mai 2016) fixant les limites maximales autorisées des contaminants dans les produits primaires et les produits alimentaires.

(BO n°6514 du 03/11/2016, page 1681)

**LE MINISTRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE MARITIME,
LE MINISTRE DE LA SANTE,**

Vu le décret n°2-10-473 du 7 chaoual 1432 (6 septembre 2011) pris pour l'application de certaines dispositions de la loi n°28-07 relative à la sécurité sanitaire des produits alimentaires, notamment son article 53,

ARRETENT :

ARTICLE PREMIER. - Les limites maximales autorisées de contaminants prévues au 4) de l'article 53 du décret n°2-10-473 susvisé, et les seuils d'alertes y relatifs sont fixés à l'annexe au présent arrêté conjoint.

Pour l'ensemble des produits primaires et des produits alimentaires, ces limites maximales ainsi que les seuils d'alerte s'appliquent à la partie comestible du produit concerné.

Toutefois, pour les produits destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge les limites maximales fixées s'appliquent au produit tel que consommé.

ART. 2. - Au sens du présent arrêté conjoint, on entend par :

- **Contaminant :** toute substance qui n'est pas intentionnellement ajoutée au produit primaire ou au produit alimentaire, mais qui reste présente dans le produit concerné comme un résidu :
 - ☐ de sa production, y compris les traitements appliqués aux cultures et au bétail et dans la pratique de la médecine vétérinaire ; ou,
 - ☐ de sa manipulation, transformation, préparation, traitement, conditionnement, emballage, stockage ou transport; ou,
 - ☐ à la suite de sa contamination par l'environnement.

Ne sont pas couvertes par cette définition, les matières étrangères tels les débris d'insectes et les poils d'animaux ;

- **Limite maximale** : la concentration, au-delà de laquelle, pour un couple donné d'un produit primaire ou d'un produit alimentaire par rapport au contaminant, le risque pour la santé humaine est suffisant pour considérer le produit non-conforme ;
- **Seuil d'alerte** : la limite maximale de concentration de contaminant au-delà de laquelle une enquête visant à comprendre les modalités et la cinétique de contamination du produit est menée.

ART. 3. - Pour des produits primaires et des produits alimentaires séchés, dilués, transformés ou composés de plus d'un ingrédient, les limites maximales des contaminants fixées à l'annexe précitée tiennent compte des éléments suivants :

- les changements apportés à la concentration du contaminant par le séchage ou la dilution ;
- les changements apportés à la concentration du contaminant par la transformation ;
- les proportions des ingrédients dans le produit ;
- le seuil de quantification de l'analyse.

Dans le cas où aucune limite maximale de contaminants n'a été fixée à l'annexe précitée pour les produits visés au premier alinéa du présent article, les exploitants des entreprises et établissements du secteur alimentaire responsables de ces produits au moment où ceux-ci sont contrôlés doivent, en se fondant sur les éléments sus-indiqués, justifier, les facteurs de concentration, de dilution ou de déshydratation correspondants.

Si l'exploitant ne fournit pas ces facteurs ou s'il fournit des facteurs inappropriés, lesdits facteurs sont fixés par le directeur général de l'ONSSA sur la base des informations disponibles aux fins d'assurer une protection maximale de la santé du consommateur.

Les produits primaires et les produits alimentaires non conformes aux limites maximales fixées à l'annexe précitée ne peuvent être utilisés comme ingrédients ni être mélangés à des produits dont les limites maximales sont conformes.

ART. 4. - Les produits primaires et les produits alimentaires figurant à l'annexe précitée, pour lesquels un seuil d'alerte et sa date limite d'application sont fixés, doivent faire l'objet d'une surveillance régulière par les services compétents de l'ONSSA jusqu'à la date limite d'application du seuil d'alerte fixée dans ladite annexe.

Tout dépassement du seuil d'alerte constaté avant sa date limite d'application n'entraîne pas la non-conformité du produit concerné mais donne lieu à une enquête visant à comprendre les modalités et la cinétique de contamination du produit. Après sa date limite d'application, le seuil d'alerte peut être transformé en limite maximale.

La période accordée jusqu'à la date limite d'application du seuil d'alerte doit permettre aux filières concernées de s'adapter au seuil d'alerte prévu et de mettre en place toute mesure permettant de comprendre les causes et de réduire la probabilité d'un dépassement dudit seuil.

ART. 5. - Lorsqu'un seuil d'alerte est fixé, celui-ci s'applique dans les conditions définies à l'article 6 ci-dessous, jusqu'à sa date limite d'application fixée à l'annexe précitée. Après cette date, il est décidé de modifier ce seuil d'alerte, de le maintenir, de le supprimer ou de le transformer en une limite maximale de même niveau ou d'un niveau différent.

Toutefois, dans le cas où les données scientifiques font apparaître la nécessité de modifier le seuil d'alerte aux fins d'assurer une protection maximale de la santé du consommateur, celui-ci peut être modifié avant sa date limite d'application.

ART. 6. - Lorsqu'une limite maximale ou un seuil d'alerte est fixé ou modifié, la fixation de la nouvelle limite maximale ou du nouveau seuil d'alerte doit tenir compte des données sanitaires et peut prendre en considération les données :

- socio-économiques de la production concernée, pour éviter de mettre au rebut une trop grande proportion de la production ;
- techniques, en termes de capacité des filières à mettre en œuvre les bonnes pratiques de production et/ou de transformation ;
- analytiques, en termes de faisabilité technique, d'existence de méthodes et de laboratoires compétents pour les mettre en œuvre.

ART. 7. - Les limites maximales fixées à l'annexe au présent arrêté conjoint, s'appliquent dès la publication de celui-ci au *Bulletin officiel*.

Les seuils d'alerte mentionnés à l'annexe précitée s'appliquent à compter de la date de publication du présent arrêté conjoint au *Bulletin officiel* jusqu'à la date limite d'application correspondante mentionnée dans ladite annexe.

ART. 8. - Le présent arrêté conjoint sera publié au Bulletin officiel.

Rabat, le 23 chaabane 1437 (30 mai 2016)

**Le ministre de l'agriculture et de la pêche maritime, AZIZ
AKHANNOUCH Le ministre de la santé, EL HOUSSAINE LOUARDI**

Annexe

À l'arrêté conjoint du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime et du ministre de la santé n°1643-16 du 23 chaabane 1437 (30 mai 2016) fixant les limites maximales de contaminants autorisées dans ou sur les produits primaires et les produits alimentaires.

II. *Mycotoxines*

Catégorie	Produit primaire ou produit alimentaire	Limites maximales (µg /kg)			Seuil d'alerte (µg /kg)	Date limite d'application des seuils d'alerte
		<i>B₁</i>	<i>Somme de B₁, B₂, G₁ et G₂</i>	<i>M₁</i>	<i>M₁</i>	
2.1	<i>Aflatoxines</i>					
2.1.1	Arachides et autres graines oléagineuses, noisettes et noix du Brésil destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de produits alimentaires, sauf si elles sont destinées à être broyées pour la fabrication d'huile végétale raffinée	8,0	15,0	-	-	-
2.1.2	Amandes, pistaches et noyaux d'abricot destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de produits alimentaires	12,0	15,0	-	-	-
2.1.3	Fruits à coque, exception faite des fruits à coque énumérés aux points 2.1.1 et 2.1.2, destinés à être soumis à un traitement de tri, ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de produits alimentaires	5,0	10,0	-	-	-

2.1.4	Arachides et autres graines oléagineuses et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de produits alimentaires à l'exception : - des huiles végétales brutes destinées à être raffinées - des huiles végétales raffinées	2,0	4,0	-	-	-
2.1.5	Amandes, pistaches et noyaux d'abricot destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme	8,0	10,0	-	-	-

	ingrédients de produits alimentaires					
2.1.6	Noisettes et noix du Brésil destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de produits alimentaires	5,0	10,0	-	-	-
2.1.7	Fruits à coque, exception faite des fruits à coque énumérés aux points 2.1.5. et 2.1.6, et produits dérivés de leur transformation destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation directe comme ingrédient de produits alimentaires	2,0	4,0	-	-	-
2.1.8	Fruits séchés, autres que les figues sèches, destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de produits alimentaires	5,0	10,0	-	-	-
2.1.9	Fruits séchés, autres que les figues sèches, et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de produits alimentaires	2,0	4,0	-	-	-
2.1.10	Figues sèches	6,0	10,0	-	-	-
2.1.11		2,0	4,0	-	-	-

	Toutes les céréales et tous les produits dérivés de céréales, y compris les produits de céréales transformés, à l'exception des produits alimentaires figurant aux points 2.1.12, 2.1.15 et 2.1.17					
2.1.12	Maïs et riz destinés à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de produits alimentaires	5,0	10,0	-	-	-
2.1.13	Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits à base de lait	-	-	-	0,05	3 ans
2.1.14	Catégories suivantes d'épices: <i>Capsicum</i> spp. (fruits séchés dérivés, entiers ou en poudre, y compris les piments, la poudre de piment, le poivre de Cayenne et le paprika) <i>Piper</i> spp. (fruits dérivés, y compris le poivre blanc et le poivre noir) <i>Myristica fragrans</i> (noix de muscade) <i>Zingiber officinale</i> (gingembre) <i>Curcuma longa</i> (safran des Indes) Mélanges d'épices contenant une ou plusieurs des épices susmentionnées	5,0	10,0	-	-	-
2.1.15	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge	0,10	-	-	-	-
2.1.16	Préparations pour nourrissons et préparations de suite, y compris le lait pour nourrissons et le lait de suite	-	-	0,025	-	-
2.1.17	Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales, spécifiquement pour les nourrissons	0,10	-	0,025	-	-
2.2	Ochratoxine A	Limites maximales (µg /kg)			Seuil d'alerte (µg /kg)	Date limite d'application des seuils d'alerte
2.2.1	Céréales brutes	5,0			-	-
2.2.2	Tous les produits dérivés de céréales brutes, y compris les	3,0			-	-

	produits de céréales transformées et les céréales destinés à la consommation humaine directe, à l'exception des produits alimentaires figurant aux points 2.2.9, 2.2.10 et 2.2.14			
2.2.3	Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	-	10,0	3 ans
2.2.4	Grains de café torréfié et café torréfié moulu, à l'exception du café soluble	5,0	-	-
2.2.5	Café soluble (café instantané)	10,0	-	-
2.2.6	Vins (y compris les vins mousseux, mais à l'exclusion des vins de liqueur et des vins ayant un titre alcoométrique volumique minimal de 15%) et vins de fruits	-	2,0	3 ans
2.2.7	Vins aromatisés, boissons aromatisées à base de vin et cocktails aromatisés de produits vitivinicoles	-	2,0	3 ans
2.2.8	Jus de raisin, jus de raisin concentré reconstitué, nectar de raisin, moût de raisins et moût de raisins concentré reconstitué, destinés à la consommation humaine directe	-	2,0	3 ans
2.2.9	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	0,5	-	-
2.2.10	Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales, spécifiquement pour les nourrissons	0,5	-	-
2.2.11	Épices, y compris séchées	15	-	-

	<i>Piper</i> spp. (les fruits qui en proviennent, y compris le poivre blanc et le poivre noir) <i>Myristica fragrans</i> (noix de muscade) <i>Zingiber officinale</i> (gingembre) <i>Curcuma longa</i> (safran des Indes) <i>Capsicum</i> spp. (fruits séchés, entiers ou en poudre, y compris les piments, la poudre de piment, le poivre de Cayenne et le paprika) Mélanges d'épices contenant une des épices susmentionnées			
--	---	--	--	--

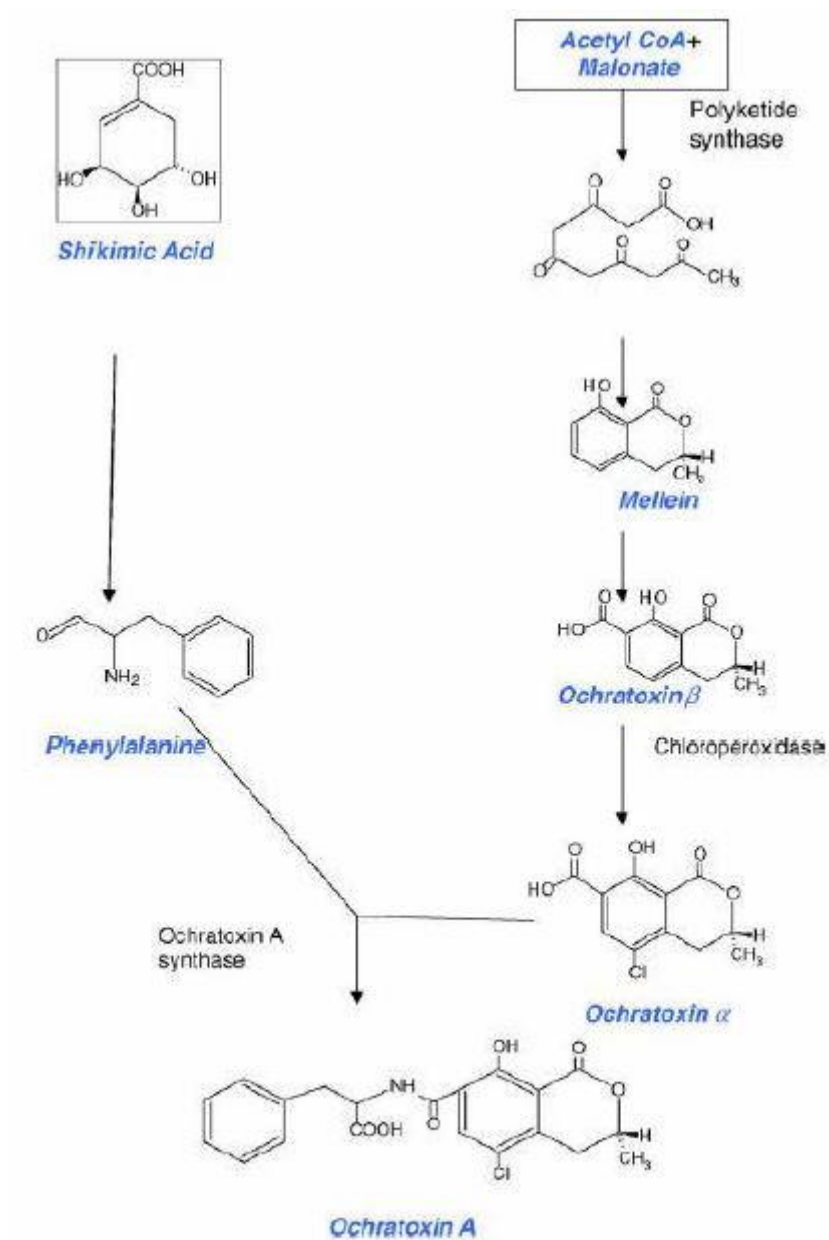
2.2.12	Bois de réglisse (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> et autres espèces), ingrédient pour infusion	-	20	3 ans
2.2.13	Extrait de réglisse (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> et autres espèces), pour utilisation dans des produits alimentaires, en particulier les boissons et la confiserie	-	80	3 ans
2.2.14	Gluten de blé non vendu directement au consommateur	8,0	-	-
2.3	Patuline	Limites maximales (µg /kg)	Seuil d'alerte (µg /kg)	Date limite d'application des seuils d'alerte
2.3.1	Jus de fruits, jus de fruits concentrés reconstitués et nectars de fruits	-	50	4 ans
2.3.2	Boissons spiritueuses, cidre et autres boissons fermentées produites à partir de pommes ou contenant du jus de pomme	-	50	4 ans
2.3.3	Produits à base de morceaux de pomme, tels que la compote de pommes et la purée de pommes, destinés à la consommation directe à l'exception des produits alimentaires figurant aux points 2.3.4 et 2.3.5	-	25	4 ans
2.3.4	Jus de pomme et produits à base de morceaux de pomme, tels que la compote de pommes et la purée de pommes, destinés aux nourrissons et enfants en bas âge, et étiquetés et vendus comme tels	10,0	-	-
2.3.5	Aliments pour bébés, autres que les préparations à base de céréales, destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	10,0	-	-
2.4	Déoxynivalénol	Limites maximales (µg /kg)	Seuil d'alerte (µg /kg)	Date limite d'application des seuils d'alerte
2.4.1	Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine, le riz et le maïs	-	1 250	4 ans
2.4.2	Blé dur et avoine bruts	-	1 750	4 ans
2.4.3	Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	1750	-	-
2.4.4	Céréales destinées à la consommation humaine directe,	-	750	4 ans

	farine de céréales, son et germe en tant que produit fini commercialisé pour la consommation humaine directe, à l'exception des produits alimentaires figurant aux points 2.4.7, 2.4.8 et 2.4.9 et des produits à base de riz			
2.4.5	Pâtes sèches	-	750	4 ans
2.4.6	Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit-déjeuner	-	500	4 ans
2.4.7	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200	-	-
2.4.8	Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est >500 microns	750	-	-
2.4.9	Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns.	1250	-	-
2.5	Zéaralénone	Limites maximales (µg /kg)	Seuil d'alerte (µg /kg)	Date limite d'application des seuils d'alerte
2.5.1	Céréales brutes autres que le maïs et le riz	-	100	4 ans
2.5.2	Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	350	-	-
2.5.3	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son et germe en tant que produit fini commercialisé pour la consommation humaine directe, à l'exception des produits alimentaires figurant aux points 2.5.6, 2.5.7, 2.5.8 et 2.5.9 et des produits à base de riz	-	75	4 ans
2.5.4	Huile de maïs raffinée	-	400	4 ans
2.5.5	Pain (y compris les petits produits de boulangerie),	-	50	4 ans

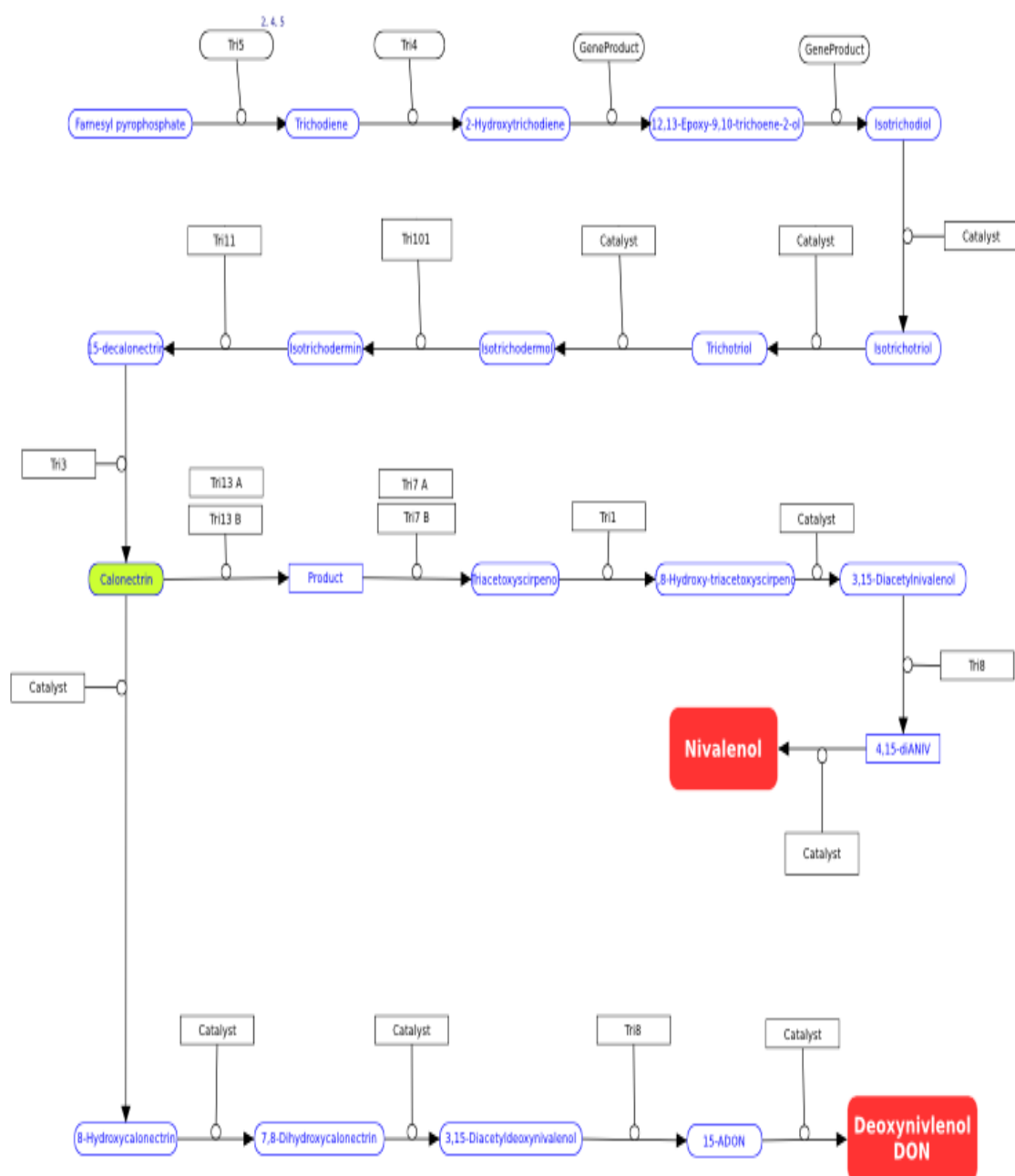
	pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales			
--	--	--	--	--

	pour petit-déjeuner, à l'exclusion des collations au maïs et des céréales pour petit-déjeuner à base de maïs			
2.5.6	Maïs destiné à la consommation humaine directe, collations à base de maïs et céréales pour petit-déjeuner à base de maïs	100	-	-
2.5.7	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	20	-	-
2.5.8	Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est >500 microns	200	-	-
2.5.9	Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns.	200	-	-
2.6	Fumonisines (somme B₁+ B₂)	Limites maximales (µg /kg)	Seuil d'alerte (µg /kg)	Date limite d'application des seuils d'alerte
2.6.1	Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	4 000	-	-
2.6.2	Maïs destiné à la consommation humaine directe, aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe, à l'exception des aliments figurant aux points 2.6.3 et 2.6.4	1 000	-	-
2.6.3	Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs et collations à base de maïs	800	-	-
2.6.4	Préparations à base de maïs et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200	-	-
2.6.5	Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est >500 microns	1 400	-	-
2.6.6	Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns.	2 000	-	-

Annexe 3 : voie de synthèse de l'ochratoxine A (Huff *et al.*, 1979)



Annexe 4 : voie de synthèse du déoxynivalénol (McCormick *et al.*, 2011).



Annexe 5 : Tableau récapitulatif de la contamination des aliments par les moisissures et les mycotoxines ainsi que leur répartition géographique (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Toxines	Principales moisissures productrices	Aliments concernés	Répartition Géographique
Aflatoxines	<i>Aspergillus nomius</i> <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Arachide, oléagineux coton, épices, poivre	Répartition mondiale Moins présentes en Asie
Ochratoxines	<i>A. verrucosum</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. viridicatum</i> , <i>A. ochraceus</i>	Céréales (avoine, orge, seigle) abats, café, cacao lait, soja	Europe du Nord, Inde Amérique du Sud Afrique Centrale
Fumonisines	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Céréales (maïs, sorgho, blé), chips	Répartition mondiale Moins présentes en Europe et Canada
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>	Céréales semoules, farines	Canada, Russie Asie du Sud-est
Alcaloïdes de l'ergot	<i>Claviceps purpurea</i> <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i>	Blé et dérivés, seigle graminées	Répartition mondiale
Trichothécènes	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> , <i>F. tricinctum</i> <i>F. crookwellense</i> , <i>F. poae</i>	Céréales, fruits ensilages, fourrages	Répartition mondiale Surtout en Europe
Patuline	<i>A. clavatus</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Byssochlamys nivea</i>	Fruits (abricots, pommes, raisin), vin	Répartition mondiale
Citrinine	<i>A. terreus</i> , <i>A. carneus</i> <i>A. niveus</i> <i>P. expansum</i> , <i>P. citrinum</i>	Céréales (maïs, riz, seigle) fruits secs, salaisons fromages	Europe du Nord et de l'Est, Amérique du Nord
Acide cyclopiazonique	<i>P. camemberti</i> , <i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamaritii</i>	Céréales, lait légumineuses viandes, fromages	Même répartition que les Aflatoxines
Toxines trémorgènes	<i>P. roqueforti</i> , <i>P. crustosum</i> <i>A. clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>	Ensilages, fourrages fruits secs	Australie, Europe Nouvelle-Zélande
Stérigmatocystine	<i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i>	Céréales (riz, maïs) café, fromages	Répartition mondiale
Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>	Plantes fourragères poacées	Afrique du Sud Nouvelle-Zélande Australie, Pays Basque
Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Légumineuses (lupins)	États-Unis, Europe Afrique du Sud Nouvelle-Zélande
Toxines d' <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria solani</i> <i>Alternaria alternata</i>	Céréales (sorgho, riz) tabac, fruits, légumes	Répartition mondiale
Stachybotryotoxines	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Ensilages, fourrages poacées canne à sucre	Europe de l'Est

Annexe 6 : Préparation des milieux de cultures (Leslie, Summerell and Bullock, 2006).

✓ **CZ : Milieu Czapek**

Utilisation : Dans la bibliographie, c'est le milieu de référence pour la mise en culture des *Aspergillus*.

- NaNO₃ : 3,0 g
- MgSO₄ 7H₂O : 0,5 g
- KCl : 0,5 g
- FeSO₄ 7H₂O : 0,01 g
- K₂HPO₄ : 1,0 g
- Saccharose : 30,0 g
- agar : 15,0 g
- Eau distillée (qsp.) 1000 ml
- Il est conseillé de compléter ce milieu par 1 ml d'une solution de ZnSO₄ 7H₂O 1,0 g, CuSO₄ 5H₂O 0,5 g dans 100 ml d'eau.

✓ **CYA : Czapek + extrait de levures**

Utilisation : Dans le but d'identifier les *Aspergillus* ainsi que l'étude de la production des mycotoxines.

- NaNO₃ : 3,0 g
- MgSO₄ 7H₂O : 0,5 g
- KCl : 0,5 g
- FeSO₄ 7H₂O : 0,01 g
- K₂HPO₄ : 1,0 g
- Saccharose : 30,0 g
- agar : 15,0 g
- Il est conseillé de compléter ce milieu par 1 ml d'une solution de ZnSO₄ 7H₂O 1,0 g, CuSO₄ 5H₂O 0,5 g dans 100 ml d'eau.
- extrait de levures 5,0 g
- Eau distillée (qsp.) 1000 ml

✓ **Vert de malachite**

Utilisation : milieu sélectif pour *Fusarium*

- Peptone 11,25g
- KH₂PO₄ 0,75g
- MgSO₄-7H₂O 0,375g
- Vert de malachite 0,0019g
- Agar 15g
- Chloramphénicol 0,075 g
- Eau distillée 1000 ml

✓ **PDA (potato dextrose agar)**

Utilisation : milieu universel nutritif utilisé pour croissance, isolement et énumération des moisissures

- Extrait de pomme de terre 200 ml
- Glucose 20 g
- Agar 12 g
- Eau distillée 1000 ml



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco

A. Ennouari^{a,b}, V. Sanchis^c, S. Marín^c, M. Rahouti^b, A. Zinedine^{a,*}^aNational Institute of Health (INH), BP 769 Agdal, 27, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Morocco^bDepartement of Biology Faculty of Sciences, Mohamed V Agdal University, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Morocco^cFood Technology Department, Lleida University, CeRTA-UTPV, Agrotecnio Center, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2012

Received in revised form

18 October 2012

Accepted 23 October 2012

Keywords:

Mycotoxins

Deoxynivalenol

Analysis

Durum wheat

Morocco

ABSTRACT

Eighty one (81) samples of durum wheat collected from seven areas from Morocco (Khmiset, Beni Mellal, Settat, Fès–Meknès, Skhirat–Témara, Tansift–El Haouz and Rabat–Salé) were surveyed for the presence of the mycotoxin deoxynivalenol (DON). Samples were extracted with water, the extracts were purified by immunoaffinity chromatography (IAC) columns and DON was then identified and quantified with liquid chromatography (LC) coupled to diode array detection (DAD). Analytical results showed that 9 out of 81 total samples (11.1%) were contaminated with DON. DON levels in positive samples ranged between 65 and 1310 µg/kg. The maximum contamination level of DON (1310 µg/kg) was found in a durum wheat sample from Rabat–Salé area, while the minimum value (65 µg/kg) was registered in a sample from Beni Mellal area. The mean DON level in positive samples was 502.1 ± 40.4 µg/kg. Only one previous work exists on DON contamination in Moroccan wheat samples.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cereals and derivatives are the basis of the food and feed in Morocco. However, the development of fungi can affect their sanitary quality and cause economic losses. Mycotoxins are natural contaminants produced by a range of fungal species. The Food and Agriculture Organisation (FAO) estimates that 25% of the World food crops, including many basic foods, are affected by mycotoxin producing fungi (Köppen et al., 2010). Indeed, a major cause of impaired health of agricultural crops is contamination by mycotoxins such as trichothecenes. These secondary metabolites are produced by species of the genera *Fusarium*, *Trichothecium*, and *Stachybotrys mycothecium* (Jarvis, 1992; Sharma & Kim, 1991).

Forty trichothecenes were isolated and separated into 4 groups (A, B, C, D) in 1977 (Ueno, 1980). The group B trichothecenes includes the toxin deoxynivalenol. Deoxynivalenol (DON) is a secondary metabolite produced by several *Fusarium* species in various types of grain. It is the most frequently occurring type-B trichothecene and can be found worldwide. DON is also known under its synonym "vomitoxin" and its presence in foods can cause clinical or subclinical manifestations to humans and animals (reviewed by Pestka, 2010). DON occurs in wheat and barley cultivars infected with *Fusarium* head blight (Kokkonen, Ojala, Parikka, & Jestoi, 2010).

A direct relationship between the incidence of FHB and contamination of wheat with DON has been established. The incidence of FHB is strongly associated with moisture at the time of flowering (anthesis). The timing of rainfall, rather than the amount, is the most critical factor in *Fusarium* infection. DON contents are significantly affected by the susceptibility of cultivars toward *Fusarium* species, previous crop, tillage practices, and fungicide use. *Fusarium graminearum* grows optimally at 25 °C and at a water activity above 0.88, while *Fusarium culmorum* grows optimally at 21 °C and at a water activity above 0.87 (Moss, 2002). Sanchis and Magan (2004) reported that the optimal temperatures for in vitro growth were (20–22 °C) and (20–25 °C) for *F. graminearum* and *F. culmorum*, respectively. However, the temperature values for the synthesis of DON in vitro for the same species were 30 °C and 26 °C respectively. The geographical distribution of *Fusarium* species is related to temperature and humidity requirements (Bhatnagar, Payne, Cleveland, & Robens, 2004).

The toxin DON (vomitoxin) is known for its toxicological effects mainly on the immune system and gastrointestinal tract. Indeed, chronic ingestion of DON in low doses causes anorexia, reduced growth, alters nutritional efficiency, while at high doses causes more acute effects such as vomiting, rectal bleeding and diarrhea (Pestka & Smolinski, 2005; Rotter, Prelusky, & Pestka, 1996; SCF 1999).

DON has been described as teratogen, neurotoxin, and immunosuppressant and trichothecenes in general have been associated with chronic and fatal intoxication of humans and animals through

* Corresponding author. Fax: +212 5 37 77 20 67.
E-mail address: zinedineab@yahoo.fr (A. Zinedine).

consumption of contaminated food and feed (JECFA, 2001a, 2001b; Rotter et al., 1996). The acute effects of DON (nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, etc.) are difficult to distinguish from the gastrointestinal effects of microbes and have been attributed to the presence of DON at concentrations of 3–93 mg/kg in grain for human consumption. It was also demonstrated that DON has long-term toxic effects on the immune system, growth, and reproduction (Bhatnagar et al., 2004).

Given their toxicity, the international legislations have been set to limit and restrict the contamination of food by these toxins and therefore protect consumers health. According to the regulations of the European Commission, the maximum allowable level of DON in durum wheat for human consumption is 1750 µg/kg (European commission (EC), 2007).

In Africa, the presence of mycotoxins in food is often overlooked due to public ignorance about their existence. Morocco has a climate characterized by high humidity and high temperature which favors growth of molds. The presence of mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, zearalenone, etc.) in foods has been reported in Morocco (Zinedine, Juan, et al., 2007; Zinedine & Mañes, 2009; Zinedine, Soriano, Juan, Mojemmi, et al., 2007; Zinedine, Soriano, Juan, Molto, et al., 2007). However limited information is available on the presence of DON and its associated fungi, in cereals.

The aim of this study was to analyze for the first time, samples of durum wheat from seven areas from the kingdom of Morocco for determination of DON by using liquid chromatography with DAD detection.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

DON standard was supplied by Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain). Acetonitrile and methanol were purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands).

All solvents were LC grade. Pure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore, Billerica, MA, USA) and was used when water was required.

2.2. Sampling

Eighty one (81) samples of durum wheat were randomly collected from different traditional markets, farms or in establishments of the Ministry of Agriculture ("Office National Interprofessionnel des Céréales et des Légumineuses", ONICL and The "Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires" ONSSA) in seven areas of Morocco Khmisset (12), Beni Mellal (10), Settlat (11), Fès–Meknès (13), Skhirat–Témara (10), Tansift-El Haouz (12) and Rabat–Salé(13). The samples were packed in plastic bags, then stored at 4 °C prior to analyses.

2.3. DON analysis

The extraction of DON was carried out with an in-house validated method at the Laboratory of Applied Mycology of the Food Technology Department of the University of Lleida. Briefly, samples were first ground and 10 g were extracted with 40 mL of MilliQ water by shaking on a magnetic stirrer (SBS multipoint) at 700 rpm for 10 min. Samples were centrifuged (hettich zentrifugen EBA12) at 6000 rpm for 5 min. Four (4) mL of the supernatant were collected and passed through an immuno-affinity column (DONPREP®, R-Biopharm, Rhone Ltd). The column was then washed with 10 mL of MilliQ water, the toxin was finally eluted with 3 mL of methanol. The collected eluate was evaporated with

a stream of nitrogen at 40 °C until dry, and then dissolved with 500 µL of the mobile phase for LC analysis.

2.4. Chromatographic conditions

The DON was detected and quantified by using an LC system (Waters 2695, separations module, Waters, Milford, USA) and a column (Waters Spherisorb 5 µm 4.6 × 150 mm analytical column). The mobile phase (water/acetonitrile/methanol; 94/3/3, v/v/v) was pumped at 1.2 mL/min. The temperature of the column oven was 35°. The absorbance detector 2487 (Waters, Milford, USA) was set at 220 nm. The retention time of DON under these conditions was 16 min. The detection limit was 62.5 µg/kg. Quantification was always achieved with a software integrator (Empower, Milford, MA, USA). The toxin DON was quantified on the basis of the HPLC absorbance response compared with that of a range of analytical standards.

2.5. Validation of analytical method

The analytical method used for DON was assessed for selectivity, linearity (Fig. 1), and precision. Selectivity was checked by injecting three times 50 mL of DON standard solutions before injecting extracted samples and comparing the peak retention times and the UV spectra of the substances that produce these peaks. Linearity was assessed by performing triplicate injections of standard solutions at concentrations of 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 µg DON/mL. Standard curves were generated by linear regression of peak areas against concentrations. Calibration curves showed good linearity with correlations coefficients R^2 ranging from 0.9799 to 0.9994.

Accuracy and recovery were established by determination of DON in wheat spiked samples at 0.05, 0.2 and 1.0 µg/g ($n = 3$). Recovery values ranged from 76 to 110%, while RSDr ranged from 6 to 18%. The limit of detection (LOD) was considered as the DON concentration that provides a signal equal to $b + 3S_b$, where b is the intercept of the calibration curve and S_b is the standard error of the estimate assuming to be the blank, and the limit of quantification (LOQ) was considered equal to $3 \times \text{LOD}$. Quantification limit for DON was 0.04 µg/g.

3. Results and discussion

The presence of DON in durum wheat samples is summarized in Table 1. As shown, there were 11.1% of samples contaminated with DON. The toxin levels in positive samples ranged from 65 to 1310 µg/kg. The maximum contamination level of DON (1310 µg/kg) was found in a durum wheat sample from Rabat–Salé area, while

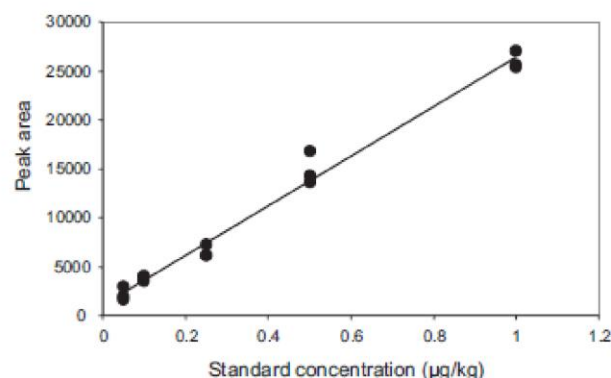


Fig. 1. DON calibration curve for HPLC analysis.

Table 1
DON levels in durum wheat samples from Morocco.

Area	Positive samples (%)	Range (µg/Kg)	Mean ± RSD ^b (µg/Kg)	Maximum level of DON (µg/Kg)
Khmiset	Nd	Nd ^a	Nd	Nd
Beni Mellal	4 (40)	Nd–632	336.5 ± 23.5	632
Settat	3 (27.2)	Nd–321	283.6 ± 62.8	321
Fès–Meknès	1 (7.6)	Nd–1012	1012 ± 35	1012
Skhirat–Témara	Nd	Nd	Nd	Nd
Tansift–EkHaouz	Nd	Nd	Nd	Nd
Rabat–Salé	1 (7.6)	Nd–1310	1310 ± 45	1310
Total	9 (11.1)	Nd–1310	502.1 ± 40.4	1310

^a Nd: not detected.

^b RSD: relative standard deviation.

the minimum value (65 µg/kg) was registered in a sample from Beni Mellal. The mean contamination level of DON in positive samples was 502.1 ± 40.4 µg/kg. Fig. 2 shows a positive sample of wheat contaminated with a DON level of 319 µg/kg. The frequencies of contamination of durum wheat samples with DON were 40, 27.2, 7.6 and 7.6%, for Beni Mellal, Settat, Fès–Meknès and Rabat–Salé areas, respectively. No sample exceeded the maximum limit set for DON (1750 µg/kg) by European authorities in cereals (European commission (EC), 2007).

Our findings are similar to the results obtained by Hajjaji et al. (2006). Indeed these authors reported the presence of DON in 7 out of 17 (41.17%) samples of stored wheat grains from Beni Mellal area with a maximum level of 128 µg/kg. Our results showed the presence of DON at lower levels comparing to similar investigations worldwide described especially in countries from the Mediterranean area. In durum wheat from Tunisia, Bensassi, Zaid, Abid, Hajlaoui, and Bacha (2010) reported a global percentage of DON contamination of about 83%. Binder, Tan, Chin, Handl, and Richard (2007) reported a 71% incidence of DON in wheat grain in north of Asia. In Argentina, Lori, Sisterna, Haidukowski, and Rizzo (2003)

showed that the frequencies of DON in contaminated durum wheat in the first and the second harvest were 55 and 78%, respectively. DON levels found in the present study are lower than DON levels reported from other countries. Indeed, Pan, Bonsignore, Rivas, Perera, and Bettucci (2007) reported that DON ranged from 500 to 10,000 µg/kg in wheat from Uruguay. Bensassi et al. (2010) found that DON levels ranged from 7200 to 54,000 µg/kg in wheat samples from Tunisia. In Saudi Arabia, Al-Julaifi and Al-Falih (2001) reported that DON concentrations ranged from 2 to 4000 µg/kg in wheat samples. More recently in Saudi Arabia, Al-Hazmi (2011) showed that DON levels varied between 15.24 and 803.22 µg/kg in wheat samples.

In Europe, DON was found as a frequent contaminant (57%) of wheat grains (11,444 total samples) with a maximum level of 1–5700 µg/kg (JECFA, 2001a, 2001b). A European study on occurrence of *Fusarium* toxins in samples from 11 countries (11,022 samples) revealed that 57% of total samples were positive for DON, a high frequency of DON was found in maize and wheat and wheat flour (Gareis et al., 2003). In Russia, DON levels ranged between 50 and 8600 µg/kg in wheat samples (Tutelyan, 2004).

The presence of DON in wheat samples analyzed herein shows a variability among areas. Indeed, DON was found in 4 among 7 areas investigated. These findings could be explained by the influence of environmental factors, mainly temperature, relative humidity, insect attack, drought, and storage conditions. According to the study of Champeil, Fourbet, Doré, and Rossignol (2004), the levels of contamination with mycotoxins produced by *Fusarium* species such as DON, nivalenol, and zearalenone in the wheat crops have a direct relation with year and cropping system including the use of fertilizers, which in turn can be driven by climatic changes. From the microbiological standpoint the difference of frequencies and levels of contamination may be attributed principally to the variation in the ratio between DON-producers and non-DON-producers species (Beyer, Klix, & Verreet, 2007) and the influence of spore type on the level of DON in wheat grain (Beyer, Verreet, & Ragab, 2005) and also to the variation in the susceptibility to

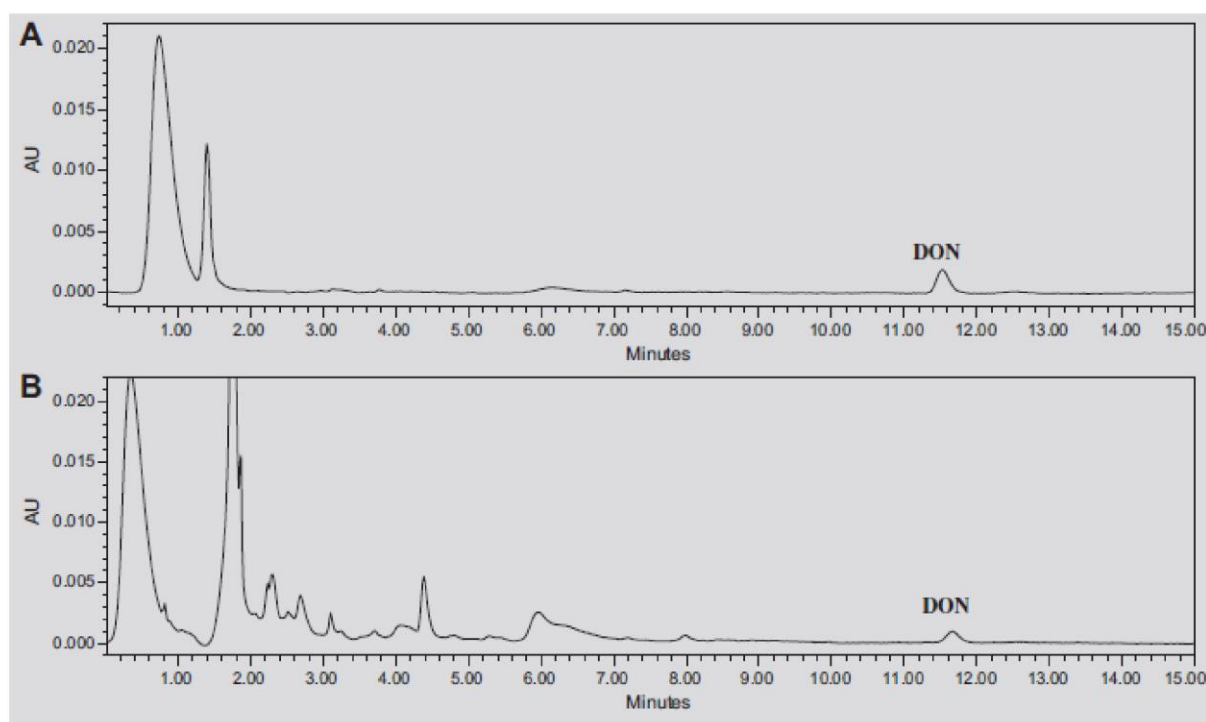


Fig. 2. LC chromatogram of: (A) A standard solution of DON (1000 ng/mL), (B) A positive wheat sample (319 µg/kg).

different *Fusarium* species in interaction with climatic factors (Jajić, Jurić, & Abramović, 2008).

4. Conclusion

From this work it is concluded for the first time that durum wheat commercialized in Morocco can be contaminated with DON. The findings of the present study revealed that durum wheat produced and consumed in Morocco is lowly contaminated by DON. As far as we know, this is the first investigation on the presence of DON in wheat grain available in several areas from Morocco. However more investigations are needed to isolate and identify the DON producing fungi in this area and also to study the environmental factors which determine the production of this mycotoxin.

Acknowledgments

This work was supported by the Mycored project (STV 2011). The first author is most grateful to Mycored group for the scholarship given. The authors thank the Spanish government (AGL2010-22182-C04-04) for the financial support.

References

- Al-Hazmi. (2011). Fungal flora and deoxynivalenol (DON) level in wheat from Jeddah market, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 10, 168–173.
- Al-Julaifi, M. Z., & Al-Falih, A. M. (2001). Detection of trichothecenes in animal feeds and foodstuffs during the years 1997 to 2000 in Saudi Arabia. *Journal of Food Protection*, 64, 1603–1606.
- Bensassi, F., Zaied, C., Abid, S., Hajlaoui, M. R., & Bacha, H. (2010). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control*, 21, 281–285.
- Beyer, M., Klix, M. B., & Verreet, J. A. (2007). Estimating mycotoxin contents of *Fusarium*-damaged winter wheat kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 153–158.
- Beyer, M., Verreet, J. A., & Ragab, W. S. M. (2005). Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 233–240.
- Bhatnagar, D., Payne, G. A., Cleveland, T. E., & Robens, J. F. (2004). Mycotoxins: current issues in U.S.A. In D. Barug, H. van Egmont, R. Lopez-Garcia, T. van Osenbruggen, & A. Visconti (Eds.), *Meeting the mycotoxin menace* (pp. 17–47). Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J., & Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, animal feed and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 265–282.
- Champeil, A., Fourbet, J. E., Doré, T., & Rossignol, L. (2004). Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23, 531–537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.011>.
- European commission (EC). (2007). COMMISSION REGULATION No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1831/2003 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*, L 255/14.
- Gareis, M., Schothorst, R. C., Vidnes, A., Bergsten, C., Paulsen, B., Brera, C., et al. (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Report of Experts Participating in SCOOP Task 3.2.10. Available at <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>.
- Hajjaji, A., El Otmami, M., Bouya, D., Bousseta, A., Mathieu, F., Collin, S., et al. (2006). Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 494–499.
- Jajić, I., Jurić, V., & Abramović, B. (2008). First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. *Food Control*, 19, 545–550.
- Jarvis, B. B. (1992). Macrocyclic trichothecenes from Brazilian *Bacharis* species: from microanalysis to large scale isolation. *Phytochemical Analysis*, 3, 241–249.
- JECFA. (2001a). Deoxynivalenol. (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). In *Fifty sixth meeting*. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>.
- JECFA. (2001b). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Food Additives Series 47* (WHO Geneva).
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., & Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 17–25.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., & Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1595–1612.
- Lori, G. A., Sisterna, M. N., Haidukowski, M., & Rizzo, I. (2003). *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158, 29–35.
- Moss, M. O. (2002). Mycotoxin review 2 *Fusarium*. *Mycologist*, 16, 158–161.
- Pan, D., Bonsignore, F., Rivas, E., Perera, G., & Bettucci, L. (2007). Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 149–152.
- Pestka, J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 84, 663–679.
- Pestka, J. J., & Smolinski, A. T. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 8, 39–69.
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B., & Pestka, J. J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 1–34.
- Sanchis, V., & Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. In N. Magan, & M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in food: Detection and control* (pp. 174–189). Boca Raton, FL: CRC Press.
- SCF. (1999). Opinion on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON) expressed on 2 December 1999. Scientific Committee on Food, Final. SCF/CS/CNTM/MYC/19. Available at http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc.scf.out44_en.pdf.
- Sharma, R. P., & Kim, Y. W. (1991). Trichothecenes. In R. P. Sharma, & D. K. Salunkhe (Eds.), *Mycotoxins and phytoalexins* (pp. 339–359). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Tutelyan, V. A. (2004). Deoxynivalenol in cereals in Russia. *Toxicology Letters*, 153, 173–179.
- Ueno, Y. (1980). Trichothecenes mycotoxins. In H. Draper (Ed.), *Advances in nutritional research*, Vol. 3 (pp. 301–353), chap. 10.
- Zinedine, A., Juan, C., Idrissi, L., & Mañes, J. (2007). Ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Microchemical Journal*, 87, 154–158.
- Zinedine, A., & Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, 334–344.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J. C., Bouclouze, A., et al. (2007). Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants*, 24, 285–291.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Juan, C., Moltó, J. C., Idrissi, L., & Mañes, J. (2007). Limited Survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 124–127.



Isolation and molecular identification of mycotoxin producing fungi in durum wheat from Morocco

A. Ennouari¹, V. Sanchis², M. Rahouti¹, A. Zinedine^{3,*}

¹Departement of Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Morocco.

²Food Technology Department, Lleida University, XaRTA-UTPV, Agrotecnio Center, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.

³Departement of Biology, Faculty of Sciences, Chouaib Doukkali University, El jadida 24000, Morocco.

Received 17 Sep 2017,
Revised 20 Nov 2017,
Accepted 26 Nov 2017

Keywords

- ✓ Deoxynivalenol
- ✓ Ochratoxin A,
- ✓ Durum wheat,
- ✓ Fungi,
- ✓ Molecular identification,
- ✓ Fusarium head blight

A. Zinedine
zinedineab@yahoo.fr

Abstract

In the present study, a total of 1053 isolates of fungi were isolated from eighty one (81) samples of durum wheat collected in seven areas in Morocco (Khemiset; Béni-Mellal; Settat; Fès-Meknès; Skhirat-Témara; Marrakech; and Rabat-Salé). The molecular identification of isolates was performed by a PCR-based method. Selected fungi strains were then studied for their potential to produce mycotoxins especially ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON). The results of biodiversity showed that the most abundant species were found belonging to *Alternaria* spp. (86.2%), *Fusarium* spp. (71.1%), and *Aspergillus* spp. (14%). Results of LC analysis indicated also that 27 out of 980 isolates (2.75 %) of *Fusarium* spp. produced the toxin DON. The maximum level of DON found (5.22 µg/kg) was produced on a wheat sample from "Settat" area. These results are in agreement with previous data where we reported the presence of DON by LC on the ground wheat (1.013 µg/kg). Results of LC analysis, showed also that OTA was produced by 8 of 43 total isolates (18.6%) of *Aspergillus* section *Nigri*. The maximum level of OTA produced found also in a wheat sample from Settat area (0.72 µg/kg). Molecular identification of the isolates showed the presence of *F. graminearum* (11.1%), *F. equiseti* (61.1%), *F. ecuminatum* (5.5%), *F. sporotrichioides* (5.5%), *F. verticillioides* (11.1%), *F. coeruleum* (5.5%) and *F. oxysporum* (5.5%). The identification of *Aspergillus* species showed the abundance of *A. flavus* (41.1%), *A. niger* (35.6%), *A. tubingensis* (15.1%) and *A. niger* aggregate (8.2%).

1. Introduction

Cereals are susceptible to fungal attack both in the field and during storage. It may cause economic losses at all levels of food and feed production chain [1]. The fungal species that mainly contaminate the crops belong to genera *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* and *Claviceps* [2]. These fungi may produce secondary metabolites, known as mycotoxins. Wide year to year fluctuations in the levels of mycotoxins in cereals are observed, the main factors favoring fungal invasion and growth being humidity and temperature. Most of *Fusarium* species can cause a Fusarium head blight (FHB) disease by a production of a plethora of mycotoxins [3]. According to [4, 5 and 6], the main causal agents of FHB in Europe are *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* and *Microdochium nivale*.

Many mycotoxins were initially discovered after they have had caused a variety of subacute health problems in animals and humans as a result of the consumption of contaminated products. Mycotoxins produced may cause human and animal toxicoses, the principal symptoms are nausea, lethargy, vomiting, digestive and haemolytic disorders, impairment of both humoral and cellular immune responses, and nervous disorders [5]. With the development and application of good storage and processing practices, the mycotoxin contamination and occurrence is considerably reduced, the actual concern being more focused on chronic effects at low levels of exposure. In this regard, several mycotoxins have been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as confirmed or potential (probable and possible) human carcinogens [7].

The trichothecene type B deoxynivalenol (DON) or vomitoxin is a mycotoxin produced by several *Fusarium* species, mainly *F. culmorum* and *F. graminearum*, which are abundant in cereal crops [8, 9 and 10].

This mycotoxin is the most prevailing *Fusarium* mycotoxin worldwide [11]. To ensure food and feed safety, the European Commission has set maximum threshold values for some mycotoxins in unprocessed cereals for human consumption [12] and guideline limits for *Fusarium* mycotoxins in animal feed. The thresholds for (DON) content are 0.20 mg/kg for processed cereal-based food for infants and baby food; 0.50 mg/kg for bread, biscuits, cereal snacks and breakfast cereals and 0.75 mg/kg for cereals intended for direct human consumption, cereal flour, bran and germ as end product marketed for human consumption. For unprocessed cereals, the threshold is 1.25 mg/kg.

Ochratoxin A (OTA) is part of a group of mycotoxins produced as secondary metabolites by several fungi of the *Aspergillus* or *Penicillium* genus. The chemical structure of OTA represent a pentaketide composed of dihydroisocoumarine linked to β -phenylalanine. OTA has been shown to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunotoxic to several species of animals and is known to cause kidney and liver tumors in mice and rats [13]. This toxin is considered to be involved in severe kidney pathologies, possibly linked to urinary tracts tumors [14], and has been classified by the (IARC) as a possible carcinogen to humans (group 2B) [7]. According to the 2002 report on the assessment of dietary intake of OTA by the population of the EU member states [15], this mycotoxin has been detected in a variety of food commodities such as cereals, oleaginous seeds, coffee beans, wine, meat, cocoa and spices.

North Africa, where wheat consumption in the form of couscous, pasta, macaroni, spaghetti, bread, and frik is a cultural tradition, the safety assessment is very important. The mycobiota of wheat and wheat products was found to be dominated by *Aspergillus* sections *Nigri* and *Flavi* species [16, 17 and 18].

In continuity with previous study on hard durum wheat, which found that durum wheat produced and consumed in Morocco is littly contaminated with DON. [19], this work is aiming to identify fungi isolated from durum wheat in different area from Morocco using molecular biology tests (PCR) and to evaluate the deoxynivalenol (DON) and ochratoxin A (OTA) production capacity of isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* species.

2. Materials and methods

2.1 Sampling

Eighty one (81) samples of durum wheat were collected from different markets or directly from farms in seven areas of Morocco. The weight of each sample was 200 g. Some of the samples were taken from the "Office National Interprofessionnel des Céréales et des Légumineuses" (ONICL) and The "Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires" (ONSSA). The distribution of the collected samples is shown in table 2. The samples were packed in plastic bags, then stored at 4°C prior to analysis.

2.2 Chemicals and Reagents

Mycotoxin standards, including DON and OTA were supplied by Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain). Acetonitrile, methanol and ethanol were purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Benzene and n-hexane were purchased from Merck (Damstadt, Germany). All solvents were LC grade. Filter papers (Whatman No. 1) and glass microfiber filters (Whatman GF/ A) were purchased from Whatman (Maidstone, UK). Immunoaffinity columns (IAC), DON (DONPREP) and extracts clean-up were purchased from R-Biopharm (Rhone LTD Glasgow, UK). Pure water was obtained from a milli-Q apparatus (Millipore, Billerica, MA, USA) and was used when water was required. Phosphate buffer saline (PBS) was prepared with potassium chloride (0.2 g) (Panreac, Castellar del Valles, Spain), potassium dihydrogen phosphate (0.2 g) (Sigma), disodium phosphate anhydrous (1.16 g) (Panreac) and sodium chloride (8.0 g) (J.T Baker) in 1 L of pure water; the pH was brought to 7.4.

2.3 Mycobiota determination

The study of the mycobiota present in the samples was carried out by determination of internal fungi. For isolation of the internal mycobiota a subsample of 200 kernels of each sample was surface disinfested in a 3% aqueous solution of sodium hypochlorite for 2 minutes, and rinsed twice with sterile distilled water. The kernels were aseptically plated in Potato dextrose agar (PDA) (5 kernels/plate). Moreover, malachite green agar (MGA 2.5) (11.25 g of peptone, 0.75 g of KH_2PO_4 , 0.375 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0019 g of green malachite, 0.075 g of chloramphenicol, and 15 g of agar in 750 mL of distilled water) was used for plating in order to detect *Fusarium* species [20-22]. Plates were incubated at 25°C for 7 days (PDA) and 10 days (MGA 2.5). After incubation, they were examined for fungal growth, and the moulds present on the kernels were identified to genus level using the methods of Pitt and Hocking (1997). *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. isolates were transferred to PDA, Czapek (Cz) and Czapek yeast extract agar (CYA) plates. *Fusarium* sp. isolates were transferred to Carnation

leaf agar (CLA). The isolation frequency and the relative density of genera and species were calculated according to [23] as follows:

$$\text{frequency (\%)} = \frac{\text{Number of samples of occurrence of a genus}}{\text{Total number of samples}} \times 100$$

$$\text{relative density (\%)} = \frac{\text{Number of isolates of a genus or species}}{\text{Total number of fungi or genus isolates}} \times 100$$

$$\text{average (\%)} = \frac{\text{Number of infected grains of a genus or species}}{\text{Total number of grains}} \times 100$$

After incubation, *Fusarium* strains were isolated on the (CYA) to study the capacity of DON production and were grouped according to morphological and cultural characteristics. The groups were also identified using the method of the medium (CLA).

The *Aspergillus* strains were isolated from all the media PDA, Cz and CYA for studying their capacity to produce ochratoxin A.

2.4 Molecular identification of *Fusarium* and *Aspergillus* isolates.

The identification of mycotoxigenic *Fusarium* and *Aspergillus* isolates present in the samples of wheat was done by molecular biology methods.

2.4.1 DNA extraction

Cultures were grown for 2 days at 27°C on 500 µl of Czapeck's yeast medium. Mycelium was recovered after 10 min of centrifugation at 17500 xg and 300 µl of extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) was added. The mycelium suspension was vortexed with five 2.8 mm stainless steel beads (Precellys, Bertin Technologies) during 10 minutes. After centrifugation at 17500 xg for 10 min, 150 µL of 3 M sodium acetate (pH 5.2) were added to the supernatant. The supernatant was incubated at -20°C for 10 more minutes and centrifuged (17500 xg, 10 min). The DNA-containing supernatant was transferred to a new tube and nucleic acids were precipitated by adding 1 volume of isopropyl alcohol. After 5 minutes of incubation at room temperature the DNA suspension was centrifuged (17500 xg, 10 min).

The (DNA) pellet was washed with 70% ethanol to remove residual salts. Finally, the pellet was air-dried and the DNA was resuspended in 50 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

2.4.2 DNA Amplification and Sequencing

Specific PCR assays were carried out using primers FLAVIQ1 (5' GTCGTCCCCTCTCCGG 3') and FLAQ2 (5' CTGGAAAAAGATTGATTTGCG 3') for *A. flavus* [24], PAR1 (5' GTCATGGCCGCGGGGGCGTC 3') and PAR2 (5' CCTGGAAAAAATGGTTGTTTTGCG 3') for *A. parasiticus* [25], [26], AcKS10R (5'-CCCTGATCCTCGTATGATAGCG-3') and AcKS10L (5'-CCGGCCTTAGATTTCTCTCACC-3') for *A. carbonarius* [27], NIG1 (5'-GATTTCGACAGCATTT(CT/TC)CAGAA-3') and NIG2 (5'-AAAGTCAATCACAATCCAGCCC-3') for *A. niger* and TUB1 (5'-TCGACAGCTATTCCCCCTT-3') and TUB2 5'-TAGCATGTCATATCACGGGCAT-3') for *A. tubingensis* [28].

The primer pairs BT2A/BT2B [29] and EF-1/EF-2 [30] were also used to obtain the sequence of beta-tubulin and elongation factor sequences, respectively, in order to identify *Fusarium* isolates. PCR reactions were performed in 50 µl as the final volume, containing 50 ng of DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 80 µM (each) dNTP, 1 µM of each primer, 2 mM MgCl₂ and 0.5 U of DNA polymerase (DFS-Taq DNA polymerase, BIORON, Germany). The reaction mixtures were incubated in a thermocycler (Applied Biosystem GeneAmp 2700) for 35 cycles consisting of 30 s at 95°C, 45 s at 60°C and 1 min at 72°C. PCR products were cleaned with the UltraClean PCR Clean-up DNA Purification kit (MoBio, USA). The PCR purified products were directly sequenced by the company Macrogen (Seoul, Korea). Then Blast n-searches in GenBank permitted the identification of the level of identity with known sequences, and subsequently the species corresponding to the isolates.

2.5 DON and OTA production ability

2.5.1 OTA-producing ability

The isolates belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera were evaluated for OTA-producing ability using a previously described high performance liquid chromatography (HPLC) screening method [31]. Briefly, the 73

isolates were grown in plates containing (CYA) [32] and incubated at 25°C for 7 days. From each culture, three agar plugs were removed from different points of the colony and extracted with 1 mL of methanol. The obtained extracts were filtered and analysed by (HPLC). (OTA) was quantified on the basis of the HPLC fluorometric response compared with that of the standard (OTA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The detection limit for OTA is 0.21 µg/kg.

2.5.2 DON-producing ability

The isolates belonging to *Fusarium* genus were evaluated for DON-producing ability. So, 980 *Fusarium* isolates were inoculated on (CYA) and incubated at 25°C for 7 days.

DON was extracted by a variation of a simple method [31]. Briefly, three agar plugs (diameter: 6 mm) were obtained from the inner, middle and outer area of each colony of potential DON-producers grown on (CYA) plates, and were introduced in a vial containing 1 ml of the mobile phase (94% H₂O, 3 % acetonitrile, 3% methanol). After the agitation and a rest of 60 min at room temperature, the extract was analyzed by HPLC after stirring and filtration with a hydrophilic filter (0.45 µm).

The toxin (DON) was detected and quantified by using an LC system (Waters 2695, separations module, Waters, Milford, USA) and a column (Waters Spherisorb 5µm 4.6 x 150 mm analytical column). The mobile phase (water/acetonitrile/methanol; 94/3/3, v/v/v) was pumped at 1.2 mL/min. The temperature of the column oven was 35 °C. The absorbance detector 2487 (Waters, Milford, USA) was set at 220 nm. The retention time of (DON) under these conditions was 16 min. The detection limit was 62.5 µg/kg. Quantification was always achieved with a software integrator (Empower, Milford, MA, USA). The (DON) was quantified on the basis of the (HPLC) absorbance response compared with that of a range of analytical standards.

2.6 Water activity (aw)

AquaLab serie 3 (Decagon devices Inc., WA, USA) was used to determine aw in wheat sample. The patented chilled-mirror dew-point sensor measures water activity between 0.030-1.000aw with a ±0.003aw accuracy in less than five minutes. aw was measured for all samples of seven areas.

2.7 Chromatographic conditions

2.7.1 Deoxynivalenol (DON)

The toxin was detected and quantified by using an LC system (Waters 2695, separations module, Waters, Milford, USA) and a column (Waters Spherisorb 5µm 4.6 x 150mm analytical column). The mobile phase (water/acetonitrile/methanol; 94/3/3, v/v/v) was pumped at 1.2 mL/min. The temperature of the column oven was 35°C. The absorbance detector 2487 (Waters, Milford, USA) was set at 220 nm. The retention time of (DON) under these conditions was 16 min. The detection limit was 62.5 µg/kg. Quantification was always achieved with a software integrator (Empower, Milford, MA, USA). The toxin DON was quantified on the basis of the HPLC absorbance response compared with that of a range of analytical standards.

2.7.2 Ochratoxin A

The equipment used for the (HPLC) detection of (OTA) was a separation Module Alliance 2695 Waters, an analytical column Water Spherisorb 5 mm ODS2, 4.6 _ 250 mm and a Multi k Fluorescence Detector Waters 2475. Excitation and emission wavelengths were set, respectively, at 365 and 455 nm for AFs (0 to 16 min), and 333 and 463 nm for OTA (16 to 25 min). Derivatization of aflatoxins was obtained using a post-column photochemical derivatization device (UVE™ Derivatizer LC Tech, Germany). Mobile phase consisted of methanol, acetonitrile and acetic acid 0.1%, using the following proportions: 27% of methanol, 14% of acetonitrile and 59% of acetic acid 0.1%, until minute 16, and then 50% of methanol and 50% of acetonitrile until the end of the run. The mobile phase flow rate was 0.8 mL/min. The injection volume was 100 µL.

2.8 Validation of analytical method

The analytical methods used were assessed for selectivity, linearity, and precision. Selectivity was checked by injecting 100 µL of mycotoxin standard solution three times before injecting extracted samples and comparing the peak retention times and the fluorescence spectra of the substances that produced these peaks. Standard curves were generated by linear regression of peak areas against concentrations. Precision was established by determining (OTA, DON), in ground wheat and positive strains samples at least by triplicate, in those samples (blank samples) fortified in order to calculate the recovery rates. The limit of detection (LOD) was considered to be three fold the signal of blank noise, and the limit of quantification (LOQ) was calculated as 3x LOD. Method performance characteristics for DON, OTA are summarized in Table 1. These values are in accordance to performance criteria established by Commission Regulation (EC) No. 401/2006 [12].

Table 1: Method performance for detection of deoxynivalenol (DON) and ochratoxin A (OTA) in media culture.

	LODa (ug/kg)	LOQb (ug/kg)	n	Spiking level (ug/kg)	Recovery (%) ^c	RSDrd (%)
OTA	0.2	0.6	5	2.5	74 ± 16	21
			5	5.0	103 ± 13 95	13
			5	7.5	□ ± 12	13
DON	100	300	5	100	124 ± 8	6
			5	500	86 ± 10	12
			5	1000	99 ± 3	3

a LOD = Limit of detection.

b LOQ = Limit of quantification.

c Mean value □ } standard deviation.

d RSDr = relative standard deviation.

3. Results and discussion

3.1 Data treatment Biodiversity

Fungal results associated with durum wheat grain collected from Moroccan markets and farms are presented in Table 2. Macroscopic and microscopic examinations of the isolates led us to identify the following genera listed in decreasing order of frequency *Alternaria*. 86.2%, *Fusarium*. 71.1%, *Rhizopus*. 8.06%, *Epicoccum*., 6, 97%, *Penicillium*. 6.38%, *Cladosporium* .4.68%, *Aspergillus* section *Nigri* 4.04%, *Ulocladium*. 2.22%, *Aspergillus* section *Flavi* 2%, *Drechslera*. 1.77%, *Mucor*., 1.28%, *Curvularia*. 0.45% and other genera 7.32%.

According to the results obtained in our study regarding mycotoxin producing genera, *Fusarium*. was present in all samples collected from the seven areas, the most infected areas being Skhirat-Témara, Khmiset and Béni-mellal. The values were 86 %, 84 % and 76.25 %, respectively. The second genus of interest in terms of percentage of contaminated samples was *Aspergillus*, particularly *Aspergillus* section *Nigri* and *Aspergillus* section *Flavi*. Its presence was detected in all samples, although the infection level was not very high. The most contaminated areas by *Aspergillus* section *Nigri* were Skhirat-Témara, Fès-Meknès and Rabat-Salé . The values were 10.5 %, 8.85 % and 2.69 %, respectively (Tables 2). Concerning *Aspergillus flavus* we found a strong presence in the grain from Fès-Meknès (6.92 %) and Skhirat-Témara (3.5 %).

We have noticed a difference in the presence of *Fusarium* and *Aspergillus* in the seven areas of the Kingdom. This difference may be due to the climate conditions (temperature, precipitation, etc.) which changes from one region to another and several factors related to storage parameters such as temperature and humidity. Cereals are highly nutritive substrates rich in starch and protein, promoting fungal invasion, by providing necessary carbohydrates and nitrogen for micromycetes development [33]. According to the obtained results on wheat fungal biodiversity, it can be seen that both field and storage molds are present. The same conclusion resulted from the work of [34]. The matching result is due to the similarity of climate conditions between Morocco and Tunisia. Other similar studies on this topic have found the same fungal genera predominance pattern [35-38].

3.2 Water activity

Among the parameters that help a mold to proliferate and produce mycotoxins is the water activity. Below a certain availability of water (aw) they cannot grow or produce mycotoxins, although some spores survive and may be activated when these conditions are favourable. The optimal water activity values for several fungal species are : aw > 0.95-0.90: *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma* sp., *Stachybotrys chartarum*, *Phialophora* sp., *Alternaria* sp., and *Fusarium* sp, *Phoma* sp. aw from 0.90 to 0.85: *Aspergillus versicolor*, *A. sydowii*, and *A. nidulans*.

aw < 0.85: *A. versicolor*, *A. glaucus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. aurantiogriseum*) [35]. According to the found results Table 5, the water activity values are as follows: Rabat-Salé (0.589 ± 0.054), Marrakech (0.566 ± 0.064), Skhirat-Témara (0.538 ± 0.067), Fès-Meknès (0.511 ± 0.034, Settat (0.556 ± 0.047), Khmiset (0.635 ± 0.053), Béni-mellal (0.592 ± 0.0168). These values are within the range proposed to prevent fungal growth during wheat storage and commercialization [36]. However, before wheat reaches these conditions of water activity allowing free storage of mycotoxin-free and fungal growth, these mycotoxins have been produced both in the field or while the grain dried. For all of this, it is necessary to know the mycobiota present in the wheat grains with capacity to produce deoxynivalenol and ochratoxin A.

Table 2: Internal mycobiota of wheat samples from different areas of Morocco.

	Rabat- Salé			Marrakech			Skhirat-Témara			Fès-Meknès			Settat			Khmisset			Béni-mellal		
	(n= 13) a			(n= 12)			(n= 10)			(n= 13)			(n= 11)			(n= 12)			(n= 10)		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	B	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<i>Fusarium</i>	64.62	11.98	4.01	52.08	9.66	3.23	86.00	19.32	6.47	61.92	13.27	4.44	72.73	11.95	4.00	76.25	19.25	6.44	84.00	14.56	4.88
<i>Alternaria</i>	77.31	12.8	8.43	79.17	15.52	10.22	78.5	8.92	5.88	82.31	13.64	8.99	95.91	16.77	11.05	90	19.04	12.54	100	13.31	8.77
<i>Epicoccum</i>	1.92	6.61	0.1	5.42	12.4	0.19	2	4.13	0.06	2.69	7.44	0.11	3.18	5.79	0.09	19.58	41.32	0.62	14	22.31	0.33
<i>Cladosporium</i>	5	15.91	0.17	2.92	13.64	0.15	4.5	13.64	0.15	12.31	42.05	0.46	1.82	4.55	0.05	3.75	3.41	0.04	2.5	6.82	0.07
<i>Curvularia</i>	0.38	28.57	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.91	28.57	0.02	0.83	28.57	0.02	1	14.29	0.01
<i>Drechslera</i>	0	0	0	2.08	19.35	0.07	4	29.03	0.11	2.69	25.81	0.1	2.27	16.13	0.06	0.83	6.45	0.02	0.5	3.23	0.01
<i>Rhizopus</i>	8.46	17.56	0.28	21.67	38.93	0.63	3.5	5.34	0.09	4.23	8.4	0.14	4.55	7.63	0.12	2.5	4.58	0.07	11.5	17.56	0.28
<i>Ulocladium</i>	1.92	19.23	0.06	4.17	19.23	0.06	1.5	0	0	1.92	19.23	0.06	0.91	7.69	0.02	2.08	15.38	0.05	3	19.23	0.06
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	1.15	10	0.05	0	0	0	3.5	20	0.1	6.92	55	0.27	0.91	7.5	0.04	0	5	0.02	1.5	2.5	0.01
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	2.69	11.48	0.09	0.42	1.64	0.01	10.5	37.7	0.28	8.85	36.07	0.27	1.82	4.92	0.04	2.5	4.92	0.04	1.5	3.28	0.02
<i>Penicillium</i>	12.69	25.5	0.63	1.67	4.5	0.11	11	33	0.81	15.77	34	0.84	2.73	1	0.02	0.83	2	0.05	0	0	0
<i>Mucor</i>	0.77	80	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.45	20	0.01	6.25	0	0	1.5	0	0
Other genera	11.15	27.33	0.51	4.58	8.67	0.16	14.50	25.33	0.47	4.62	12.67	0.23	5.45	8.67	0.16	5.42	11.33	0.21	5.50	6.00	0.11

a: Frequency (%) = number of samples of occurrence of a genus x 100/total number of samples.

b: Relative density (%) = number of isolated of a genus x 100/total number of isolated fungi.

c: Average percent (%) = Number of infected kernels by a mold in each sample x100/total number of kernels.

Table 3: Molecular identification of *Fusarium* and *Aspergillus* species present in Moroccan wheat.

	Rabat-Salé	Marrakech	Skhirat-Témara	Fès-Meknès	Settat	Khmiset	Béni-mellal
<i>F. graminearum</i>	1	1	-	-	-	-	-
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. equiseti</i>	2	2	-	1	2	-	4
<i>F. langsethiae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. acuminatum</i>	-	-	-	-	-	-	1
<i>F. sporotrichioides</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>F. verticillioides</i>	-	-	-	-	-	-	2
<i>F. coeruleum</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>F. avenaceum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tubingensis</i>	1	-	3	6	1	-	-
<i>A. niger</i>	3	-	17	6	-	-	-
<i>A. niger aggregate</i>	-	-	1	5	-	-	-
<i>A. flavus</i>	2	4	7	13	2	1	1

Table 4 : Deoxynivalenol (DON) and Ochratoxin A (OTA) production by isolated.

Areas	Deoxynivalenol (DON)				Ochratoxin A (OTA)			
	Positive strains (frequency %)	Range (µg/Kg)	Mean±RSD ** (µg/Kg)	Max level (µg/Kg)	Positive strains (frequency %)	Range (µg/Kg)	Mean±RSD** (µg/Kg)	Max level (µg/Kg)
Rabat- Salé	3 (0.30)	33.3 - 122	74.16±44.75	122	Nd	Nd	Nd	Nd
Marrakech	5 (0.51)	<15.6 - 332	92.268±135.62	332	Nd	Nd	Nd	Nd
Skhirat-Témara	Nd	Nd	Nd	Nd	1 (2.4)	0-0.57	0.285±0.403	0.57
Fès-Meknès	Nd	Nd	Nd	Nd	3 (7.1)	0.081-0.635	0.269±0.316	0.635
Settat	5 (0.51)	45 - 5222	1232.2±2239.11	5222	3 (7.1)	0.123-0.727	0.353±0.326	0.727
Khmisset	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Béni-mellal	5 (0.51)	23.3-332	109.86±126.40	332	Nd	Nd	Nd	Nd

3.3 Mycotoxin-producing ability and molecular identification of *Fusarium* and *Aspergillus* species

A correct identification of the species is needed to assess the risk of contamination of food by mycotoxins. Not all the species of a genus are able to produce mycotoxins and their production level is different... It was noted that the two mycotoxins are present in several cereals. Only 27 from the analyzed strains (980 strains in total) are able to produce DON with a minimum concentration of < 15.6 µg/Kg for the Marrakech area and a maximum concentration level of 5222 µg/Kg in samples of Settat Table 4. The obtained results for the production of DON confirm that of a previous work [41] except for the results of the region of – Fès-Meknès where no producing strains were detected; one sample is contaminated which agrees with the results of an earlier study [19].

Among the identified species, DON producers are mainly *Fusarium graminearum* and *Fusarium coeruleum* [42]. Only two regions were characterized by the presence of these molds (Rabat – Salé and Skhirat-Témara). The *Aspergillus* species isolated and identified from 81 samples from seven areas of Morocco are *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. niger aggregate* and *A. flavus*. The most abundant is *Aspergillus flavus* (30 isolates), followed by *A. niger* (26 isolates), *A. tubingensis* (11 isolates) and *A. niger aggregate* (6 isolates) Table 3. Among the identified strains there are ochratoxin and / or aflatoxin producing ones. The ochratoxin A is mainly produced by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, particularly *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* and *Penicillium verrucosum* predominantly found in wheat. Wheat products are the major group of food commodities where this toxin has the greatest impact, due to its usage as staple food for majority of world population [43]. We notice a ochratoxin's production activity among strains collected from samples culture of Skhirat-Témara, Fès-Meknès and Settât which maximum values are 0.57 µg/Kg, 0.635 µg/Kg and 0.727 µg/Kg, respectively. OTA was produced by 4 out of 11 *A. tubingensis* (36.36%) and 3 out of 26 *A. niger* isolates (11.5%). The reported percentages of ochratoxigenic isolates of *A. niger* are quite variable depending on the number of isolates studied and geographical origin [44, 45]. *A. tubingensis* was detected for the first time as a producer of OTA in grape in the work of [46]. The low level of production of ochratoxin by the isolated strain is due to the storage conditions more or less respected compared to the results obtained by other researchers [16, 36 and 45]. *A. tubingensis* produces low amount of OTA [47].

Table 5: Water activity of Moroccan wheat grains.

Moroccan Areas	aw (mean ± SD)
Rabat-Salé	0.589±0.054
Marrakech	0.566±0.064
Skhirat-Témara	0.538±0.067
Fès-Meknès	0.511±0.034
Settat	0.556±0.047

Conclusions

The results of the mycobiota studies revealed the predominance of the genera *Alternaria* and *Fusarium* in the analyzed wheat samples. We noticed that no differences in mycobiota were observed between samples from the seven areas studied, except for *Penicillium* sp. which has a relatively high contamination levels for the area Fès-Meknès, Skhirat-Témara and Rabat-Salé, which is probably due to higher humidity during the year. According to the results of this study it is recommended to monitor the quality of pre and postharvest wheat in the aim of reducing contamination by moulds and mycotoxins at the level of finished product.

Acknowledgments: This work was supported by the MycoRed project (STV 2011). Authors thank the Spanish government (AGL2010- 22182-C04-01) for the financial support.

References

1. C. Rémésy, F. Leenhardt, A. Fardet, *Cah. Nutri. Diét.* 50(1) (2015) 39-46.
2. D. Herebian, S. Zühlke, M. Lamshöft, M. Spiteller, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 939-948.
3. A.W., Schaafsma, D.C. Hooker, *Int. J. Food Microbiol.* 119 (2007) 116-125
4. X.-M., Xu, D.W., Parry, P., Nicholson, M.A., Thomsett, D., Simpson, S., Edwards, B.M., Cooke, F.M., Doohan, J.M., Brennan, A., Moretti, G., Tocco, G., Mule, L., Hornok, G., Giczey, J., Tatnell, . *Plant Pathol.* 112 (2005) 143-154.
5. S. Landschoot, K., Audenaert, W., Waegeman, B., Pycke, B., Bekaert, B., De Baets, G., Haesaert, *Cro. Prot.* 30 (2011) 1297-1305.
6. V. Hietaniemi, S., Rämö, T., Yli-Mattila, M., Jestoi, S., Peltonen, M., Kartio, E., Sieviläinen, T. Koivisto, P. Parikka, ... *Food Add. & Conta.* 33 (2016) 831-848.
7. IARC, Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1993, vol. 56, p. 489.
8. C. Cortinovis, M., Battini, F. Caloni, *J Equine Vet Sci.* 32 (2012) 72–74.
9. T. Gagkaeva Gavrilova OP, T, Yli-Mattila IG. Loskutov. *Euphytica.* 191 (2013) 3:355–364.

10. S. Tralamazza, R., Bemvenuti, P., Zorzete, F. de Souza Garcia, B. Corrêa, *Food Chemistry*, 196 (2016) 445-450.
11. J. Pestka, *Ani. Feed Sci. Tech.* 137 (2007) 283-298.
12. European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L364, 5–24.
13. G. Boorman, M., McDonald, S., Imoto, R., Persing, J. *Toxicol. Pathol.* 20 (1992) 236-245.
14. S.D. Stoev, *Vet. Hum. Toxicol.* 40 (1998) 352.
15. Scientific Cooperation (SCOOP) Task Report 3.2.7, Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States, 2002. http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html.
16. A. Riba, S., Mokrane, F., Mathieu, A., Lebrihi, N., Sabaou, *Int. J. Food Microbiol.* 122 (2008) 85–92.
17. A. Zinedine, C., Juan, J., Soriano, J., Moltó, L., Idrissi, J. Mañes, *Int. J. Food Microbiol.* 115(1) (2007) 124-127.
18. A. del Palacio, L. Bettucci, D. Pan, *Braz. J. Microbio.*, 47 (2016) 1000-1005.
19. A. Ennouari, V., Sanchis, S., Marin, M., Rahouti, A., Zinedine, *Food Control.* 32 (2013) 115-118.
20. G. Castellá, M.R., Bragulat, M.V., Rubiales, F.J. Cabañes, *Mycopathologia.* 137 (1997) 173-178.
21. A. Ackermann, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56 (1998) 169–176.
22. J.I. Pitt, A.D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage*. Springer, London. (2009).
23. W.F.O. Marasas, L.W., Burgess, R.Y., Anelich, S.C., Lamprecht, D.J. van Schalkwyk, *South Afr. J. Bot.* 54 (1988) 63-71.
24. N. Sardiñas, C., Vázquez, J., Gil-Serna, M.T., González-Jaén, B., Patiño, *Int. Food Microbiol.* 145 (2011) 121-125.
25. N. Sardiñas, C., Vázquez, J., Gil-Serna, M.T., González-Jaén, B., Patiño, *Food Add. Contam.* 27 (2010) 853-858.
26. H. Ok, D., Kim, D., Kim, S., Chung, M., Chung, K. Park, H. Chun, *Food Control*, 37 (2014) 284-291.
27. M.V. Selma, P.V., Martinez-Culebras, R., Aznar, *Int. J. Food Microbiol.* 122 (2008) 126-134.
28. A. Susca, G., Stea, G., Perrone, *Food Add. Contam.* 24 (2007) 1148-1153.
29. N.L. Glass, G.C., Donaldson, *Appl. Env. Micro.* 61 (1995) 1323-1330.
30. K. O'Donnell, H.C., Kistler, E., Cigelnik, R.C., Ploetz, *Proceesd. Nation. Acad. Sci.* 95 (1998) 2044-2049.
31. M.R. Bragulat, M.L., Abarca, F.J. Cabañes, *J. Food Microbiol.* 71(2001) 139-144
32. J.I. Pitt, A.D. Hocking, *Fungi and food spoilage*, 2nd ed. Aspen Publishing, Gaithersburg, MD, USA. (1997).
33. M. Magan, D. Aldred, *Food Microbiol.* 119 (2007) 131-139.
34. N. Belkacem-Hanfi, N., Semmar, I., Perraud-Gaime, A., Guesmi, M., Cherni, I., Cherif, et al, *J. Stored. Prod. Res.* 55 (2013) 116-123.
35. R. Gregori, P., Meriggi, A., Pietri, S., Formenti, G. Baccarini, P. Battilani, *Food Control.* 30(1) (2013) 280-287
36. A. Medina, F.M. Valle-Algarra, R. Mateo, J.V., Gimeno-Adelntado, F., Mateo, M., Jimenez, *Int. J. Food Microbiol.* 108 (2006) 196-e203.
37. C. Tabuc, D., Marin, P., Guerre, T., Sesan, J., Bailly, *J. Food Prot.* 72 (2009) 662-665.
38. M. L., Gonzalez Pereyra, S. M., Chiacchiera, C. A. R., Rosa, R., Sager, A. M., Dalcero, L., Cavaglieri, *J. Sci. Food. Agr.* 91(8) (2011) 1474-1481
39. ASTM-International D 3273-00 (2000). Standard test method for resistance to growth of mold on the surface of interior coatings in an environmental chamber.
40. S. Rahman, *Handbook of food preservation* (2nd ed.). Boca Raton, USA: Taylor& Francis. (2007).
41. J. Blesa, J., Moltó, S., El Akhdari, J., Mañes, A., Zinedine, *Food Control.* 46 (2014) 1-5.
42. A. Bottalico, *J. Plant. Pathol.* 80 (1998) 85-103.
43. R. Kumar, K., Ansari, N., Saxena, P., Dwivedi, S., Jain, M. Das, *Food Control.* 26 (2012) 63-67.
44. C.A. Da Rocha Rosa, V., Palacios, M., Combina, M.E., Fraga, A., De Oliveira Rekson, C.E., MEDINI, A.M., Dalcero, *Food Add. Cont.* 19 (2002) 408–414
45. C. Magnoli, M., Violante, M., Combina, G., Palacio, A., Dalcero, *Lett. Appl. Micro.* 37 (2003) 179–184
46. A. Medina, R., Mateo, L., López-Ocaña, F.M., Valle-Algarra, M., Jiménez, *Appl. Env. Micro.* 71 (2005) 4696–4702.
47. A. Medina, *Int. J. Food. Micro.* 122 (2008) 93-99.

(2018) ; <http://www.jmaterenviromsci.com>