

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE KOUBA-ALGER



N° d'ordre: DOC/... /2020

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de
DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES
SPECIALITE: Microbiologie Appliquée

Présentée par

ZEBIRI SALIHA

Evaluation de la contamination du blé et de ses dérivés consommés en
Algérie par les champignons ochratoxinogènes et par l'ochratoxine A

Soutenu le.10 .../ 10.... / 2020

Devant le jury d'examen composé de:

M. Kameli Abdelkrim	Professeur, ENS de Kouba, Alger	Présidente
M. Abderrahmani Ahmed	Professeur, USTHB, Alger	Examineur
Mme. Meklat Atika	Professeur, USD Blida	Examinatrice
Mme. Merrouche Rabia	Maître de Conférences A, ENS de Kouba, Alger	Examinatrice
M. Riba Amar	Professeur, UMBB, Boumerdess	Directeur de thèse
M. Mokrane Salim	Professeur, ENS de Kouba, Alger	Invité

*Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux,
Louange à Allah, Seigneur de l'univers.*

*Que les salutations d'Allah soient sur son messager qu'il a envoyé en qualité de
miséricorde universelle, ainsi que sur ses compagnons et ses frères jusqu'à la
résurrection.*



الحمد لله الذي علم الإنسان ما لم يعلم

TOUT D'ABORD, JE REMERCIE DIEU, LE GENEUX QUI A ENSEIGNE L'HOMME CE QU'IL NE SAVAIT PAS.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS

INDEX DES FIGURES

INDEX DES TABLEAUX

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

RESUMÉ

ABSTRACT

ملخص

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I. Les champignons	4
1. Identification	4
1.1. Identification morphologique	4
1.1.1. Examen macroscopique des cultures	4
1.1.2. Examen microscopique des cultures	5
a) Thalle végétatif	5
b) Origine endogène ou exogène des spores	5
c) Aspect des spores	5
d) Mode de groupement des conidies	6
1.2. Identification moléculaire	6
2. Champignons toxigènes	7
2.1. Genre <i>Aspergillus</i>	7
2.2. Genre <i>Penicillium</i>	9
2.3. Genre <i>Fusarium</i>	10
2.4. Genre <i>Alternaria</i>	11
II- Les mycotoxines	12
1. Les principales denrées concernées	12
2. Biosynthèse des mycotoxines	14
3. Répartition géographique des principales mycotoxines	15
4. Exposition	16
5. Régulation et législation des mycotoxines dans le monde	17
III. l'ochratoxine A, contaminant majeur du blé et ses dérivés	19
1. Production du blé	19
1.1. Production mondiale	19
1.2. Production en Algérie	20
1.3. Importation du blé en Algérie	21

2. Présentation de l'ochratoxine A	23
3. Propriétés physico-chimiques	23
4. Champignons ochratoxinogènes dans le blé et ses dérivés	24
4.1. <i>Aspergillus</i>	24
4.1.1. Section Flavi	24
4.1.1.1- <i>Aspergillus flavus</i>	25
a) Caractères culturels	25
b) Morphologie microscopique	25
4.1.1.2- <i>Aspergillus alliaceus</i>	26
4.1.2. Section Circumdati	26
4.1.2.1. <i>Aspergillus ochraceus</i>	27
a) Caractères culturels	27
b) Morphologie microscopique	27
4.1.3. Section Nigri	28
a) Morphologie microscopique	29
a) Caractères culturels	29
b) Morphologie microscopique	30
4.2. <i>Penicillium</i>	30
4.2.1. Morphologie microscopique	31
5. Toxicocinétique de l'Ochratoxine A	31
6. Toxicité de l'OTA	33
6. 1. Néphrotoxicité	33
6. 1.1. Mécanisme de la néphrotoxicité	34
6. 2. Carcinogénicité	35
6. 3. Génotoxicité et mutagénicité	35
6. 4. Immunotoxicité	35
6. 5. Tératogénicité	36
7. Contamination du blé par l'Ochratoxine	37
8. Contamination par l'ochratoxine A de l'ensemble de la chaîne alimentaire	39
9. Méthodes d'analyse de l'ochratoxine A dans les aliments	40
9. 1. Extraction	40
9. 2. Détection	40
10. Les procédés de décontamination	41
10.1. Mise en place d'un plan de contrôle et d'analyse des points critiques	41
10.2. La décontamination	43
I. Matériel	44
1. Echantillons utilisés	44
3. Milieux de culture	44
4. Appareillage, produits chimiques et standards analytiques	45
II. METHODES	45
1. Collection des échantillons	45
1.1. Echantillons de blé en grain	45
1.2. Echantillons de blé et dérivés prélevés au niveau d'une meunerie et d'une semoulerie	48
2. Détermination de la teneur en humidité	52
3. Etude de la mycobiota	52
3.1. Dénombrement et isollements de la flore fongique	52
3.1.1. Méthode directe	52
3.1.2. Technique de suspension-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé	53
3.2. Identification morphologique de la flore fongique	55
4. Etude du pouvoir producteur des aflatoxines et d'ochratoxine A	55
4.3.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture	55
4.3.2. Culture et extraction	56

4.3.3. Analyse par chromatographie sur couches mince (CCM)	56
4.4. Détection et quantification de l'OTA par HPLC	58
5. Identification moléculaire	58
5.1. Préparation du mycélium	59
5.2. Extraction de l'ADN fongique	59
a- Solution de lyse	59
b - Extraction d'ADN	59
5.3. Amplification de l'ADNr extrait par PCR	60
a) Amorces utilisées	60
b) Préparation du mélange réactionnel de PCR	60
c) Condition de la PCR et appareillage	62
5.4. Vérification des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	62
5.4.1. Préparation du gel d'agarose et électrophorèse	62
5.4.2. Révélation et visualisation des produits PCR	63
5.5. Séquençage de la région ITS et d'une partie du gène CaM et analyse phylogénique.	63
6. Evaluation de l'ochratoxine A dans le blé et ces dérivées	64
6.1. Extraction de l'OTA	64
6.2. Dosage de l'OTA par HPLC-FLD	64
RESULTATS ET DISCUSSIONS	66
RESULTATS ET DISCUSSIONS	66
I. Etude de la flore fongique	66
1. Dénombrement et Distribution des genres fongiques dans le blé stocké	66
2. Identification morphologique des champignons	67
3. Dénombrement et distribution des genres fongiques dans les dérivés du blé	70
3. 1. Blé avant transformation (blé dur et blé tendre)	71
3.2. Etapes de transformation et les produits finis du blé dur	72
1.2.3. Etapes de transformation et les produits finis du blé tendre	74
4. Distribution des sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons analysés	76
4. 1. Echantillons du blé stocké	77
4.2. Dérivés du blé	78
5. Conclusion	80
II. Etude du pouvoir producteur des aflatoxines et de l'ochratoxine A	81
1. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	81
1.1. Détection de la fluorescence sur milieu CAM et CCM	81
2. Etude du pouvoir producteur d'OTA par les isolats d'<i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i>	83
2.1. Détection de la fluorescence sur milieu CYA et par CCM	83
2.2. Détection et quantification de l'OTA par HPLC	85
2.3. Etude du pouvoir producteur de l'OTA par les isolats d' <i>Aspergillus</i>	86
2.3. Etude du pouvoir producteur d'OTA par les isolats de <i>Penicillium</i>	89
III. Identification moléculaire des isolats d'<i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i>	90
1. Identification moléculaire des isolats d'<i>Aspergillus</i>	91
2. Identification moléculaire des isolats de <i>Penicillium</i>	93
V. Production de l'OTA par les espèces du genre <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	95
1.1. Les espèces de la section <i>Circomdati</i>	96
1.2. Les espèces de la section <i>Flavi</i>	97
1.3. Les espèces de la section <i>Nigri</i>	97
2. Production de l'OTA par les espèces du genre de <i>Penicillium</i> identifiées	98

VI. Contamination de blé et ses dérivés par l'ochratoxine A	101
1. Données de validation de la méthode	101
2. Contamination du blé en grain	101
3. Contamination des dérivés de blé	103
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	108
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
ANNEXE I	138

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique	CAM	
ADNr18S	Adnr18s	CPA	Acide Cyclopiazonique
AIRC	International Agency For Research On Cancer	CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
AFB1	Aflatoxine B1	CYA	Czapeck Yeast Extract Agar
AFG	Aflatoxine G Pour Aflatoxin Green	dNTP	Désoxy Nucléotides
AFM	Aflatoxine M Pour Aflatoxin Milk	DON	Déoxynivalénol
AFSSA	Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments	dNTP	Désoxy Nucléotides
AFs	Aflatoxines	ENS	Ecole Normale Supérieure
ARN16s	Acide Ribonucléique 16s	ETS	Externally Transcribed Spacer
ATCC	American Type Culture Collection	FA/FB/FC/FP	Fumonisines A, B, C et P.
ATP	Adénosine Triphosphate	FAO	Food and Agriculture Organization
a_w	Activity of water	FBs	Fumonisines
Blast	Basic Local Alignment Search Tool	FA/FB/FC/FP	Fumonisines A, B, C et P.
BEN	Néphropathie Endémique des Balkans	HACCP	Hazard Analysys Critical Control Points
CAM	Coconut Agar Medium	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CCLS	Coopérative des Céréales et de légumes Secs	HPLC-FLD	High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection
CCM	Chromatographie sur Couche Mince	HT2	Toxine HT
CE	Commission Européenne.	IAC	Immuno Affinity Column
CFU	Unité Formant de Colonie.	IARC	International Agency for research on cancer.
CIN	Néphropathie Interstitielle Chronique	IgA ,IgG, IgM,	Immunoglobulin G, M, A
CNIS	Centre National de l'Informatique et des Statistiques	ITGC	Institut Technique des Grandes Cultures
IGS	Inter Genic Spacer	OTHQ	Hydroxyl quinone ochratoxin
IL-2	Interleukine 2	pc	poids corporel

Liste des abréviations

INRA	Institut National de la Recherche Agronomique	PCR	Polymerase Chain Reaction
ITS		PDA	Potato, Dextrose, Agar
LBSM	Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens	ROS	reactive oxygen species
LC – FLD	liquid Chromatography with Fluorescence	Rpm	Rotation Par Minute
MADR	Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural.	Rf	rapport frontal
Min	Minutes	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
LOD	Limit of Detection	Sp/spp	Specie
LOQ	Limit of Quantification	TC	Terpenes Cyase
MADR	Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural.	TE	Tris-EDTA
Min	Minutes	UE	Union Européenne
Mg	Microgramme	UPC	Unité de Production Céréalière
NEB	Néphropathie Endémique des Balkans.	USA	Etats Unis d’Amérique
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthetases	USDA	United States Department of Agriculture
NRRL	Northern Regional Research Laboratory	UV	Ultra Violet
OAIC	Office Algérien Interprofessionnel des Céréales	UV-DAD	Ultraviolet Diode Array Detector
OTA	Ochratoxine A.	ZEA	Zéaralénone

Index des figures

Figure 1. Représentation d'une unité d'ADN ribosomal. ETS: Espaceur Transcrit Externe (Externally Transcribed Spacer). ITS: Espaceur Transcrit Interne (Internally Transcribed Spacer). IGS:espaceur intergénique non transcrit (Inter Genic Spacer).....	6
Figure 2. A. Schéma représentant la structure <i>Aspergillus</i> ; tête unisériée et bisériée, B. Aspect microscopique (Chabasse et al., 2002; Frisvad et al., 2019).....	8
Figure 3. Schéma des différentes dispositions de verticilles chez <i>Penicillium</i> sp. (Samson et Frisvad, 2005).....	10
Figure 4. A: Caractères morphologiques de <i>Fusarium</i> ; B: Schéma de conidies d' <i>Alternaria</i> (http://mycota-crcr.mnhn.fr/site/accueil.php?lang=eng).....	12
Figure 5. Voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc, 2009).....	15
Figure 6. Carte des taux de contamination alimentaire des principales mycotoxines dans différentes régions du monde (Naehrer, 2015).....	16
Figure 7. a) Blé tendre. b) Blé dur.....	19
Figure 8. Production mondiale des céréales et utilisation des stocks (2008-2019).....	20
Figure 9. Les pays fournisseurs de l'Algérie en blé dur.....	22
Figure 10. Les pays fournisseurs de l'Algérie en blé tendre.....	22
Figure 11. Structures chimiques de l'ochratoxine A (bleu foncé: partie phénylalanine; rouge: anneau de dihydroisocoumarine; vert: hydrogènes acides), B et C. Les structures mises en évidence (bleu clair) sont caractéristiques des trois différentes molécules d' ochratoxine (Kőszegi et Poór, 2016).....	24
Figure 12. A. flavus, A. aspect macroscopique (culture de 7 jours sur CYA). B et C. Aspect microscopique: B. La tête conidienne. C. sclérotés (Frisvad <i>et al.</i> , 2019).....	26
Figure 13. A. alliaceus, A. aspect macroscopique (Culture de 7 jours sur CYA) B. aspect microscopique des sclérotés (Frisvad et al., 2019).....	26
Figure 14. Aspergillus ochraceus. A. aspect macroscopique: culture de 7 jours sur CYA. B-D. Aspect microscopique: B. la tête conidienne. C. conidies. D. sclérotés (Frisvad et al., 2019).....	28
Figure 15. Aspect microscopique des conidiophores de la section Nigri: A. unisériés. B. bisériés (Varga et al., 2011).....	29
Figure 16. (I) Culture sur milieu CYA de (A) <i>A. niger</i> , (B) <i>A. carbonarius</i> . (II) Aspect microscopique des Conidies de (A) <i>A. carbonarius</i> et (B) <i>A. niger</i> (Samson et al., 2007).....	30
Figure 17. Penicillium nordicum. A. aspect macroscopique: culture de 7 jours sur CYA. B et C. Aspect microscopique: B. la tête conidienne. C. Conidies (Samson et Frisvad, 2005).....	31
Figure 18. Les principaux métabolites de l'OTA (Ringot et Chango, 2009).....	32
Figure 19. Résumé des effets biochimiques de l'OTA: OTHQ: Hydroxyl quinone ochratoxin; OTB: Dechlorinated ochratoxin; LIPOX: Lipoperoxidation; Nox: Nitrogen oxide; ROS: Reactive oxygen species (Malir et al., 2016).....	37
Figure 20. Contamination de la chaîne alimentaire et les moyens de prévention (Pfohl-Leszkowicz et Manderville, 2007).....	41
Figure 21. Localisation géographique des régions de prélèvements des échantillons de blé et dérivés.....	46
Figure 22. Entreposage de blé au niveau des Coopératives des Céréales et des Légumes Secs. a. Silos. b. Sacs de toile de jute, empilés sur des palettes. c. En vrac.....	47
Figure 23. Prélèvements des échantillons de blé stockés au niveau des hangars et les silos.....	47
Figure 24. Diagramme des phases du procédé de fabrication des semoules de blé dur, montrant les positionnements des prélèvements des échantillons.....	49
Figure 25. Diagramme des phases ou étapes du procédé de fabrication de la farine de blé tendre, montrant les positionnements des prélèvements des échantillons.....	50

Figure 26. Représentation schématique de la méthode directe utilisée pour l'analyse fongique.	54
Figure 27. Représentation schématique de la technique de suspension-dilutions, utilisée pour l'analyse fongique.	54
Figure 28. Schéma du protocole de l'étude du pouvoir producteur des AFS et de l'OTA.	57
Figure 29. Principe de fonctionnement d'une colonne d'immunoaffinité.	64
Figure 30. Les principaux genres de moisissures développées sur les grains du blé cultivé sur milieu DRBC.	67
Figure 31. Les moisissures (dominance du genre <i>Aspergillus</i>) développées sur les grains de blé, cultivé sur milieu DRBC.	67
Figure 32. Aspects macroscopiques et microscopiques (40 des principaux genres de moisissures développées sur les grains de blé et ses dérivés.	68
Figure 33. Aspects morphologiques des moisissures des échantillons des dérivés du blé sur milieu DRBC.	70
Figure 34. Fréquence des genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans les échantillons des dérivés du blé dur, collectés au niveau de la semoulerie de M'sila.	73
Figure 35. Fréquence des genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans les dérivés du blé tendre, collectés au niveau de la meunerie de M'sila.	75
Figure 37. Taux de contamination des grains de blé par les sections d' <i>Aspergillus</i>	77
Figure 38. Fréquence des principales sections d' <i>Aspergillus</i> isolées des échantillons de dérivés de blé tendre, collectés au niveau de la meunerie de M'sila.	79
Figure 39. Fréquence des principales sections d' <i>Aspergillus</i> isolées des échantillons de dérivés de blé dur, collectés au niveau de la semoulerie de M'sila.	79
Figure 41. Localisation des tâches bleues d'aflatoxine B produites par les isolats aflatoxinogène après CCM et visualisation sous UV 365 nm.	82
Figure 42. Mise en évidence de la production d'OTA par les isolats de la section <i>Circomdati</i> (Z1), section <i>Nigri</i> (Z14) et <i>Penicillium</i> sp. sur milieu CYA par fluorescence sous lumière UV (365 nm).	84
Figure 43. Localisation des tâches bleues verdâtres d'OTA produites par les isolats ochratoxinogènes après CCM et visualisation sous UV 365 nm.	84
Figure 44. Courbe d'étalonnage de l'OTA.	85
Figure 45. Chromatogramme d'un standard OTA 1mg/L.	86
Figure 46. Spectre d'absorption dans l'UV visible de l'OTA produite par l'isolat Z43 dissous dans du méthanol.	86
Figure 47. Profil d'élution en HPLC des extraits méthanoliques de l'OTA produite par l'isolat Z10.	88
Figure 48. Profil d'élution en HPLC de l'extrait méthanolique de l'OTA produite par l'isolat Z1588	
Figure 49. Profil électrophorétique des produits PCR obtenus par amplification de la région CMD5- CMD6. Lignes 1-15 et 17- 18: isolats, M: marqueur de taille (100 pb), 16 témoin sans ADN (remplacé par de l'eau).	90
Figure 51. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences du gène CaM, des isolats d' <i>Aspergillus</i> provenant des échantillons de blé et ses dérivés.	92
Figure 52. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences du gène de la CaM, des isolats rattachés au genre <i>Penicillium</i> provenant des échantillons de blé et ses dérivés.	96

Index des tableaux

Tableau 1. Principales mycotoxines et espèces fongiques productrices et les principales denrées alimentaires contaminées.	13
Tableau 2. Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme	17
Tableau 3. Teneurs maximales ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord.	17
Tableau 4. Evolution de production et de rendement du blé dur et blé tendre en Algérie de et les importations.....	22
Tableau 5. Présence de l'OTA dans les grains de céréales pour différents pays.	38
Tableau 6. Répartition selon l'origine, la nature et le nombre des échantillons prélevés aux niveaux des CCLS de blé et l'ITGAC.	48
Tableau 7. Répartition des échantillons prélevés des dérivés de blé dur et leurs distributions.	52
Tableau 8. Nombre d'échantillons des dérivés de blé tendre et leurs distributions.....	52
Tableau 9. Séquence des amorces utilisées en PCR.....	62
Tableau 10. Composition du mélange réactionnel pour un volume de 25 μl	62
Tableau 11. Les résultats de dénombrement (Taux de contamination) des champignons des 90 échantillons de blé stockés.	67
Tableau 12. Fréquence de contamination par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans les échantillons de grains blé collectés au niveau de la semoulerie et la meunerie de M'sila.....	71
Tableau 13. Taux de contamination par les moisissures et la fréquence des principaux genres dans les dérivés du blé dur, collectés au niveau de la semoulerie de M'sila.	73
Tableau 14. Dénombrement des moisissures et fréquence des principaux genres dans les dérivés du blé tendre collecté au niveau de la meunerie de M'sila.	75
Tableau 15. Pourcentages de similarités des 18 isolats des différentes sections d' <i>Aspergillus</i>	91
Tableau 16. Pourcentages de similarités des isolats des différentes sections de <i>Penicillium</i> avec les espèces de référence les plus proches.....	94
Tableau 17. Distribution des isolats d' <i>Aspergillus</i> producteurs d'OTA dans les échantillons de blé et dérivés. La production de l'OTA par les isolats des différentes sections d' <i>Aspergillus</i> en relation avec l'origine et localité.	87
Tableau 18. Distribution des isolats de <i>Penicillium</i> producteurs d'OTA dans les échantillons de blé et dérivés, en relation avec l'origine et localité.....	88
Tableau 19. Production de l'OTA par les différentes souches du genre <i>Aspergillus</i> identifiées.....	97
Tableau 20. Production de l'OTA par les différentes souches du genre <i>Penicillium</i> identifiées.....	99
Tableau 21. Résultats de la validation de l'analyse de l'OTA par HPLC dans les échantillons de blé et ses dérivés.....	101
Tableau 22. Teneurs en OTA dans les échantillons de blé	102
Tableau 23. Détection de l'OTA dans les échantillons de blé dur collectés au niveau de la semoulerie dans la région de M'sila.....	105
Tableau 24. Teneurs de l'OTA dans les échantillons de blé tendre collectés au niveau de la meunerie dans la région de M'sila.	106

Liste des publications et des communications

I. Publications internationales entrant dans le cadre des travaux de la thèse

Zebiri, S., Mokrane S., Verheecke-Vaessen C., Choque E., Reghioui, H., Sabaou, N., Riba, A. (2018). Occurrence of ochratoxin A in Algerian wheat and its milling derivatives. *Toxin Reviews*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1438472>. IF = 3.42

Un exemplaire de la publication est donné à la fin du manuscrit.

II. Communications entrant dans le cadre des travaux de la thèse

Communication orale

Zebiri S., Reghioui H., Riba A., Verheecke C., Mokrane S. et Sabaou N. Evaluation de la contamination en champignons ochratoxinogènes et en ochratoxine A (OTA) dans le blé et ses dérivés. **Séminaire International sur les Sciences Alimentaires SISA. Constantine -les 14, 15 et 16 octobre 2014.**

Zebiri S., Reghioui H., Mokrane S., Verheecke C., Mathieu F., Sabaou N. et Riba A. Evaluation de la contamination du blé et de ses dérivés par les champignons ochratoxinogènes et par l'ochratoxine A. **1ères Journées de Biologie des Systèmes Microbiens, JBSM 2014. Les 14 et 15 décembre 2014.**

Zebiri S., Reghioui H., Riba A., Verheecke C., Mokrane S. et Sabaou N. Evaluation de la contamination en champignons ochratoxinogènes et en ochratoxine A (OTA) dans le blé et ses dérivés. **1er Séminaire International de biologie bio ressources et sécurité des aliments. Béchar 06-08 décembre 2014.**

Bouti K., **Zebiri S.**; Mokrane S.; Mathieu F., Sabaou N. et Riba A. **2 èmes Journées de Biologie des Systèmes Microbiens, JBSM 2016. 26 et 27 novembre 2016.**

Communication affichée

- **ZEBIRI S.**, Mokrane S., Verheecke-Vaessen C., Reghioui H., Nasserline S., Mathieu F. And Amar Riba. OCCURRENCE OF OCHRATOXIN A IN ALGERIAN WHEAT AND ITS MILLING DERIVATIVES **1st International Congress en Biotechnologie for Sustainable Développement (CIBSDD). Boumerdes, Algeria on October, 24-25, 2017.**
- **Zebiri S.**, Riba A., Reghioui H., Bouti K., Mokrane S. et Sabaou N. Evaluation de la contamination en champignons toxigènes et en mycotoxines dans le blé et ses dérivés. **2ème Congrès International sur la Biodiversité Végétale - Marrakech 27 - 29 - 3- 2014.**
- **Zebiri S.**, Reghioui H., Mokrane S., Bouti Karima; Mathieu F., Sabaou N. et Riba A. Evaluation de la contamination du blé et de ses dérivés par les champignons ochratoxinogènes et par l'ochratoxine A. **2 èmes Journées de Biologie des Systèmes Microbiens, JBSM 2016. 26 et 27 novembre 2016.**
- Bouti K., Riba A., **Zebiri S.**, Azzoune N., Sabaou N. **2ème Congrès International sur la Biodiversité Végétale - Marrakech 27 - 29 - 3- 2014.**

RESUMÉ

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par certaines espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* qui est rencontré surtout dans les céréales, café et produits de la vigne. Son accumulation dans l'organisme peut être à l'origine des effets néphrotoxiques, tératogènes, immunosuppresseurs et carcinogènes. L'objectif de ce travail est d'étudier la contamination du blé et ses dérivés, consommés en Algérie par les champignons toxiques et par l'OTA et l'évolution de cette contamination pendant le processus de transformation du blé (blé avant transformation, blé à différentes étapes de mouture et les produits finis). À cet effet, une analyse de 200 échantillons a été effectuée dont 90 échantillons du blé dur et du blé tendre et 110 échantillons de dérivés de blé provenant d'une meunerie et d'une semoulerie. Les résultats de l'analyse mycologique, montrent un taux de contamination fongique moyen allant de 60% à 100%. Les isolats fongiques identifiés, appartiennent principalement aux genres *Aspergillus* (70%), *Penicillium* (27,5%), *Alternaria* (40%) et *Mucor* (19,4%). Les échantillons des étapes du processus de la mouture du blé tendre, présentent des teneurs en moisissures allant de 707 à 2950 UFC/g et la valeur moyenne obtenue dans les échantillons des dérivés du blé dur est de 1570 UFC/g. La densité de la flore fongique a été plus importante dans les produits destinés à la consommation animale dont la farine du blé dur (2525 UFC/g), les restes (3175 UFC/g) et le son de blé (2950 UFC/g). La faible densité fongique est remarquée dans la semoule fine (900 UFC/g) et la farine (800 UFC/g) destinée à la consommation humaine. Le genre *Penicillium* a été isolé dans 46% des échantillons analysés des dérivés du blé dur et dans 62,7% des échantillons analysés des dérivés du blé tendre tandis que, le genre *Aspergillus* est celui qui domine dans la majorité des échantillons analysés. Les espèces des sections *Nigri*, *Circumdati* et *Fumigati* ont été révélées avec des proportions moins importantes que celles de la section *Flavi*. Parmi les 439 isolats des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, 50 isolats soit 12% se sont révélés producteurs d'OTA. L'identification moléculaire des isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* par le séquençage des régions ITS1-5.8S -ITS2 de l'ADNr et une partie du gène de la calmoduline (CaM), indique que les espèces impliquées dans la production d'OTA dans le blé et ses dérivés sont surtout *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkia*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius* et *Penicillium islandicus*. Les quantités de l'OTA produites par ces espèces qui sont déterminées par HPLC sont comprises entre 8,93 et 3033,3 µg/g pour *Aspergillus* et entre 0,8 et 43,9 µg/g pour *Penicillium*.

Après une extraction et purification par colonnes d'immuno-affinité, l'analyse par HPLC-FLD a révélé la présence d'OTA dans 62 sur les 81 échantillons de blé et de ses dérivés, soit des taux de 71,8% et 80,8%, respectivement avec des concentrations allant de 0,84 à 34,75 µg/kg. Trente échantillons (48,4%) dépassent les normes établies par l'union européenne. Nos résultats ont montré que l'OTA n'était pas éliminé après le processus de broyage mais qu'il était simplement réparti entre les différents fragments de broyage. Les niveaux d'OTA sont légèrement plus faibles dans les fractions destinées à la consommation humaine (semoule 2,42 µg/kg et farine 9,49 µg/kg) par rapport aux fractions destinées à l'alimentation animale (son de blé 11,32 µg/kg). Les résultats obtenus montrent clairement que le blé et ses dérivés consommés en Algérie sont fortement contaminés par les espèces ochratoxinogènes et par l'OTA. Ceci impose à prendre des mesures de bonnes pratiques agricoles et d'hygiène visant à réduire la contamination de manière significative afin d'assurer un produit de bonne qualité sanitaire sans risque pour le consommateur.

Mots clés: Blé, farine, semoule, OTA, *Aspergillus*, *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, ITS, CaM, Algérie.

Abstract

Evaluation of the contamination of consumed wheat and its derivatives by ochratoxinogenic fungi and ochratoxin A in Algeria.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by certain species of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* that are found mainly in cereals, coffee and grapevine products. Its accumulation in the body can cause nephrotoxic, teratogenic, immunosuppressive and carcinogenic effects. The objective of this work is to study the contamination of consumed wheat and its derivatives by toxic fungi and OTA and the evolution of this contamination during the wheat processing (wheat before processing, wheat at different milling stages and finished products) in Algeria. For this purpose, an analysis of 200 samples was carried out, including 90 samples of durum wheat and common wheat and 110 samples of wheat derivatives collected from mills (semolina and flour manufactures). The results of the mycological analysis showed an average fungal contamination rate ranging from 60% to 100%. The identified fungal isolates belonged mainly to *Aspergillus* (70%), *Penicillium* (27.5%), *Alternaria* (40%) and *Mucor* (19.4%) genera. The samples collected from the different stages of common wheat milling process had mold contents ranging from 707 to 2950 UFC/g and the average value obtained in the samples of durum wheat derivatives was 1570 UFC/g. The density of the fungal flora was higher in products intended for animal consumption with durum wheat flour (2525 UFC/g), wheat scraps (3175 UFC/g) and wheat bran (2950 UFC/g). The low fungal density was noted in fine semolina (900 UFC/g) and flour (800 UFC/g) that are intended for human consumption. The genus *Penicillium* was isolated in 46% of the analyzed samples of durum wheat derivatives and in 62.7% of the analyzed samples of common wheat derivatives. On the other hand, the *Aspergillus* genus dominated the majority of the analyzed samples. The sections *Nigri*, *Circumdati* and *Fumigati* were less abundant than those of the *Flavi* section. Among the 439 isolates of *Aspergillus* and *Penicillium* genera, 50 isolates representing 12% were found to be producers of OTA. Molecular identification of *Aspergillus* and *Penicillium* isolates by sequencing ITS1-5.8S-ITS2 regions of DNAr and a part of the calmodulin (CaM) gene indicated that the involved species in the production of OTA in wheat and its derivatives were mainly *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkia*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius* and *Penicillium islandicus*. The amounts of the species production of OTA were determined by and were between 8.93 and 3033.3 µg/g for *Aspergillus* and between 0.8 and 43.9 µg/g for *Penicillium*.

After extraction and purification by immunoaffinity columns, analysis by HPLC-FLD, revealed the presence of OTA in 62 out of 81 samples of wheat and its derivatives with rates of 71.8% and 80.8%, respectively with concentrations ranging from 0.84 to 34.75 µg/kg. Thirty samples (48.4%) exceed the standards established by the European Union. Our results showed that OTA was not eliminated after the grinding process, but that it was simply distributed between the different grinding fractions. OTA levels were slightly lower in the fractions intended for human consumption (semolina 2.42 µg/kg and flour 9.49 µg/kg) compared to fractions intended for animal feed (wheat bran 11.32 µg/kg). The obtained results demonstrate that wheat and its derivatives that are consumed in Algeria are heavily contaminated by ochratoxinogenic species and by OTA. This requires taking measures of good agricultural and hygienic practices aiming to significantly reduce contamination to ensure a product of good sanitary quality without risk for the consumer.

Keywords: Wheat, flour, semolina, *Aspergillus*, *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, ITS, CaM, OTA, Algeria.

ملخص تقييم تلوث القمح ومشتقاته المستهلكة في الجزائر، بواسطة الفطريات المنتجة للأكروتوكسين و الأكراتوكسين A.

ملخص

Ochratoxin A (OTA) الأكراتوكسين A (OTA) سم فطري ينتجه أنواع معينة من جنس الـ *Aspergillus* و الـ *Penicillium* يوجد بشكل رئيسي في منتجات الحبوب، البن والعنب. يمكن أن يسبب تراكمه في الجسم آثارًا سامة للكلى، آثارًا مشوهة، مثبطة للمناعة ومسرطنة. الهدف من هذا العمل هو دراسة تلوث القمح ومشتقاته المستهلكة في الجزائر بالفطريات السامة و OTA وكذلك تطور هذا التلوث أثناء عملية طحن القمح (قمح قبل التصنيع، القمح في مراحل مختلفة من الطحن والمنتجات النهائية). تم خلال هذه الدراسة تحليل 200 عينة: 90 عينة من القمح الصلب والقمح اللين و 110 عينة من منتجات القمح، تم الحصول عليها من مطحنة الدقيق والسميد.

تظهر نتائج التحليل الفطري وجود تلوث فطري بمعدل يتراوح بين 60% و 100% في جميع العينات التي تم تحليلها. تنتمي العزلات التي تم تحديدها من عينات القمح بشكل رئيسي إلى أجناس *Aspergillus* (70%)، *Penicillium* (27.5%)، *Alternaria* (40%) و *Mucor* (19.4%). تحتوي عينات مراحل عملية طحن القمح اللين على محتويات العفن تتراوح من 707 إلى 2950 UFC/g ومتوسط القيمة التي تم الحصول عليها في عينات مشتقات القمح الصلب هي 1570 UFC/g. كانت كثافة الفطرية أعلى في المنتجات المعدة للاستهلاك الحيواني: دقيق القمح الصلب (2525 UFC/g)، البقايا (3175 UFC/g) والنخالة (2950) UFC / g. لوحظت كثافة فطرية منخفضة في السميد الناعم (900 UFC/g) والدقيق (الفرينة) (800 UFC/g) المخصصة للاستهلاك البشري. تم عزل جنس الـ *Penicillium* بنسبة 46% في العينات التي تم تحليلها من مشتقات القمح الصلب وبنسبة 62.7% في العينات التي تم تحليلها من مشتقات القمح اللين بينما كان جنس *Aspergillus* هو الذي يسيطر في غالبية العينات التي تم تحليلها. كشفت النتائج أن أنواع الأقسام: *Nigri*، *Circumdati* و *Fumigati* سجلت بنسب أصغر من *Flavi* من إجمالي *Aspergillus*.

من بين 439 عزلة من جنس *Aspergillus*، *Penicillium*، تم العثور على 50 عزلة (12%) منتجة لـ OTA. يشير التشخيص الجزيئي باستخدام طريقة تضاعف سلسلة متعدد البلمرة (PCR) لمنطقة الحيز الاستنساخي الداخلي لمنطقة ITS1-ITS2 من 5.8S - DNAr وجزء من مورثة (CaM) لعزلات *Aspergillus* و *Penicillium*، إلى أن الأنواع المنتجة لـ OTA في القمح مشتقاته هي أساساً: *Aspergillus ochraceus*، *A. westerdijkia*، *A. alliaceus*، *A. carbonarius* و *Penicillium islandicus*. تتراوح تراكيز الـ OTA التي تنتجها هذه الأنواع والتي تم تحديدها بـ HPLC ما بين 0.83 و 3033.3 ميكروغرام/غرام لأنواع *Aspergillus* وبين 0.8 و 43.9 ميكروغرام / غرام لأنواع *Penicillium*.

كشفت التحليل بواسطة HPLC-FLD بعد استخدام الأعمدة المناعية (IAC) immunoadfinity columns للتنظيف، عن وجود OTA في 62 عينة من 81 عينة من القمح ومشتقاته، بنسبة 71.8% و 80.8% على التوالي بتركيزات تتراوح من 0.84 - 34.75 ميكروغرام / كغ. تجاوزت ثلاثون عينة (48.4%) المعايير التي وضعها الاتحاد الأوروبي. أظهرت نتائجنا أنه لم يتم التخلص من OTA بعد عملية الطحن ولكن تم إعادة توزيعه ببساطة بين نواتج الطحن. كانت مستويات OTA أقل قليلاً في النواتج المخصصة للاستهلاك البشري (السميد 2.42 ميكروغرام/كغ والدقيق 9.49 ميكروغرام/كغ) وأعلى في المشتقات المخصصة أساساً لتغذية الحيوانات (النخالة 11.32 ميكروغرام/كغ). يشكل وجود OTA في القمح للاستهلاك البشري في الجزائر مشكلة صحية خطيرة و جادة.

الكلمات الرئيسية: قمح، سميد، *Aspergillus*، *Flavi*، *Circumdati*، *Nigri*، *CaM*، *OTA*، الجزائر.