

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DE SCIENCE  
DEPARTEMENT MICROBIOLOGIE ET  
BIOCHIMIE



DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE  
ET DE LA VIE  
FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE  
OPTION : MECROBIOLOGIE  
APPLIOUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par : Ketfi chérif Zina  
Rahmouni Ibtissem**

**Intitulé**

**Méthodes de détection des Toxines Fongiques  
dans quelques produits alimentaires**

**Soutenu devant le jury composé de :**

<b>Président:</b> Dr. Hendel Noui	Université M'sila
<b>Encadreur:</b> Dr. Selloum Mounir	Université M'sila
<b>Examineur:</b> Dr. Boubekeur Hafsa	Université M'sila

**Année universitaire : 2021 /2022**

# Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience de réussir à réaliser ce travail.

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur Monsieur Selloum Mounir pour sa précieuse aide et ses orientations.

Nous tenons aussi à remercier monsieur le chef du département de microbiologie et biochimie à l'Université de M'sila ainsi que tout le personnel et les enseignants du département pour leur soutien inestimable.

Tous nos remerciements à tous ceux qui nous ont encouragés et qui ont contribué à la réalisation de ce travail, de près ou de loin.

# Dédicace



## *Je dédie ce travail*

*A celui qui a mis mes pas sur le droit chemin, à celui qui m'a donné l'amour... **ma mère** la source de la tendresse*

*A celui qui m'a donné le courage .... **mon père**, que Dieu le protège*

*A mes **chères sœurs** ..... pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral..... Imène, Ikhlasse, Hanane, Hiba*

*A mon **frère** Ibrahim*

*A mon **amie** Amina et Sarra*

*A mes **étudiants** l'invisibilité de toutes les wilayas d'Algérie*

*A tous ceux qui m'ont appris une lettre ..... **Mes professeurs***

*A tous les moments difficiles qui m'ont changé pour le mieux et m'ont beaucoup apporté*

*A moi-même qui m'a encouragé malgré tous les obstacles et m'a fait aspirer au meilleur*

**Zina**



*Je dédie ce mémoire*

*A mes très chers parents grâce à leurs tendres  
encouragements et leurs sacrifices.*

*A mon homme qui a toujours à mes côtés.....,  
qu'Allah le protège.*

*A mes chères sœur Imène et Sara,*

*Mes tantes et leurs enfants*

*Mes grands-parents et à toute ma famille et tous ceux  
qui me sont cher.*

*Ibtissem*

# Sommaire

**Remerciements**

**Dédicaces**

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**.....1

## **Chapitre 1: Les champignons et les mycotoxines**

### **1. Les champignons producteurs des toxines**

1.1. Généralités.....	3
1.2. Principales moisissures toxinogènes .....	4
1.2.1. Genre Penicillium .....	4
1.2.2. Genre Aspergillus .....	5
1.2.3. Genre Fusarium .....	5
1.2.4. Genre Alternaria .....	6
1.2.5. Genre Claviceps .....	7

### **2. Les mycotoxines**

2.1. Généralités sur les mycotoxines .....	7
2.2. Les Principales mycotoxines .....	8
2.2.1. Aflatoxines .....	8
2.2.2. Ochratoxine A .....	9
2.2.3. Zéaraléonone .....	10
2.2.4. Trichothécènes.....	10
2.2.5. Citrinine .....	11
2.2.6. Fumonisines.....	11
2.2.7. La patuline .....	12
2.2.8. Autres mycotoxines .....	12
2.3. Les voies de la biosynthèse des mycotoxines.....	13
2.4. Les Conditions de production des toxines.....	14
2.4.1. Activité de l'eau .....	15

2.4.2. La Température .....	15
2.4.3. Le PH .....	16
2.4.4. Présence d'oxygène.....	16
2.4.5. La Lumière .....	16
2.4.6. La Nature de substrat .....	16
2.4.7. Les Interactions microbiennes.....	17
2.5. Les Effets des mycotoxines.....	17
<b>3. Les aliments touchés par les champignons producteur des toxines</b>	
3.1. Conditions de contamination .....	18
3.2. Les principales denrées concernées .....	19
3.2.1. Les céréales .....	19
3.2.2. Les fruits et légumes .....	19
3.2.3. Les produits laitiers .....	20
3.2.4. Les oléagineux.....	20
3.2.5. La viande et les charcuteries.....	20
3.2.6. Filière viticole.....	20

## **Chapitre 2: Méthodes de détection des mycotoxines**

### **1. Identification des mycotoxines**

1.1. Les méthodes de détection des mycotoxines .....	22
1.1.1. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM).....	23
1.1.2. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	24
1.1.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	25
1.1.4. ELISA.....	26
1.2. Méthodes d'analyse de quelques mycotoxines.....	27
1.2.1. Aflatoxine.....	27
1.2.2. Ochratoxine A .....	28
1.2.3. La zéaralène.....	28
1.2.4. La fumonisine.....	28
1.2.5. La patulin.....	28
<b>Conclusion.....</b>	<b>29</b>

### **Références bibliographiques**

## **RESUME**

### **Méthodes de détection des mycotoxines dans quelques produits alimentaires**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certains champignons lorsqu'ils se développent dans un environnement qui leur est favorable, et la plupart d'entre eux sont toxiques pour les organismes vivants (animaux, humains) car liés à leur nutrition. Les moisissures qui peuvent produire des toxines se développent sur de nombreuses denrées alimentaires tels que les céréales et les fruits secs .

Les mycotoxines les plus courantes sont : l'aflatoxine, l'ochratoxine A, la patuline, la fumonisine et la zéaralénone. Ces toxines provoquent des maladies graves à de très faibles concentrations. Ainsi, de nombreuses méthodes d'analyses quantitatives et qualitatives sont utilisées pour détecter ces toxines et déterminer leur quantité dans différentes denrées alimentaires, notamment : les méthodes physico-chimiques (chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie en phase gazeuse (CPG), chromatographie liquide à haute résolution (HPLC)) ainsi que les méthodes immunologiques rapides (ELISA), où ces méthodes sont liées à plusieurs techniques de détection, notamment : la fluorométrie, la spectrométrie de masse et la spectroscopie d'absorption.

Par conséquent, résoudre le problème des mycotoxines nécessite de déployer et d'unifier les efforts pour assurer la sécurité alimentaire.

**Mots-clés:** Moisissures, Mycotoxines, Denrées alimentaires, Méthodes de détection.

## **ABSTRACT**

### **Methods for detecting mycotoxins in some food products**

Mycotoxins are secondary metabolites produced by some fungi when they grow on a suitable environment for them, and most of them are toxic to living organisms (animal, human) because they are related to their nutrition. Molds that can produce toxins grow on many foodstuffs such as grains and dried fruits.

The most common mycotoxins are : Aflatoxin, Ochratoxin A, Patulin, Fumonizin, and Zearalenone. These toxins cause serious diseases in very low concentrations. Therefore, many quantitative and qualitative analysis methods are used to detect these toxins and determine their quantity in different foodstuffs, including: physicochemical methods (thin layer chromatography (CCM), gas phase chromatography (CPG), high-resolution liquid chromatography (HPLC) ) as well as rapid immunological methods (ELISA), where these methods are linked to several techniques for detection, including: fluorometry, mass spectrometry, and absorption spectroscopy .

Therefore, solving the problem of mycotoxins requires making and unifying efforts to ensure food safety.

**Keywords:** Molds, Mycotoxins, Foodstuffs, Detection methods.

### طرق الكشف عن السموم الفطرية في بعض المنتجات الغذائية

السموم الفطرية هي مواد أيضية ثانوية تنتجها بعض الفطريات عندما تنمو على بيئة مناسبة لها، وأغلبها سام للكائنات الحية (حيوان، إنسان) لأنها مرتبطة بتغذيته، فالعفن الذي يمكنه إنتاج السموم ينمو على العديد من المواد الغذائية مثل الحبوب والفاكهة المجففة.

ومن السموم الفطرية الأكثر شيوعاً: أفلاتوكسين، أكراتوكسين A، باتولين، فيمونزين، زيرالينون. حيث تسبب هذه السموم أمراضاً خطيرة وذلك في تراكيز ضعيفة جداً لذلك يتم استعمال طرق تحليل كمية وكيفية عديدة للكشف عن هذه السموم وتحديد كميتها في المواد الغذائية المختلفة ومن بينها: الطرق الفيزيوكيميائية (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM، كروماتوغرافيا طور الغازي CPG، كروماتوغرافيا السوائل عالية الدقة HPLC) وكذلك الطرق المناعية السريعة (الإليزا)، حيث يتم ربط هذه الطرق بتقنيات عديدة للكشف من بينها: قياس التآلق، قياس الطيف الكتلي، الامتصاص الطيفي.

لذلك يستدعي حل مشكلة السموم الفطرية بذل الجهود وتوحيدها من أجل ضمان سلامة الأغذية.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات، السموم الفطرية، المواد الغذائية، طرق الكشف.

## Liste des abréviations

**AFB1** : Aflatoxine B1

**AFB2** : Aflatoxine B2

**AFG1** : Aflatoxine G1

**AFG2** : Aflatoxine G2

**AFs** : Aflatoxines

**A<sub>w</sub>**: Activity of water

**°C** : Degrés Celsius

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CIT**: La citrinine

**CO<sub>2</sub>**: Dioxyde de carbone

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FAO**: Food and Agriculture Organisation

**FB1**: Fumonisine B1

**FLD** : Détection fluorimétrique

**FID** : La détection par ionisation de flamme

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

**IARC**: L'agence internationale de recherche sur le cancer

**MS** : Spectrométrie de masse

**O<sub>2</sub>**: Dioxygène

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé

**OTA**: Ochratoxine A

**PA :** Phosphatase alcaline

**PH:** Potentiel d'hydrogène

**PM:** Poids moléculaire

**TCT :** Trichothécène

**UV :** Rayonnement ultraviolet

**ZEA:** Zéaralénone

## Liste des figures

<b>Fig. 01:</b> Structure des principales aflatoxines : B1, B2, G1, G2 et M1.....	9
<b>Fig. 02:</b> Structures de l'ochratoxine A, la zéaralénone, le déoxynivalénol et la citrinine.....	10
<b>Fig. 03:</b> Structure des fumonisines B1, B2 et B3.....	11
<b>Fig. 04:</b> Structure de la patuline .....	12
<b>Fig. 05:</b> Voies de biosynthèse des mycotoxines .....	14
<b>Fig. 06:</b> Contamination le long de la chaîne alimentaire et moyens de prévention .....	18
<b>Fig. 07:</b> Quelques exemples d'aliments contaminés par des moisissures .....	19
<b>Fig. 08:</b> Principes d'analyse des mycotoxines .....	22
<b>Fig. 09 :</b> CCM et Développement d'un chromatogramme.....	23
<b>Fig. 10 :</b> Chromatographie HPLC.....	25
<b>Fig. 11 :</b> Chromatographie en phase gazeuse.....	26
<b>Fig. 12 :</b> Les différentes étapes du test ELISA.....	27

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Toxines sécrétées par les principaux genres de moisissures .....	3
<b>Tableau 2:</b> Quelques toxines produites suivant l'espèce de <i>Penicillium</i> .....	4
<b>Tableau 3:</b> Quelques toxines produites suivant l'espèce d' <i>Aspergillus</i> .....	5
<b>Tableau 4:</b> Quelques toxines produites suivant l'espèce de <i>Fusarium</i> .....	6
<b>Tableau 5:</b> Quelques toxines produites suivant l'espèce d' <i>Alternaria</i> .....	6
<b>Tableau 6:</b> Quelques alcaloïdes produits suivant l'espèce de <i>Claviceps</i> .....	7
<b>Tableau 7:</b> Quelques mycotoxines et leur origine chimique.....	13
<b>Tableau 8:</b> Organes cibles et pathologies associées aux principales mycotoxines .....	17
<b>Tableau 9:</b> Principales mycotoxines, moisissures toxigènes et principaux substrats les plus souvent contaminés .....	21
<b>Tableau 10 :</b> Quelques types de détecteurs/d'analyseurs associés aux CLHP et CPG.....	26

# **INTRODUCTION**



## Introduction

---

L'Homme se nourrit d'aliments d'origine animale ou végétale, crus ou cuits qu'il trouve dans son environnement et pris directement de la nature ou transformés 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 de bactéries ou de champignons, hydrocarbures aliphatiques, 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 (Lahouar, 2016).

Parmi les agents pathogènes qui peuvent contaminer les aliments, les champignons toxinogènes constituent un danger réel pour la santé de l'Homme et de l'animal lorsqu'elles contaminent les différents produits alimentaires. La prolifération fongique et la contamination par les mycotoxines altèrent la qualité marchande des produits alimentaires impliquant d'énormes pertes économiques. La FAO (Food and Agriculture Organisation) estime qu'environ 25% des récoltes mondiales sont susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produites par des moisissures potentiellement toxinogènes appartenant, essentiellement, aux genres *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* et *Alternaria spp.*, infectant une large variété de denrées alimentaires avant, après la récolte et au cours du stockage. Le nombre de mycotoxines responsables d'effets secondaires sur la santé humaine et animale est en perpétuelle augmentation, on distingue cinq importantes mycotoxines sont les aflatoxines (AFs), les ochratoxines, les trichothécènes, les fumonisines (FB), la zéaralénone (ZEA) et la patuline qui se sont révélées potentiellement cancérigènes, génotoxiques, néphrotoxiques, immuno-toxiques, tératogènes et mutagènes (Houissa, 2020; Lahouar, 2016).

Dans un cadre de contrôle réglementaire, il est nécessaire de connaître les taux de toxines fongiques dans les matières premières alimentaires. Pour déterminer le niveau de contamination d'un lot, il convient de pouvoir évaluer la quantité de mycotoxines qu'il contient (Gauthier, 2016).

## Introduction

---

De ce fait, l'objectif de ce travail a donc été les méthodes de détection des mycotoxines dans quelques produits alimentaires.

Dans ce contexte, deux principaux chapitres ont fait l'objet d'étude dans notre mémoire :

- Chapitre 1 : Les champignons et les mycotoxines.
- Chapitre 2 : Méthodes de détection des mycotoxines.

# **CHAPITRE 1**

---

## **LES CHAMPIGNONS ET LES MYCOTOXINES**

## 1. Les champignons producteurs des toxines

### 1.1. Généralités

Les champignons, ou 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 microflore. Ils sont constitués de filaments mycéliens (hyphes) et d'organes fructifères capables de coloniser divers substrats. Ils sont ubiquitaires, non photosynthétiques et hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils nécessitent une source extérieure de carbone et d'azote pour leur croissance (Gauthier, 2016).

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction ; ils produisent un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification (Tabuc, 2007).

Les mycotoxines sont principalement synthétisées par cinq espèces toxigènes de champignons microscopiques : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Fusarium* et *Alternaria* (Tableau 1).

Les mycètes sont répartis en 4 embranchements selon la composition des parois, la structure des filaments et les spores produites au cours des cycles de reproduction sexuée et asexuée :

**Tableau 1:** Toxines sécrétées par les principaux genres de moisissures (Gauthier, 2016)

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>	Alcaloïdes de l'ergot

Les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les Deutéromycètes (les Deutéromycètes sont divisés en 3 classes: les Blastomycètes, les Hyphomycètes, les Coelomycètes) (Gauthier, 2016).

## 1.2. Principales moisissures toxigènes

### 1.2.1. Genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* comprend entre 150 et 300 espèces (Tableau 2), réparties en quatre sous-genres 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 *Talaromyce*. 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) (Gauthier, 2016).

**Tableau 2:** Quelques toxines produites suivant l’espèce de *Penicillium* (Gauthier, 2016)

Espèces	Toxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Acide cyclopiazonique, Roquefortine C
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxine A
<i>Penicillium roqueforti</i>	Acide pénicillique, Roquefortine C
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinine, Patuline, Roquefortine C
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium cyclopium</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinine
<i>Penicillium oxalicum</i>	Roquefortine C, Acide sécalonique D
<i>Penicillium crustosum</i>	Pénitrem A, Roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Acide cyclopiazonique, Patuline, Roquefortine C, Griséofofulvine

### 1.2.2. Genre *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* est classé dans la division des Deutéromycètes. Certaines formes sexuées d'*Aspergillus* spp sont connues et appartiennent à la division des Ascomycètes, dont les genres les plus notables sont *Eurotium* et *Emericella* (Gauthier, 2016).

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Tableau 3), Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines (Tabuc, 2007). Les colonies d'*Aspergillus* spp, duveteuses ou poudreuses, à développement rapide, sont le plus souvent de couleurs vives et variées (Gauthier, 2016).

**Tableau 3:** Quelques toxines produites suivant l'espèce d'*Aspergillus* (Gauthier, 2016)

Espèces	Toxines produites
<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
<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 terreus</i>	Citrinine, Patuline, Territrem, Terréine, Terrétonine
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine
<i>Aspergillus sydowii</i>	Stérigmatocystine, Griséofulvine
<i>Aspergillus candidus</i>	Candiduline

### 1.2.3. Genre *Fusarium*

Les *Fusaria* sont des champignons filamenteux saprophytes appartenant aux Deutéromycètes. Certaines formes sexuées (*Gibberella*, *Nectria*) sont connues et rattachées à l'embranchement des Ascomycètes. C'est un genre qui comprend entre 50 et 100 espèces anamorphes (Tableau 4). Le genre *Fusarium* tire son nom du latin « *fusus* » qui signifie fuseau, en référence à la forme des conidies. 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 (Gauthier, 2016).

**Tableau 4:** Quelques toxines produites suivant l'espèce de *Fusarium* (Gauthier, 2016)

Espèces	Toxines produites
<i>Fusarium culmorum</i>	Trichothécènes B, Zéaralénone, Culmorine, Fusarine C
<i>Fusarium avenaceum</i>	Moniliformine, 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

#### 1.2.4. Genre *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 (Tableau 5). *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. Les colonies d'*Alternaria* spp ont un aspect de velours, de couleur noire ou grise (Gauthier, 2016).

**Tableau 5:** Quelques toxines produites suivant l'espèce d'*Alternaria* (Gauthier, 2016)

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

### 1.2.5. Genre *Claviceps* :

Les espèces du genre *Claviceps* classées dans la famille des Clavicipitacées, division des Ascomycètes. Il regroupe une cinquantaine d'espèces produisant plus de cinquante alcaloïdes différents (Tableau 6).

Les différentes espèces se distinguent par la couleur, la forme et la taille du sclérote, aussi nommé ergot. Le sclérote est la forme de résistance du champignon durant l'hiver. Son enveloppe protectrice est rigide et de couleur brun-violacé à noir. Les caractéristiques morphologiques du sclérote dépendent de l'hôte. Il est composé d'un amas compact de filaments mycéliens. Au printemps, le sclérote germe et cet agglomérat, dénommé stroma, devient l'organe dans lequel se réalise l'élaboration des ascocarpes, producteurs de spores (Gauthier, 2016).

**Tableau 6:** Quelques alcaloïdes produits suivant l'espèce de *Claviceps* (Gauthier, 2016)

Espèces	Toxines produites
<i>Claviceps fusiformis</i>	Clavine, Elymo-clavine
<i>Claviceps paspali</i>	Acide lysergique, Chanoclavine
<i>Claviceps purpurea</i>	Acide lysergique, Chanoclavine, Ergotamine, Agroclavine Ergocriptine, Ergosine, Chanoclavine
<i>Claviceps africana</i>	Clavine, Dihydroergosine

## 2. Les mycotoxines

### 2.1. Généralités sur les mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du mot grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison (Houissa, 2020). Les champignons toxinogènes produisent plusieurs métabolites secondaires hautement toxiques appelées couramment mycotoxines (Lahouar, 2016) de faible poids moléculaire (PM <1000 Daltons), pour la plupart, une structure hétérocyclique. Leur petite taille et leur faible solubilité dans l'eau les rendent particulièrement stables en milieux acides et basiques, et résistantes aux traitements thermiques (Gauthier, 2016). On peut aussi classer les mycotoxines plus simplement selon leurs principaux effets toxiques. On distingue parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue

agro-alimentaire et sanitaire les aflatoxines, les ochratoxines et l'ochratoxine A en particulier, la patuline, les fumonisines, la zéaralène et les trichothécènes (Gallotti et Fremy, 2006). L'absence de mycotoxines n'entraîne pas la mort du champignon mais peut limiter sa survie ou sa croissance. Le rôle des toxines fongiques est d'améliorer la compétitivité des champignons qui les produisent : communication entre champignons, moyen de défense, chimiotactisme des insectes favorisant la dissémination des spores (Gauthier, 2016).

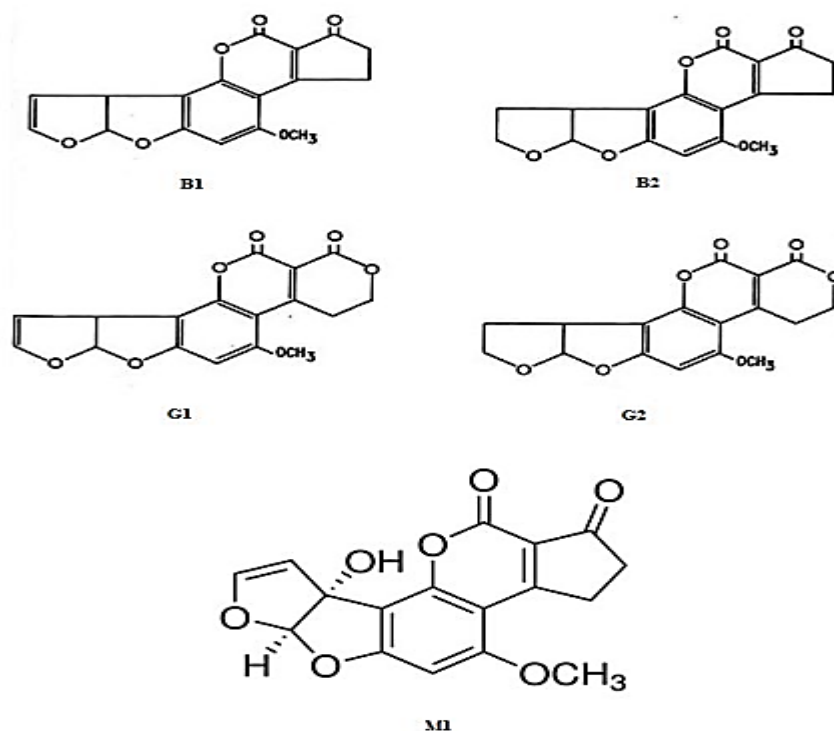
## **2.2. Les Principales mycotoxines**

### **2.2.1. Aflatoxines**

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difuranocoumarine (Bhatnagar et al., 2003). Ces substances sont produites par des espèces d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*.

Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent : la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunosuppression. Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 (figure 1). Parmi les aflatoxines, l'AFB1 est la plus fréquente et la plus toxique. Elle est considérée comme étant le plus puissant hépatocancérigène pour les mammifères et elle est classée en tant que cancérigène probable du groupe 1 par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC) (Lahouar, 2016).

Les Propriétés physico-chimiques sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau insolubles dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique), elles sont assez facilement extraites. Sous lumière ultra-violette (U.V. longs), elles sont fluorescentes (bleue pour les AFB "blue" et verte pour les AFG "green", l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve) (Gallotti et Fremy, 2006).

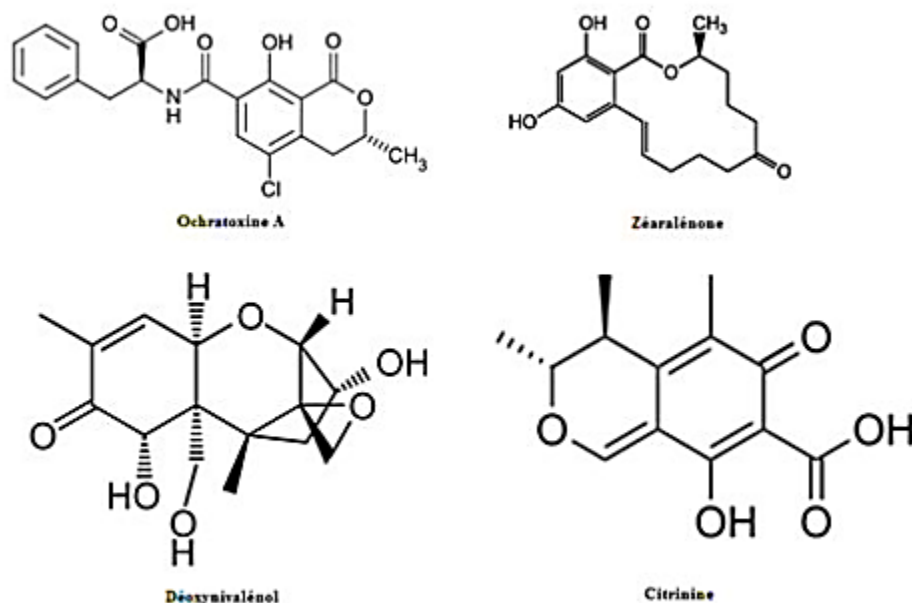


**Fig. 01** : Structure des principales aflatoxines : B1, B2, G1, G2 et M1 (Lahouar, 2016)

### 2.2.2. Ochratoxine A

L'ochratoxine A est un dérivé de phénylalaninyl produit par des espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* (figure 2) (Lahouar, 2016). L'OTA est connue par ses propriétés néphrotoxiques, cancérigènes, immuno-toxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées (Pitt et al., 2001). En effet, l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un composé cancérigène pour l'Homme. Après consommation d'aliments contaminés, l'OTA est fréquemment détectée dans le sang humain. Elle est caractérisée par une longue demi-vie d'élimination (environ 35 jours dans le sérum), à cause de sa liaison aux protéines plasmatiques, sa circulation entéro-hépatique et sa réabsorption dans l'urine. Par conséquent, l'OTA est la mycotoxine la plus détectée dans le sang humain dans le monde (Lahouar, 2016).

Parmi les propriétés physico-chimiques de L'OTA : la masse moléculaire est 403,8 g/mol, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau (Gallotti et Fremy, 2006).



**Fig. 02 :** Structures de l'ochratoxine A, la zéaralénone, le déoxynivalénol et la citrinine  
(Lahouar, 2016)

### 2.2.3. Zéaralénone

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine de structure œstrogénique non-stéroïde produite par des espèces du genre *Fusarium* tel que *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (figure 2) (Bennett et Klich, 2003). La zéaralénone se lie compétitivement aux récepteurs d'œstrogène et elle est par conséquent connue par ses effets œstrogéniques incluant : l'infertilité, diminution du taux de la testostérone sérique et du nombre des spermatozoïdes, réduction du taux de grossesse et des changements des taux de progestérone (Shier et al., 2001). ZEN est également considérée cancérigène et classée par l'IARC dans le groupe 3. Elle est aussi responsable de complications hépatotoxiques et hématotoxiques (Abbes et al., 2006).

Parmi les propriétés physico-chimiques de ZEN: la masse moléculaire égale à 318,4 g/mol . très faiblement soluble dans l'eau et l'hexane ; sa solubilité augmente avec la polarité des solvants : benzène, chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol (Gallotti et Fremy, 2006).

### 2.2.4. Trichothécènes

Les trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par des espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis* et *Trichoderma*. Toutes les trichothécènes ont en commun un 12, 13-époxytrichothécène et un acide olifénique avec une variété de substituants (Bennett et Klich, 2003). Les trichothécènes sont classées en 4 groupes A, B, C et D selon leur structure chimique. Elles provoquent principalement une

nécrose et une hémorragie pendant les processus de régénération du sang dans la moelle osseuse et la rate et des changements des organes reproducteurs (Lahouar, 2016).

Parmi les propriétés physico-chimiques de TCT: Les masses moléculaires varient de 154 à 697 g/mol, Ils sont le plus souvent solubles dans les solvants moyennement polaires (alcools, solvants chlorés) (Gauthier, 2016).

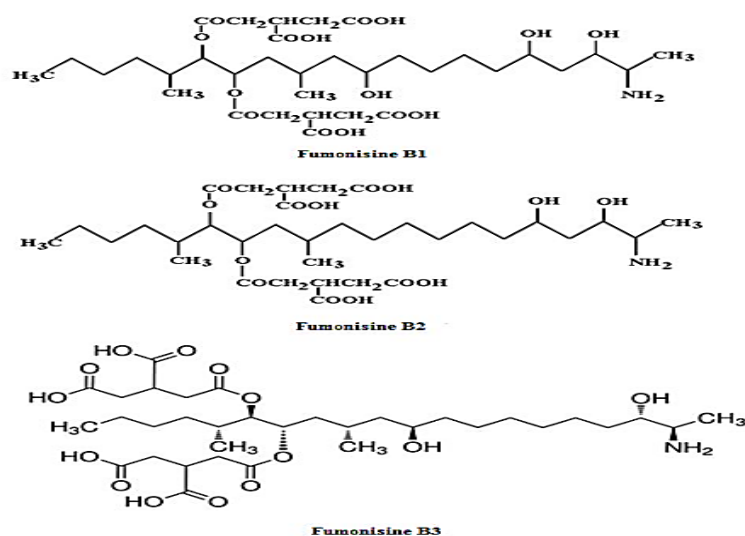
### 2.2.5. Citrinine

La citrinine (CIT) est produite principalement par *Penicillium citrinum* mais aussi par *Penicillium expansum* et *Penicillium verrucosum* et quelques espèces du genre *Aspergillus* et *Monascus* (figure 2) (Kurata, 1990 ; Li et al., 2003). La CIT est toxique pour l'Homme et l'animal (CAST, 2003). Plusieurs études ont montré que la CIT est cytotoxique, génotoxique, mutagène, immuno-toxique et tératogène (Liu et al., 2003 ; Bouslimi et al., 2008).

### 2.2.6. Fumonisines

Les fumonisines sont synthétisées principalement par plusieurs espèces du genre *Fusarium* y compris *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatum*. Plusieurs fumonisines sont isolées et caractérisées mais FB1, FB2 et FB3 sont les plus fréquemment détectées dans les produits alimentaires. La FB1 est un diester d'acide propane-1,2,3- tricarboxylique (figure 3). Les fumonisines sont des cancérrogènes probables et elles sont classées parmi le groupe 2B selon l'IARC et l'OMS (Lahouar, 2016).

Les propriétés physico-chimiques: La FB1 a un poids moléculaire de 722 g/mol et la FB2 de 706 g/mol. Ce sont des composés polaires, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants apolaires (Gallotti et Fremy, 2006).

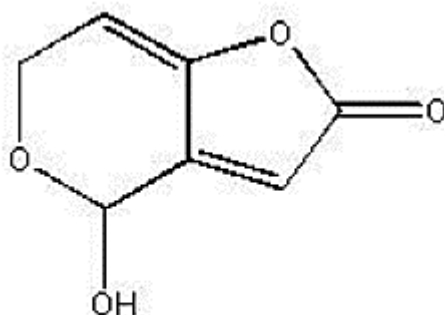


**Fig. 03:** Structure des fumonisines B1, B2 et B3 (Lahouar, 2016)

### 2.2.7. La patuline

Cette mycotoxine est produite par plusieurs *Penicillium* comme par exemple *P. expansum*, et *Aspergillus* par exemple *Aspergillus clavatus*. La patuline a des effets neurotoxiques (Gallotti et Fremy, 2006).

Parmi les propriétés physico-chimiques: Elle est insoluble dans les solvants organiques apolaires comme le benzène ou les éthers de pétrole (mélanges d'alcane) (Figure 4). Sa solubilité est par contre excellente dans l'eau et les solvants organiques polaires tels que les alcools, l'acétone, les éthers (Gauthier, 2016).



**Fig. 04:** Structure de la patuline (Gallotti et Fremy, 2006)

### 2.2.8. Autres mycotoxines

D'autres mycotoxines produites par les *Fusarium* sont aujourd'hui émergentes et de plus en plus décrites. Bien que considérées comme moins importantes en raison de leur faible probabilité de toxicité aiguë, elles ont cependant une haute prévalence dans les produits alimentaires. Parmi ces mycotoxines émergentes, sont retrouvées (Desjardins, 2006; Escrivá et al., 2015) :

- Les moniliformines, produites par *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*. Elles ont une structure proche du pyruvate, mais leur mode d'action n'est pas encore clairement décrit. Du point de vue de la toxicité, elles altèrent le cartilage chez l'homme et peuvent également avoir un impact sur les lymphocytes.
- Les énniantines, produites par *F. avenaceum*. Ce sont des molécules ionophores inhibitrices d'enzymes comme la cholestérol-acétyltransférase chez l'homme. Isolées pour la première fois dans les années 1940, des recherches importantes sont initiées pour élucider leur lien avec le gushing, phénomène de giclage de la bière.
- La beauvericine, qui a montré des activités antimicrobiennes et anti-tumorigènes.

- La sambutoxine, décrite pour la première fois en 1995. Elle possède une toxicité sur les animaux expérimentaux.

- La furasine C, produite par *F. tricinctum*, *F. verticillioides* ou encore *F. graminearum*.

Elle possède une activité mutagène bactérienne (test d'Ames positif). Elle est également associée à des cancers de l'œsophage et est responsable de cancer du sein par son action comme agoniste oestrogénique (Sondergaard et al., 2011).

**2.3. Les voies de la biosynthèse des mycotoxines**

Les mycotoxines ne constituent pas une classe chimique à part. Elles ont trois origines chimiques différentes : les acides aminés, les polycétoacides et les terpènes (Gauthier, 2016). Le tableau 7 indique quelques exemples de mycotoxines et leur origine chimique.

**Tableau 7:** Quelques mycotoxines et leur origine chimique (Cherras et al., 2017 )

<b>Mycotoxines dérivées des acides aminés</b>	<b>Mycotoxines dérivées des acides Polycétoacide</b>	<b>Mycotoxines dérivées des terpènes</b>
Alcaloïdes de l'ergot	Aflatoxines	Toxine T-2
Gliotoxine	Citrinine	Verrucarrine
Roquefortine	Stérigmatocystine	Déoxynivalénol
Sporidesmine	Zéaralénone	
Ochratoxines		

Les mycotoxines ne forment pas un groupe chimique homogène mais sont classées en fonction des composés desquels elles sont issues (figure 5) :

- **La voie des acides aminés** : ce sont les unités constituant les protéines. Leur caractéristique commune est la présence des groupes -COOH et -NH dans leur structure chimique. Font partie des dérivés des acides aminés : les alcaloïdes de l'ergot du seigle, l'Acide aspergillique, la Roquefortine, les Sporidesmines, l'Acide cyclopiazonique, la Slaframine, la Tryptoquivaline, la Gliotoxine...

- **La voie des polycétoacides** (polyacétates) : ce sont des composés indispensables au métabolisme énergétique des cellules de tous les organismes vivants. Les Ochratoxines, les Aflatoxines, la Zéaralénone, la Stérigmatocystine, la Citrinine, la Patuline et les Rubratoxines sont issues de la métabolisation des polycétoacides.
- **La voie des terpènes** : ce sont des composés organiques principalement issus des résines produites par les végétaux. La Toxine T2, le Déoxynivalénol, la Fusarénone, les Roridines ou encore les Verrucarines sont des dérivés des terpènes (Gauthier, 2016).

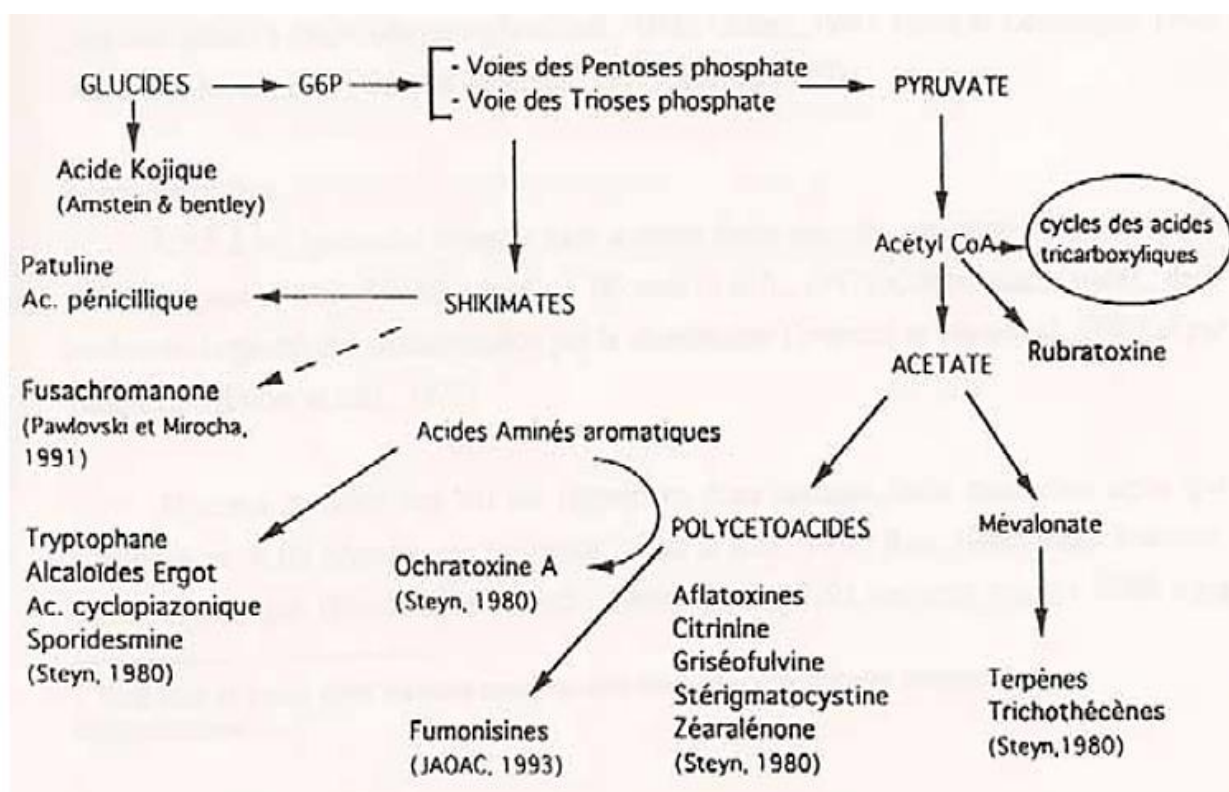


Fig. 05: Voies de biosynthèse des mycotoxines (Gauthier, 2016)

#### 2.4. Les Conditions de production des toxines

La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, le plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée (Tabuc, 2007).

### 2.4.1. *Activité de l'eau*

L'activité de l'eau, symbolisée par le sigle  $A_w$  (pour activity of water), 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. 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. La croissance de tous les micro-organismes est caractérisée par des  $A_w$  minimum, optimum et maximum. 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 (Gauthier, 2016).

### 2.4.2. *La Température*

La température conditionne le développement de la flore fongique et surtout sa vitesse de croissance. La température peut soit inhiber les réactions enzymatiques par dénaturation des enzymes en cas de l'élévation de la température, soit provoquer la diminution de la vitesse des activités enzymatiques en cas de baisse de température. 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 toxine. De manière générale, elle est supérieure à la température optimale de la toxinogénèse. Pour *Penicillium viridicatum* (producteur d'Ochratoxine A), sa 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'Ochratoxine A n'est possible qu'à une température comprise entre 12 et 24°C (Gauthier, 2016).

La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 à 35°C, La croissance des *Fusarium* est plus favorable dans les climats tempérés à des températures allant de 26 à 28°C, tandis que les *Aspergillus* prolifèrent mieux sous des températures chaudes. Pour *Aspergillus ochraceus* par exemple, la température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C. Certaines espèces sont psychrophiles ou psychrotolérantes et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les champignons du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4°C à 31°C avec un optimum à 12° (Lahouar, 2016).

### 2.4.3. Le 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 (FB1) 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 (Gauthier, 2016).

### 2.4.4. Présence d'oxygène

La disposition O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> est une ressource sélective pour la croissance fongique. La majeure partie des micromycètes est aérobie, Certains peuvent vivre en anaérobiose (Gauthier, 2016). Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique. Une concentration en oxygène inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO<sub>2</sub> empêchent l'élaboration de mycotoxines (Cairns-Fuller et al., 2005 ; Tabuc, 2007).

### 2.4.5. La 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. Certaines espèces ne peuvent pas se passer de lumière tandis que d'autres la fuient : chez *Verticillium agricinum*, l'exposition prolongée aux rayons ultraviolets peut limiter la croissance voire provoquer la mort du mycélium (Gauthier, 2016).

### 2.4.6. La Nature de substrat

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique (souvent présent dans les céréales) diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Gauthier, 2016 ; Pfohl-Leszkowicz, 2001).

2.4.7. Les Interactions microbiennes

La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs. Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite est réduite quand une souche d'*Aspergillus flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*Aspergillus parasiticus*, et ce, même si la souche d'*Aspergillus parasiticus* est une souche non toxino-gène (Tabuc, 2007).

2.5. Les Effets des mycotoxines

Les mycotoxines ont des structures très variées, qui dépendent des voies de biosynthèse. De ce fait, les effets de ces contaminants sur la santé seront extrêmement variables en fonction de leur devenir dans l'organisme et des organes cibles mais aussi en fonction des niveaux et de la durée de l'exposition ainsi, parfois, que de l'âge des personnes (animaux) exposées.

Les organes cibles majeurs et les effets associés à l'exposition aux principales mycotoxines sont rapportés dans le Tableau 8 ci-dessous. Parmi les centaines de toxines identifiées à ce jour, les aflatoxines sont probablement les plus importantes en santé publique. En effet, l'aflatoxine B1 est la seule mycotoxine classée comme cancérogène chez l'homme et c'est l'agent cancérogène naturel le plus puissant connu à l'heure (Makhlouf, 2019).

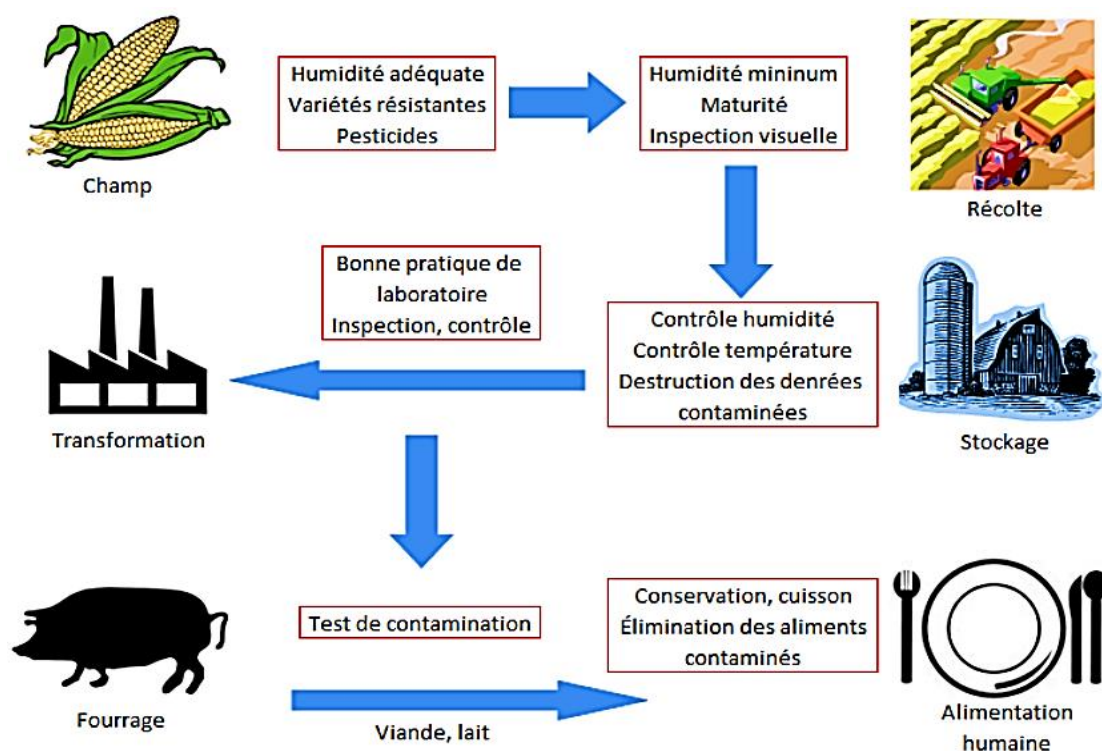
**Tableau 8 :** Organes cibles et pathologies associées aux principales mycotoxines (Makhlouf, 2019)

Toxines	Toxicité et organes cibles	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par cytochromes P450 Conjugaison aux GS-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de l'activité de la phospho-nolpyruvate carboxykinase Impact sur la synthèse des protéines par compétition Inhibition de la production d'ATP
Patuline	Neurotoxicité, Mutagenèse <i>In vitro</i> Cytotoxicité	Inhibition tyrosine phosphatase (PTP) Perturbation la fonction de barrière intestinale
Deoxynivalenol	Hématotoxicité Immunomodulation Problèmes digestifs	Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines (élongation de la chaîne protéique)
T-2 et HT-2	Reprotoxicité Neurotoxicité Génotoxicité Immunotoxicité	
Zéaralénone	Troubles de la fertilité et de la reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques Bioactivation par des réductases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1, B2, B3	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité, Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinguanine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

### 3. Les aliments touchés par les champignons producteur des toxines

#### 3.1. 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 6). 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 (Gauthier, 2016).



**Fig. 06 :** Contamination le long de la chaîne alimentaire et moyens de prévention (Gauthier, 2016)

Comme précisé dans la Partie 1, les toxines fongiques sont principalement produites par cinq genres de champignons : *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Claviceps* et *Alternaria*. Ils sont classés en quatre groupes, selon le lieu où ils se développent :

- Les mycètes dont la croissance se produit sur des plantes sénescents ou stressés. 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 (Gauthier, 2016).

### 3.2. Les principales denrées concernées

#### 3.2.1. Les céréales

Les céréales sont des vecteurs importants de dissémination des toxines fongiques (figure 7), car elles sont universellement consommées par les animaux et les Hommes. Elles sont contaminées soit au champ soit au moment du stockage, principalement par l'intermédiaire des insectes (Pfohl, 1999).

#### 3.2.2. 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 (figure 7). 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, 1999).



Fig. 07 : Quelques exemples d'aliments contaminés par des moisissures (Aurélie, 2013)

### 3.2.3. 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 (Gauthier, 2016).

### 3.2.4. 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. Toutefois, les toxines sont en grande partie éliminées lors de l'extraction des huiles et de l'étape de purification (Groopman et al., 1981).

### 3.2.5. La viande et les charcuteries

Les charcuteries ne sont pas des substrats naturels favorables aux champignons toxigènes. Néanmoins, des moisissures peuvent se multiplier, comme *Wallemia sebi*, qui produit le Walleminol A. La contamination des viandes résulte plutôt de la transmission des toxines par le biais de la chaîne alimentaire. L'Ochratoxine A est ainsi couramment retrouvée dans les muscles de porc et de volailles, et dans les abats (Gauthier, 2016).

### 3.2.6. Filière viticole

Les vins et jus de raisin sont considérés, après les céréales, comme la deuxième source de contamination en Ochratoxine A. 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 (Nährer et al., 2014).

Les principales mycotoxines ainsi que les espèces productrices et les aliments les plus souvent contaminés sont listés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Principales mycotoxines, moisissures toxigènes et principaux substrats les plus souvent contaminés (Makhlouf, 2019)

Mycotoxines	Types	Genres	Espèces productrices	Produits les plus contaminés
Aflatoxines	B1, B2, G1, G2, M1	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus de la section Flavi</i>	Céréales (maïs), arachides, épices, fruits secs, lait et produits laitiers (AFM1)
Ochratoxine	A	<i>Penicillium</i>	<i>P.verrucosum</i>	Céréales, cacao, grains de café, épices, jus de raisin et vin
		<i>Aspergillus</i>	<i>A.ochraceus, A.carbonarius</i>	
Trichothécènes	DON	<i>Fusarium</i>	<i>F.langsethiae, F.sporotrichioides, F.poa, F.graminearum, F.culmorum, F.crookwellense, F.tricinatum, F.acuminatum, F.equiseti, F.solani</i>	Céréales (blé, avoine et maïs)
	T-2 HT-2		<i>F.equiseti, F.poa, F.sporotrichioides, F.tricinatum, F.langsethiae</i>	
Zéaralénone		<i>Fusarium</i>	<i>F.graminearum, F.culmorum, F.crookwellense</i>	Céréales
Acide cyclopiazonique		<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavus, A.oryzae, plusieurs espèces de la section flavi</i>	Céréales, épices, fruits secs
		<i>Penicillium</i>	<i>P.camemberti</i>	
Patuline		<i>Penicillium</i>	<i>P.verrucosum, P.expansum</i>	Céréales, pommes, poires
		<i>Aspergillus</i>	<i>A.clavatus</i>	
		<i>Byssochlamys</i>	<i>B.nivea</i>	
Fumonisines	B1, B2, B3	<i>Fusarium</i>	<i>F.verticillioides, F.proliferatum</i>	Maïs, Riz
Stérigmatocystine		<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavus, A.nidulans, A.versicolor</i>	Céréales, arachides, épices, noix fruits secs,
Citrinine		<i>Aspergillus</i>	<i>A.terreus, A.carneus, A.niveus,</i>	Céréales, arachides, fruits et produits secs, noix, jus de pommes
		<i>Penicillium</i>	<i>P.verrucosum, P.citrinum, P.expansum</i>	
Alcaloïdes de l'ergot		<i>Claviceps</i>	<i>C.purpurea, C.paspali, C.Africana, C.fusiformis</i>	Blé et céréales

# **CHAPITRE 2**

---

## **LES MÉTHODES DE DÉTECTION DES MYCOTOXINES**

## 1. Identification des mycotoxines

### 1.1. Les méthodes de détection des mycotoxines

Les mycotoxines étant présentes à l'état de traces dans les aliments et matières premières étudiés, il est indispensable d'avoir recours à des méthodes d'analyse extrêmement performantes (figure 8). Qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, ces méthodes reposent le plus souvent sur le principe de séparation chromatographique, couplée à des procédés de détection comme la fluorimétrie, la spectrophotométrie ou la radiodétection. Les méthodes physico-chimiques comme la « chromatographie sur couche mince » (CCM), la « chromatographie liquide à haute performance » (CLHP ou HPLC) et la « chromatographie en phase gazeuse » (CPG) sont principalement utilisées pour doser les mycotoxines.

Des méthodes plus récentes et plus rapides sont fondées sur des principes immunochimiques comme le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Gauthier, 2016).

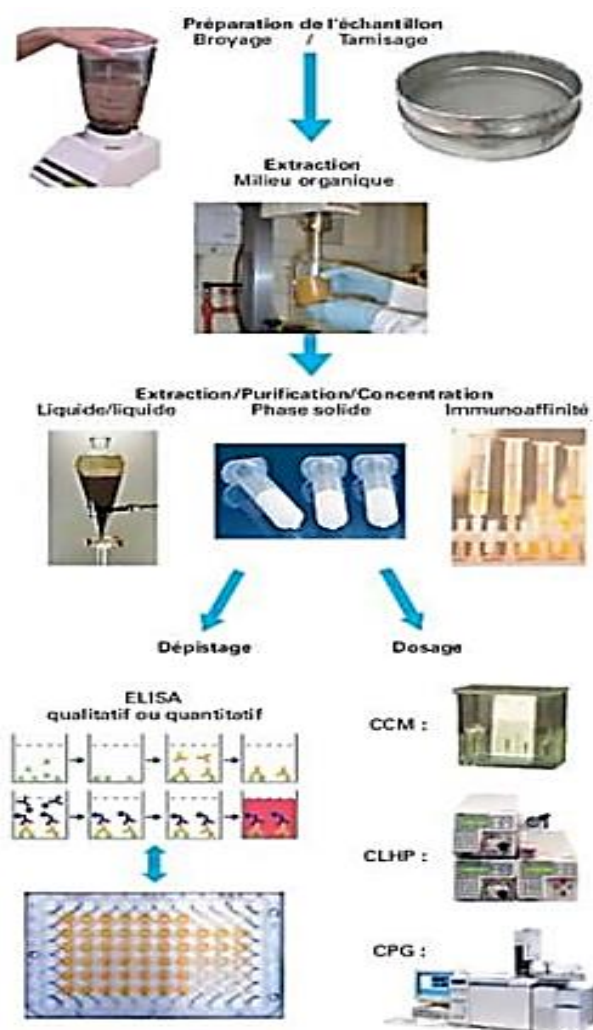
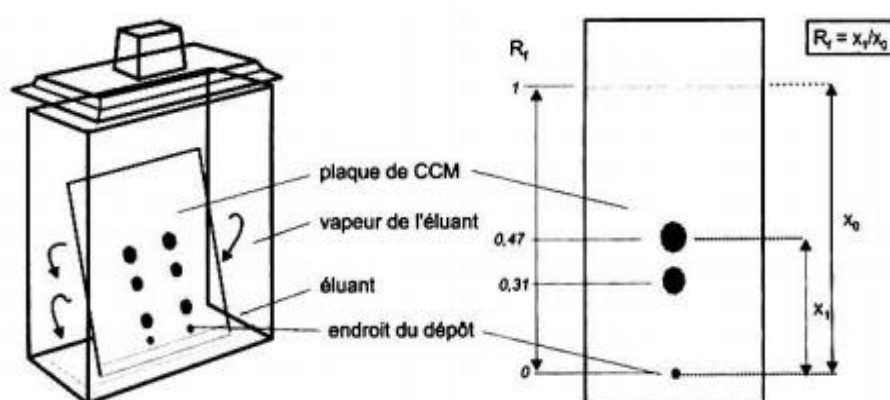


Fig. 08: Principes d'analyse des mycotoxines (Heit, 2015).

### 1.1.1. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)

Au début des années 70, la chromatographie sur couche mince (CCM) est reportée par l'équipe de Gimeno comme la première technique reconnue et recommandée pour la détection des mycotoxines (Gargouri, 2021). Cette méthode assure une détection qualitative et semi-quantitative des mycotoxines, elle est peu coûteuse, facile à manipuler et permet un criblage rapide et simultané de plusieurs échantillons (Houissa, 2020). Elle comprend une phase stationnaire, constituée d'une couche mince de matériel absorbant (gel de silice), qui est plongée dans une phase mobile liquide (éluant), composée d'un solvant qui va obliger les molécules à se séparer le long de la phase stationnaire (figure 9). Cette méthode est fondée sur les différences d'affinité des composés vis-à-vis des deux phases (Gauthier, 2016). Cette méthode a été utilisée pour des analyses unidimensionnelles et bidimensionnelles. Les techniques de détection varient en fonction des mycotoxines à détecter : les substances colorées sont visualisées sous la lumière visible. Les mycotoxines fluorescentes sont examinées sous la lumière UV. Tandis que pour les toxines non fluorescentes des réactifs de pulvérisation spécifiques chromogéniques ou fluorogéniques sont utilisés pour relever des couleurs ou de la fluorescence (Gargouri, 2021). CCM est largement accepté comme référence approuvée de détermination des AF ; il a été remplacé par HPLC pour l'analyse quantitative des mycotoxines (Jyoti et Alka, 2020).



**Fig. 09:** CCM et Développement d'un chromatogramme (Arnold, 2015)

### *1.1.2. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)*

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été une évolution, depuis la fin des années 1960 (Jyoti et Alka, 2020). Cette méthode permet une analyse quantitative, elle est présente un intérêt important pour la quantification des mycotoxines et elle est considérée aujourd'hui comme une méthode de choix dans ce cadre. Les molécules peu volatiles, thermolabiles et solubles sont traitées, en général par HPLC (Heit, 2015). Dans ce procédé, l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire de faible granulométrie. L'augmentation de la pression dans le système est due au fort débit d'écoulement de l'éluant (figure 10) (Gauthier, 2016).

L'HPLC a été couplée à différentes techniques de détection telles que les détections par spectrophotométrie d'absorption, la spectrophotométrie en émission de fluorescence (FLD) et la spectrométrie de masse (MS) (tableau 10). Ceci donne la possibilité de séparer et purifier une large gamme d'espèces fongiques avec une bonne sensibilité et une bonne sélectivité. L'HPLC-FLD étant particulièrement bien adaptée pour analyser des mycotoxines naturellement fluorescentes, comme les Aflatoxines AFs ou l'Ochratoxine OTA (Gargouri, 2021). Le couplage de l'HPLC avec la spectrométrie de masse (HPLC-MS) a ouvert de nouvelles possibilités pour l'identification et la quantification de multiples mycotoxines ionisables (AFs et OTA) sans la nécessité de les dériver (Wen et al., 2014) .

La HPLC est préférée à la CCM en raison de ses bons facteurs de sensibilité, détectabilité et spécificité. En revanche, la CLHP reste la méthode chromatographique la plus coûteuse (Gauthier, 2016).

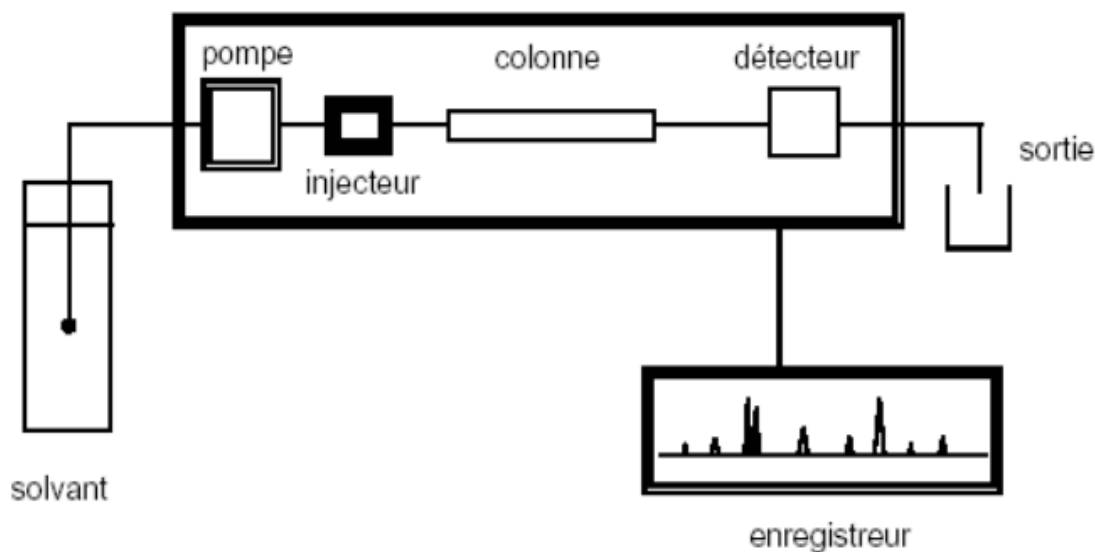


Fig. 10 : Chromatographie HPLC (Selila et Grine, 2018)

### 1.1.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse permet une analyse quantitative des mycotoxines, Elle a été appliquée à l'analyse des mycotoxines dans les années 90 (Gargouri, 2020 ; Heit, 2015).

C'est une méthode qui peut être couplée à une technique de détection comme la spectrométrie de masse (MS), la détection par ionisation de flamme (FID) pour identifier des substances volatiles issues des mycotoxines (tableau 10) (Gargouri, 2020) car cette méthode a une spécificité et une sensibilité élevées pour toutes les mycotoxines qui peuvent être dérivé de composé volatile pour être un gaz chromatographié (Jyoti et Alka, 2020).

La CPG s'applique aux composés gazeux, le mélange à étudier est vaporisé à l'entrée d'une colonne contenant la phase stationnaire (liquide ou solide), il est ensuite transporté à travers cette colonne à l'aide d'un gaz vecteur (phase mobile) (figure 11). Les différents composés du mélange vont se séparer et sortir de la colonne, les uns après les autres, suivant leur affinité avec la phase stationnaire (Gauthier, 2016).

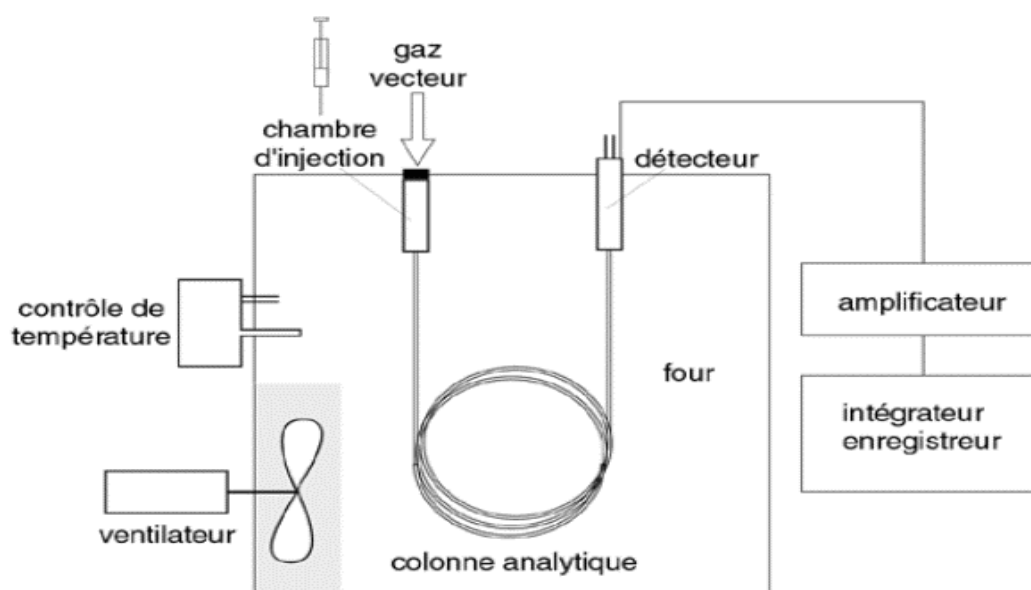


Fig. 11: Chromatographie en phase gazeuse (Ranger, 2015)

Tableau 10 : Quelques types de détecteurs/d'analyseurs associés aux CLHP et CPG (Heit, 2015).

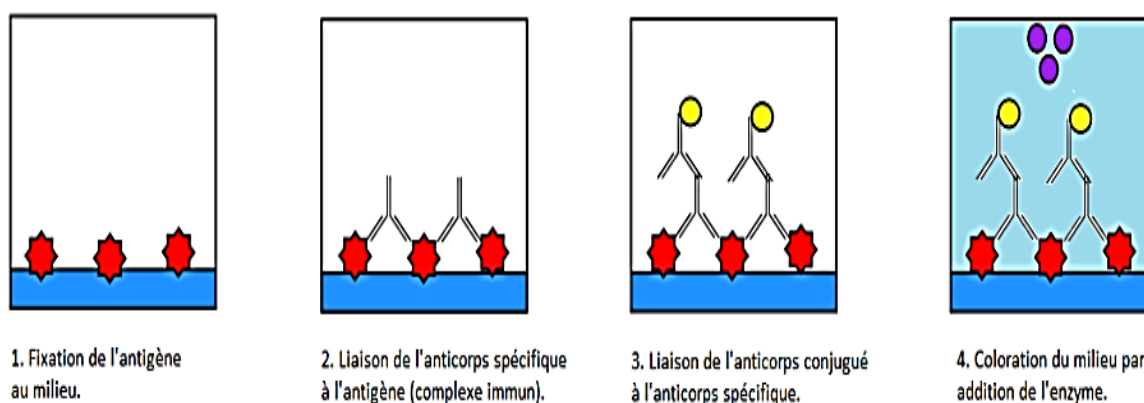
Types d'analyseurs	Caractéristiques
<b>Spectrophotomètre UV - visible</b>	A longueur d'onde variable A barrette de diodes UV (deutérium) - visible (tungstène) - Enregistrement du spectre lors de l'élution des composés
<b>Spectrofluorimètre</b>	Lampes au deutérium, au xénon-mercure ou laser, nécessite la présence de chromophores
<b>Réfractomètre différentiel</b>	Carbones asymétriques
<b>Détecteur à ionisation de flamme</b>	Le plus courant en CPG,
<b>MS</b>	Le gaz de nébulisation correspond au gaz de séchage
<b>MS/MS</b>	Fractionnement des ions après une analyse primaire

#### 1.1.4. ELISA

La méthode ELISA (Enzyme Linked Imuno-Adsorbent Assay) est une méthode immuno-enzymatique, elle est développée dans les années 70. Elle possède une bonne sensibilité et une bonne spécificité lors de la détection des mycotoxines (les résultats du dosage sont obtenus après un court délai de quelques heures (3 à 24 heures). Elle est très populaire actuellement en raison de son coût relativement faible et de son application facile (Gargouri, 2020 ; Gauthier, 2016 ; Turner et al., 2009).

ELISA est un test qualitatif et semi-quantitatif principalement employée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Le test ELISA est une méthode utilisant un ou deux anticorps, un de ces anticorps est spécifique de l'antigène recherché

(la toxine fongique), tandis que l'autre réagit aux complexes immuns formés (complexes antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme et Parmi les enzymes les plus communément utilisées dans le marquage la peroxydase et la phosphatase alcaline (PA). Cette enzyme permet de catalyser une réaction qui libère un substrat chromogène, capable de colorer le milieu (figure 12). Cette coloration proportionnelle à la quantité de toxines contenues dans l'échantillon, pourra ensuite être appréciée par colorimétrie (Gargouri, 2020 ; Gauthier, 2016). Cette méthode permet la détection spécifique de quelques types de mycotoxines comme les aflatoxines (AFs), fumonisines, trichothécènes (TCT), l'ochratoxine (OTA) et le zéaralénone (ZEN) (Gargouri, 2020).



**Fig. 12:** Les différentes étapes du test ELISA (Gauthier, 2016)

## 1.2. Méthodes d'analyse de quelques mycotoxines

Le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires (Gallotti et Fremy, 2006).

### 1.2.1. Aflatoxine

Les méthodes validées de dosage des aflatoxines totales (AFB1+B2+G1+G2) ou AFB1 seule sont généralement basées sur des systèmes chromatographiques de purification et de séparation (telle que la chromatographie liquide haute performance HPLC). À côté de ces méthodes quantitatives des méthodes immuno-enzymatiques telles que ELISA. Cet outil est appliqué surtout au dosage de l'AFB1 dans les matières premières et les grains (Gallotti et Fremy, 2006).

### ***1.2.2. Ochratoxine A***

Les méthodes de détection de l'OTA sont l'ELISA, CCM (aujourd'hui moins utilisée que dans le passé) et la méthode la plus utilisée c'est HPLC-FD, alors que le couplage GC-MS s'est avéré mal adapté à l'analyse de l'OTA. Selon les matrices, les limites de quantification sont comprises entre 0,01 et 0,1 µg/L pour les vins, 0,5 et 2 µg/kg pour les céréales et 0,1 et 0,5 µg/kg pour les abats (Gallotti et Fremy, 2006).

### ***1.2.3. La zéaralène***

Plusieurs approches analytiques basées sur des méthodes immunologiques (l'ELISA), a été développée pour la détermination de la zéaralène dans les céréales ou le lait, la limite basse de performance est de l'ordre de la dizaine à la centaine de µg/kg. Et les méthodes physico-chimiques, la chromatographie couche mince est pratiquement abandonnée aujourd'hui au profit de la HPLC et la CPG. Le principe de détection repose très fréquemment sur la détection fluorimétrique mais également UV (longueur d'onde fixe ou variable), les limites de quantification sont comprises entre 5 et 10 µg/kg (Gallotti et Fremy, 2006).

### ***1.2.4. La fumonisine***

Le dépistage des fumonisines FB1 et FB2 dans le maïs et les aliments peut se réaliser par des immuno-essais de type ELISA.

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection fluorimétrique après dérivation de l'extrait permet de quantifier les fumonisines dans les différentes matrices. Les limites de quantification sont comprises entre 50 et 100 µg/kg selon les matrices (Gallotti et Fremy, 2006).

### ***1.2.5. La patuline***

Les méthodes de dosage les plus récentes c'est la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à un détecteur spectrométrie de masse. Les limites de détection de la patuline sont comprises entre 1 et 10 µg/L dans le jus de pomme. Il existe une méthode validée pour les jus et compotes de pomme (Gallotti et Fremy, 2006).

# CONCLUSION

---

## Conclusion

---

Les moisissures sont des organismes ubiquitaires, susceptibles de se développer à tous les stades de la production agro-alimentaire ; que ce soit aux champs, au moment du stockage ou lors de la transformation. Du champ jusqu'à l'assiette du consommateur, de nombreux champignons sont susceptibles de se développer et de sécréter des toxines fongiques, si un certain nombre de conditions sont réunies (conditions météorologiques favorables, composition idéale du milieu de croissance...).

Les mycotoxines représentent un réel danger pour la santé humaine et animale. Cependant, la présence de toxines et de champignons dans les aliments est aléatoire et rend délicate l'évaluation du risque mycotoxique, posant ainsi un problème de sécurité alimentaire.

Il est nécessaire de connaître les taux de toxines fongiques dans les matières premières alimentaires. Pour ce fait, différentes techniques de détection de ces mycotoxines ont été développées : des méthodes physico-chimiques comme la « chromatographie sur couche mince » (CCM), la « chromatographie liquide à haute performance » (CLHP) et la « chromatographie liquide en phase gazeuse » (CLPG), Et des méthodes immunochimiques comme le test ELISA.

**RÉFÉRENCES**

---

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- 1- Abbes, S., Ben Salah-Abbes, J., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., AbdelWahab, M.A., Oueslati, R. (2006). Preventive role of phyllosilicate clay on the immunological and biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. *International Immunopharmacology* 6, 1251-1258.
- 2- Arnold, M. E. N. (2015). Inventaire et analyse chimique des exsudats des plantes d'utilisation courante au Congo-Brazzaville. 228 pages. Thèse de doctorat, Chimie, Ecole doctorale470 : chimie de Paris sud, Université Paris-sud, France.
- 3- AURELIE, L (2013). Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. *Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne*, vol. 195, p. 9-27.
- 4- Bennett, J. W., Klich, M. (2003). *Mycotoxins*. **Clinical Microbiology Reviews** 16, 497-516.
- 5- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., & Cleveland, T. E. 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 83-93.
- 6- Bouslimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., Bacha, H. (2008). Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicology* 251, 1-7.
- 7- Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. (2005). *Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of Penicillium verrucosum on wheat grain*, **Journal of Applied Microbiology** 99, 1215-1221.
- 8- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium mycotoxins. chemistry, genetics, and biology*. St Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- 9- Escrivá, L., Font, G., and Manyes, L. (2015). In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology* 78, 185–206.
- 10- Galotti, S., Fremy, J.M. (2006). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. France. p82.
- 11- Gargouri, D. (2020). Synthèse de réactifs multifonctionnels et d'analogues de mycotoxines. Application à la détection de mycotoxines dans des solutions alimentaires.

236 pages. Thèse de doctorat, chimie bio-organique, Université de Rouen Normandie, France.

- 12-** GAUTHIER, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. 132 pages. Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie, Sciences pharmaceutiques, université de Bordeaux, France.
- 13-** Grine, Z., Selila, L. (2018). Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'irbesartan dans des comprimés de 150 mg par la chromatographe liquide a haute performance. 146 pages. Thèse de doctorat, faculté de pharmacie, Université de Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.
- 14-** Groopman J.D, Croy R.G, Wogan G.M. In vitro reactions of aflatoxin B1-adducted DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 78. USA, 1981
- 15-** Heit, S. (2015). Identification de Fusarium et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. 129 pages. Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université de Lorraine, France.
- 16-** HOUISSA, H. (2020). Les Mycotoxines du mil : occurrence et flore fongique. 259 pages. Thèse pour obtenir le grade de docteur, Sciences Biologiques Mycologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier, université de Tunis El-Manar, Tunisie.
- 17-** Jyoti S., Alka M. (2020). *Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods : a review*. Food science & nutrition, no.8, p. 2183-2204.
- 18-** Kurata, H. (1990). Mycotoxins and mycotoxicoses. IN A. E. Pohland, V.R. Dowell, & J.L. Richards (EDs.), Microbial toxins in foods and feeds. New York, USA: Plenum Press, 249-259.
- 19-** Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie: Incidence et profils écophysiologiques. 225 pages. Thèse de doctorat. Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Tunisie.
- 20-** Liu, B. H., Yu, F. Y., Wu, T. S., Li, S. Y., Su, M. C. Wang, M. C., Shih, S.M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191, 255-263.
- 21-** MAKHLOUF, J. (2019). Caractérisation de la biodiversité des souches d'Aspergillus de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique. 142 pages. Thèse de doctorat, pathologie, toxicologie, génétique et nutrition, université de Toulouse, France.

- 22-** Nährer K, Kovalsky P. Surveying the mycotoxin threat. The where and what of mycotoxin contamination. BIOMIN Mycotoxin survey 2013. Science and Solutions 5, 2014. 12p.
- 23-** Pfohl-Leszkowicz A. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Paris :Tec&Doc, 1999. 47
- 24-** Pfohl-Leszkowicz, A. (2001). Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. Tec & Doc, 3-14.
- 25-** 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.
- 26-** Ranger, J. (2015). Les techniques de contrôle analytique adaptées à la lutte contre les médicaments de contrefaçon. 109 pages. Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université de Limoges, France.
- 27-** Shier, W.T., Sier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J. (2001). *Structure-activity relationships for human oestrogenic activity in zearalenone mycotoxins*. **Toxicol** 39, 1435-1438.
- 28-** Sondergaard, T.E., Hansen, F.T., Purup, S., Nielsen, A.K., Bonefeld-Jørgensen, E.C., Giese, H., and Sørensen, J.L. (2011). Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast .cancer cells in vitro. *Toxicol. Lett.* 205, 116–121.
- 29-** Tabuc, C. (2007). Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. 190 pages. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique, Toulouse, France.
- 30-** Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S.A. (2009). *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review*. *Analytica Chimica Acta* 632, 168–180.
- 31-** Wen, J. ; Kong, W. ; Hu, Y. ; Wang, J. ; Yang, M. Multi-Mycotoxins Analysis in Ginger and Related Products by UHPLC-FLR Detection and LC-MS/MS Confirmation. *Food Control* **2014**, 43, 82–87