

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie environnementale et  
infectieuse*

### THEME

---

**Etude mycotoxicologique du café commercialisé  
dans la région de Laghouat**

---

**Présenté par :**

BOUAZZARA Houria, BOULELLI Nour El Houda

**Devant le jury :**

**Président(e) :** Mr. CHAIBI Rachid

**Rapporteur :** Mr. CHETATHA Mohamed

**Examineur (rice)s :** Mr. GACEM Mohamd Amine

**Soutenu publiquement le : 21 / 05 /2017.**

## ***Remerciements :***

*Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force, le courage, la patience et les moyens à fin de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de biologie, Facultés des sciences, Université Ammar Thelidji Laghouat.*

*Nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et remerciements au Mr. CHETATHA MOHAMMED. Enseignant, à l'Université Ammar Thelidji, Laghouat. Pour avoir accepté la charge d'être encadreur de ce mémoire. Nous le remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils, ses orientations et pour les efforts qu'il avait consentis durant la rédaction de ce mémoire, ainsi pour son soutien moral et scientifique qui nous a permis de mener à terme ce projet.*

*Un grand merci à Mr. CHAIBI RACHID. Le chef département de biologie. Qui nous a orienté à choisir ce sujet.*

*Notre reconnaissance profonde et nos remerciements vont aussi au membre du jury, pour avoir accepté l'examen et la discussion de notre travail,*

*Nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## ملخص :

التعرض المتكرر لجرعات منخفضة من السموم الفطرية تسبب تسمّات وأورام سرطانية . حيث أن الفطريات المفرزة للسموم يمكن العثور عليها في العديد من المنتجات الغذائية. والهدف من هذه الدراسة هو تحديد الفطريات المنتجة للسموم.

وقد أظهرت دراسة الفطريات المنتجة للسموم الفطرية في البن الأخضر وجود سلالات مفرزة للأوكراتوكسين A والأفلاتوكسين B لستة أنواع من البن الأخضر التي تُسوّق في منطقة الأغواط بما في ذلك : الأرابيكا (البرازيلية و الأوغندية) و الكانيفورا نوعية روبيسنا ( الفيتنامية، الاندونيسية ، الإيفوارية و الهندية). وقد تم تحديد جنس الفطريات من نوع *Aspergillus* المنتجة للسموم الفطرية باستخدام طرق العزل التالية: طريقة ورق النشاف وطريقة Ulster مع استعمال مصدران مختلفان للكربون، الغلوكوز و السكروز.

يتم الكشف عن الأفلاتوكسين و الأوكراتوكسين بواسطة تقنية (TLC) ، حيث أظهرت التحاليل الفطرية أن نوع *Aspergillus* هو الأكثر تواجدا متبوعا بـ *Pinicillium* و *Rhizopus*.

الأنواع التي تمّ تحديدها هي : *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. niger*.

الكلمات المفتاحية: الأمراض الفطرية ، الأوكراتوكسين A ، الأفلاتوكسين B<sub>1</sub> ، البن الأخضر (الأرابيكا و الروبيستا) ، *Pinicillium* ، *TLC*, *Aspergillus*

## Résumé :

L'exposition répétée à faible dose des mycotoxines induits des intoxications et des cancers, les moisissures sécrétrices de mycotoxines pourrait être trouvé dans plusieurs matrices alimentaires. L'objectif est de déterminer la mycoflore toxinnogène dans le café vert, l'étude a démontré la présence des souches sécrétrices d'OTA et AFB<sub>1</sub> dans les six variétés commercialisé dans la région de Laghouat notamment l'Arabica (Brésilienne et Ougandaise), et Robusta (Vietnamienne, Indonésienne, Ivoirienne et Indienne). L'identification des espèces toxinnogènes du genre *Aspergillus* est réaliser en suivant les méthodes d'isolement buvard et Ulster avec deux sources de carbone différentes le glucose et le saccharose. La détection d'aflatoxines et l'ochratoxine est faite par la technique CCM. L'analyse mycologique à montré que le genre *Aspergillus* est le plus dominant, suivie du *Rhizopus* et *Penicillium*. Les espèces identifiées sont *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. niger*. Mots clés : Mycotoxicoses, Ochratoxine A, Aflatoxine B<sub>1</sub>, Café vert (Arabica et Robusta), *Aspergillus*, *Pinicillium*, CCM.

## Abstract:

The repeat exposition in low dose of mycotoxins causes poisoning , intoxication and cancer , The mold that produce mycotoxins are found in several food stuff , the research of toxicogenic microflora in green coffee beans reveals the presence of OTA and AFB<sub>1</sub> , in several variety of green coffee Brazilian , Ugandan Arabica and Vietnamese , Indian , Ivorian , Indonesian Robusta that are commercialized in LAGHOUAT, the identification of mycotoxinogenic *Aspergillus* was done on different methods like the blotting and Ulster methods with two different origins of carbon Glucose and saccharose the TLC method was used to detect the OTA and AFB<sub>1</sub>.

The most found genus is *Aspergillus* , the *Rhizopus* and finally *Penicillium* , the species found are : *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. niger*.

Keywords: Mycotoxicosis , Ochratoxine A , Aflatoxin B<sub>1</sub> , Green coffee Arabica and robusta, *Aspergillus* , *Penicillium* , TLC .

## Sommaire

Remerciement	
Résumé	
Dédicace	
Sommaire	
Liste des figure	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Mycotoxines et santé.

I. Les mycotoxines .....	3
I.1. Propriétés de mycotoxines .....	3
I.2. Les facteurs influencent la production des mycotoxines .....	3
I.2.1. Facteurs intrinsèques .....	4
I.2.2. Facteurs extrinsèques .....	4
II. Les mycotoxicose .....	5
III. La néphropathie endémique des Balkans (NEB) .....	6
IV. Les différents types de mycotoxines .....	6
IV.1. L'ochratoxine .....	6
IV.1.1. L'ochratoxine A .....	6
IV.1.2. Structure chimique .....	6
IV.1.3. Propriétés physico-chimiques de l'ochratoxine A .....	8
IV.1.4. Biosynthèse de l'ochratoxine .....	9
V. L'effet de l'ochratoxine A sur la santé .....	10
VI. L'ochratoxine A et néphropathie .....	10
VII. Cancérogénicité de l'OTA .....	11
VIII. Mécanisme de carcinogénicité de l'OTA .....	12
IX. La fréquence de l'ochratoxine A en Algérie .....	12
X. Les aflatoxines .....	14
X.1. Définition .....	14
X.2. Aflatoxine B <sub>1</sub> .....	14
X.3. Structure chimique .....	14
X.4. Propriétés physico-chimiques .....	15
X.5. Biosynthèse de l'aflatoxine .....	15
XI.L'effet de L'aflatoxine sur la santé .....	16
XII. Méthodes d'analyse des mycotoxines .....	17

XII.1. Les méthodes immunologiques .....	17
XII.2. Les méthodes physico-chimiques .....	17
XII.2.1. Chromatographie sur couche mince .....	18
XII.2.2. La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (HPLC) .....	18

## **Chapitre II : Le café**

I. Histoire du café .....	19
II. Généralité sur le café .....	19
III. Ecologie du café .....	19
IV. Description botanique .....	20
V. Constituants d'une cerise de café .....	22
VI. Composition du café .....	23
VII. La caféine .....	24
IX. Le marché de café .....	26

## **Partie expérimentale**

### **I. Matériel et méthodes**

I. Choix de la région .....	27
II. Echantillonnages .....	27
III. Prélèvement .....	27
IV. Analyse physicochimique .....	28
V. Etude de la mycoflore .....	29
VI. Identification des moisissures .....	31
VII. Analyse mycotoxologique .....	35

### **II. Résultat :**

I. Analyses physicochimique .....	37
II. Analyse mycologique .....	38
III. Identification des espèces du genre <i>Aspergillus</i> et genre <i>Penicillium</i> .....	42
IV. Analyses mycotoxologique .....	46

**Discussions** .....

**Conclusion** .....

**Références bibliographiques** .....

**Annexes**

## Liste des figures :

<b>Figure 1.1 :</b> Contribution de chaque denrée alimentaire dans l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA .....	07
<b>Figure 1.2 :</b> Formule développée de l'ochratoxine A .....	08
<b>Figure 1.3 :</b> La voie de biosynthèse de l'OTA dans le genre <i>Penicillium</i> , l'ordre de ces réactions représente la succession des gènes liée au génome de l'OTA .....	09
<b>Figure 1.4 :</b> Hypothèse de la voie de formation de l'ochratoxine A .....	09
<b>Figure 1.5 :</b> Zones touchées par la NEB .....	11
<b>Figure 1.6 :</b> Les travaux de recherche réalisés par IARC (1993) sur l'effet de la consommation de l'OTA par les souris.....	12
<b>Figure 1.7:</b> Les travaux de recherche réalisés par IARC (1993) sur l'effet de l'injection de l'OTA sur les souris. ....	12
<b>Figure 1.8 :</b> Structure de l'aflatoxine B1 .....	14
<b>Figure 1.9 :</b> Génome de l'aflatoxine. ....	15
<b>Figure 1.10 :</b> La voie de biosynthèse de l'aflatoxine. ....	16
<b>Figure 2.1:</b> Les deux espèces de caféier. A : le caféier <i>Arabica</i> , Honduras., B : le caféier <i>Canephora robusta</i> , Côte d'Ivoire .....	20
<b>Figure 2.2 :</b> Arbre du café dessiné en Arabie sur le naturel. ....	21
<b>Figure 2.3 :</b> Branche du café .....	21
<b>Figure 2.4 :</b> Le fruit de café .....	21
<b>Figure 2.5 :</b> Les composants de la cerise du café .....	22
<b>Figure 2.6 :</b> Structure de la caféine .....	24
<b>Figure 2.7:</b> Les principaux pays exportateurs du café « sac de 60kg » .....	26
<b>Figure 2.8:</b> Les principaux pays importateurs du café « sac de 60kg » .....	26
<b>Figure 3.1:</b> pH mètre de paillasse utilisé pour la mesure (HANNA, WTW : inolab pH 720). 28	

<b>Figure 3.2</b> : Méthode direct du buvard. ....	29
<b>Figure 3.3</b> : Méthode direct d’Ulster. ....	30
<b>Figure 3.4</b> : Technique de micro culture .....	32
<b>Figure 3.5</b> : Technique d'inoculation des différents isolats d' <i>Aspergillus</i> .....	32
<b>Figure 3.6</b> : Technique de confirmation d’ <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu AFPA.....	33
<b>Figure 3.7</b> : Technique d'inoculation des différents isolats de <i>Penicillium</i> .....	33
<b>Figure 3.8</b> : Culture fongique pure sur milieu YES de 14 jours d’incubation. ....	34
<b>Figure 3.9</b> : Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide .....	35
<b>Figure 3.10</b> : Rota-vapeur type Buchi R-200 .....	35
<b>Figure 3.11</b> : Cuve de migration CCM.....	36
<b>Figure 3.12</b> : Chambre UV forte puissance type CAMMAG.....	36
<b>Figure 4.1</b> : PH calculé pour chaque variété de cafés analysés. ....	37
<b>Figure 4.2</b> : Taux d’humidité relative des échantillons de café analysée. ....	37
<b>Figure 4.3</b> : Taux de contamination révélé pour chaque méthode d’isolement utilisée.....	38
<b>Figure 4.4</b> : Taux de contamination de chaque variété de café. ....	38
<b>Figure 4.5</b> : Abondance des espèces fongiques isolées de la variété Arabica Brésilienne. ....	39
<b>Figure 4.6</b> : Abondance des espèces fongiques isolées de la variété Arabica Ougandaise.....	39
<b>Figure 4.7</b> : Abondance des espèces fongiques isolées de la variété Robusta Vietnamienne. ....	40
<b>Figure 4.8</b> : Abondance des espèces fongiques isolée de la variété Robusta indonésienne....	40
<b>Figure 4.9</b> : Abondance des espèces fongiques isolée de la variété Robusta ivoirienne. ....	41
<b>Figure 4.10</b> : Abondance des espèces fongiques isolée de la variété Robusta Indienne.....	41
<b>Figure 4.11</b> : Espèces du genre <i>Aspergillus</i> sur les milieux standards d’identification (après 14 jours); (A): <i>Aspergillus terreus</i> ; (B): <i>Aspergillus ochraceus</i> ; (c): <i>Aspergillus parasiticus</i> ; (D) : <i>Aspergillus flavus</i> . ; (M) : aspect microscopique (Gr. x 100HI) ; CYA: Czapek yeast extract agar, 37°C; G25N: 25% Glycerol nitrate agar, 25°C; MEA: Malt extract agar, 25°C. ...	43

<b>Figure 4.12:</b> Espèces du genre <i>Aspergillus</i> sur milieux AFPA : <i>Aspergillus flavus</i> et <i>parasiticus</i> , 25°C. ; C) : <i>Aspergillus parasiticus</i> ; D): <i>Aspergillus flavus</i> . .....	44
<b>Figure 4.13 :</b> Espèces du genre <i>penicillium</i> sur les milieux standard d'identification au 14 <sup>ième</sup> jour; (A): <i>Penicilium chrysogenum</i> ; (B): <i>Penicilium expansum</i> ; CYA: Czapek yeast extract agar, 25°C; G25N: 25% Glycérol nitrate agar, 25°C; MEA: Malt extract agar, 25°C; CDA: Czapek-Dox agar, 25°C.....	45
<b>Figure 4.14 :</b> Espèce de genre <i>Penicillium</i> sous microscope optique G.X1000HI ; A) : <i>Penicillium chrysogenum</i> ; B) : <i>Penicillium expansum</i> .....	45
<b>Figure 4.15 :</b> Pourcentage des souches de genres <i>Aspergillus</i> sécrétrices et non sécrétrices de mycotoxines. ....	46
<b>Figure 4.16 :</b> Révélation des sécrétions des différentes souches mycotoxinogene visualisées sous la lumière UV ; AFB <sub>1</sub> , OTA (chambre de lecture type CAMMAG) ; les numéros correspond aux codes de différentes souches testés.....	47
<b>Figure 4.17:</b> Graphique montrant le taux des souches d' <i>Aspergillus parasiticus</i> productrice d'AFB <sub>1</sub> .....	48
<b>Figure 4.18 :</b> Graphique montrant le taux des souches d' <i>Aspergillus ochrasus</i> productrice d'OTA. ....	48
<b>Figure 4.19 :</b> Graphique montrant les souches d' <i>Aspergillus flavus</i> productrice d'AFB <sub>1</sub> . ....	48

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 01 :</b> Teneurs maximales définies par le règlement (CIRC) No. 123/2005. Le taux maximal des mycotoxines dans les denrées alimentaires. ....	3
<b>Tableau 02 :</b> Taux de contamination par l'ochratoxine A dans différents pays .....	10
<b>Tableau 03:</b> Fréquence de l'ochratoxine A en Algérie dans la population générale et les personnes atteintes de néphropathie chronique, résultats avec les analyses effectués sur la région des Balkans (10 à 40ng/ml) pourrai conclure a ce que la fréquence de l'OTA dans le sang sois sans conséquence .....	13
<b>Tableau 04 :</b> Composition moyenne en % de matière sèche des cafés verts et torréfiés selon la variété, et d'un café instantané soluble .....	23
<b>Tableau 05 :</b> Echantillons prélevés. ....	27
<b>Tableau 06 :</b> les principaux critères morphologiques des <i>Aspergillus</i> sur les milieux standard utilisés pour l'identification des espèces. ....	42
<b>Tableau 07 :</b> Les principaux critères morphologiques des <i>Penicillium</i> sur les milieux standard utilisés pour l'identification des espèces. ....	45

## **Listes des abréviations :**

**A.E.E** : Arabica Echantillon Essai.

**AFB<sub>1</sub>** : Aflatoxine B1.

**AFPA**: *Aspergillus flavus-parasiticus* agar.

**Ao.E.E** : Arabica Ouganda Echantillon Essai.

**Aw** : Activité water.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**CDA**: Czapek Dox Agar.

**CIRC** : Centre international de la recherche sur le cancer.

**CLHP** : la chromatographie liquide haute performance.

**CYA** : Czapek Yeast Extract Agar.

**ELISA** : Enzyme-linked immunosorbent assay.

**G25N** : 25 % Glycérol Nitrate Agar.

**HPLC**: Chromatographie liquide haute performance.

**HR** : Humidité relative.

**ISTA** : International Seed Testing Association.

**MEA**: Malt Extract Agar.

**MESNA** : 2-mercaptoethane sulfonates.

**NEB** : Néphropathie Endémique des Balkans.

**NIC** : Néphropathie inertielle chronique.

**NTP** : Programme de toxicologie nationale.

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé.

**OTA** : Ochratoxine A.

**PDA**: Potatoes Dextrose agar.

**PH** : Potentiel hydrogene.

**Ppb** : Partie par matière.

**RI.E.E** : Robusta Vitnamienne Echantillon Essai.

**RIA** : Radio immunoassay.

**RII.E.E** : Robusta Indonisienne Echantillon Essai.

**RIII.E.E** : Robusta ivoirienne Echantillon Essai.

**RIV.E.E** : Robusta indienne Echantillon Essai.

**UV** : Ultrat violet.

**YES**: Yeast Extract Sucrose.

# **Introduction**

### Introduction :

Dès le moyen âge, la première mycotoxicose décrite a été l'ergotisme, provoqué par les alcaloïdes de l'ergot de seigle. Dont l'agent causal *Claviceps purpurea*, qui est responsable de l'élaboration de la mycotoxine. Les céréales sont les plus souvent contaminées par les mycotoxines de *Claviceps*.

Mais, en fait, plusieurs études ont commencé à s'intéresser sérieusement aux produits toxiques des moisissures qu'à partir de 1960, lorsque se produisit en Angleterre une épidémie, dite maladie de la dinde (« *Turkey X* » disease) ; la découverte des aflatoxines s'ensuivit, ce groupe de mycotoxines qui est le plus important, ayant fait l'objet des plus nombreuses études. Depuis lors, les études concernant les aflatoxines et les autres toxines fongiques notamment l'ochratoxine, les sporidesmines, les rubratoxines et la zéaralénone a augmenté à une vitesse vertigineuse. (IARC., 2002; Pfohl-Leskowicz., 2000; Pfohl-Leskowicz et Castegnaro., 2002). D'autres études ont démontré que les aflatoxines présentent une menace majeure vu son effet cancérigène (IARC., 1993).

Les maladies engendrées par les intoxications alimentaires ne cessent d'augmenter et constituent un des problèmes les plus répandus à l'échelle internationale. La contamination alimentaire est d'origine microbienne (champignons, moisissures et bactéries) parmi ces moisissures il y'a ceux qui ont un pouvoir toxigène tels que les moisissures productrices de métabolites secondaires (Bryden., 2012), parmi l'ensemble de ces métabolites le terme « Mycotoxine » qui est réservé à ceux qui présentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale.

D'après l'OMS, 25% des denrées alimentaires seront contaminées par les mycotoxines (Manon et Johnson., 1985), même à l'état de traces, les mycotoxines peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et animale, provoquant des toxicités chroniques (effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes, néphrotoxiques, oestrogéniques, immunosuppresseurs) liée à une ingestion répétée de faibles doses (Es kola., 2002; Bennet., 1987). Plusieurs centaines de mycotoxines ont été identifiées mais heureusement seule une vingtaine causent des mycotoxicoses. Parmi les mycotoxines les plus répandues l'Ochratoxine et l'Aflatoxine.

L'OTA est connu pour son effet néphrotoxique (Austwick et al., 1979; Plestina.,1992), surtout après l'épidémie causé par cette mycotoxine en 1950 « la néphropathie endémique des Balkans » vu les habitudes d'approvisionnement et de stockage de céréale pratiqué par la

communauté de la région des Balkans, ces habitudes constituent un milieu favorable aux développements des moisissures mycotoxinogènes.

Le café représente la deuxième marchandise la plus échangée après le pétrole, les statistiques montrent que deux personnes sur trois en consomment, elle constitue la 2<sup>ème</sup> boisson la plus consommée après l'eau. Les plus gros consommateurs sont les Finlandais avec 13,8 kg par an. En Algérie la consommation moyenne annuelle du café est de 4 kg/personne (**Rodriguez J., 2013**). Le café compte parmi les aliments facilement contaminés par les moisissures vu les conditions de son stockage (humidité et chaleur élevée) qui favorise le développement des moisissures. Ça nous mène à nous demander :

Est-ce que le café commercialisé en Algérie est contaminé par les moisissures ?

Est-ce que cette flore fongique est mycotoxinogène ?

Dans notre modeste travail, on s'intéresse à l'ochratoxine A et l'aflatoxine B<sub>1</sub> qui sont principalement produites par les genres *Penicillium* et *Aspergillus* qui se développent sur un très grand nombre de produits alimentaires. Actuellement l'Algérie n'a pas encore marginalisé les teneurs maximales des OTA et AFB<sub>1</sub> dans le café contrairement aux occidentaux qui ont fixé les teneurs à 5 µg/kg. (**CIRC., 2005**)

Pour répondre à ces deux questions nous avons organisé notre travail en 2 parties :

La première partie est consacrée à une revue bibliographique divisée en deux chapitres, un sur mycotoxines et santé qui consistera à présenter l'aspect épidémiologique des mycotoxines et l'autre sur le café.

La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes utilisées, la démarche globale consiste à isoler et dénombrer les moisissures contaminant le café les principaux genres potentiellement toxigènes sont identifiés morphologiquement, la détection des mycotoxines est ensuite réalisée par la chromatographie sur couche mince. Et à la fin nous présentons les principaux résultats et discussion.

Notre étude vise donc à :

- Évaluer la flore fongique contaminant les échantillons de café analysés.
- Isoler, purifier, identifier et conserver les souches fongiques mycotoxinogènes.
- Étudier le potentiel toxigène des souches isolées à partir du café.

# **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre I :**

# **Mycotoxines et santé**

## I. Les mycotoxines :

Les mycotoxines sont un grand groupe de métabolites secondaires provenant de diverses moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* (Bryden., 2012). Parmi les métabolites secondaires, le terme « mycotoxines » est réservé à ceux qui présentent un risque potentiel pour la santé chez l'Homme et l'animal, aussi ils entraînent d'énormes pertes économiques annuelles, y compris la perte des cultures fourragères et des aliments de bétail (Mohamed., 2011). Actuellement, ils sont recensés entre 300 et 400 mycotoxines parmi elles une trentaine sont assez courante et produites à des taux suffisamment élevé pour avoir des conséquences sur la santé humaine. Les mycotoxines couramment retrouvées dans les aliments sont les aflatoxines (AF), la zearalénone (ZEA) et le désoxynivalénol (DON), les fumonisines, les trichotécènes, la citrinine et la patuline. (Miazzo et al., 2000; Oueslati et al., 2012).

La contamination par les mycotoxines est très répandue dans les aliments d'origine végétale, les céréales, le café, le cacao, les fruits, les noisettes, les amandes, les graines, le fourrage et les autres aliments ou aliments destinés à la consommation humaine ou animal (Guan et al., 2011, Wu et al., 2015). La prolifération des moisissures et la production de mycotoxines peuvent se produire sur le champ et / ou pendant le stockage, dans des conditions de températures et d'humidité appropriées (Bryden., 2012).

### I.1. Propriétés de mycotoxines :

- (i) Composés de faibles poids moléculaires non volatils à température ambiante ;
- (ii) Des métabolites secondaires produits par les moisissures ;
- (iii) Qui peut causer une maladie ou la mort d'un être humain ou un animal à de petites concentrations (Bennett et Klich., 2003).

### I.2. Les facteurs influencent la production des mycotoxines :

La production des mycotoxines est un processus complexe qui n'est pas entièrement élucidé il dépend de plusieurs facteurs (Brocard G et le Bacle C ., 2009) :

### **I.2.1. Facteurs intrinsèques :**

#### **I.2.1.a. Patrimoine génétique :**

Le potentiel génétique est un facteur important. Au sein du même genre, on peut distinguer des espèces connues pour être toxigènes et d'autres non. Au sein d'une même espèce toxigène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. (Mitchell et al., 2004)

### **I.2.2. Facteurs extrinsèques :**

La sécrétion, la quantité sécrétée et le type de mycotoxine dépendent d'une interaction complexe et pas totalement comprise de plusieurs facteurs qui incluent la température, l'activité de l'eau  $A_w$ , la nature du substrat et le pH, et l'atmosphère gazeuse. (Pfohl-Leskowicz A., 1999).

#### **I.2.2.a. La Température :**

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais, le plus souvent, légèrement inférieure (Le Bars, 1990). L'aflatoxinogénèse est favorisée par des températures comprises entre (25-37) C° (Guiraud., 1988). Alors que celle des ochratoxines est optimale à 28 C°, mais réduite à 15 C°.

#### **I.2.2.b. La nature de substrat et pH :**

Les aflatoxines affectent beaucoup plus les graines oléagineuses particulièrement l'arachide, leur biogénèse repose sur ordre d'importance sur les glucides, les lipides, et les protéines. Elles sont favorisées par un pH compris entre 2-8. (Le Bars., 1990).

#### **I.2.2.c. Activité de l'eau ( $A_w$ ) :**

L' $A_w$  est un des principaux facteurs de production de mycotoxines particulièrement dans les produits faiblement hydratés. La toxigénèse a lieu dans des conditions d' $A_w$  légèrement supérieures (+0,02) à l' $A_w$  minimal pour la croissance. Au-delà de ce seuil, la toxigénèse augmente de manière exponentielle avec l' $A_w$  si les autres conditions écologiques restent constantes (Le Bars., 1984).

#### **I.2.2.d. Atmosphère gazeuse:**

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; Keller et al., 1997).

### II. Les mycotoxicoses :

Les mycotoxicoses sont des maladies aiguës ou chroniques causées par les mycotoxines. Les caractéristiques cliniques, les organes cibles et les résultats dépendent des caractéristiques toxiques intrinsèques de la mycotoxine et de la quantité et de la durée de l'exposition, ainsi que de l'état de santé de la personne exposée (Maja P., 2016).

La présence des mycotoxines dans les produits alimentaires est dangereuse, car leurs effets se manifestent à long terme après le cumul de ces derniers dans le corps, seulement une vingtaine de mycotoxines sont toxiques pour l'humain et l'animal à cause de leurs thermo stabilités qui confient un pouvoir pathogène très élevé, provoquent de nombreuses maladies (Castegnaro., 1995; Coker., 1997; Pfohl-Leskowicz., 1999). Les cancérologues suspectent que des facteurs alimentaires sont impliqués dans l'apparition des cancers (approximativement 35% des cancers) (Hiraku et al, 1998).

Le centre international de la recherche sur le cancer (CIRC), en 1993, a répertorié l'ochratoxine A comme « potentiellement cancérogène pour l'homme » (groupe 2B) (Annexe 01). Depuis 2002, un règlement européen fixe les teneurs maximales admissibles (Tab. 01), Le circulaire 18/02/2010 du Ministère de la Santé française a fixé la valeur seuil de 8ppb sur le café vert pour l'activité de surveillance.

**Tableau 1 :** Teneurs maximales définies par le règlement (CIRC) No. 123/2005. Le taux maximal des mycotoxines dans les denrées alimentaires.

Produit	Teneurs maximale (µg/kg)
Grains de café torréfié et café torréfié moulu (règlement CE 1881/2006)	5
Café soluble (règlement CE 1881/2006)	10
produits dérivés de céréale	3
les raisins secs	10
vin et aux jus de raisins	2
les céréales brutes	5
Aliments infantiles	0.5

### III. La néphropathie endémique des Balkans (NEB) :

La NEB a été découverte en 1950 dans un village à côté de la rivière Danube, puis dans la Bulgarie (Tonevet *al.*, 1956), Yougoslavie (Aranicki *et al.*, 1961; Danilovi *.,* 1958; Pichler *et al.*, 1959) et la Roumanie (Bruckner *et al.*, 1965), maladie caractérisée par une tubulonéphrite, une enzymurie et une déficience rénale (Radonic *et Radosevic.*, 1992; Vukelic *et al.*, 1992; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002; Pfohl-Leszkowicz *et Manderville.*, 2007) .

Les malades atteints de la NEB présentaient à l'âge de 60 ans une Protéinurie tubulaire (déficience de la réabsorption de protéines au niveau du tubule rénal), une filtration glomérulaire réduite, ainsi qu'une faible capacité de concentration (Toncheva D, Dimitrov T., 1996) une fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire, et jusqu'à 50% des patients avaient une tumeur urothéliale des reins (Stefanovic V., Djukanovic L., Cukuranovic R., 2011) plusieurs chercheurs ont démontré que les tumeurs du tractus urinaire (urètre, pelvis, et la vessie) ont une forte association avec cette néphropathie (risque cancérigène) (Chernozemsky *et al.*, 1978; Cvorisec *et al.*, 1998; Djokic *et al.*, 1999; Radovanovic *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 2003; Stojanov *et al.*, 1977; Stoyanov *et al.*, 1978), la reproductibilité expérimentale des effets néphrotiques et cancérigènes de l'OTA suspectés chez l'homme, a été observée chez le rat, la souris, le poulet et le porc (Krogh., 1992 ; Krogh *et al.*, 1979; Krogh *et al.*, 1976; Stoev *et al.*, 2000).

### IV. Les différents types de mycotoxines :

Il existe de nombreuses mycotoxines produites par différentes moisissures contaminant les produits alimentaires en général. Pour le cas des grains de café on rencontre essentiellement l'Ochratoxine et les Aflatoxines (Castegnaro *et Pfohl-Leszkowicz*, 2002). Nous développerons uniquement ces deux mycotoxines.

#### IV.1. L'ochratoxine :

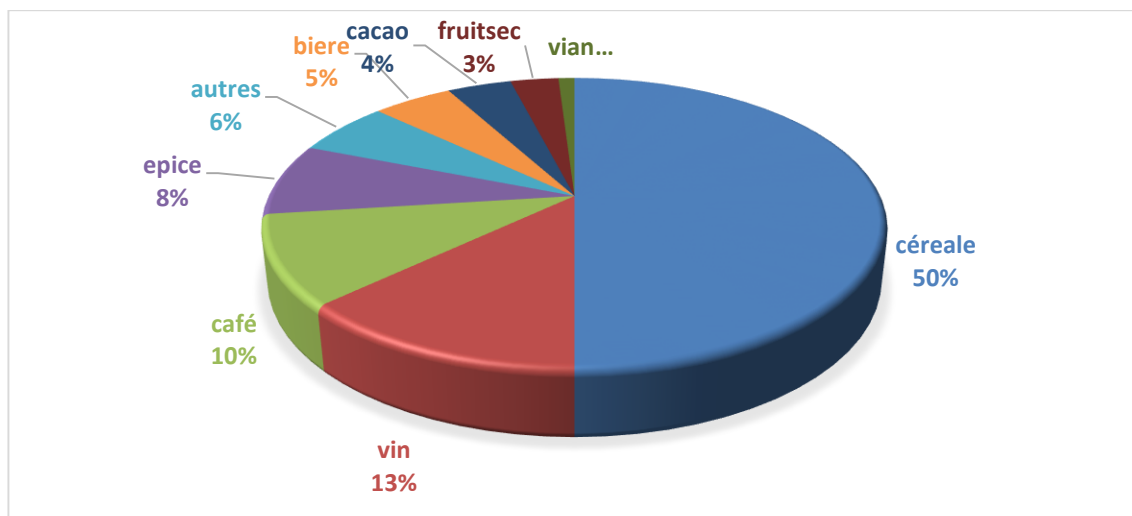
Actuellement les mycotoxines qui ont été décrites sont les ochratoxines B, C,  $\alpha$ ,  $\beta$  mais ils sont moins toxiques et beaucoup plus rares, et seuls l'ochratoxine A qui est la plus toxique, la plus fréquente et la plus connue, et très rarement ochratoxine B qui ont été retrouvées sur les produits végétaux (G. Brocard *et C. le Bacle.*, 2009).

##### IV.1.1. L'ochratoxine A :

L'OTA a été signalée dans le café en 1974 par Levi *et co-auteurs* (Levi, Trenk *et Mohr.*, 1974). Plus tard, une étude de Pfohl-Leszkowicz *et de Manderville* a montré que l'apport

d'OTA dans le café n'est pas négligeable compte tenu de leurs propriétés cancérigènes (Pfohl-Leszkowicz et Manderville., 2007).

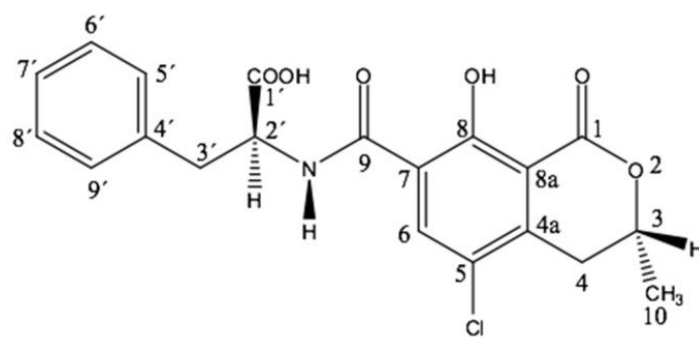
L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par les moisissures principalement de genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Fernández-Cruz M., Mansilla L., Tadeo L., 2010). En fait, cette mycotoxine qui était décrite pour la première fois en 1965 (Ana Júlia Benites et al., 2016), et il pourrait être trouvé comme un contaminant de plusieurs matrices alimentaires tels que les céréales et ses dérivés, le café, les épices, noix, fruits secs, olives, raisins, viande, lait, vin, bière, et cacao.



**Figure 1.1:** Contribution de chaque denrée alimentaire dans l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA (SCOOP task 3.2.7 ; Européen., 2002).

### IV.1.2. Structure chimique :

L'ochratoxine A est constituée d'une fraction de dihydroisocoumarin dérivée de polyketide relié à la phénylalanine par le groupe carboxy-12. A cause de sa structure chimique, la structure chimique de l'OTA est montrée dans la figure 1.2. Elle s'agit de 7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4dihydro-3R-méthylisocoumarine-7-L-β-phénylalanine (Vander M, Steyne, Fourie, Scott, et Theron., 1965 ; Abarca, Accensi, Bragulat, Castella, et Cabañes., 2003).



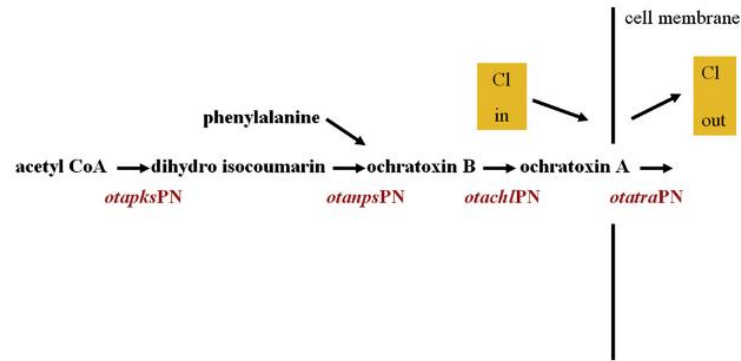
**Figure 1.2** : Formule développée de l'ochratoxine A (Frantisek Malir et al., 2016).

### IV.1.3. Propriétés physico-chimiques de l'ochratoxine A :

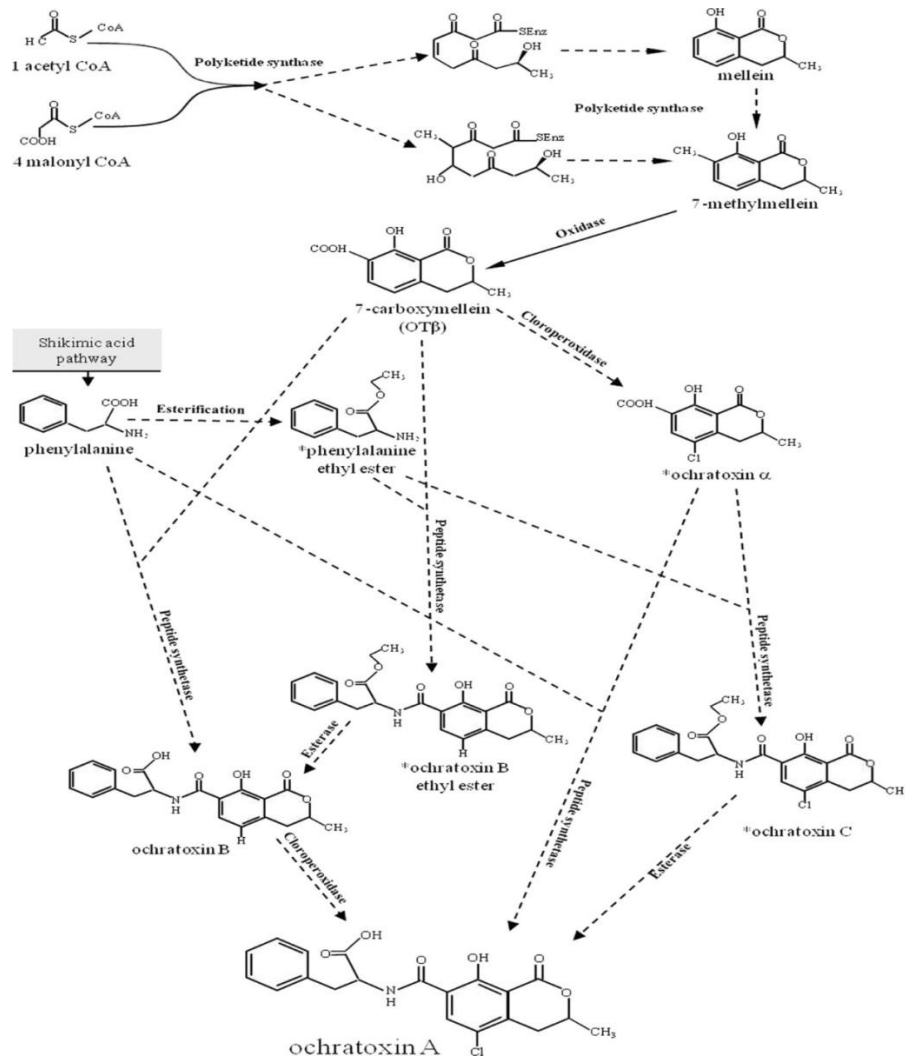
- L'OTA est un composé incolore et avec une structure cristalline de masse molaire 403,8 g/mole.
- L'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires à pH acide ou neutre ainsi que dans les solutions aqueuses alcalines, mais elle est faiblement soluble dans l'eau.
- Cristallisé dans le xylène, l'OTA forme des cristaux qui émettent une fluorescence verte (milieu acide) bleue (milieu alcalin) en lumière UV; ces cristaux ont un point de fusion de 169°C. (André el Khoury et Ali Atoui., 2010).
- Le point de fusion de l'OTA diminue à 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène.
- L'OTA est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1, présentant deux groupements ionisables: le groupement carboxyle de la phénylalanine (pKa 4,4) et le groupement hydroxyle phénolique (pKa 7,3). (André el Khoury et Ali Atoui., 2010).
- L'OTA est thermostable il peut résister à 3 heures d'autoclavage à 121°C.

### IV.1.4. Biosynthèse de l'ochratoxine :

Actuellement la voie de biosynthèse de l'ochratoxine A comme la patuline n'a pas été complètement élucidé, seulement une partie de sa biosynthèse a été développée (Fig. 1.4), d'après les recherches effectuées sur les espèces *Aspergillus ochraceus* (Wang, L et al., 2015), *Aspergillus westerdijkiae* (Bacha, N et al., 2009), *Aspergillus carbonarius* (Gallo, A et al., 2014) et *Penicillium verrucosum* (Abbas, A et al., 2013) le cluster du gène de l'OTA (Fig. 1.3) contient les pks (polyketide synthèse et Nrpsnon-ribosomal peptide synthétase) (Karolewicz, A; Bogs C.; Geisen R., 2005 ; Geisen R., Schmidt-Heydt M., Karolewicz A., 2006) qui ont une large collection d'enzymes qui code pour synthèse des polyketides qui sont nécessaires dans la synthèse des OTA (Gallo A, Ferrara M, Perrone G., 2013).



**Figure 1.3 :** La voie de biosynthèse de l'OTA dans le genre *Penicillium*, l'ordre de ces réactions représente la succession des gènes liée au génome de l'OTA (Markus S, Eva, Batzler j , Rolf G.,2011).



**Figure 1.4 :** Hypothèse de la voie de formation de l'ochratoxine A (Harris J, Mantle P, 2001 ; Gallo A et al., 2012) .

### V. L'effet de l'ochratoxine A sur la santé :

Il a été démontré que deux nouvelles espèces, *Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus steynii*, produisent l'OTA plus que *Aspergillus ochraceus* (J.gil-sema et al., 2011). OTA est retrouvé plus souvent dans le sang des individus ayant consommé des aliments contaminés par cette dernière (Sangare-Tigori et al., 2006) .

L'OTA provoque chez l'homme la néphropathie endémique des Balkans (BEN), et des cancers primitifs, sa présence a été marquée dans le lait maternel (Creppy, 1999 ; Hassan et al., 2006). Des études préalables dans le cadre du programme de toxicologie nationale (NTP) aux États-Unis ont montré que l'OTA en doses élevées peut provoquer des tumeurs rénales chez les rongeurs. (Boorman., 1989)

**Tableau 2:** Taux de contamination par l'ochratoxine A dans différentes populations (E.E. Creppy, M. Castegmaro, 1993).

Pays	Taux
Algerie (A.Khalef et al., 1993 )	2 ng/ml
Tunisie (Radic B et al.,1997)	1,74-140,5 ng/ml
Balkans (petokova-bocharovaetcoll ., 1988)	10-40 ng/ml
Allemagne (Bauer et Garies., 1987)	14,4 ng/ml

### VI. L'ochratoxine A et néphropathie :

La plus grande communauté infectée par l'OTA sont les populations qui pratiquent l'autoconsommation et le stockage (habitudes d'approvisionnement) des aliments dont le blé et le riz (Krogh et al., 1977; Pavlovic et al., 1979; Petkova-Bocharova et Castegnaro, 1985; Puntaric et al., 2001; Vrabcheva et al., 2004; Vrabcheva et al., 2000).

La plus grande concentration de l'OTA retrouvé dans le sang a été observé chez cette communauté (dans la région des Balkans) (Fuchs et al., 1991; Nikolov et al. 1996; Petkova-Bocharova et Castegnaro, 1991; Petkova-Bocharova et al., 1988; Plestina et al., 1990; Radic et al., 1997).

Il existe une corrélation positive entre l'excès de précipitations de l'OTA et le nombre de personnes décédées des suites d'une NEB dans deux années consécutives (Austwick et al., 1979; Plestina ., 1992) .

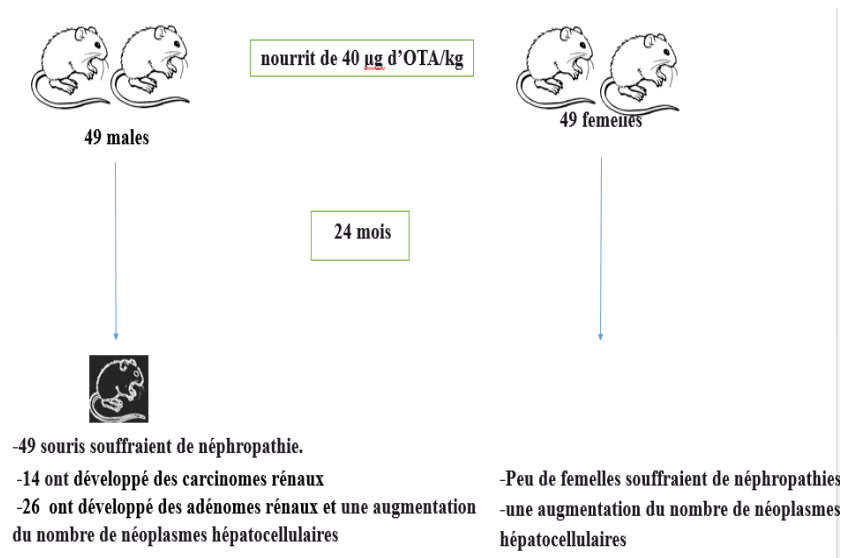


**Figure 1.5:** Zones les plus touchées par la NEB d'après (Stefanovic V, Radovanovic Z., 2008).

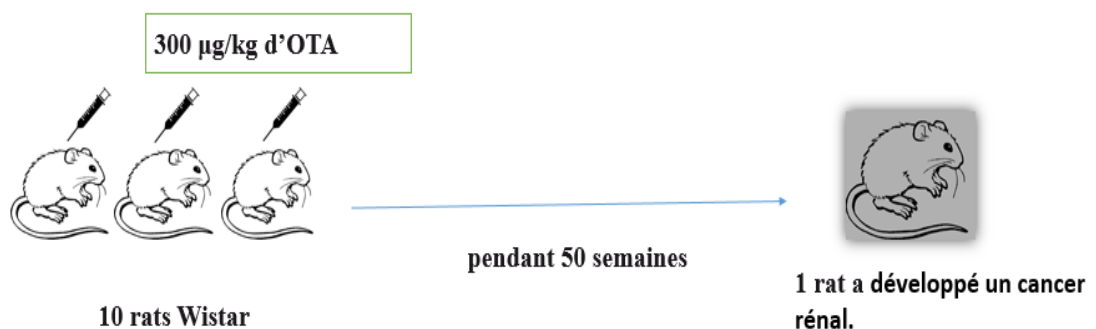
### VII. Cancérogénicité de l'OTA :

Des travaux de recherche effectués sur des rats de laboratoire où ils ont administré des taux d'OTA à des rats pendant une période donnée et ont eu des résultats qui confirment que l'OTA est impliqué dans l'apparition des cancers et des néphropathies.

Une étude effectuée par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), entre deux espèces de rats (Lewis et Dark Agouty) a démontré que les rats males de l'espèce Dark Agouty développaient des tumeurs alors que les femelles n'ont pas du tout été touchées (Castegnaro M, Mohr U, Pfohl-Leszkowicz A et al., 1998), la différence flagrante entre le sexe de cet espèce est dû au patrimoine génétique comme le 2-mercaptoethane sulfonates (MESNA) qui protège les rats contre la néphrotoxicité et la carcinogénicité, l'effet protecteur du MESNA sur la carcinogénicité de l'OTA a été étudié dans une étude à long terme (Pfohl-Leszkowicz A, Bartsch H, Azemar B., 2002). Dans cette étude ils ont observé que le MESNA permet de diminuer les caryomegalies dans le rein de tous les animaux traités, mais n'a, en revanche, aucun effet bénéfique pour diminuer l'incidence des carcinomes rénaux.



**Figure 1.6:** Les travaux de recherche réalisée par IARC (1993) sur l'effet de la consommation de l'OTA par les souris.



**Figure 1.7:** Les travaux de recherche réalisée par IARC (1993) sur l'effet de l'injection de l'OTA sur les souris.

### VIII. Mécanisme de carcinogénicité de l'OTA :

Après la métabolisation, l'OTA est génotoxique, elle induit des échanges de chromatides sœurs dans des lymphocytes humains IARC (1993), des aberrations chromosomiques qui sont d'ailleurs observées chez les malades souffrants de NEB. L'OTA induit aussi des cassures simples brins et des micronoyaux (Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA., 2007). L'OTA est cancérigène par un mécanisme de génotoxicité directe (Faucet-Marquis V, Pfohl-Leszkowicz A, Dai J., 2004).

### IX. La fréquence de l'ochratoxine A en Algérie :

La fréquence de l'ochratoxine A a été déterminée en Algérie en 1993 (Tab.03). La fréquence retrouvée en Algérie semble élevée vu le régime alimentaire basant sur la consommation journalière des céréales et comme on l'a déjà mentionnée les céréales sont les aliments les plus

contaminés par l'ochratoxine A (**A. khalef et al., 1993**). 430 échantillons de la population générale algérienne et 84 néphropathie ont été analysés, 57% des 346 échantillons de la population générale sont positifs avec un taux supérieur de 2 ng/ml, parmi les échantillons prélevé de néphropathes 95% sont positifs avec un seuil de 2ng/ml (tab 03). Ce qui confirme l'implication de l'OTA dans les néphropathies (**A. khalef et al., 1993**). La comparaison des résultats avec les analyses effectuées sur la région des Balkans (10 à 40ng/ml) pourront conclure à ce que la fréquence de l'OTA dans le sang soit sans conséquence.

Au cours des travaux de recherche réaliser par (**Wafa Hassen et al., 2005**) sur l'implication de l'OTA et néphropathie humaine en Tunisie en dix ans d'études, (1991-2001). Dans ce bilan, ils comparent les contaminations sériques en OTA dans trois groupes : un groupe d'individus sains ne présentant aucune pathologie, un groupe de néphropathes présentant une NIC inexplicée et un groupe de néphropathies à étiologie connue. Ils montrent que l'incidence la plus importante de la contamination sérique en OTA est retrouvée dans le groupe présentant une NIC inexplicée. OTA-positifs est de 97 %.

**Tableau 03:** Fréquence de l'ochratoxine A en Algérie dans la population générale et les personnes atteintes de néphropathie chronique. (**A.khalef et al., 1993**).

Nombre d'échantillons analysés	Origine des échantillons			
	Population générale 346		Néphropathies 84	
Niveau de contamination (ng/ml)	Nombre échantillons positifs	%	Nombre d'échantillons positifs	%
0,1-0,2	34	9,9	4	4,7
>2	197	57,0	76	90,4
Totale	231	66,9	80	95,0
Taux maximum	9		46	

## X. Les aflatoxines :

### X.1. Définition :

Les aflatoxines constituent un groupe de dix-huit composés dont quatre sont les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments. Il s'agit des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et M<sub>1</sub> : (métabolite de l'aflatoxine B<sub>1</sub>). L'aflatoxine B<sub>1</sub> est la plus toxique et la plus explorée. (Yannikouris a. Et Jouany j.p., 2002 ; Pitt et Hocking., 2009). Trois principales souches d'*Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*) sont connues pour leur capacité à synthétiser naturellement les aflatoxines dans des conditions chaudes et humides (G. Brocard et C. le Bacle., 2009).

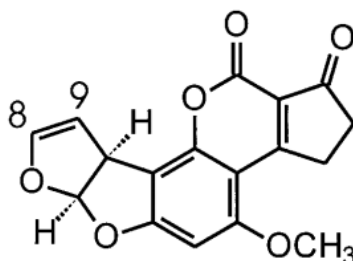
### X.2. Aflatoxine B<sub>1</sub> :

Aflatoxine B<sub>1</sub> est un métabolite de bisfuranocoumarin produites par *Aspergillus flavus* et les espèces apparentées, et l'une des plus célèbres mycotoxines et possédant le profil toxicologique le plus sérieux. (Alex P. Wacoo, Deborah Wendiro, Peter C. Vuzi, et Joseph F. Hawumba., 2014)

### X.3. Structure chimique :

Chimiquement, les aflatoxines sont des composés hétérocycliques d'origine naturelle fortement oxygénés et ont des structures étroitement liées. Toutes les aflatoxines contiennent essentiellement un noyau de coumarine associé à un bifuran. Une structure de pentanone est attachée au noyau de coumarine dans le cas d'aflatoxines de série B. Celui-ci est remplacé par une lactone à six membres dans les aflatoxines de série G. (Salunkhe D K, Adsule R N and Padule D N, 1987).

La structure chimique l'aflatoxine B<sub>1</sub> est montrée dans la figure 1.8 dont le nom chimique est le suivant: 6-thoxydifurocoumarone2,3,6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta-[c]furo[3',2':4,5] furo [2,3-h] [l] benzopyran-1,11-dione (Ripert christian., 2013).



**Figure 1.8** : Structure de l'aflatoxine B<sub>1</sub> (Maryann E. Smela, Sophie S. Currier, Elisabeth A. Bailey et John M. Essigmann., 2001).

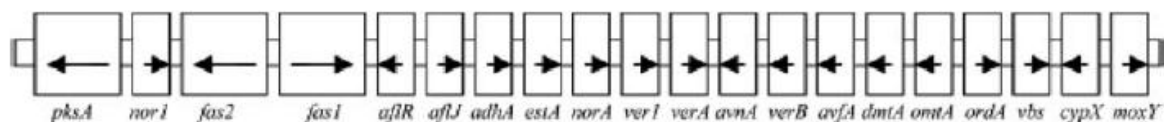
### X.4. Propriétés physico-chimiques :

Les aflatoxines sont des dérivés de difuranocoumarine. Ce sont des molécules de faibles poids moléculaires (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants moyennement polaires comme le chloroforme et le méthanol, elles sont assez facilement extraites (AFSSA., 2006). Toutes les aflatoxines ont une absorption maximale autour de 360 nm (Akbas et Ozdemir., 2006). Sous la lumière ultraviolette (UV), elles ont une fluorescence : bleue pour les AFB « bleue » à 425 nm et verte pour les Aflatoxine G « green » à 450 nm. L'aflatoxine M<sub>1</sub> a une fluorescence bleu-mauve. AFB<sub>1</sub> est l'aflatoxine la plus courante, il est suivi par l'AFB<sub>2</sub>. AFG est assez rare. La fluorescence de la toxine G (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) est plus de 10 fois supérieure à celle de la Aflatoxine B (Alcaide-Molina et al., 2009).

### X.5. Biosynthèse de l'aflatoxine :

La biosynthèse des aflatoxines commence par la détection des gènes codants pour la toxine, la synthèse commence de malonylCoA, et l'hexanoylCoA, et se termine par la formation de l'AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub> (Fig. 1.9) dans cette voie au moins 18 enzymes sont nécessaires, Les gènes codants pour ces enzymes ont été déterminé et étudié et localisé au total 70 kb de gènes dans le génome de *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Schmidt-Heydt et Geisen., 2007).

La voie de biosynthèse simplifiée est la suivante les aflatoxines sont toutes formé à partir de précurseur qui est le versiconal hemiacetal acetate (12) après le versiconal peut être transformé en versicolorin A (13) ou versicolorin B (14) après le versicolorin A (13) se transforme en sterigmatocystin (15) et le versicolorin B (14) se transforme en dihydrosterigmatocystin (16) ces deux métabolites se transforment respectivement en aflatoxines G<sub>1</sub> (3) B<sub>1</sub> (1) et M<sub>1</sub> et en aflatoxine B<sub>2</sub>.et aussi en G<sub>2</sub> et M<sub>2</sub> il existe aussi des voies de transformation de AFB<sub>1</sub> en AFB<sub>2</sub> et vice versa (Fig. 1.10). (Brase S et Glaser., 2013).



**Figure 1.9 :** Génome de l'aflatoxine. (Yabe et Nakajima., 2004).

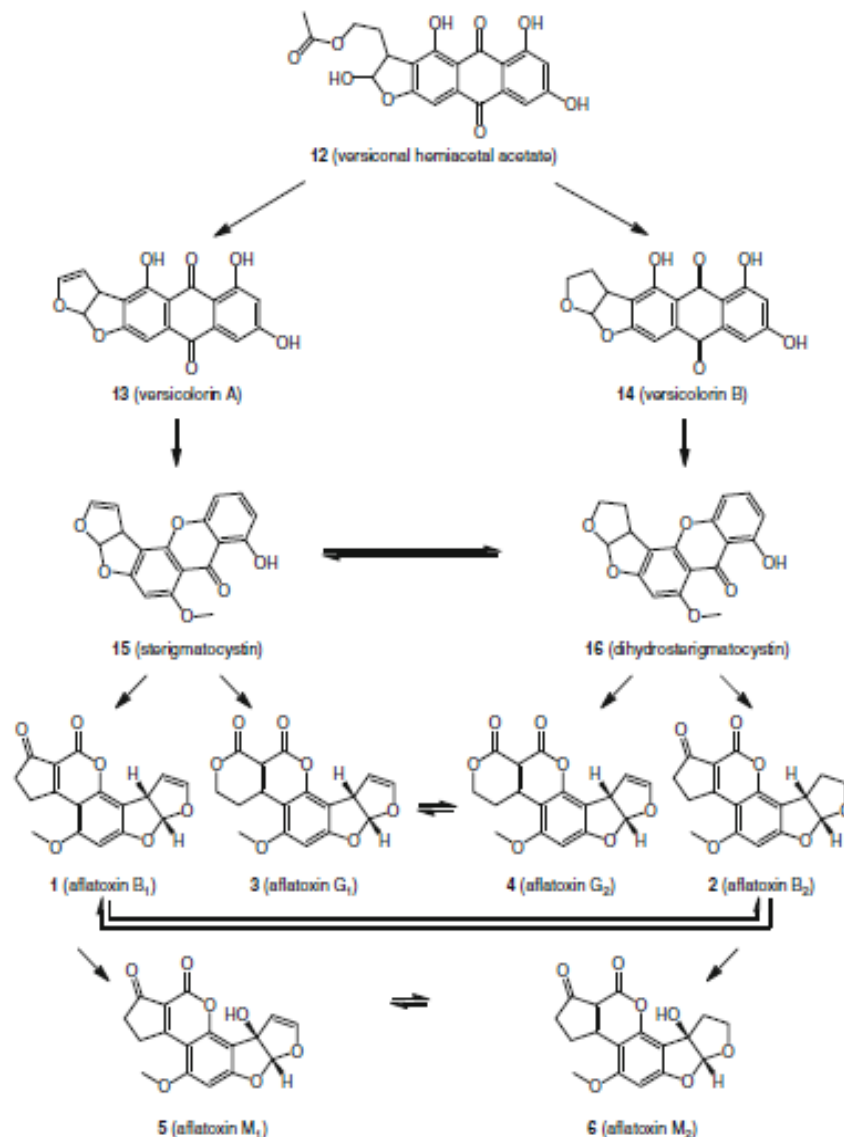


Figure 1.10 : La voie de biosynthèse de l'aflatoxine. (Brase S et Glaser., 2013).

### XI. L'effet de L'aflatoxine sur la santé :

L'aflatoxicose est une maladie due à l'empoisonnement par ingestion d'aflatoxine dans les aliments contaminés, ça peut arriver par l'exposition à de très fortes doses d'aflatoxine dans une courte durée, ou une faible exposition pendant une longue durée, en toxicité chronique, l'organe cible principale est le foie (Bad Bug Book., 1992).

L'aflatoxine B<sub>1</sub> est la plus dangereuse pour sa cancérogénicité. La dose journalière tolérable est estimée à 0,15 ng/kg (Moss., 2002). Elle a été détectée dans le sang des femmes enceintes, dans le cordon ombilical, et dans le lait maternel dans les régions de l'Afrique avec des variations très importantes saisonnièrement (Maxwell S, Apeagyei F, de Vries H, Mwanmut D,

**Hendrickse R., 1989).** L'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* sont des espèces provoquent des intoxications mortelles chez l'animale et l'homme, les signes cliniques chez l'animal sont lésions hépatiques souvent accompagnées de cirrhoses. L'effet cumulatif de faibles doses d'aflatoxines provoque des cancers primitifs du foie (**IARC., 2014**). La toxicité de l'AFB a déjà été largement étudiée (**Peers et Linsell., 1977; Williams et al., 2004; IARC., 2012**). Une tentation de suicide en utilisant l'aflatoxine B<sub>1</sub> a été enregistré en USA 1966, ou une jeune femme a ingéré 5.5 mg d'aflatoxine B<sub>1</sub> en 2 jours et après 6 mois 35 mg en 2 semaine, elle a montré une nausée et des migraines des transitent, éruption musculaire non puritique, la biopsie du foie n'a rien montré même avec les examens succédaient après 14 ans, l'hypothèse laisse à supposer que l'effet de l'aflatoxine B<sub>1</sub> se manifeste seulement après une ingestion successive en faible dose (**Willis R, Mulvihill J et Hoofnagle J., 1980**).

En 2004, 317 cas dont 125 décès par hépatite aigue, et une endémie dû à la consommation de maïs local après une enquête il s'est avéré que le maïs a été contaminé par l'aflatoxine (**Kenya., 2004**).

### **XII. Méthodes d'analyse des mycotoxines :**

Il existe deux grands principes de méthodes qui peuvent être appliqués à l'analyse de traces de mycotoxines dans les aliments : les approches immunologiques et les approches physico-chimiques (**Afssa., 2009**).

#### **XII.1. Les méthodes immunologiques :**

Les méthodes immunologiques s'appuient sur la reconnaissance plus ou moins spécifique de l'analyte à doser (ici l'antigène Ag) par un anticorps produit et caractérisé pour inter-agir avec ce dernier. Ce principe est utilisé à la fois pour purifier les analytes cibles (colonnes d'immunoaffinité) mais également pour doser rapidement les mycotoxines en première intention (ELISA, RIA, (Annexe 01). (**Fremy et Usleber., 2003**).

#### **XII.2. Les méthodes physico-chimiques :**

Les méthodes chromatographiques appliquées à la séparation et la mesure ont un principe commun qui fait intervenir une différence de comportement des constituants d'un mélange (comprenant l'analyte) entre une phase stationnaire et une phase mobile. Trois types de technique chromatographiques sont principalement utilisés pour doser les mycotoxines : la chromatographie en couche mince (TLC : Thin Layer Chromatography) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

### **XII.2.1. Chromatographie sur couche mince :**

Chromatographie sur couche mince est l'une des techniques de séparation les plus utilisées dans l'analyse des aflatoxines. Elle se compose d'une phase stationnaire en silice ou en alumine ou en cellulose immobilisée sur un matériau inerte tel que le verre ou le plastique, appelé thematrix (**V. Betina., 1985**). La phase mobile composée de différents solvants organiques (chloroforme, méthanol ou éthanol, toluène/acétate d'éthyle), qui transporte l'échantillon le long de son déplacement à travers la phase solide stationnaire gel de silice. (**Alex P. Wacoo, Deborah Wendi, Peter C, Vuzi, et Joseph F, Hawumba., 2014**).

#### **XII.2.1.a. Avantages et inconvénients de l'utilisation de la CCM :**

- N'est pas couteuse et l'identification des composées cibles est très facile en utilisant l'analyse spectrale UV (**N.W. Turner, S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky., 2009**).
- Il peut Détecter plusieurs types de mycotoxines dans l'échantillon d'essai unique (**Balzer, C. Bogdanić, et S. Pepeljnjak., 1978**).
- Elles possèdent une excellente sensibilité mais elle manque de précision ; les erreurs accumulées lors de l'application de l'échantillon, le développement des plaques, et l'interprétation des plaques (**J. Stroka and E. Anklam, 2002. E. Papp, K. H-Otta, G. Z'aray, et E. Mincsovics., 2002**).

### **XII.2.2. La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (HPLC) :**

La CLHP est l'une des méthodes les plus courantes pour détecter et quantifier les mycotoxines dans les aliments (**Avishay-Abraham Stark., 2010**), est une technique analytique qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés, contenus dans un mélange, en vue de leur caractérisation et de leur quantification. Elle permet de retenir une molécule spécifique grâce à des interactions associées à des différences de polarité entre une phase mobile et une phase stationnaire inverse. La séparation des constituants se fait en fonction de la polarité. Les composés les plus polaires sont exclus en premier. (**Alex P. Wacoo, Deborah Wendi, Peter C. Vuzi, Joseph F et Hawumba., 2014**).

# **Chapitre II :**

## **Le Café**

### I. Histoire du café :

L'histoire du café est très riche en anecdote et en légende, elle pose de difficiles questions aux historiens qui souhaitent établir les étapes véridiques de son apparition et de son extension au monde entier.

Cependant les premières mentions écrites du café sont dues aux savants médecins, *Razhès*, à la fin du IX<sup>e</sup> siècle, et *Avicenne*, au XI<sup>e</sup> siècle, qui décrivent les effets du café sur l'appareil digestif.

Le café provient très probablement des caféiers qui poussent à l'état sauvage dans les forêts africains humides situés aux environs du lac Victoria.

Il semble que ces arbustes aient été ensuite introduits dans la province de Kaffa au sud-ouest de l'Éthiopie, région de montagnes et haut plateaux qui bordent le sud-est du Soudan. Faut-il suivre l'avis de quelques linguistes qui pensent que l'origine du mot « café » viendrait du nom de cette province alors que pour d'autres linguistes il s'agirait de la transformation du mot arabe « qahwah » (**Geraud debry., 1993**).

Deux types de caféiers sont cultivés : *Coffea arabica* et *Coffea canephora*. L'espèce Arabica est la plus ancienne et celle qui est la plus cultivée. Le Robusta fut découvert plus tardivement, vers le XIX<sup>e</sup> siècle (**Stella A, 1998 et Hardy C., 1998**).

### II. Généralité sur le café:

Le café vert est le fruit mûr de caféier. Qui est un arbuste appartient à la famille des *Rubiacés*. (**Fredot E, 2012 et Dupont F., 2007**).

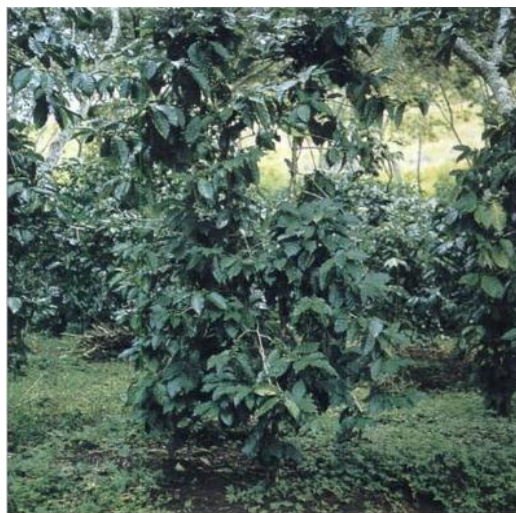
Une centaine d'espèces de café a donc été répertoriés. Certes, mais deux espèces jouent les stars et se partagent, à elles seules, la presque totalité de la production du café. Il s'agit de *Coffea arabica*, celle-là même qui fut découverte en Éthiopie et non en Arabie, comme son nom le laisserait supposer et de *Coffea canephora*.

En fait, c'est une variété de *Coffea canephora*, dite Robusta, qui est très répandu. Par conséquent, lorsqu'on parle de café Arabica et de café Robusta, cela correspond à des réalités différentes, le premier terme s'appliquant à une espèce, le second à une variété. Comme ces noms sont passés dans le langage commun, nous parlerons également d'Arabica et de Robusta (**Jeanguyot M, Séguier-Guis M et Duris D., 2003**).

Le caféier est un arbuste qui peut atteindre jusqu'à 10-12 mètres de haut pour les Robusta et de 5-6 mètres de haut pour les Arabica.

### III. Ecologie du café :

En fonction de la latitude l'Arabica poussé du niveau de la mer dans les latitudes proches des tropiques entre les latitudes de 25°N. et 25°S. À des altitudes de 600 à 2000 mètres sur les hauts plateaux proches de l'équateur. La température idéale est comprise entre 15 et 24°C. Le *Canephora robusta* pousse généralement en basse altitude, là où l'hygrométrie est élevée, mais on peut le trouver jusqu'à 1000 m d'altitude au niveau de l'équateur. La température idéale est entre 24 et 30° c. pour le Robusta qui peut supporter des conditions plus chaudes et sèches mais ne tolère pas des températures inférieures à 15°. (Clifford, M.N. and Willson, K.C., 1988)



A



B

**Figure 2.1:** Les deux espèces de caféier. A : le caféier *Arabica*, Honduras., B : le caféier *Canephora robusta*, Côte d'Ivoire (Jeanguyot M, Séguier-Guis M et Duris D., 2003).

### IV. Description botanique :

La forme d'un caféier varie en fonction de l'espèce. En général, le caféier se compose d'une tige principale verticale (tronc : qui est droit et lisse) (Fig. 2.2). Ses branches sont basses et tombantes, les feuilles sont vertes, allongées et persistantes, elles sont opposées au découpage sur les ventouses. Chaque paire de feuilles est positionnée transversalement à la paire de feuilles suivante (Fig. 2.3) (FAO., 2014). Dans l'aisselle de chaque feuille il y a une série de quatre à six bourgeons, et directement au-dessus d'eux y a un bourgeon légèrement plus grand

appelé bourgeon extra-axillaire. Les fleurs sont blanches (étoiles odorantes « odeur proche de celui du jasmin » d'une durée de quelques jours). Le caféier peut fleurir presque toute l'année (Murthy PS et Naidu MM., 2012).



**Figure 2.2 :** Arbre du café dessiné en Arabie sur le Naturel. Gravure de Thomassin, 1666 ; planche extraite du voyage de l'Arabie heureuse, **jean de la Roque ; édition 1716.**



**Figure 2.3 :** Branche du café (Michelle J, Séguier-Guis M ; Duris D., 2003).

Les fruits est verts, jaunissant ou rouges, coexistant sur la même branche, ils sont semblables à des cerises, ils renferment deux graines qui deviendront les grains de café. (Debry G, 1993).

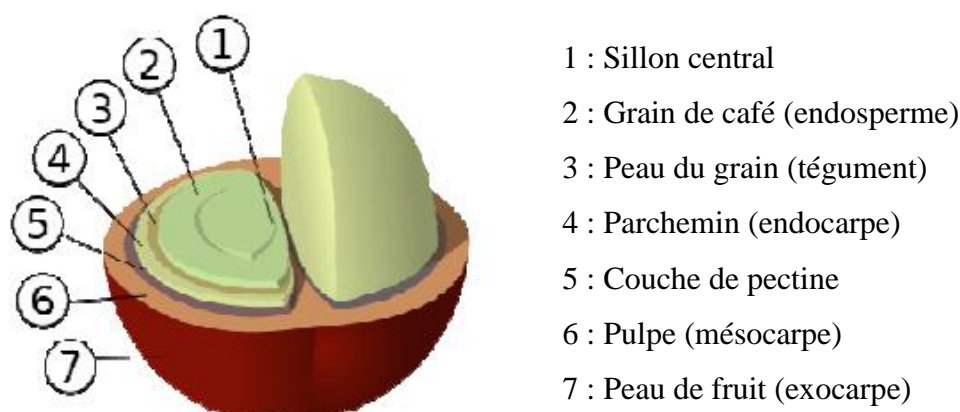


**Figure 2.4 :** Le fruit de café (Murthy PS et Naidu MM., 2012)

### V. Constituants d'une cerise de café :

Le fruit de café comprend :

- La peau (Épicarpe ou exocarpe), qui est une couche monocellulaire couverte avec une substance cireuse qui protège les fruits; c'est habituellement rouge, rose foncé ou jaune **(Murthy PS et Naidu MM., 2012)**.
- La pulpe (mésocarpe), qui comprend une pulpe charnue et, dans les fruits mûrs, une couche pectinacée gluante de mucilage adhérant au parchemin;
- Le parchemin ou parche (endocarpe), qui est un revêtement de polysaccharide mince, friable, semblable à du papier **(FAO, 2006)**.
- La peau d'argent, qui est la couche de graines composée principalement de polysaccharides, en particulier de cellulose et d'hémicelluloses, en plus de monosaccharides, de protéines, de polyphénols et d'autres composés mineurs;
- Deux graines ovales contenant de l'endosperme et des embryons **(Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SM, Cavalari AA, Pot D, Pereira LF, et al., 2006)** .



**Figure 2.5 :** Les composants de la cerise du café **(Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SM, Cavalari AA, Pot D, Pereira LF, et al., 2006 ; CAC. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme., 2009)**.

## VI. Composition du café :

Le tableau suivant précise les compositions de café Arabica et Robusta en distinguant celles des grains verts, des grains torréfiés et de la poudre de café instantané soluble (**Debry G., 1993**).

**Tableau 04 :** Composition moyenne en % de matière sèche des cafés verts et torréfiés selon la variété, et d'un café instantané soluble (**Debry G., 1993**).

Composants	Arabica		Robusta		Poudre de café instantané soluble
	Vert	Torréfié	Vert	Torréfié	
<b>Minéraux</b>	3.0-4.2	3.5-4.5	4.0-4.5	4.6-5.0	9.0-10.0
<b>Cafeine</b>	0.9-1.2	~1.0	1.6-2.0	~2.0	4.5-5.1
<b>Trogonelline</b>	1.0-1.2	0.5-1.0	0.6-0.75	0.3-0.6	-
<b>Lipides</b>	12.0-18.0	14.5-20.0	9.0-13.0	11.0-16.0	1.5-1.6
<b>Acides chlorogéniques totaux</b>	5.5-8.0	1.2-2.3	7.0-10.0	3.9-4.6	5.2-7.4
<b>Acides aliphatiques</b>	1.5-2.0	1.0-1.5	1.5-2.0	1.0-1.5	-
<b>Oligo-saccharides</b>	6.0-8.0	0-3.5	5.0-7.0	0-3.5	0.7-5.2
<b>Polysaccharides totaux</b>	50.0-55.0	24.0-39.0	37.0-47.0	-	~ 6.5
<b>Acides aminés</b>	2.0	0	2.0	0	0
<b>protéines</b>	11.0-13.0	13.0-15.0	11.0-13.0	13.0-15.0	16.0-21.0
<b>Acides humiques</b>	-	16.0-17.0	-	16.0-17.0	15.0

### 1) Les apports en minéraux :

Les cendres du café représentent environ 4% (3 à 5.4% de la matière sèche. 90% des minéraux sont hydrosolubles et sont présents dans la boisson. La composition moyenne en minéraux des grains verts, exprime en pourcentage de la matière sèche, est la suivante (**Pascal Obrecht., 2009**). : Potassium : 80 mg ; Calcium : 3 mg ; Sodium : 1 mg ; des oligoéléments : fer (0,1 mg), zinc (0,01 mg), cuivre (0,001 mg), chrome.

### 2) Les apports en glucides :

Les glucides représentent environ 50% de la matière sèche du café. *Coffea arabica* est généralement un peu plus riche que *Coffea canephora robusta* (Debry G., 1993).

### 3) Les apports en lipides :

Comme toutes les graines, celle du café contient des lipides, en majorité des acides palmitiques, stéariques, oléiques et linoléiques. Le café est d'ailleurs considéré comme un agent hypocholestérolémiant (Pascal Obrecht., 2009).

### 4) Les apports en protéines :

Les teneurs en protéines de *Coffea arabica* et de *Coffea canephora robusta* sont comparables. Elles varient de 8.7 à 12.2 de la matière sèche du grain vert, les acides aminés libres ne représentent que 0.2 à 0.8 % (Bekedam EK., 2008).

### 5) Les apports en vitamines :

Parmi les vitamines, c'est la vitamine B3 (400 à 1200 µg) qui est majoritairement retrouvée et les vitamines B5 (environ 80 µg), B2 (2 µg) et B6 (0.6 µg). Les vitamines B1 et C sont dégradées lors de la torréfaction (Nehlig A., 2014).

## VII. La caféine :

La caféine est un alcaloïde, substance organique d'origine végétale naturellement présente dans le café. Appartenant à la famille des xanthines ou méthylxanthines. Elle s'agit de 1, 3, 7-triméthylxanthine (IUAPC : International Union of Pure and Applied Chemistry) ou 1, 3, 7-triméthyl-1H-purine-2, 6-dione (Victor R. Preedy., 2012).

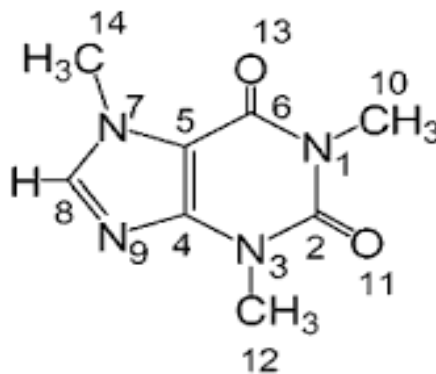


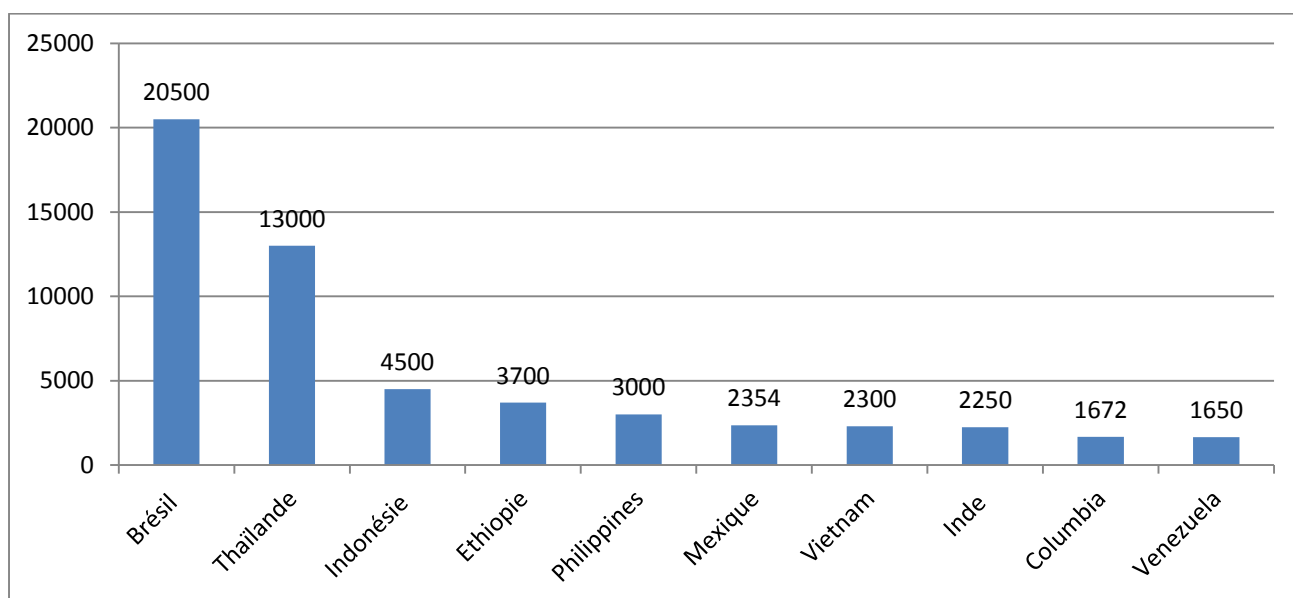
Figure 2.6 : Structure de la caféine (Victor R. Preedy., 2012).

## IX. Le marché de café :

Le café est une des principales produits d'origine agricole échangées sur le marché international, et souvent une contribution majeure aux exportations des régions productrices. Le café est souvent présenté comme le deuxième bien d'exportation dans le monde après le pétrole et la deuxième boisson après l'eau. (OIC., 2017).

### IX.1. Les principaux pays exportateurs du café « sac de 60kg » (OIC., 2017) :

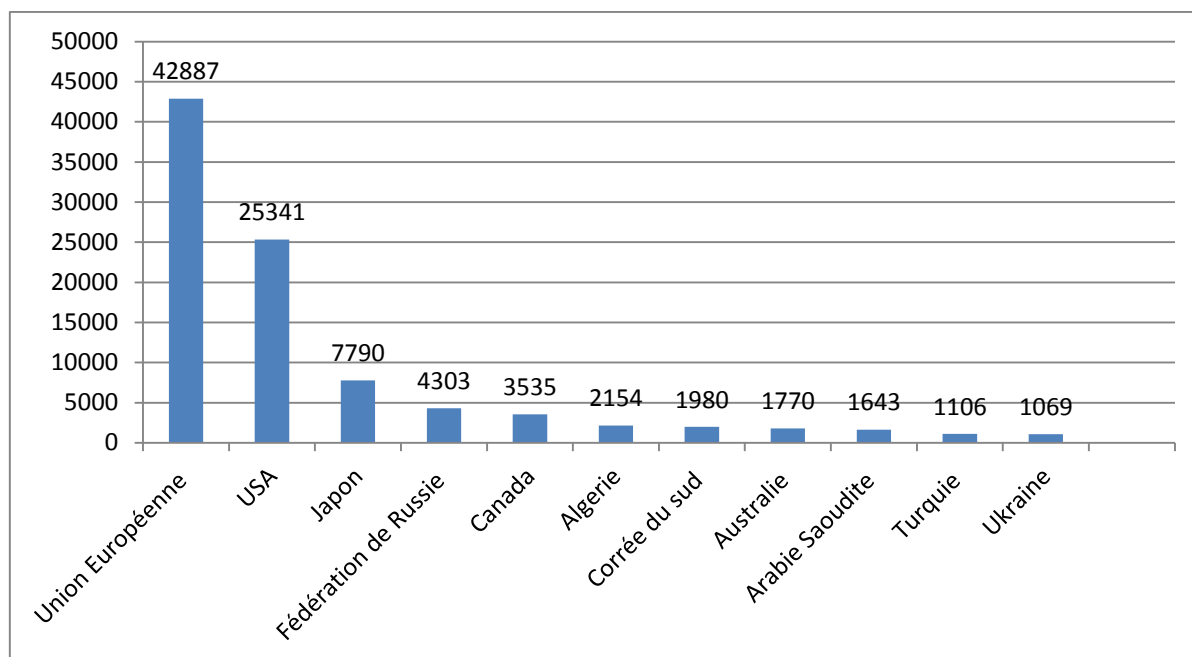
Le premier exportateur de café est le Brésil, avec 20500 sacs de 60 kg, suivi par le Thaïlande, l'Indonésie, Ethiopie, la Philippine, le Mexique, le Vietnam, l'Inde, la Columbia et Venezuela.



**Figure 2.7:** Les principaux pays exportateurs du café « sac de 60kg » (OIC, 2017)

## IX.2. Les principaux pays importateurs du café « sac de 60kg » (OIC, 2017) :

L'Union européenne est classée comme le premier importateur de café avec 42887 sacs de 60 kg, suivi par USA, Japon, Fédération de Russie, Canada, Algérie, Corée du sud, Australie, Arabie saoudite, Turquie, et Ukraine.



**Figure 2.8 :** Les principaux pays importateurs du café « sac de 60kg » (OIC., 2017)

# **Partie expérimentale**

# **Matériel et méthodes**

### **I. Choix de la région :**

D'une superficie de 400 km<sup>2</sup> la wilaya de Laghouat se situe à 400km au sud de la capitale Alger, la wilaya compte au total 636379 habitants (**Monographie D.P.A.T., 2010**). La consommation du café dans cette région est très élevée dus aux coutumes et traditions, la région de Laghouat est l'une des villes algériennes où la préparation du café est faite traditionnellement (le café vert est torréfié à feu doux et broyer manuellement) (**H.Gueddouda., 2014**). Le nombre des torréfacteurs du café vert augmente de plus en plus la wilaya comprend à présent 4 torréfacteurs.

### **II. Echantillonnages :**

Le café vert présent dans les marchés algériens provient de plusieurs pays notamment du Brésil, l'Ouganda, Vietnam, Cote d'ivoire, l'Indonésie et l'Inde. La consommation annuelle du café en Algérie est de plus de 70 000 tonnes. (**L'express international., 2003**). L'échantillonnage a été effectué depuis les vendeurs à partir des sacs de 60 kg.

### **III. Prélèvement :**

Le prélèvement du café vert se faisait du mois de novembre jusqu'en janvier dans la région de Laghouat au total six variétés ont été analysées. Dont deux variétés d'Arabica (Brésilien et Ougandaise) et quatre variétés de Robusta (Indonésienne, Vietnamiennne, Indienne, Ivoirienne).

L'analyse consiste à faire les tests physicochimiques, calculer le taux d'humidité relative, calculer le taux de contaminations, et mettre en évidence la présence des mycotoxines dans la mycoflore du café vert.

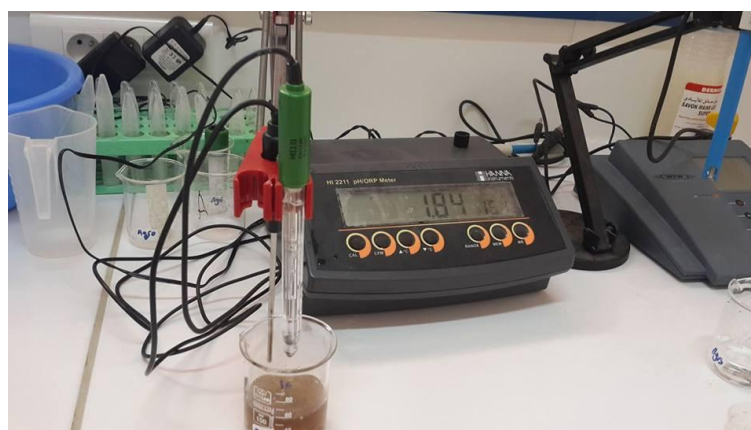
**Tableau 05** : Echantillons prélevé.

Variété de café	Code utilisés	Date du début d'analyse
Arabica brésilienne	A.E.E	29/11/2016
Robusta vietnamienne	RI.E.E	
Robusta indonésienne	RII.E.E	
Arabica ougandaise	A0.E.E	18/12/2016
Robusta ivoirienne	RIII.E.E	
Robusta vietnamienne	RI.E.E	
Arabica brésilienne	A.E.E	19/12/2016
Arabica ougandaise	A0.E.E	
Robusta Indonésienne	RII.E.E	
Robusta ivoirienne	RIII.E.E	23/01/2017
Robusta vietnamienne	RI.E.E	
Robusta indienne	RIV.E.E	
Robusta indonésienne	RII.E.E	29/01/2017
Arabica Brésilienne	A.E.E	

#### IV. Analyse physicochimique :

##### IV.1. Mesure du pH :

Pour la mesure du pH il faut peser 5g de café broyer et le mélanger avec 45 ml d'eau distillée et agiter pour que le mélange s'homogénéise après 15 min faire la mesure du pH à l'aide du pH mètre (**Multon, 1982**). (Nous avons fait l'analyse en trois prises d'essai pour chaque variété et la lecture du pH à l'aide de deux types de pH mètre).



**Figure 3.1** : pH mètre de paillasse utilisé pour la mesure (HANNA, WTW inolab pH 720).

### IV.2. Humidité relative :

La teneur en eau dans les graines de café est mesurée après avoir séché 5g de café broyé dans une étuve à  $105 \pm 02^\circ$  pendant 24h. (3 prises d'essai pour chaque échantillons) l'humidité relative est calculé d'après la formule suivante (**Afnor., 1980**) :

$$HR\% = \frac{Pech - Pf}{Pech - t} \times 100$$

HR%: humidité relative en pourcentage

Péch: poids de la prise d'essai avant l'étuvage

Pf: poids de la prise d'essai après l'étuvage

t : poids tarée du verre.

### V. Etude de la mycoflore :

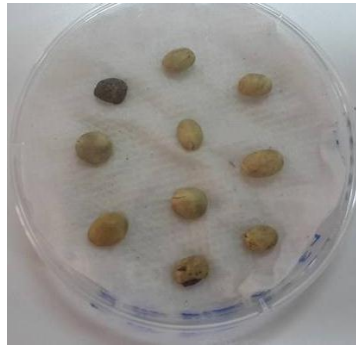
L'étude de la mycoflore des graines de café a été réalisée en appliquant différentes méthodes pour évaluer la mycoflore fongiques contaminants (**Hannin.S, Hassikou.K, Benkirane, Ouazzanitouhami, A et Douira. A., 2003**).

- La méthode du buvard.
- La méthode Ulster.

#### V.1.Méthode buvard :

La méthode du buvard a été recommandée dans le cadre des règles internationales pour l'analyse des semences (**ISTA., 1985**), afin de détecter les différentes moisissures contaminants les graines de café.

Cette méthode consiste à tester 100 grains de chaque variété à raison de 10 grains par boîte de pétrie de 90 mm de diamètre. Ces grains n'ayant subi aucun traitement préliminaire sont placés sur trois rondelles de papier filtre (buvard) et humidifiés avec de l'eau distillée stérile.



**Figure 3.2 :** Méthode direct sur buvard.

### V.2.Méthode Ulster :

Toute graine porte une microflore naturellement acquise au cours de son cycle de développement, des manutentions, du stockage. Pour évaluer cette spermoflore (**Lanier L., JolyP., Sondoux P. et Bellenere A., 1978**), on applique généralement la méthode Ulster qui consiste à placer les graines du café dans des boîtes de pétrie rempli de milieu synthétique approprié pour l'isolement des moisissures.



**Figure 3.3 :** Méthode direct d'Ulster.

Dans notre étude le principal milieu de culture qui a été utilisé est le PDA, qui est un milieu de base pour l'isolement et la numération des moisissures et des levures des produits alimentaires. (**Botton et al., 1990**).

L'incubation des boîtes de Pétri a lieu à une température de 25°C pendant 7 jours. Les grains sont ensuite examinés sous la loupe pour observer et dénombrer les moisissures.

Le taux de contamination est estimé selon la formule suivante :

$$C(\%) = \frac{N2}{N1} \times 100$$

N1 : nombre total de grains par boîte.

N2 : nombre de grains contaminés.

C% : taux de contamination.

### V.3.Purification et conservation des moisissures :

L'obtention des isolats purs repose sur la réalisation de plusieurs repiquages successifs sur milieu PDA. Ces isolats purs sont repris sur d'autres boîtes de pétrie contenant le milieu de culture PDA et incubés à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours, la conservation des cultures pures est réalisée sur des tubes de PDA inclinés et les conserver au frais à  $4^{\circ}\text{C}$ , afin de faciliter leur identification ultérieurement.

### VI. Identification des moisissures :

L'identification des moisissures reposent sur plusieurs critères d'ordre macroscopiques (morphologiques) tel que l'aspect et couleur et diamètre de la colonie et de leur reverse, présence des exsudats. Et d'ordre microscopique tel que la présence ou absence des spores, leur forme et leur structure et leur taille, l'aspect de mycélium. (Pitt et Hocking., 2009).

#### VI. 1. Identification des genres :

Le processus de l'identification des genres de moisissures repose sur les caractéristiques microscopiques de culture fongiques obtenues par la technique de « Micro culture » et la technique du ruban adhésif «Méthode de scotch».

**-Technique du ruban adhésif (méthode de scotch) :** cette technique consiste à adhérer un bout de scotch d'une fraction mycélienne jeune d'une culture pure, et la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Chabasse., 2002). Et les observer sous microscope optique au grossissement x100, x400 selon pitt et hocking.

**-Micro-culture :** c'est une technique réalisé pour l'identification de genre de moisissure elle est utile pour observer la sporulation et favorise la fructification (Grillot R., 1996). Nous avons inoculé des spores de souche fongique pure, sur des lames menées de petits carrés de PDA solidifiés et les recouvrir par des lamelles (Ramirez., 1982), déposé sur le support en verre sous forme (U) sur papier filtre stérile humidifié d'eau distillée stérile dans une boîte pétrie.

Les spores sontensemencées sur les limites périphériques (bordures) du milieu. L'incubation se fait à  $25^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours, Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont, transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol pour l'observation microscopique (Harris., 1986).

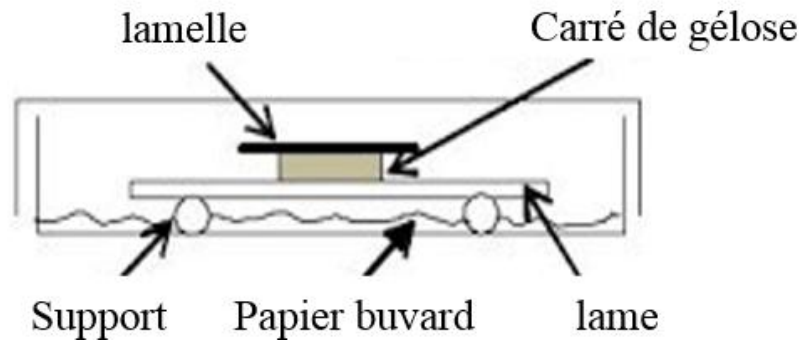


Figure 3.4 : Technique de micro culture (Grillot R., 1996).

## VI.2. Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*:

Le processus de l'identification des espèces de l'*Aspergillus* et de *Penicillium* repose sur les caractéristiques morphologiques de culture fongiques obtenues par la technique de « single spore » (Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H., 1999). Nous avons inoculé aseptiquement quelques spores d'une culture jeune pure dans des tubes à hémolyse remplie 2/3 de son volume d'agar 0.2 % et de quelques gouttes de tween 80. Après agitation du tube sur un agitateur électrique et à l'aide d'un inoculateur, nous avons effectué une touche de cette suspension pour prélever une seule spore et la déposer sur différents milieux de cultures. (Pitt et Hocking., 2009).

### VI.2.1. Identification des espèces *Aspergillus* :

L'identification des espèces *Aspergillus* a été effectuée sur trois milieux de cultures différents sont :

- MEA à 25 °C,
- G25N à 25 °C,
- CYA à deux températures différentes : 5°C et 37°C.

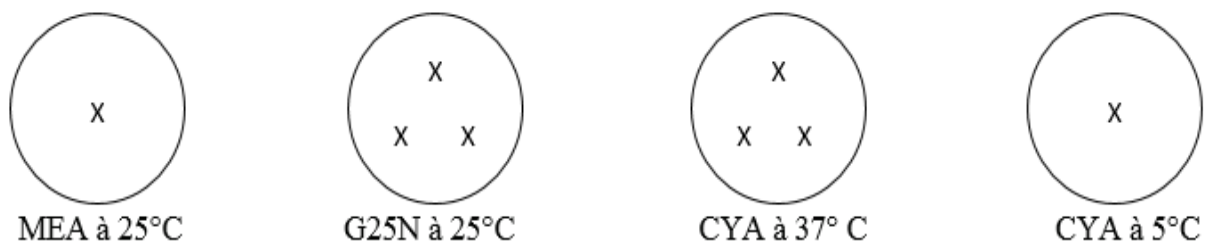
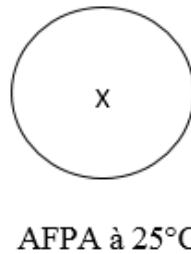


Figure 3.5 : Technique d'inoculation des différents isolats d'*Aspergillus*.

**VI.2.1.1. Confirmation de l'identité des espèces *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* :**

Pour confirmer l'identification de ces espèces on utilise le milieu AFPA à 25°C.

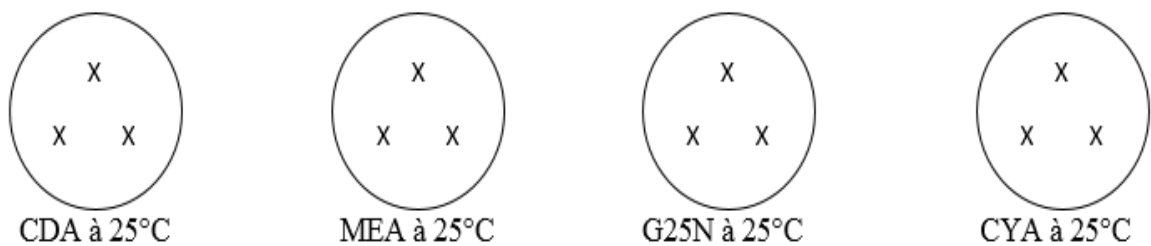


**Figure 3.6 :** Technique de confirmation d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sur milieu AFPA.

**VI.2.2. Identification des espèces *Penicillium* :**

L'identification des espèces *Penicillium* a été effectuée selon **Ramirez (1982)** sur quatre milieux de cultures différents sont :

- CDA à 25 °C.
- MEA à 25 °C.
- G25N à 25 °C.
- CYA à 25°C.



**Figure 3.7 :** Technique d'inoculation des différents isolats de *Penicillium*.

### VII. Analyses mycotoxiques :

Toutes les 40 souches d'*Aspergillus* suspectées mycotoxinogène identifiées à partir des prélèvements précédents et conservées dans des tubes inclinés seront revivifiées sur milieu PDA pendant 7 jours à 25° C, ensuite seront soumises aux analyses mycotoxiques.

#### VII.1.Extraction et purification à partir du milieu de culture liquide (extraction liquide /liquide) :

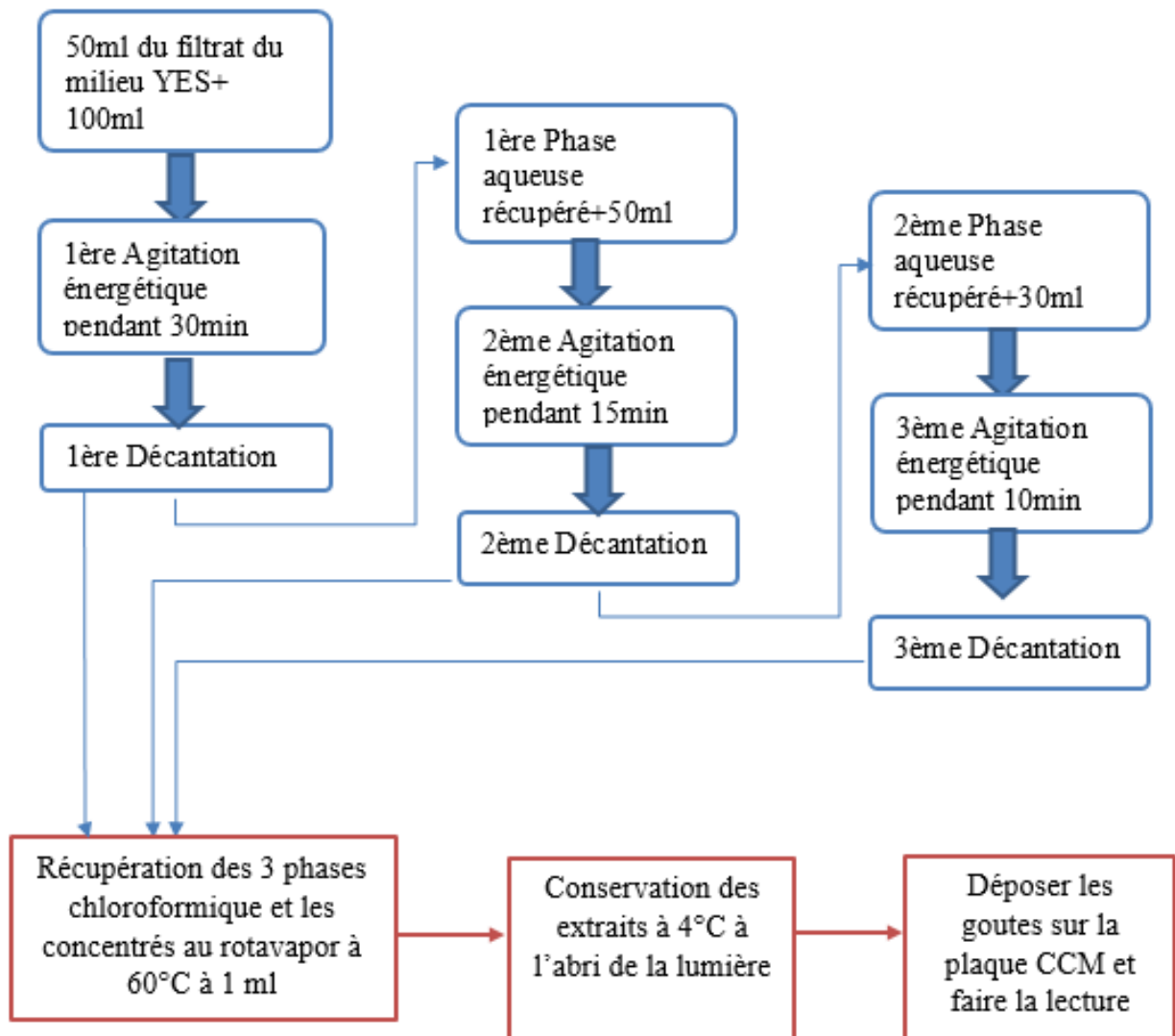
Pour tester le pouvoir mycotoxinogène des 40 souches suspectées de synthétiser l'OTA et l'AFB1, nous les avons inoculées dans des flacons contenant 50 ml du milieu semi synthétique YES pour favoriser la production des mycotoxines, les flacons seront mis en incubation pendant 14 jours à 25°C (Davis et al., 1966).



**Figure 3.8:** Culture fongique pure sur milieu YES de 14 jours d'incubation.

#### VII.2. Extraction et concentration :

L'extraction se fait à partir du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation, nous avons éliminé la biomasse formée par filtration à l'aide du papier filtre (Gattier et al., 1974). Le filtrat obtenu est additionné à 100 ml de chloroforme avec une agitation énergique pendant 30 min, on laisse ensuite le mélange décanté en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée 3 fois successivement avec l'ajout de la phase chloroformique de 50 et 30 ml pendant 15 et 10 min. avec récupération de la phase chloroformique successivement, ainsi le filtrat obtenu est concentré au rotavapor afin d'obtenir un volume inférieur à 1 ml. (H. S. Lillard, r. T. Hanlin, et d. A. Lillard., 1970).



**Figure 3.9:** Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide (Davis et al., 1966).



**Figure 3.10 :** Rota-vapeur type Buchi R-200.

### VII.3.Séparation et détection chromatographique sur CCM :

La détection des mycotoxines est réalisée par CCM ; la chromatographie couche mince permet une détection qualitative et semi-quantitative des mycotoxines selon une technique préconisée par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists), pour la détection des mycotoxines dans les produits alimentaires (AOAC., 1984).



**Figure 3.11** : Cuve de migration CCM.

Nous avons déposé 40ul de chaque concentré à analyser et 10ul de chaque solution étalon standard d'ochratoxine et d'aflatoxine sur une chromatoplaque de gel de silice (20cm, 20cm), la plaque ensuite est introduit dans une cuve de migration contenant de la phase mobile (chloroforme, méthanol, toluène) , remplie à 0.5cm de hauteur (Alex P. Wacoo, Deborah Wendiro, Peter C. Vuzi, et Joseph F. Hawumba., 2014).

#### VII.3.1. Etape de séchage des plaques à CCM :

Après migration et évaporation du produit d'élution la plaque est examinée sous UV à 366 nm la révélation de l'ochratoxine A apparaîtra sous forme d'une tache fluorescente bleu-vert et l'aflatoxine B<sub>1</sub> d'une tache fluorescente bleue (Galtier et al., 1974).



**Figure 3.12** : Chambre UV forte puissance type CAMMAG.

# Résultats

### **I. Choix de la région :**

D'une superficie de 400 km<sup>2</sup> la wilaya de Laghouat se situe à 400km au sud de la capitale Alger, la wilaya compte au total 636379 habitants (**Monographie D.P.A.T., 2010**). La consommation du café dans cette région est très élevée dus aux coutumes et traditions, la région de Laghouat est l'une des villes algériennes où la préparation du café est faite traditionnellement (le café vert est torréfié à feu doux et broyer manuellement) (**H.Gueddouda., 2014**). Le nombre des torréfacteurs du café vert augmente de plus en plus la wilaya comprend à présent 4 torréfacteurs.

### **II. Echantillonnages :**

Le café vert présent dans les marchés algériens provient de plusieurs pays notamment du Brésil, l'Ouganda, Vietnam, Cote d'ivoire, l'Indonésie et l'Inde. La consommation annuelle du café en Algérie est de plus de 70 000 tonnes. (**L'express international., 2003**). L'échantillonnage a été effectué depuis les vendeurs à partir des sacs de 60 kg.

### **III. Prélèvement :**

Le prélèvement du café vert se faisait du mois de novembre jusqu'en janvier dans la région de Laghouat au total six variétés ont été analysées. Dont deux variétés d'Arabica (Brésilien et Ougandaise) et quatre variétés de Robusta (Indonésienne, Vietnamiennne, Indienne, Ivoirienne).

L'analyse consiste à faire les tests physicochimiques, calculer le taux d'humidité relative, calculer le taux de contaminations, et mettre en évidence la présence des mycotoxines dans la mycoflore du café vert.

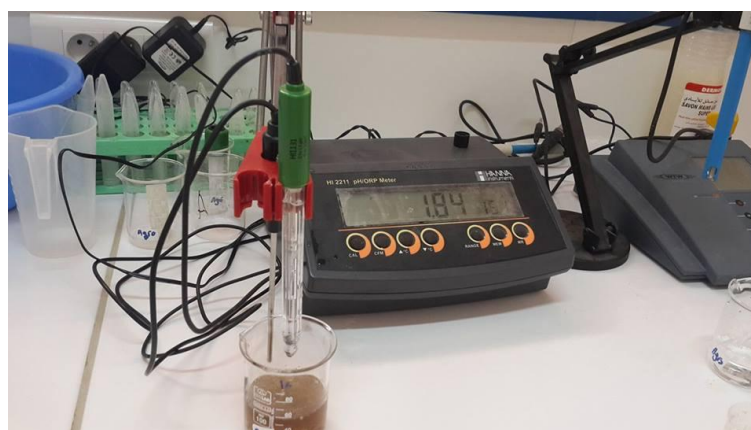
**Tableau 05** : Echantillons prélevé.

Variété de café	Code utilisés	Date du début d'analyse
Arabica brésilienne	A.E.E	29/11/2016
Robusta vietnamienne	RI.E.E	
Robusta indonésienne	RII.E.E	
Arabica ougandaise	A0.E.E	18/12/2016
Robusta ivoirienne	RIII.E.E	
Robusta vietnamienne	RI.E.E	
Arabica brésilienne	A.E.E	19/12/2016
Arabica ougandaise	A0.E.E	
Robusta Indonésienne	RII.E.E	
Robusta ivoirienne	RIII.E.E	23/01/2017
Robusta vietnamienne	RI.E.E	
Robusta indienne	RIV.E.E	
Robusta indonésienne	RII.E.E	29/01/2017
Arabica Brésilienne	A.E.E	

#### IV. Analyse physicochimique :

##### IV.1. Mesure du pH :

Pour la mesure du pH il faut peser 5g de café broyer et le mélanger avec 45 ml d'eau distillée et agiter pour que le mélange s'homogénéise après 15 min faire la mesure du pH à l'aide du pH mètre (**Multon, 1982**). (Nous avons fait l'analyse en trois prises d'essai pour chaque variété et la lecture du pH à l'aide de deux types de pH mètre).



**Figure 3.1** : pH mètre de paillasse utilisé pour la mesure (HANNA, WTW inolab pH 720).

### IV.2. Humidité relative :

La teneur en eau dans les graines de café est mesurée après avoir séché 5g de café broyé dans une étuve à  $105 \pm 02^\circ$  pendant 24h. (3 prises d'essai pour chaque échantillons) l'humidité relative est calculé d'après la formule suivante (**Afnor., 1980**) :

$$HR\% = \frac{P_{ech} - P_f}{P_{ech} - t} \times 100$$

HR%: humidité relative en pourcentage

Péch: poids de la prise d'essai avant l'étuvage

Pf: poids de la prise d'essai après l'étuvage

t : poids tarée du verre.

### V. Etude de la mycoflore :

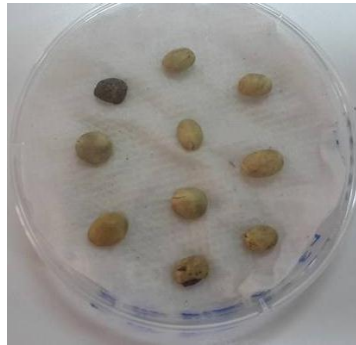
L'étude de la mycoflore des graines de café a été réalisée en appliquant différentes méthodes pour évaluer la mycoflore fongiques contaminants (**Hannin.S, Hassikou.K, Benkirane, Ouazzanitouhami, A et Douira. A., 2003**).

- La méthode du buvard.
- La méthode Ulster.

#### V.1.Méthode buvard :

La méthode du buvard a été recommandée dans le cadre des règles internationales pour l'analyse des semences (**ISTA., 1985**), afin de détecter les différentes moisissures contaminants les graines de café.

Cette méthode consiste à tester 100 grains de chaque variété à raison de 10 grains par boîte de pétrie de 90 mm de diamètre. Ces grains n'ayant subi aucun traitement préliminaire sont placés sur trois rondelles de papier filtre (buvard) et humidifiés avec de l'eau distillée stérile.



**Figure 3.2 :** Méthode direct sur buvard.

### V.2.Méthode Ulster :

Toute graine porte une microflore naturellement acquise au cours de son cycle de développement, des manutentions, du stockage. Pour évaluer cette spermoflore (**Lanier L., JolyP., Sondoux P. et Bellenere A., 1978**), on applique généralement la méthode Ulster qui consiste à placer les graines du café dans des boîtes de pétrie rempli de milieu synthétique approprié pour l'isolement des moisissures.



**Figure 3.3 :** Méthode direct d'Ulster.

Dans notre étude le principal milieu de culture qui a été utilisé est le PDA, qui est un milieu de base pour l'isolement et la numération des moisissures et des levures des produits alimentaires. (**Botton et al., 1990**).

L'incubation des boîtes de Pétri a lieu à une température de 25°C pendant 7 jours. Les grains sont ensuite examinés sous la loupe pour observer et dénombrer les moisissures.

Le taux de contamination est estimé selon la formule suivante :

$$C(\%) = \frac{N2}{N1} \times 100$$

N1 : nombre total de grains par boîte.

N2 : nombre de grains contaminés.

C% : taux de contamination.

### V.3.Purification et conservation des moisissures :

L'obtention des isolats purs repose sur la réalisation de plusieurs repiquages successifs sur milieu PDA. Ces isolats purs sont repris sur d'autres boîtes de pétrie contenant le milieu de culture PDA et incubés à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours, la conservation des cultures pures est réalisée sur des tubes de PDA inclinés et les conserver au frais à  $4^{\circ}\text{C}$ , afin de faciliter leur identification ultérieurement.

### VI. Identification des moisissures :

L'identification des moisissures reposent sur plusieurs critères d'ordre macroscopiques (morphologiques) tel que l'aspect et couleur et diamètre de la colonie et de leur reverse, présence des exsudats. Et d'ordre microscopique tel que la présence ou absence des spores, leur forme et leur structure et leur taille, l'aspect de mycélium. (Pitt et Hocking., 2009).

#### VI. 1. Identification des genres :

Le processus de l'identification des genres de moisissures repose sur les caractéristiques microscopiques de culture fongiques obtenues par la technique de « Micro culture » et la technique du ruban adhésif «Méthode de scotch».

**-Technique du ruban adhésif (méthode de scotch) :** cette technique consiste à adhérer un bout de scotch d'une fraction mycélienne jeune d'une culture pure, et la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Chabasse., 2002). Et les observer sous microscope optique au grossissement x100, x400 selon pitt et hocking.

**-Micro-culture :** c'est une technique réalisé pour l'identification de genre de moisissure elle est utile pour observer la sporulation et favorise la fructification (Grillot R., 1996). Nous avons inoculé des spores de souche fongique pure, sur des lames menées de petits carrés de PDA solidifiés et les recouvrir par des lamelles (Ramirez., 1982), déposé sur le support en verre sous forme (U) sur papier filtre stérile humidifié d'eau distillée stérile dans une boîte pétrie.

Les spores sontensemencées sur les limites périphériques (bordures) du milieu. L'incubation se fait à  $25^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours, Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont, transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol pour l'observation microscopique (Harris., 1986).

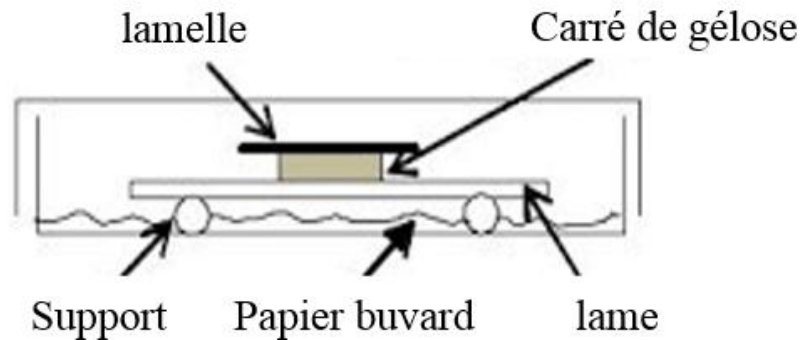


Figure 3.4 : Technique de micro culture (Grillot R., 1996).

## VI.2. Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*:

Le processus de l'identification des espèces de l'*Aspergillus* et de *Penicillium* repose sur les caractéristiques morphologiques de culture fongiques obtenues par la technique de « single spore » (Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H., 1999). Nous avons inoculé aseptiquement quelques spores d'une culture jeune pure dans des tubes à hémolyse remplie 2/3 de son volume d'agar 0.2 % et de quelques gouttes de tween 80. Après agitation du tube sur un agitateur électrique et à l'aide d'un inoculateur, nous avons effectué une touche de cette suspension pour prélever une seule spore et la déposer sur différents milieux de cultures. (Pitt et Hocking., 2009).

### VI.2.1. Identification des espèces *Aspergillus* :

L'identification des espèces *Aspergillus* a été effectuée sur trois milieux de cultures différents sont :

- MEA à 25 °C,
- G25N à 25 °C,
- CYA à deux températures différentes : 5°C et 37°C.

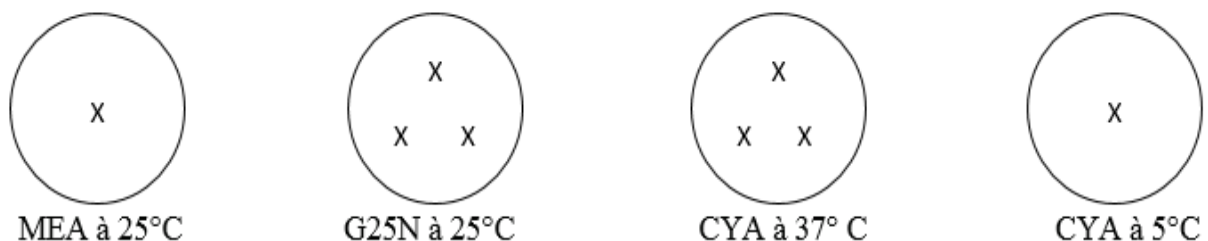
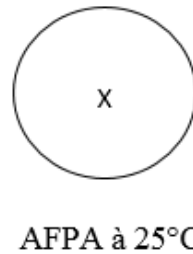


Figure 3.5 : Technique d'inoculation des différents isolats d'*Aspergillus*.

**VI.2.1.1. Confirmation de l'identité des espèces *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* :**

Pour confirmer l'identification de ces espèces on utilise le milieu AFPA à 25°C.

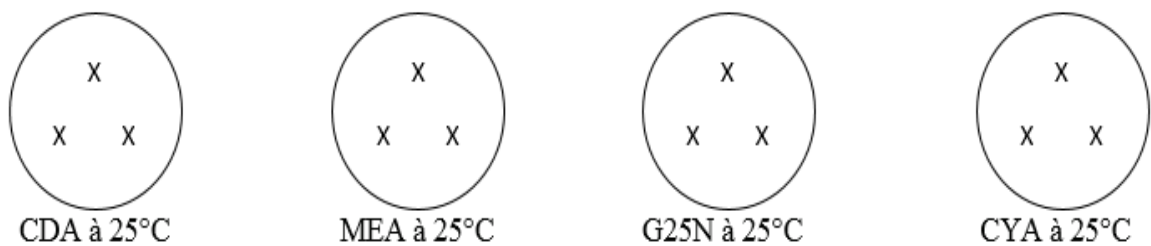


**Figure 3.6 :** Technique de confirmation d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sur milieu AFPA.

**VI.2.2. Identification des espèces *Penicillium* :**

L'identification des espèces *Penicillium* a été effectuée selon **Ramirez (1982)** sur quatre milieux de cultures différents sont :

- CDA à 25 °C.
- MEA à 25 °C.
- G25N à 25 °C.
- CYA à 25°C.



**Figure 3.7 :** Technique d'inoculation des différents isolats de *Penicillium*.

### VII. Analyses mycotoxiques :

Toutes les 40 souches d'*Aspergillus* suspectées mycotoxinogène identifiées à partir des prélèvements précédents et conservées dans des tubes inclinés seront revivifiées sur milieu PDA pendant 7 jours à 25° C, ensuite seront soumises aux analyses mycotoxiques.

#### VII.1.Extraction et purification à partir du milieu de culture liquide (extraction liquide /liquide) :

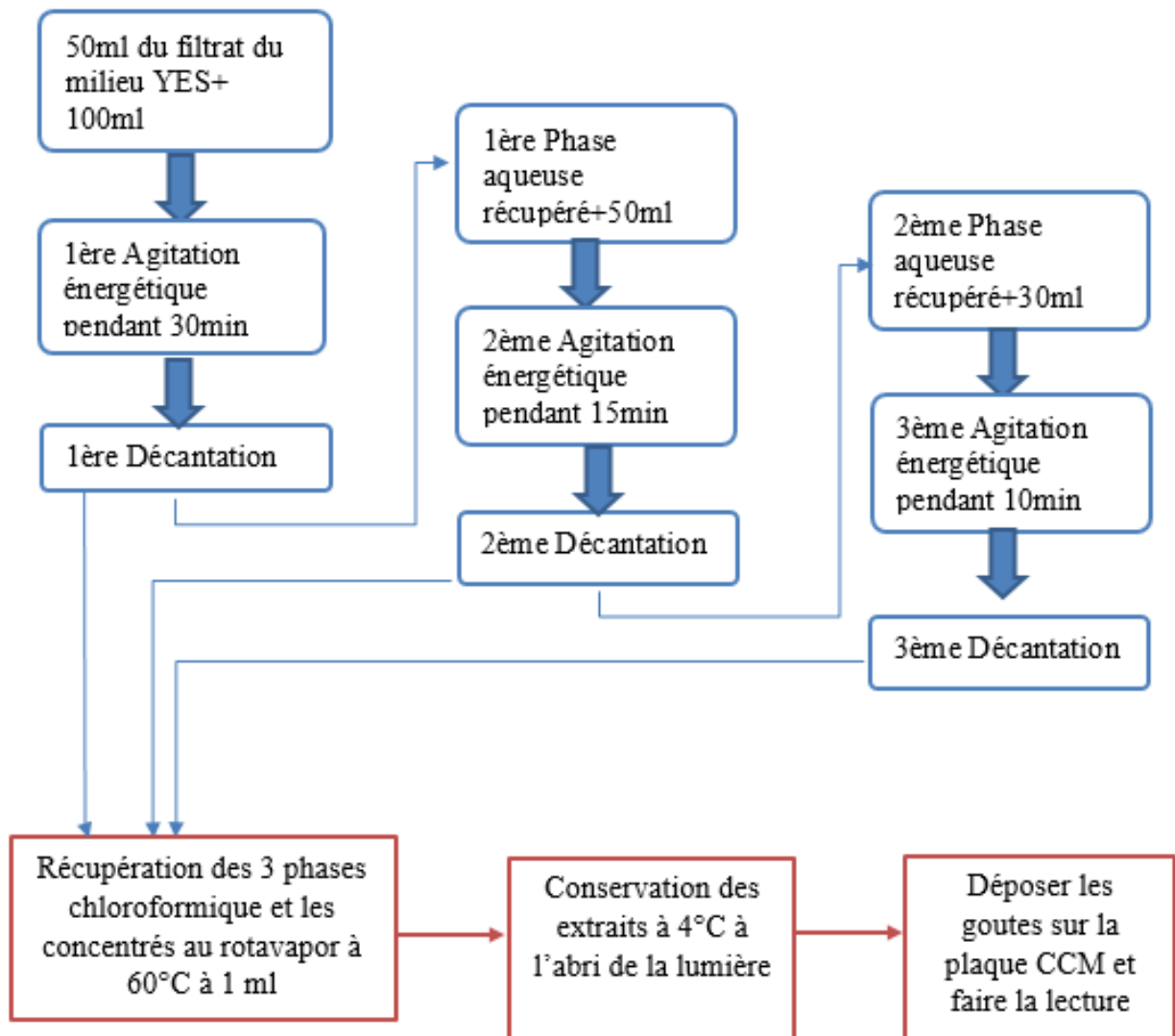
Pour tester le pouvoir mycotoxinogène des 40 souches suspectées de synthétiser l'OTA et l'AFB1, nous les avons inoculées dans des flacons contenant 50 ml du milieu semi synthétique YES pour favoriser la production des mycotoxines, les flacons seront mis en incubation pendant 14 jours à 25°C (Davis et al., 1966).



**Figure 3.8:** Culture fongique pure sur milieu YES de 14 jours d'incubation.

#### VII.2. Extraction et concentration :

L'extraction se fait à partir du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation, nous avons éliminé la biomasse formée par filtration à l'aide du papier filtre (Gattier et al., 1974). Le filtrat obtenu est additionné à 100 ml de chloroforme avec une agitation énergique pendant 30 min, on laisse ensuite le mélange décanté en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée 3 fois successivement avec l'ajout de la phase chloroformique de 50 et 30 ml pendant 15 et 10 min. avec récupération de la phase chloroformique successivement, ainsi le filtrat obtenu est concentré au rotavapor afin d'obtenir un volume inférieur à 1 ml. (H. S. Lillard, r. T. Hanlin, et d. A. Lillard., 1970).



**Figure 3.9:** Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide (Davis et al., 1966).



**Figure 3.10 :** Rota-vapeur type Buchi R-200.

### VII.3.Séparation et détection chromatographique sur CCM :

La détection des mycotoxines est réalisée par CCM ; la chromatographie couche mince permet une détection qualitative et semi-quantitative des mycotoxines selon une technique préconisée par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists), pour la détection des mycotoxines dans les produits alimentaires (AOAC., 1984).



**Figure 3.11** : Cuve de migration CCM.

Nous avons déposé 40ul de chaque concentré à analyser et 10ul de chaque solution étalon standard d'ochratoxine et d'aflatoxine sur une chromatoplaque de gel de silice (20cm, 20cm), la plaque ensuite est introduit dans une cuve de migration contenant de la phase mobile (chloroforme, méthanol, toluène) , remplie à 0.5cm de hauteur (Alex P. Wacoo, Deborah Wendiro, Peter C. Vuzi, et Joseph F. Hawumba., 2014).

#### VII.3.1. Etape de séchage des plaques à CCM :

Après migration et évaporation du produit d'élution la plaque est examinée sous UV à 366 nm la révélation de l'ochratoxine A apparaîtra sous forme d'une tache fluorescente bleu-vert et l'aflatoxine B<sub>1</sub> d'une tache fluorescente bleue (Galtier et al., 1974).



**Figure 3.12** : Chambre UV forte puissance type CAMMAG.

## I. Analyses physicochimiques :

### I.1. Mesure de pH :

La mesure du pH menait sur les différents variétés de café à démontrer que le pH est légèrement acide allant 5.8 à 6.2 la valeur la plus faible est présente dans l'Arabica d'origine Ougandaise, et la plus élevée dans la variété de Robusta d'origine Indienne.

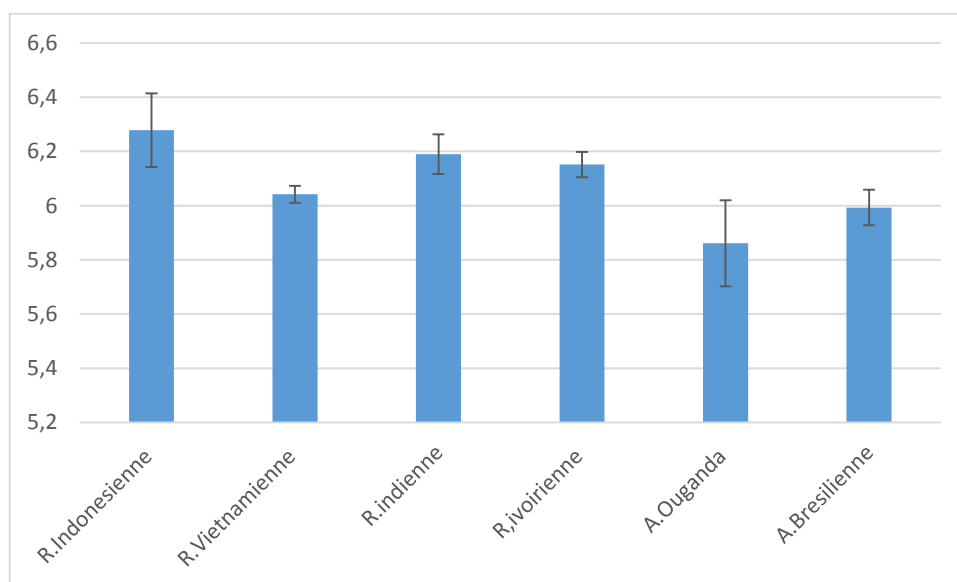


Figure 4.1 : pH calculé pour chaque variété de cafés analysés.

### I.2 L'humidité relative (HR%) :

L'humidité relative mesurée sur les échantillons de café révèle que les grains sont d'humidité relative allant de 8% à 13.8 %.

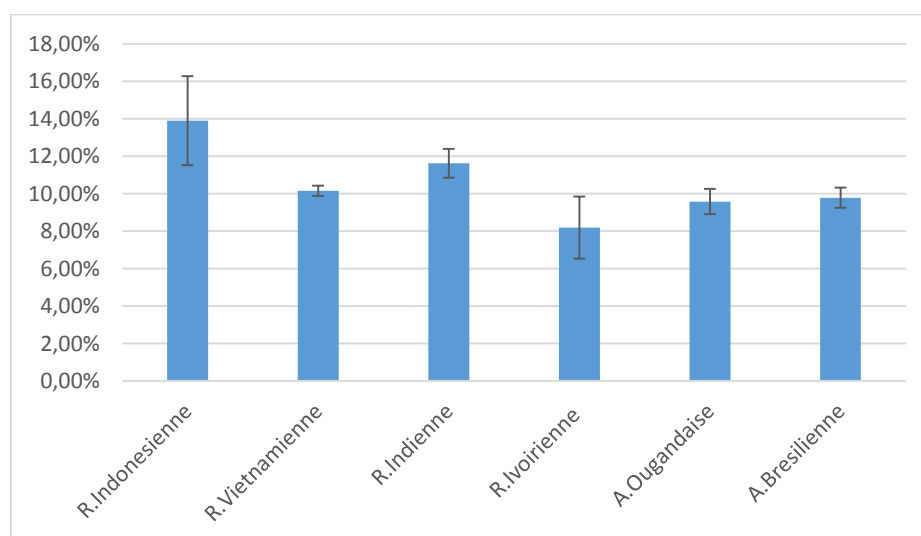


Figure 4.2: Taux d'humidité relative des échantillons de café analysée.

## II. Analyses mycologiques :

### II.1. Résultat de la méthode buvard et Ulster :

La méthode d'analyse qui révèle le plus grand taux de contamination est la méthode buvard dans tous les échantillons analysés. Avec suivie la méthode Ulster en remplaçant la source de carbone par le saccharose et en derniers la méthode Ulster.

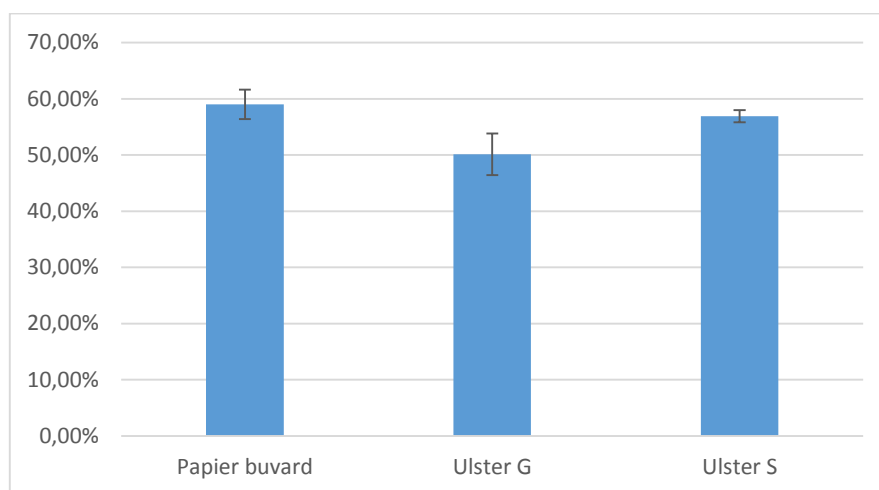


Figure 4.3 : Taux de contamination révélé pour chaque méthode d'isolement utilisée.

### II.2. Taux de contamination :

Les taux de contamination le plus élevé a été retrouvé dans la variété de café Arabica d'origine Brésilienne avec un taux de contamination de 80%, suivie de la Robusta Indonésienne et la variété la moins contaminée est la variété Robusta Vietnamienne et Indienne.

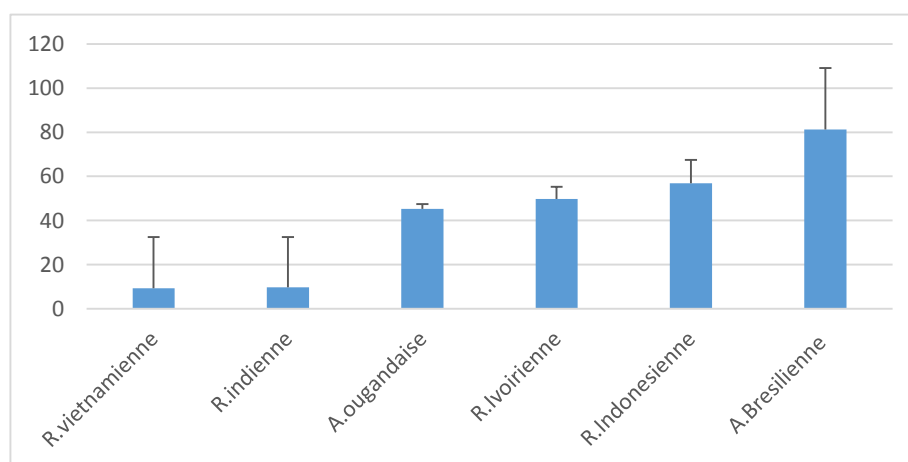
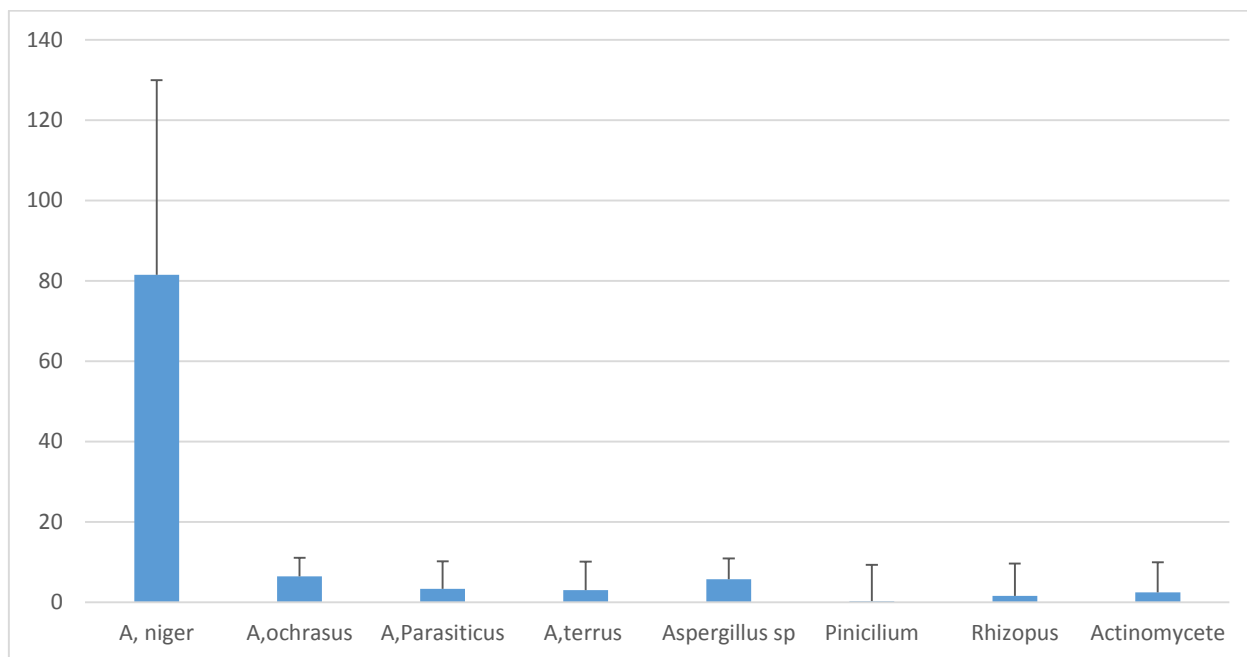


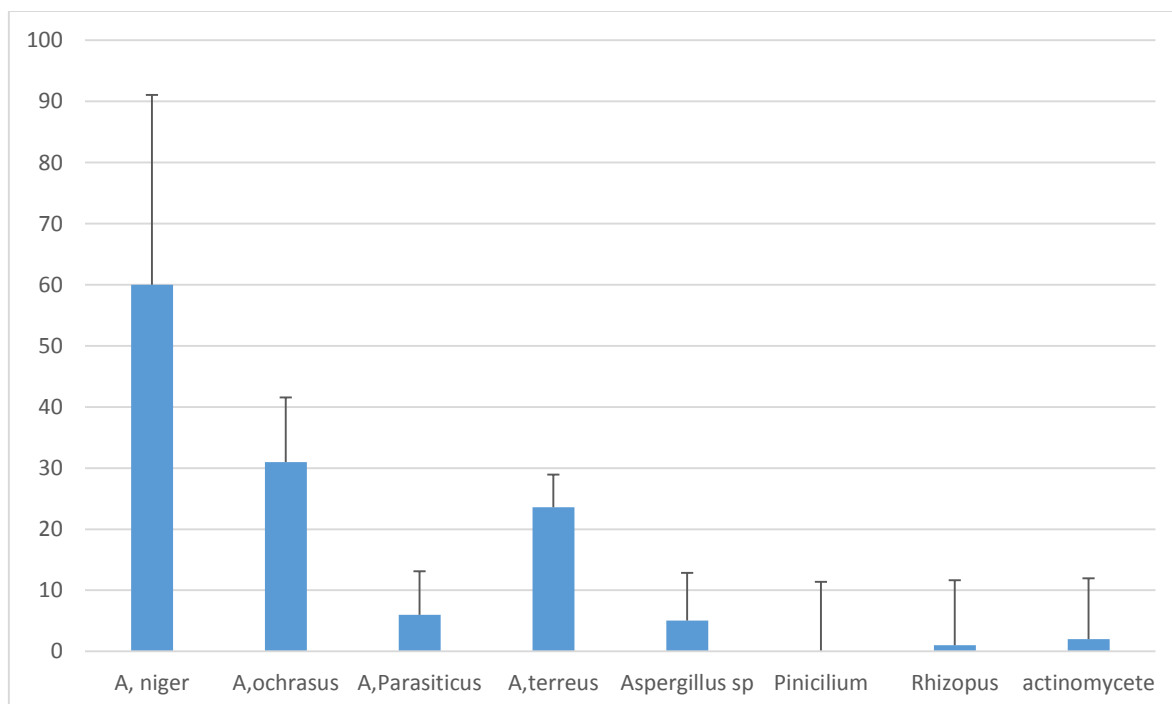
Figure 4.4 : Taux de contamination de chaque variété de café.

**II.3. Abondance des espèces fongiques isolée de chaque variété de café analysée :**



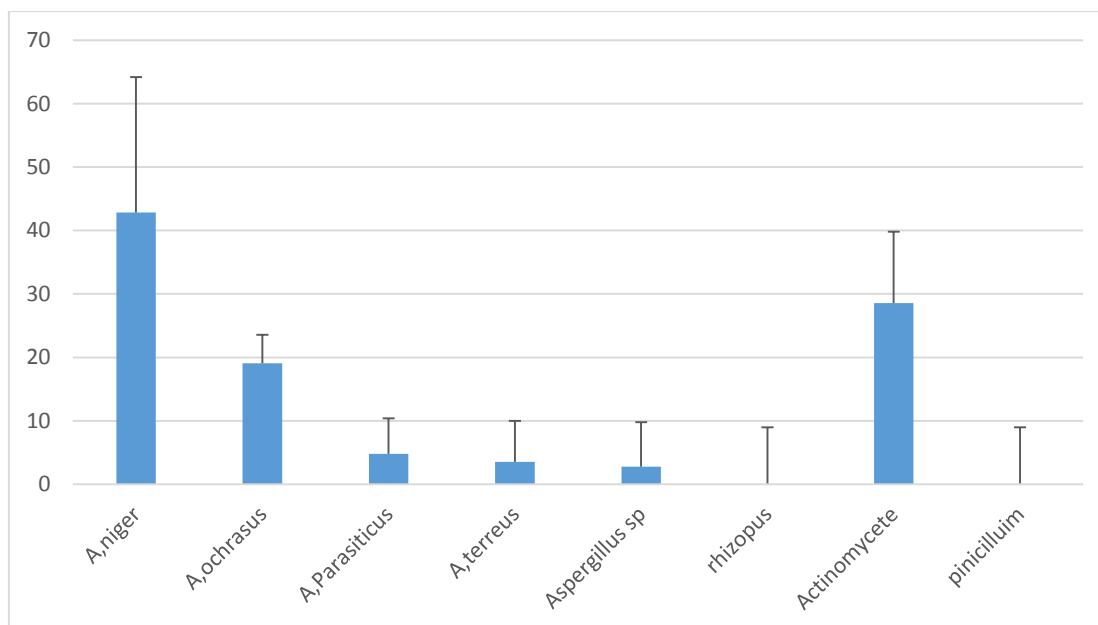
**Figure 4.5 :** Abondance des espèces fongiques isolées de la variété Arabica Brésilienne.

La figure 4.5 montre que l'espèce *Aspergillus niger* est la plus fréquentes dans la variété d'Arabica Brésilienne avec une grande abondance vis-à-vis les autres espèces elle représente la flore de stockage.



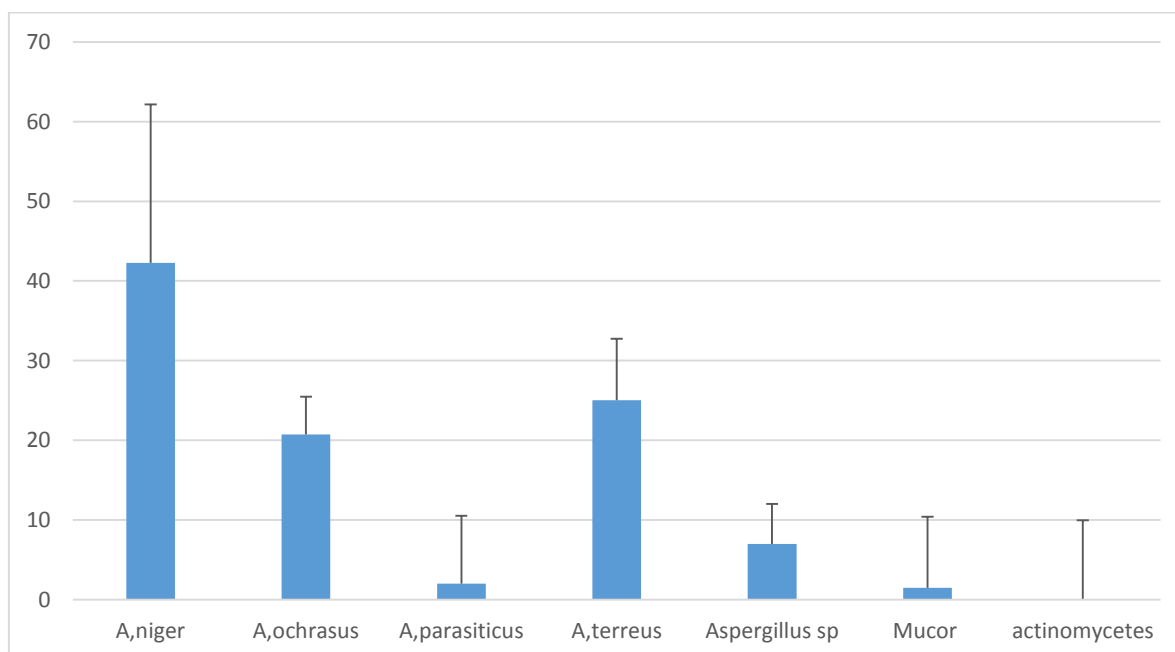
**Figure 4.6 :** Abondance des espèces fongiques isolées de la variété Arabica Ougandaise.

La variété Arabica Ougandaise montre une grande variation des espèces contaminant avec une abondance de l'espèce *Aspergillus niger* mais le taux d'*Aspergillus ochrasus* et *Aspergillus terreus* est plus élevé par rapport à la variété Arabica Brésilienne .



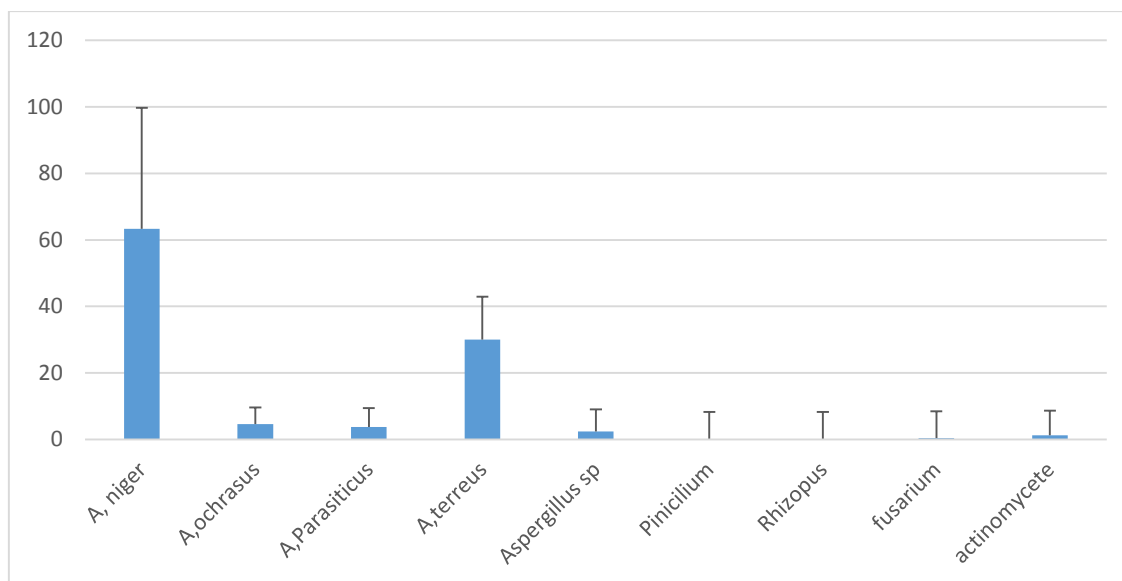
**Figure 4.7 :** Abondance des espèces fongiques isolées de la variété Robusta Vietnamienne.

La figure 4.7 démontre encore la dominance de l'espèce *Aspergillus niger* , on remarque la forte présence des actinomycètes dans cette variété, les actinomycètes sont présent dans les terres ou le café est cultivé ils sont considérés comme étant une flore de récolte .



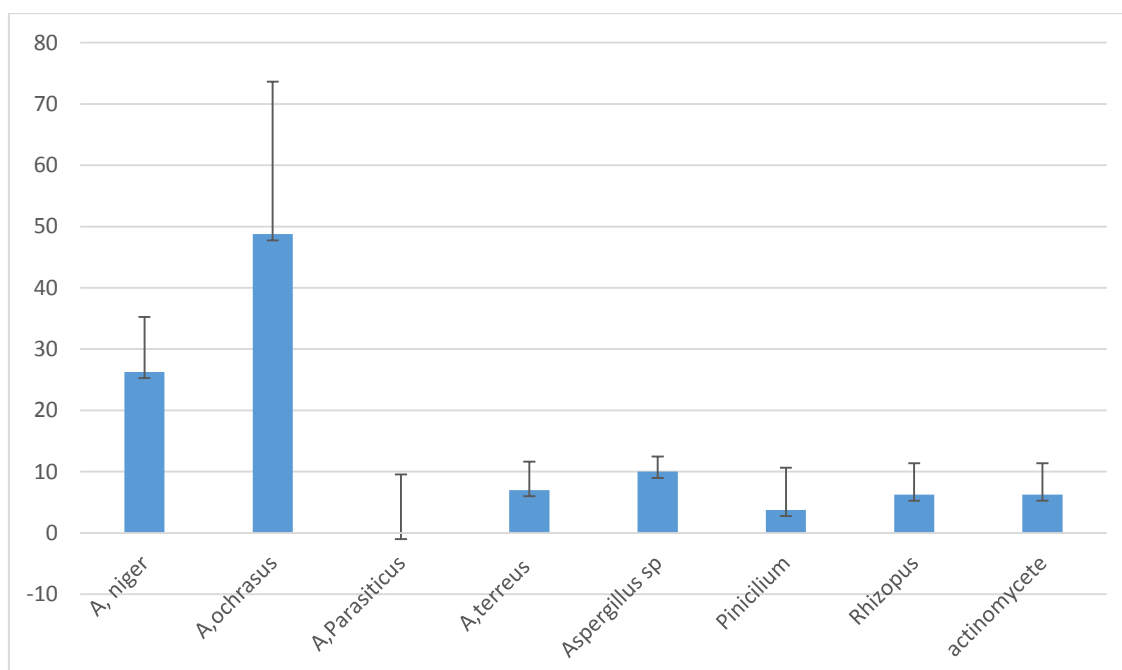
**Figure 4.8 :** Abondance des espèces fongiques isolée de la variété Robusta indonésienne.

La figure 4.8 représente les espèces présents dans la variété Robusta Indonésienne, le genre *Aspergillus* est le plus abondant les espèces les plus dominantes sont l'*Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus*.



**Figure 4.9:** Abondance des espèces fongiques isolée de la variété Robusta ivoirienne.

La figure si dessus montre que les deux espèces *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus* sont les plus présents mais les autre espèces sont moins présentes.



**Figure 4.10 :** Abondance des espèces fongiques isolée de la variété Robusta Indienne.

L'espèce *Aspergillus ochraceus* est la plus dominante avec une présence de 48% dans la variété Robusta Indienne.

### III. Identification des espèces du genre *Aspergillus* et genre *Penicillium*

La détermination des espèces se fait à partir des caractères cultureux. Les espèces d'*Aspergillus* seront identifiées selon Pitt et Hocking et les espèces de *penicillium* selon Ramirez.

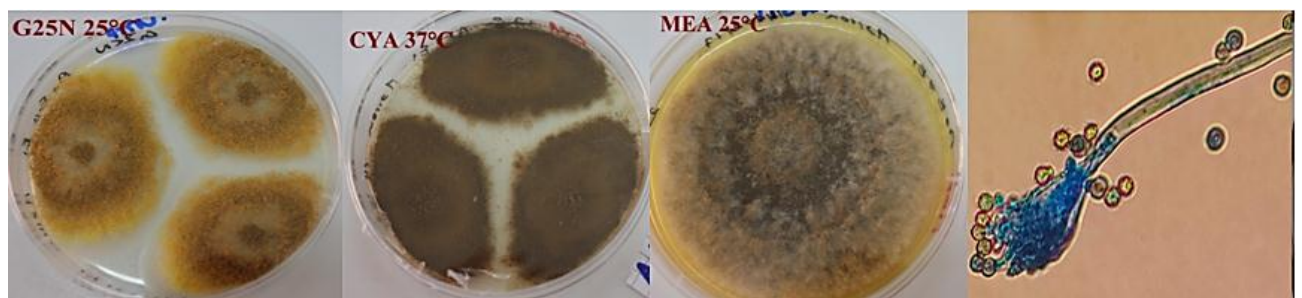
#### III.1. Identification des espèces du genre *Aspergillus* :

Après une période d'incubation de 14 jours sur milieux standard d'identification (Fig 4.11) et en se référant aux clefs d'identification de Pitt et Hocking 2009 nous avons obtenu les résultats suivantes qui sont montrées dans le tableau suivant :

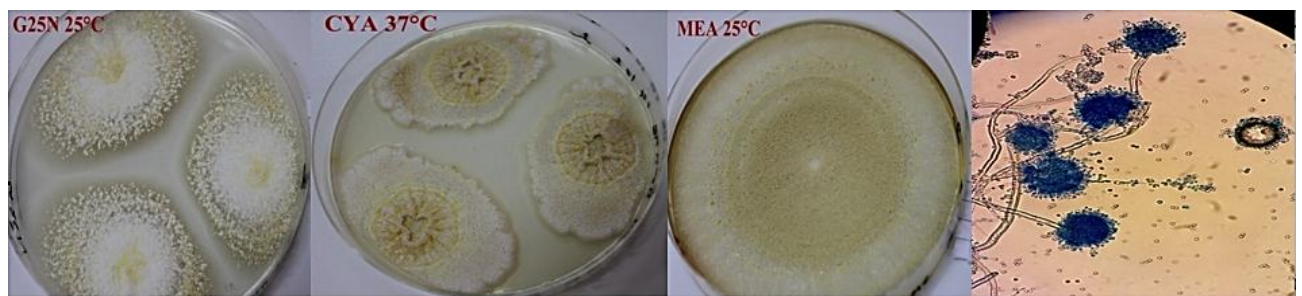
**Tableau 06:** Les principaux critères morphologiques des *Aspergillus* sur les milieux standard utilisés pour l'identification des espèces.

Espèces	Milieu de culture	Surface		Reverse	Diamètre	Exsudat
		Centre	Bordure			
<i>Aspergillus ochraceus</i> AE4E1	CYA37°C	Blanc	Blanc	Blanc	30	/
	CYA 5°C	/	/	/	/	/
	G25N 25°C	Jaune clair	Jaune clair	Blanc	50	/
	MEA 25°C	Jaune or	Jaune	Jaune	80	/
<i>Aspergillus flavus</i> R4E5E1	CYA 37°C	Vert marron	Vert	Vert	40	/
	CYA 5°C	/	/	/	/	/
	G25N 25°C	Jaune	Vert jaunâtres	Jaune clair	35	/
	MEA25°C	Vert fonce	Blanc	Marron	75	/
	AFPA25°C	Blanc	Blanc	Orange	65	/
<i>Aspergillus parasiticus</i> R4E3E1	CYA37°C	Marron fonce	Marron	Blanc	55	/
	CYA5°C	/	/	/	/	/
	G25N25°C	Jaune fonce	Jaune fonce	Jaune c	60	/
	MEA25°C	Vert fonce	Jaune verdâtre	Blanc	65	/
	AFPA25°C	Vert	Blanc	Orange	65	/
<i>Aspergillus terreus</i> A0E4E1	CYA37	Marron fonce	Marron	Marron	60	/
	CYA5	/	/	/	/	/
	G25N	Marron clair	Jaune orange	Marron	55	/
	MEA	Marron fonce	Blanc	Marron	75	/
	AFPA	Marron	Blanc	Marron	75	/

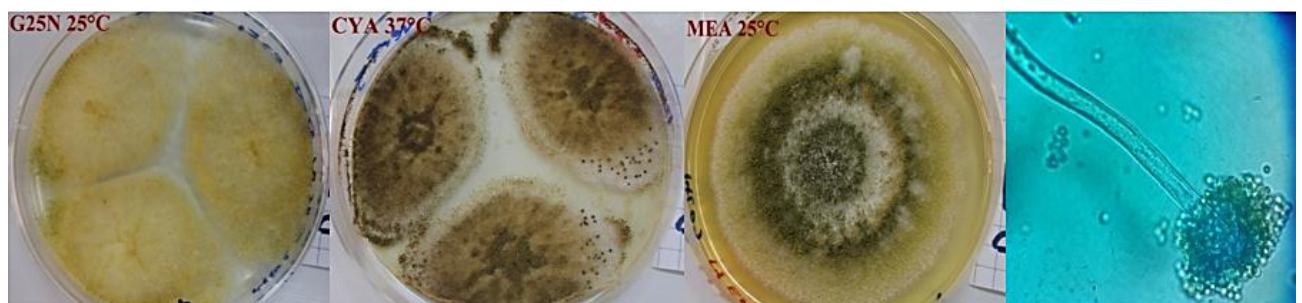
A)



B)



C)

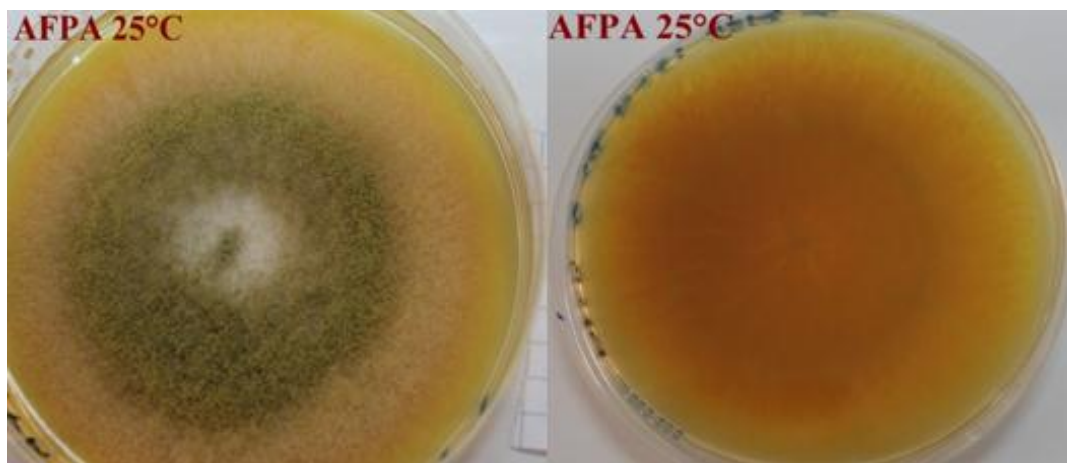


D)

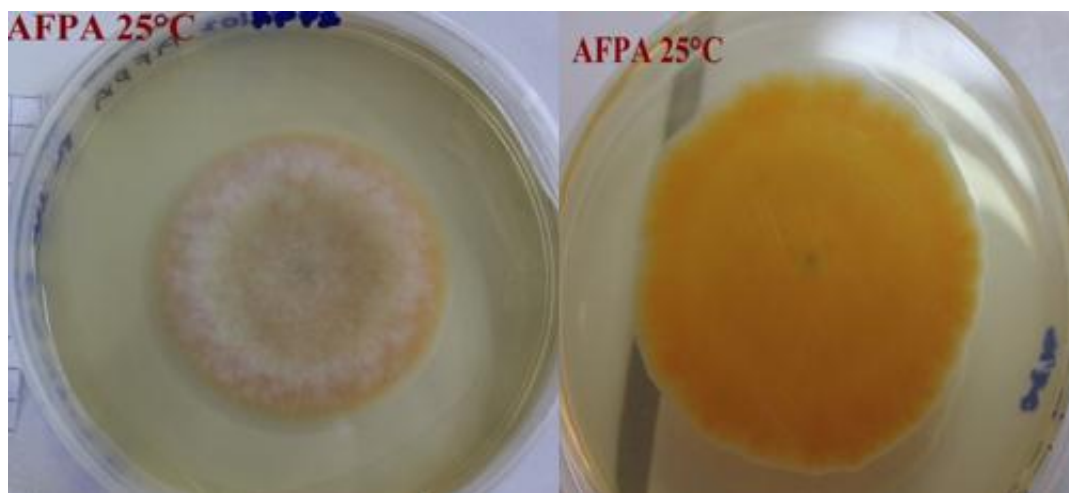


**Figure 4.11** : Espèces du genre *Aspergillus* sur les milieux standards d'identification (après 14 jours); (A): *Aspergillus terreus*; (B): *Aspergillus ochraceus*; (c): *Aspergillus parasiticus*; (D) : *Aspergillus flavus*. ; (M) : aspect microscopique (Gr. x 100HI) ; CYA: Czapek yeast extract agar, 37°C; G25N: 25% Glycerol nitrate agar, 25°C; MEA: Malt extract agar, 25°C.

C)



D)



**Figure 4.12** : Espèces du genre *Aspergillus* sur milieux AFPA : *Aspergillus flavus* et *parasiticus*, 25°C. ; C) : *Aspergillus parasiticus* ; D) : *Aspergillus flavus*.

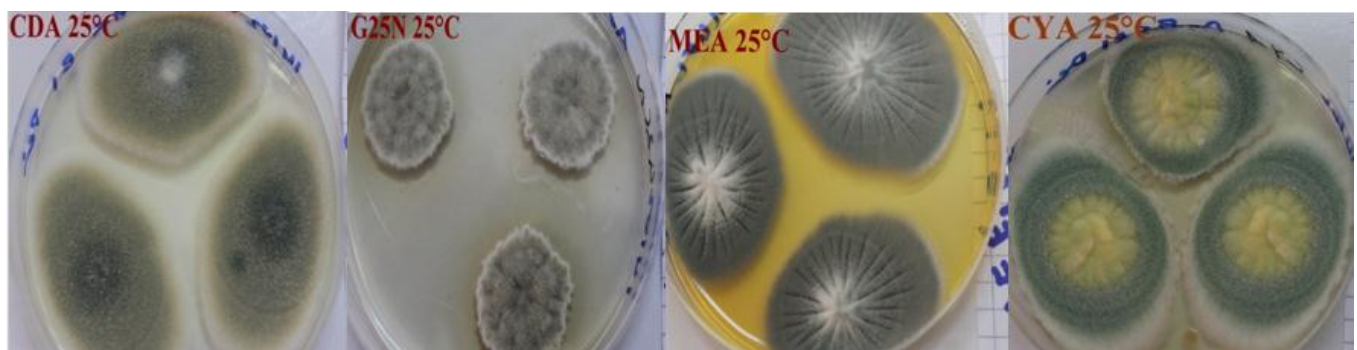
### III.2. Identification des espèces du genre *Penicillium* :

Les souches de *Penicillium* jouent aussi un rôle important dans la contamination des graines du café et nous avons identifié 2 souches de *Penicillium* qui sont montrées dans le tableau et la figure suivante :

**Tableau 07:** Les principaux critères morphologiques des *Penicillium* sur les milieux standard utilisés pour l'identification des espèces.

Espèces	Milieux de culture	Surface		Revers	Diamètre	exsudats
		Centre	Bordure			
<i>Penicillium expansum</i> AE2E1	CYA 25°C	Blanc avec fesseurs	Vert	Blanc	40mm	
	CDA	Gris	Vert foncé	Blanc	40mm	/
	G25N 25°C	Blanc	Blanc	Blanc	40mm	/
	MEA 25°C	Blanc	Vert grisâtres	Marron	53mm	/
<i>Penicillium cryso</i> genum A0E5E1	CYA 37°C	Jaune	Vert foncé	Blanc	37mm	
	CDA	Vert	Blanc	Beige	42mm	
	G25N 25°C	Beige	Beige	Vert	25mm	
	MEA 25°C	Vert	Vert	incolor	35	/

A)



B)

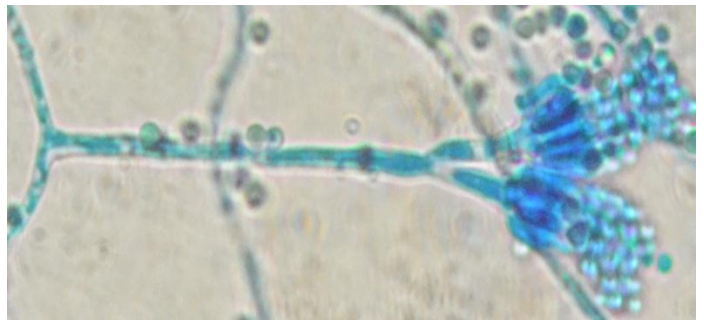


**Figure 4.13 :** Espèces du genre *penicillium* sur les milieux standard d'identification au 14<sup>ème</sup> jour; (A): *Penicillium chrysogenum*; (B): *Penicillium expansum*; CYA: Czapek yeast extract agar, 25°C; G25N: 25% Glycérol nitrate agar, 25°C; MEA: Malt extract agar, 25°C; CDA: Czapek-Dox agar, 25°C.

A) :



B) :

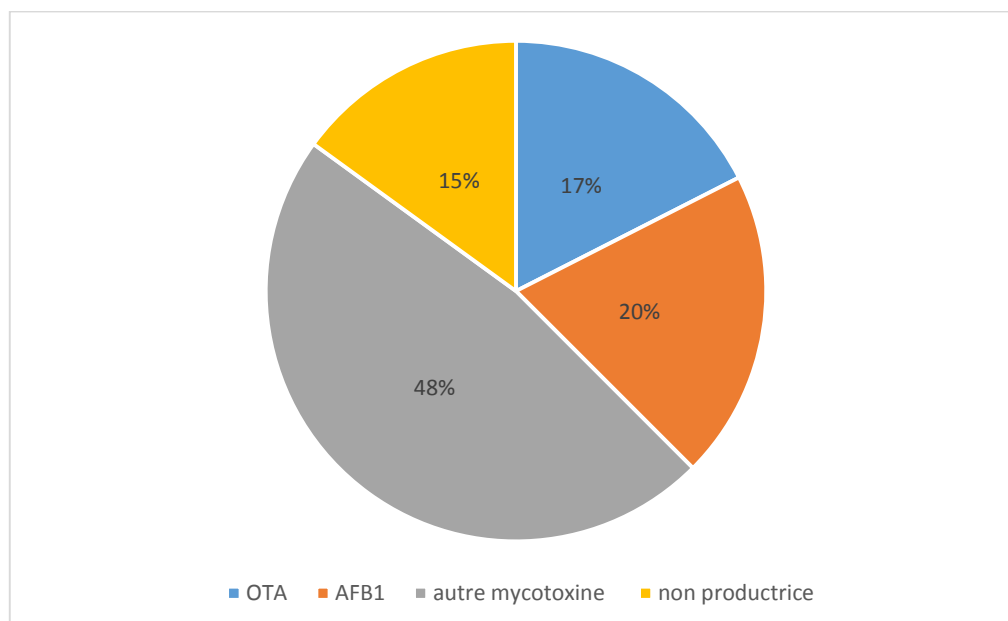


**Figure 4.14** : Espèce de genre *Penicillium* sous microscope optique G.X1000HI ; A) : *Penicillium chrysogenum* ; B) : *Penicillium expansum*.

#### IV. Analyses mycotoxiques :

##### IV.1. Les souches productrices de mycotoxines :

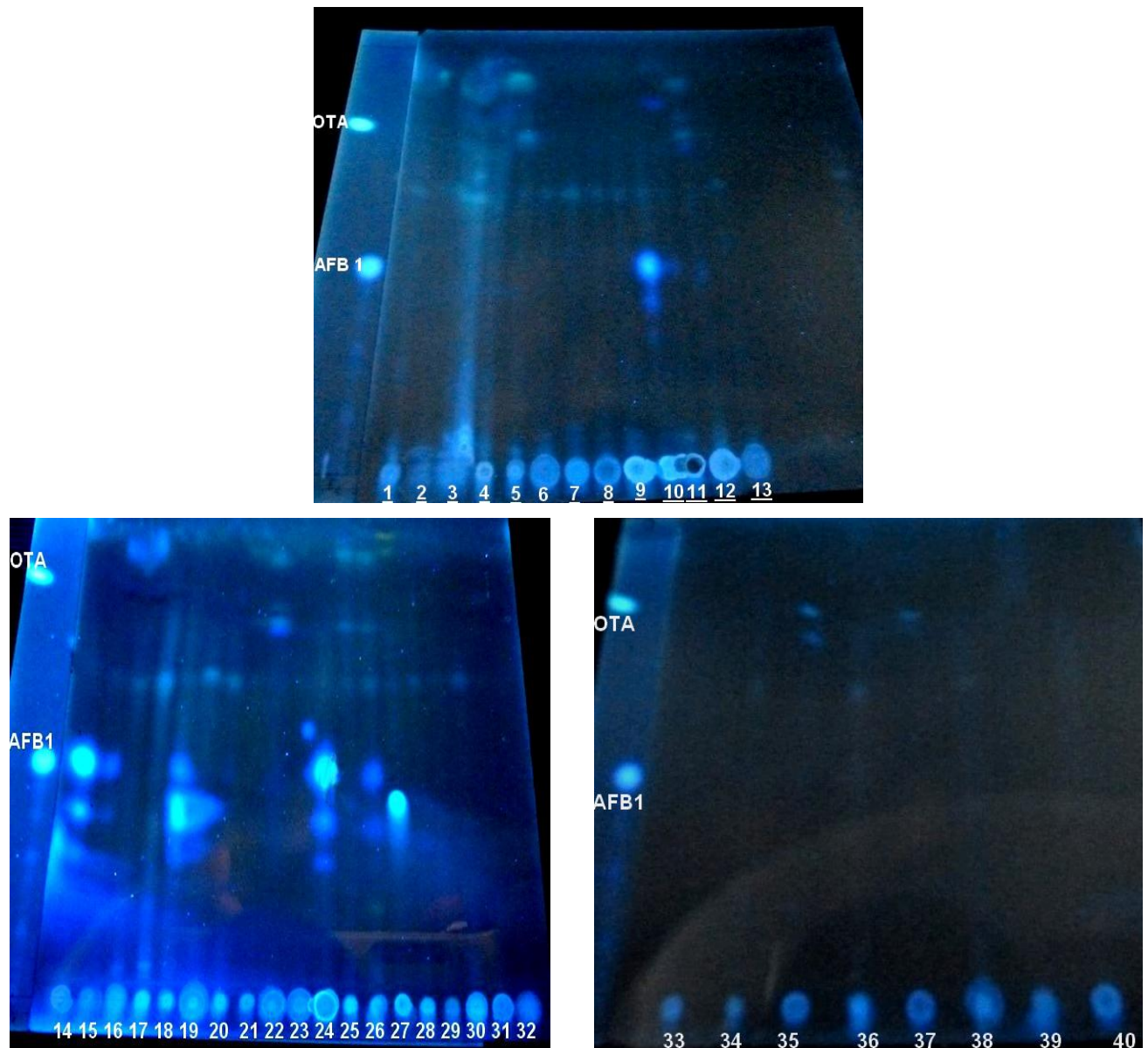
L'analyse qualitative et semi quantitative des extraits chloroformiques par chromatographie couche mince sur les 40 souches isolées a montrer que 17% des souches testées était productrices de l'ochratoxine A, 20 % d'aflatoxines B<sub>1</sub> et nous avons aussi détecté la présence d'autres tâches qui migrent de distances différentes que les deux solutions standards d'aflatoxines B<sub>1</sub> et d'ochratoxines A à un pourcentage de 48%, ont notant aussi que 15% de souches n'étaient pas productrices de mycotoxines.



**Figure 4.15** : Pourcentage des souches de genres *Aspergillus* sécrétrices et non sécrétrices de mycotoxines.

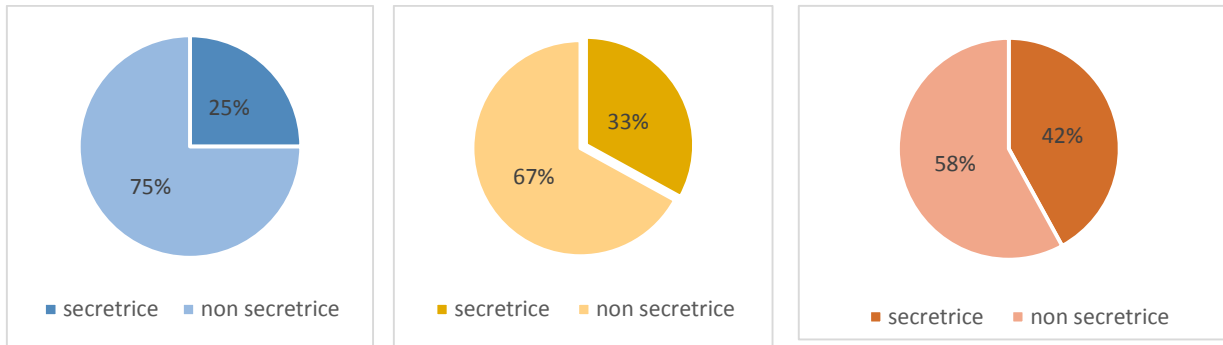
La mycotoxinogénèse des isolats testés exprimé par une fluorescence bleue pour l'aflatoxine B<sub>1</sub> et bleu-vert pour l'ochratoxine A en utilisant les deux standards de solution d'aflatoxine B<sub>1</sub> et d'ochratoxine A.

Les différents résultats sont présentés dans les figures suivantes :



**Figure 4.16:** Révélation des sécrétions des différentes souches mycotoxinogènes visualisées sous la lumière UV ; AFB<sub>1</sub>, OTA (chambre de lecture type CAMMAG) ; les numéros correspond aux codes de différentes souches testés (Annexe 02).

La présence des souches productrices d'OTA et AFB<sub>1</sub> ne veut pas forcément dire que toutes les souches sont productrices, les figures ci-dessous montrent les taux de productions calculer pour chaque espèces.



A

B

C

**Figure 4.19** : Graphiques montrants les souches, A : *Aspergillus parasiticus* productrice de AFB<sub>1</sub>, B : *Aspergillus ochraceus* productrices de OTA, C : *Aspergillus flavus* productrice d'AFB<sub>1</sub>

# Discussion

### Discussion:

Le développement des moisissures requière certaines conditions telles que le pH et l'humidité, l'analyse du taux d'humidité sur les différents échantillons testé a révélé que ce café remplit les conditions de la bonne qualité qui est marginalisée à 12% selon l'office internationale du café (OIC) seulement une seule variété qui est Robusta Indonésienne a dépasser la marge, son taux d'humidité est de 13.8%. Ce pourcentage nous mène à déduire que peut-être le transport maritime de l'Indonésie jusqu'à l'Algérie et les conditions de stockage de ces grains de café sont les facteurs qui ont influencé sur l'augmentation du taux d'humidité, car le café absorbe l'humidité pendant le stockage et le transport.

La majorité des moisissures ont la capacité de se développer sur des substrats contenant les pH allant de 4 à 8 (**Balzer. ; 2003**), le pH des échantillons de notre étude présente une légère acidité [5,8-6,2], le pH n'a pas une influence directe sur le taux de contamination des denrées alimentaires par les moisissures, par contre l'OTA est retrouvé beaucoup plus sur des aliments contenant un pH acide (**Cuero et Smith, 1987**).

Le totale de 7 variétés de cafés verts sont prélevés et analysés pour déterminer les différents genres et espèces productrices ou non de mycotoxine , pour l'isolement et l'identification des moisissures nous avons utilisé la méthode du papier buvard , et la méthode Ulster avec deux origines de carbone différentes le glucose et le saccharose , les résultats obtenus montre que la méthode buvard est la méthode qui révèle le plus grand nombre de moisissures par contre la méthode Ulster saccharose a révélé plus de contaminants que l'Ulster Glucose ce qui nous mène a supposé que le support saccharose est plus favorable au développement des moisissures. Nous avons même remarqué la présence des actinomycètes sur les milieux Ulster saccharose, la présence des actinomycètes dans le café est confirmée d'après les recherches effectuées sur les champs de café en Inde. (**Anand T, Pereira N, 2005**).

Le café vert analysé provient de différentes origines la variété du café vert qui a révélé un pourcentage élevé de contamination est le café vert Arabica Brésilienne avec un taux de contamination de 85% suivie de la Robusta Ougandaise et Ivoirienne , les variétés les moins contaminées sont la Robusta Indienne et Vietnamienne avec un taux inférieur de 15% , ce qui est peu par rapport à la flore du champs et de stockage , l'hypothèse la plus appropriée pour un taux aussi faible est l'utilisation des antifongiques dans le traitement post-récolte des grains de café vert .

Dans toutes les variétés analysées le genre le plus répondu est l'*Aspergillus* connu pour être la flore de stockage, le café Arabica Brésilienne contenait 82% d'*Aspergillus niger* et 8%

d'*Aspergillus ochraceus* dont 33% sont productrices d'OTA ce qui est proche des résultats obtenus dans les travaux de Pitt et Hocking ou ils ont trouvé des pourcentages similaires respectivement 63%, 10% et 88% (**Martins et al. 2003 ; Batista et al. 2003**).

Les moisissures du genre *Aspergillus* contaminant les grains de café sont de caractéristiques microscopiques et métaboliques variées. Ainsi à travers ce présent travail, il apparait que parmi les 40 souches testées on a pu identifier 3 souches qui ont des critères communs aux *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* de ce fait, nous les avons classées comme appartenant à ces espèces. Cette classification s'est appuyée sur la détermination des caractères culturels observés sur les milieux CYA, G25N, MEA et AFPA et des caractères microscopiques qui correspondent aux souches déjà mentionnées (**Pitt J, Hocking A., 2009**). En plus de ces caractères, ces souches sont capables de produire des aflatoxines B<sub>1</sub> et ochratoxine A, la mise en évidence a été faite par l'émission de la fluorescence bleue vert pour l'aflatoxine et vert pour l'ochratoxine A sur les plaques de CCM. 17% des souches du genre *Aspergillus* isolé sont productrice d'OTA et 20% sont productrice d'AFB<sub>1</sub>. Un pourcentage assez élevé et important pour l'évaluation de la bonne qualité du café vert.

La présence de l'ochratoxine A de l'aflatoxine B<sub>1</sub> est un indice que les souches testées ont un pouvoir toxigène.

L'absence des mycotoxines de quelques souches est expliquée soit par la possibilité que les souches *Aspergillus* isolées de ces échantillons ne soient pas toxigènes, soit elles sont toxigènes et les conditions de T°, pH et l'humidité n'était pas favorable à la mycotoxinogénèse (**Pholf-Leskowicz, 2002**). Selon (**Chapeland-Leclerc F, 2005, Pholf-Leskowicz, 1999**) la présence d'agent fongique ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines.

L'apparition des spots différents aux deux standards est expliquée que sont probablement issues de métabolismes secondaires des moisissures.

# Conclusion

### Conclusion :

La contamination des graines de café par les moisissures constituent un problème sanitaire et économique dans le monde où la consommation de café est désormais une habitude ancrée dans notre quotidien. A partir de notre travail et à travers les résultats obtenus nous avons confirmé que le café est contaminé par les moisissures et on a pu identifier que ces trois espèces : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, et *Aspergillus ochraceus* , et nous avons confirmé que ces souches là sont doté d'un pouvoir mycotoxinogène et productrices de l'aflatoxine B<sub>1</sub> et l'ochratoxine A, selon les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince, mais ça ne signifie pas que le café est pollué par les mycotoxines en raison de multiples facteurs intrinsèques et extrinsèques conditionnés pour la production de mycotoxine car notre étude s'intéresse aux pouvoir mycotoxinogène des moisissures isolées , et pas aux analyses des mycotoxines dans le substrat.

En Algérie l'étude qualitatif et quantitatif des mycotoxines n'est pas trop répandue , malgré les complications que provoques les souches productrices de ces mycotoxine sur l'économie et la santé humaine et animale , beaucoup d'élément reste a découvrir dans ce domaine , il est possible de réduire le taux de contamination de ces toxines dans les aliments en respectant les conditions de stockage, de transformation ou de récolte de chaque aliments ainsi les consignes sanitaires pour réduire le développement des moisissures car le traitement pour décontaminer les aliments est peu développée et moins efficace.

Au final et pour approfondir les recherches liée a ce thème nous voulons :

- Effectué l'étude quantitatif des mycotoxines présent dans le café vert.
- Effectué l'étude mycotoxicologique à partir du substrat de café.
- Etudier les mécanismes d'inhibition de l'action de l'OTA et l'AFB<sub>1</sub>.

# Références

### References bibliographiques:

- **A.Khalef ,C.Zidane , A.Charef , A Gharbi , M.Tadjerouna , A.M Betbeder , et E.E Creppy ;,1993.** Ochratoxicose humaine en Algerie , Humain ochratoxicosis and its pathologies . E.E.Creppy ,M.Castegmaro , VOL.231, pp 123-127
- **Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella G., et Cabanes F.J., 1994.**Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2650-2652.
- **Abbas, A., Coghlan, A., O'Callaghan, J., García-Estrada, C., Martín, J.F., Dobson, A.D., 2013.** Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxinA biosynthesis in *Penicilliumverrucosum*. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 172–181.
- **Agence Française de sécurité sanitaire des Aliment (Afssa), 2009.**Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale sensible.
- **Akbas, M. and Ozdemir, M., 2006.** Effect of different ozone treatments on aflatoxin
- **Alcaide-Molina, M., Ruiz-Jiménez, J., Mata-Granados, J., and Luque de Castro, M. 2009.** High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solidphase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and
- **Alex P. Wacoo, Deborah Wendi, Peter C. Vuzi, et Joseph F. Hawumba, 2014.** Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops.
- **Alex P. Wacoo, Deborah Wendi, Peter C. Vuzi, et Joseph F. Hawumba, 2014.** Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry*.Volume 2014, Article ID 706291, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/706291>
- **Ana JúliaBenites, Marlene Fernandes , Ana Rita Boleto , Sandra Azevedo, Sandra Silva, Ana LúciaLeitao, 2016.** Occurrence of ochratoxinA in roasted coffee samples commercialized in Portugal.
- **Anand T, Pereira N, 2005.** The role of actinomycetes in coffee plantation ecology , ecofriendly coffee .
- **André el Khoury et Ali Atoui, 2010.** Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status.
- **Antonia Gallo, Kenneth S.Bruno, MicheleSolfrizzo, Giancarlo Perrone, Giuseppina AranickiM.,GaonJ.andgerstnve E., 1961.**Chronic nephritis due to ingestion of lead contaminated flour.
- **AOAC (Association of Official Analytical Chemists),, 1984.** Official methods of analysis.WILLIAMS S. Ed., Arlington 477-489.

- **Avishay-Abraham Stark, 2010.** Molecular Mechanism of Detection of Aflatoxins and Other Mycotoxins, chap 2. pp21, M. Rai and A. Varma (eds.), Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons
- **Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., Lebrihi, A., 2009.** *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. Fungal
- **Balzer Alexander., 2003.** Les trichotecenes : nature et origine. Thèse docteurvétérinaire, Université Toulouse.
- **Balzer, C. Bogdanić, and S. Pepeljnjak, 1978.** Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A, and zearalenone in corn, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, vol. 61, no. 3, pp. 584–585.
- **Bekedam EK, 2008.** Coffee brew melanoidins: structural and functional properties of brown-colored coffee compounds. Op.cit
- **Bennett, J.W. & Klich, M., 2003.** Mycotoxins. Clinical microbiology reviews, **16**, 497–516
- **Boorman, G. A., 1989.** Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. NTP Technical Report NTP TR 358.
- **Botton. B, Breton. A, Fevre.M, Gauthier. S, Guy. Ph, Larpent J.P, Reymond. P, Sanglier J.J, Vayssier.Y, Veau.P, 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, 2ème édition, MASSON. ISBN :2-225-81987-4.
- **Brase S ,Graser F , Kramer C , Lindrer S , lensermeyer A.M , Masters , Zhong S ,** the chemistry of mycotoxine (springer).2013pp :6.
- **Bruckner I., Zosin C., Lazarescu R., Parashiv D., Mansecu N., Serban M. and Titeica M.(1965)** A clinical study of nephropathy of an endemic character in the People's Republic of Romania. In Proceedings of the International Symposium on Endemic Nephropathy.
- **Bryden WL, 2012.** Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. Animal Feed Science and Technology 2012; 173(1-2): 134-158.
- **CAC. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2009.** Report of the 3rd session of the codex committee on contaminants in foods, Proposed Draft Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A Contamination in Coffee, Appendix VI, page 73. Agenda Item 8. ALINORM 09/32/41.
- **CAC. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2009.** Report of the 3rd session of the codex committee on contaminants in foods, Proposed Draft Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A Contamination in Coffee, Appendix VI, page 73. Agenda Item 8. ALINORM 09/32/41.

- **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, *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1215-1221
- **Castegnaro M, Mohr U, Pfohl-Leszkowicz A, 1998.** Sex and strain-specific induction of renal tumours by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International J Cancer* 77, 70-75 )
- **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., 2002,** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec & Doc
- **Castegnaro, M., and Wild, C. P., 1995.** IARC activities in mycotoxin research. *Natural Toxins* 3, 327-331. characterization of new polyketide synthase genes involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus* characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium*.
- **Chabasse , D., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- **Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H., 1999.** Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29-38.
- **Clifford, M.N. and Willson, K.C., 1985.** Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage. Londres, Croom Helm, 1985. Wrigley, G. - Coffee. Londres, Longman, 1988.
- **Codex alimentarius ; 2012.** Prévention et réduction de la contamination des produits de consommation humaine et animale. FAO et OMS. Rome. **Ed 1**, pp 73-88-89.
- **Coker, R. D., 1997.** Mycotoxins and their control: constraints and opportunities. NRI bulletin 79, Chatham, UK : Natural Resources Institute.
- **Creppy, E.E., 1999.** Human ochratoxins. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, 18, 277-93.
- **Cuero, R. G., et Smith, J. E. 1987.** Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains, *Transactions of the British Mycological Society.*, 2, 221-226.
- **D'Mello, J.P.F and MacDonald, A.M.C., 1997.** Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, **69**: 155 - 156.
- **Davis N. D., U. L. Diener., D. W. Eldridge. 1966.** Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, *Applied Microbiology*, American Society for Microbiology, Vol. 14, No. 3.
- **Debry G, 1993.** Le café et la santé. Paris: John Libbey Eurotext; . 560 p
- **Dupont F, Guignard J, 2007.** Abrégés-botanique: systématique moléculaire.

- **E. Papp, K. H-Otta, G. Z'aray, and E. Mincsovcis, 2002.** Liquid chromatographic determination of aflatoxins,” *Microchemical Journal*, vol. 73, no. 1-2, pp. 39–46
- **E.K. Shwab and N.P. Keller, 2008.** Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 2008. **112**(Pt 2): p. 225-30.
- **Elling, F., Hald, B., Jacobsen, C., and Krogh, P., 1975.** Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology* 83, 739-741.
- **FAO, 2014.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO corporate document repository. Arabica coffee manual for Lao PDR 2005; January 2014. Available from: <http://www.fao.org/docrep/008/ae939e/ae939e00.htm>.
- **Farah A, 2009.** Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin P, editor. *Functional and speciality beverage technology*. 1st ed. Cambridge (UK): Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.
- **Farah A, Monteiro M, Calado V, Trugo LC, 2006.** Correlation between the chemical attributes of coffee and cup quality. *Food Chem*; **98**:373–80
- **Faucet-Marquis V, Pfohl-Leskowicz A, Dai J, 2004.** Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chem Res Toxicol* 17:1289–1296.
- **Fernández-Cruz M.L., Mansilla M.L., Tadeo J.L.** Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *J. Adv. Res.* 2010;1:113–122
- **Fernández-Cruz M.L., Mansilla M.L., Tadeo J.L.** Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *J. Adv. Res.* 2010;1:113–122
- **Flament I, 2002.** Coffee flavor chemistry. (West Sussex, England): John Wiley & Sons, Ltd. *Food and Agriculture*, 86(13):2099–2104.
- **Frantisek Malir, Vladimir Ostry, Annie Pfohl-Leskowicz, Jan Malir et Jakub Toman, 2016).** Ochratoxine A: 50 ans de recherche.
- **Fredot E, 2012.** *Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique.*
- **G. Brocard et C. le Bacle, 2009.** Document mycotoxine en milieu de travail. Département Etude et assistance médicale, INRS.
- **Gallo, A., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mulè, G., Visconti, A., & Baker, S.E., 2012.** New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a
- **Gallo, A., Ferrara, M., Perrone, G., 2013.** Phylogenetic study of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins.

- **Gallo, A., Knox, B.P., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Baker, S.E., & Perrone, G., 2014.** Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 179 (2), 10–17.
- **Galtier, P., C. Eeckhoutte et M. Alviene, 1974.** Isolement par chromatographie sur couches minces de l'ochratoxine A obtenue à partir de milieux liquides faiblement concentrés en toxine, *Toxines d'Aspergillus ochraceus WILHELM*, *Ann. Rech. Vétér.*, 5(2), 155-166.
- **Geisen, R., Schmidt-Heydt, A., Karolewicz, A., 2006.** A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Res.* 22, 134–141.
- **Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SM, Cavalari AA, Pot D, Pereira LF, et al., 2006.** Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J Exp Bot*, 57:3243–58.
- **Grillot R, 1996.** Mycoses de la peau et des phanères In : *Les mycoses humaines : démarche diagnostic* Edition scientifiques et médicales Elsevier – Collection Option Bio- p39-35.
- **Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H., and Pfohl-Leskowicz, A., 1997.** Retinol, ascorbic acid and [alpha]-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Letters* 114, 225-229.
- **Guan S, Yin T, Zhou M, Xie Z, Ruan J, C. Young, 2011.** Microbial strategies to control aflatoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal.*, 4:413-424 .
- **GUIRAUD P.J.; 1998.** *Microbiologie alimentaire. Agro-Alimentaire.* Edition DUNOD. Paris.
- **H. S. Lillard, et T. Hanlin, and d. A. Lillard, 1970.** Aflatoxigenic Isolates of *Aspergillus flavus* from Pecans' *Applied Microbiology*, Vol. 19, No. 1, p. 128-130.
- **Hardy C., 1998.** *Le café: des mots et des saveurs.* H287-1re éd. Luçon: Herscher; 139 p.
- **Harris James L. 1986.** Modified Method for Fungal Slide Culture, *Journal Of Clinical Microbiology.*, Sep, p. 460-461 Vol. 24, No. 3 0095-1137/86/090460-02\$02.00/0..
- **Harris JP, Mantle PG. 2001.** Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus* .
- **Hassan, A.M., Sheashaa, H.A., Fattah, M.F.A., et al., 2006.** Study of ochratoxin A as an
- **Hassen w, Abid-essefi s, Achour A, Maaroufi k, Creppy E, Bacha H, 2003.** Ochratoxine A et néphropathie humaine en Tunisie : dix ans d'étude, *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XV, n° 1, 25-26.
- **IARC, 1993.** IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Vol 31: some food additives, feed additives and naturally occurring substances. IARC, Lyon.
- **IARC. 2012.** A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations (Monograph No. 100F). IARC, Lyon, France.

- **IARC, 2014** Monographs- Classifications.  
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
- **Imen, 2013**. De l'identification des constituants de l'ergot de seigle à la découverte du LSD.
- **International Coffee Organization., 2017**. Country data on the global coffee trade, [enligne], [http://www.ico.org/profiles\\_e.asp](http://www.ico.org/profiles_e.asp), consulté le 16 mars .
- **International Seed Testing Association, 1985**. International Rules for Seed Testing, Rules 1985 (edi. S.R. Draber). Zurich, Switzerland: ISTA.
- **J. Gil-Serna, Vázquez, N. Sardiñas, M.T. González-Jaén, and B. Patiño**, Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section 139 *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 2011.
- **J. Stroka and E. Anklam, 2002**. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin producing moulds in food and feed," *TrAC—Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, no. 2, pp. 90–95, 2002.
- **JECFA, 1995**. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 859, 1995
- **JECFA, 1995**. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 859, 1995.
- **JECFA, 1998**. Forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of Certain Food additives and Contaminants: Aflatoxins. WHO Food Additives Series 40 (Geneva WHO), pp 359-469.
- **JECFA, 2001**. Safety evaluation of certain mycotoxins in Food. Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series 47 – FAO Food and Nutrition Paper –IPCS- International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 2001
- **JECFA, 2001**. Safety evaluation of certain mycotoxins in Food. Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series 47 – FAO Food and Nutrition Paper –IPCS- International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 2001
- **Joseph-Pierre Guiraud, Jean-Philippe Rosec, 2004**, *Pratiques des normes en microbiologie alimentaire*, AFNOR, 266-267.
- **Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M., and Oikawa, S., 2002**. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 32, 822-832.

- **Knopp S, Bytof G, Selmar D, 2006.**Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *Eur Food Res Technol*; **223**:195–201.
- **LANIER L., JOLY P., SONDOUX P. et BELLENERE A., 1978.** Mycologie et pathologie forestières, Tome II, Ed. MASON, 472 p.
- **Le Bars J., 1984.** Developpement des moisissures dans les denrées alimentaires et mycotoxinogénèse. In "Les mycotoxines : Connaissances actuelles et risques pour la santé publique dans la chaîne alimentaire" J.L. Multon, Ed. Paris. 278p.
- **LE Bars, 1990.** Encyclopédie mycologique. Tome 1. Edition Paul Lechevallier. Paris.
- **Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006.**The Fusarium Laboratory Manual. Ames, IA: Blackwell Publishing.
- **LIOI (M.B.), SANTORO (A.), BARBIERI(R.), SALZANO (S.) et URSINI (M. V.), 2004**Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, volume 557,; 19-27, OSWALD (I.P.) - Mycotoxines et immunotoxicité. Association pour la Recherche en Toxicologie, Actualités 2000, numéro de décembre ; 32-34.).
- **M. Kokkonen, L. Ojala, P. Parikka, and M. Jestoi, 2010.** Mycotoxin production of selected Fusarium species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **143**(1-2): p. 17-25
- **Maja peraica, 2016.** Chapitre 5- Mycotoxicoses. Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management. *Environmental Mycology in Public Health* page 45-49.
- **Mannon, J., and Johnson, E., 1985,** Fungi down on the farm, *New Sci.* 28, 12-16.
- **Marc Savard, Ph. D., Guy Durivage, ing, 2014.**L'analyse des mycotoxines, plus facile à demander qu'à faire.
- **Markus Schmidt-Heydt, Eva Graf, Julia Batzler ,Rolf Geisen, 2011.**The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin A biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloride rich dry cured foods , *food science and technology* 2011 elsevier s46 .
- **Martins, M.L., Martins, H.M. and Gimeno, A., 2003.** Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Addit. Contam.* 20: 1127–1131.
- **Maryann E. Smela, Sophie S. Currier, Elisabeth A. Bailey et John M. Essigmann, 2001.** The chemistry and biology of aflatoxin B1 : From mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* vol.22.no4 pp 535-545.
- **Miazzo R, Dalcero A, Rosa CA, De Queiroz Carvalho EC, Magnoli C, Chiacchiera SM, et al., 2000.** Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*; **79**(1): 1-6

- **Michelle Jeanguyot, Martine Séguier-Guis, Daniel Duris**, 2003. Terre de café. Editions Quae. 141 p.
- **Mitchell D., Para R., Aldred D. et Magan N.**, 2004. Water and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 439-445.
- **Mohamed EZ**, 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* ; 15(2): 129-144.
- **MOSS (M.O.)**, 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration and Biodegradation*, volume 50, ; 137-142 Ovidius PN. Opera omnia. III Fasti, Tristia, Epistolae ex ponto. Leipzig, Nova editio stereotypa, 1845.
- **Multon, J.L.**, 1982. Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Dérivés-Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. *Technique & Documentation* Lavoisier, Paris, pp. 576.
- **Murthy PS, Naidu MM**, 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review. *Resour Conserv Recycl* 2012; **66**:45–58.
- **Mute, Angelo Visconti and Scott E. Baker**, 2012, Role of an *Aspergillus carbonarius* *Mycological Research*, 2008.
- **Myak C, Ramirez**, 1982. *Manual and atlas of Penicillia* Amsterdam p.125.
- **N.W. Turner, S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky**, Analytical methods for
- **Nehlig A**, 2014. *Café et médecine en 20 questions*.
- **Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O.** 1983. *Fusarium Species. An illustrated Manual for Identification*. University Park, PA: Pennsylvania State University Press.
- **NRPS**, 2015. in OTA biosynthesis, *American Society for Microbiology, Appl. Environ. Nutrition*. “Aflatoxin” *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins ochraceus fc-1. Toxins*, 7, 2723–2738..
- **Nutrition, C. for F.S. and A.**, 2014. *Bad Bug Book (Second Edition)*. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/default.htm>
- **Oueslati S, Romero-Gonzalez R, Lasram S, Frenich AG, Vidal JLM**, 2012. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* ; 50(7): 2376-2381.
- **Pascal Obrecht**, 2009. *Café et la santé*. Pp 06.
- **Peers, F.G. & Linsell, C.A.**, 1977. Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. *Annales De La Nutrition Et De L'alimentation*, **31**, 1005–1017.

- **Pfohl-Leszkowicz A, Bartsch H, Azemar B, et al., 2002.** MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. *Facta Univ Ser Med Biol* 9:57–63
- **Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA, 2007.** Review on ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res* 51:61–99.
- **Pfohl-Leszkowicz A., 2001.** Définition et origines des mycotoxines in *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14
- **Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A., 2007.** Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 61e99.
- **Pfohl-Leszkowicz, A., 1999.** Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque* » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Technique et Documentation, Paris, pp. 18- 35.
- **Pfohl-Leszkowicz, Grabryelski W, Manderville RA, 2009.** Formation of 20 deoxyguanosine-carbon-8-bound ochratoxin A adduct in rat kidney DNA. *Mol Nutr Food Res* 53:154–155.
- **Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009.** *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science + Business Media, New York.
- **Radie B. Fuchs R., Peraica M., Lucie A.** Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Tox Let.* 1997, 91, 105-109.
- **Radonic, M., and Radosevic, Z., 1992.** Clinical features of Balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology* 30, 189-192.
- **Ramirez, Carlos. 1982.** *Manual and Atlas of Penicillia*. New York (USA): Elsevier biomedical press.
- **RIPERT Christian, 2013.** *Mycologie médicale*, Lavoisier, pp 750 .
- **Roze, L. V., Arthur, A. E., Hong, S. J., British Medical Journal II, 2014.** Aspergillus westerdijkiae polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. biosynthesis in Aspergillus carbonarius. *Int. J. Food Microbiol.* 179, 10–17.
- **Salunkhe D K, Adsule R N and Padule D N, 1987:** *Aflatoxins in foods and feeds*, Metropolitan Book Co. Pvt. Ltd., New Dehli, India, p. 18.
- **Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J.H. 2006.** Ochratoxin A in human Serbia, *Coll. Antropol.* 30 suppl 1, 19

- **Schwartz, G. G., 2002.**Hypothesis: Does ochratoxinA cause testicular cancer? *Cancer Causes Control* 13: 91-100
- **Silva, C.F., Batista, L.R. and Schwan, R.F. 2003.** Incidence of *Aspergillus* produced by mycotoxins in berries and beans of coffee (*Coffearabica* L.). *Rev. Brasil. Armazenamenta* 7: 30–36.
- **Stefanovic V, Djukanovic L, Cukuranovic R., 2011.** Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of Balkan endemic nephropathy, a worldwidedisease. *Ren Fail.* ;33:176–183.
- **Stella A.** L'ABCdaire du café. FA259301. Paris: Flammarion; 1998. 119 p
- **Stoev, S. D., Goundasheva, D., Mirtcheva, T., and Mantle, P. G., 2000.** Susceptibility to secondarybacterial infections in growingpigs as an earlyresponse in ochratoxicosis. *Experimental AndToxicologicPathology: Official Journal Of The Gesellschaft Fur ToxikologischePathologie* 52, 287-296.
- **Toci AT, Farah A, 2008.** Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. *Food Chem;***108**:1133–41.
- **Trugo L, 2003.**Coffee analysis. In: 2nd ed. Caballero B, Trugo LC, Finglas P, editors. *Encyclopedia of food science and nutrition*, vol. 3. Oxford (UK): Academic Press.
- **Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. and Sakabe, Y., 1995.** Caffeine degradation and increased ochratoxin production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. *Mycopathologia*, 90: 181 – 186
- **Tumours, Lton: IARC 1991,** pp. 135–137.
- **US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Int. J. Food Microbiol. 2013,** 162, 311.
- **V. Betina,1985.**Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography*, vol. 334, no. 3, pp. 211–276.
- **Verheecke , 2014.**Modulation of aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus*
- **Victor R. Preedy, 2012.** Caffeine: Chemistry, Analysis, Function and Effects, Royal Society of Chemistry, 2012 - 424 pages
- **Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Grosso, F., Nikolov, I., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M., and Dragacci, S., 2004.** Analysis of ochratoxinA in foodsconsumed by inhabitantsfrom an areawith Balkan endemic nephropathy:a 1 monthfollow-up study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2404-2410.
- **Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. &Aggarwal, D., 2004.** Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health

consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 1106–1122.

- **Willis RM, Mulvihill JJ, Hoofnagle JH.,1980.** Attempted suicide with purified aflatoxin. *Lancet*, 1198±1199.
- **Wu L, Liao P, He LQ, et al., 2015.** Growth performance, serum biochemical profile, jejunal morphology, and the expression of nutrients transporter genes in deoxynivalenol (DON)-challenged growing pigs. *BMC Veterinary Research* 144-154 p.
- **Wu L, Wang W, Yao K, et al., 2008.** Effects of Dietary Arginine and Glutamine on Alleviating the Impairment Induced by Deoxynivalenol Stress and Immune Relevant Cytokines in Growing Pigs. *PLOS ONE*, 8: e69502.
- **Wu Li, Peng Liao , Liuqin He, Zemeng Feng, Wenkai Ren, Jie Yin, Jieli Duan, Tiejun Li and Yulong Yin., 2015.** Dietary L-Arginine Supplementation Protects Weanling Pigs from Deoxynivalenol-Induced Toxicity *Toxins*, 7, 1341-1354;
- **YANNIKOURIS A et JOUANY. J.P., 2002.** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants ; leur devenir et leurs effets chez l'animal, *INRA, Prod. Anim*, 15 (1), ; 3-16.

# **Annexes**

## Annexe 01 :

## I. Méthodes d'analyse des mycotoxines

## I.1. Méthodes immunologiques :

**-RIA :** Le dosage radioimmunologique technique repose sur le principe de la liaison concurrentielle entre un antigène marqué radioactif et un antigène non radioactif. L'avantage de cette technique est le fait qu'elle est hypersensible et spécifique et la capacité d'analyser plusieurs échantillons en même temps, la sensibilité du RIA via les mycotoxines est à l'ordre de 0.25-0.50 ng (**Tsung-che t, 1989**).

Toutefois, les RIA subissent également des inconvénients: (a) il nécessite un antigène à l'état pur, (b) un isotope radioactif est utilisé comme marqueur et est associé à un potentiel pour la santé, et (c) elle a des problèmes de stockage et l'élimination des produits radioactifs de faible activité « Déchets ». Ces inconvénients ont limité les utilisations de RIA dans l'analyse quotidienne des mycotoxines. (**Alex P. Wacoo, Deborah Wendi, Peter C. Vuzi, et Joseph F. Hawumba, 2014**).

**-Elisa :** l'Elisa (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une méthode qualitative semi quantitative rapide qui consiste à l'attachement de la toxine à dosé sur l'enzyme peroxydase de raifort (PR). Le calcul de la concentration se fait par l'évaluation de la quantité de toxines attachés à la PR, la couleur est inversement proportionnel à la concentration des toxines cela veut dire que si la couleur est intense la concentration de la toxine est faible et vis versa (**Savard. M ;Guy Durivage, 2014**).

**Tableau 1 :** Sensibilité des méthodes RIA et ELISA pour le dosage des mycotoxine (**Tsung-che t, 1989**).

Type	Mycotoxine	Interval de detection Ng/pg	Limite de detection (ppb)
<b>RIA</b>	AFB	0.5-5.0	5.8
	AFM	5-50	5.0
<b>ELISA direct</b>	AFB	25-1.000	3
	AFM	25-1000	0.01
	OTA	25-500	10
<b>ELISA indirect</b>	AFB	20-1000	5
	OTA	10-1000	0.5

**II. Les mycotoxicooses :**

Le centre international de la recherche sur le cancer (CIRC), en 1993, a répertorié l'ochratoxine A comme « potentiellement cancérigène pour l'homme » (groupe 2B)

Cancérogénicité des mycotoxines			
Groupe 1	Groupe 2B	Groupe 2A	Groupe 3
comprend les aflatoxines B et G car il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de ces molécules chez l'homme et l'animal.	les molécules pour lesquelles il existe des preuves presque suffisantes de cancérogénicité chez l'homme et /ou des preuves suffisantes chez l'animal	le produit est probablement cancérogène pour l'homme. Aucune mycotoxine n'y figure.	les mycotoxines pour lesquelles il n'est pas possible de se prononcer quant à leur cancérogénicité chez l'homme

## Annexe 02 :

Tableau : Les codes de différentes souches testés

Numéro	Code
1	R.II.E.4E.1 jaune
2	RII
3	A.E3.E1. maroon G
4	A.E8.E2. jaune s
5	RIV.E3.E2. jaune p.b
6	RIV.E3.E1 vert S
7	A.E5.E1 VERT G
8	A0.E4.E2 jaune doré G
9	RII
10	A0.E5.E1 Marron G
11	AE4.E4 Jaune doré G
12	RII.E4.E4 jaune doré S
13	RIV.E3.E2 vert S
14	A.E8.E1 Jaune doré S
15	A.E7.E1 Jaune doré S
16	RII.E4.E1 vert S
17	RII.E3.E1 jaune doré G
18	RV.E6.E1 vert S
19	A.E8.E2 marron G
20	A.E4.E2 marron S
21	RIII.E3.E1jaune S
22	RII.E6.E1 jaune doré G
23	RIV.E3.E1 jaune doré
24	RIII.E3.E1 vert S
25	RIII.E3.E1 jaune G
26	A0.E5.E2 jaune doré
27	RII.E2.E1 vert S
28	A0.E4.E1. marron G
29	RII.E2.E1 marron G
30	RII.E6.E1 marron
31	RIII.E6.E1 jaune doré
32	RII.E5.E1 vert p.b
33	A.E4.E2 vert G
34	RIV.E5.E1 vert G
35	A0.E3.E1. marron
36	RIV.E4.E1 vert clair S
37	RV.E6.E2 jaune doré
38	RV.E6.E1jaune S
39	RII.E7.E1 marron S
40	RIII.E3.E1 jaune

**Annexe 03 :**  
**Milieux de cultures**

<b>PDA (Potatoes Dextrose agar).....</b>	<b>1</b>
Pomme de terre .....	200g
Glucose .....	20g
Agar .....	20g
Eau distillé .....	1000ml
<b>Eau physiologique .....</b>	<b>2</b>
Na Cl .....	9 g
Eau distillée .....	1000 ml
<b>AFPA (Milieu Sélectif pour <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>) .....</b>	<b>3</b>
Extrait de levure .....	20 g
Peptone .....	10 g
Citrate ferrique ammoniacal .....	0.5 g
Chloramphénicol .....	0.1 g
Dichloran solution ethaolique à 0.2% .....	1 ml
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000ml
<b>MEA (Malt Extract Agar) .....</b>	<b>4</b>
Extrait de malt en poudre .....	20 g
Peptone .....	1 g
Glucose.....	20 g
Agar .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml
<b>Czapek Concentre .....</b>	<b>5</b>
KCL.....	5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0.1 g
NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
Eau distillée .....	100 ml

---

<b>CYA (CzapekYeastExtract Agar) .....</b>	<b>6</b>
Czapek Concentre .....	10 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
Extrait de levure .....	5 g
Saccharose .....	30 g
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml
<b>CDA (Czapek Dox Agar) .....</b>	<b>7</b>
NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
KCL .....	05 g
MgSO <sub>4</sub> .....	05 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0.1g
Eau distillée .....	100 ml
<b>YES(Yeast Extract Sucrose).....</b>	<b>8</b>
Extait de levure.....	20 g
Saccharose .....	150 g
MgSo <sub>4</sub> .....	0.5 g
Eau distillée .....	1000 ml

**Pour toutes c'est milieu il faut ajuster le PH à 7.3**

**Colorants :**

<b>Lactophénol .....</b>	<b>1</b>
Phénol pur cristallisé .....	100 g
Acide lactique.....	100 g
Glycérol pur .....	100 g
Eau distillée .....	100 ml