

**UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHREZ
FES**

UFR DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
APPLIQUEE A L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTE

THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

ABDELLAH ZINEDINE

Spécialité: **Biologie**

Option : **Microbiologie**

**DETERMINATION DES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS ET ETUDE DE
LA REDUCTION DES AFLATOXINES PAR LES BACTERIES LACTIQUES
ISOLEES DES FERMENTS PANAIRES TRADITIONNELS**

Le 30 Octobre 2004 devant le jury:

Pr. MOHAMED BENLEMLIH	Faculté des Sciences DEM, Fès.	Président
Pr. ABDESLAM ASSEHRAOU	Faculté des Sciences, Oujda.	Examineur
Pr. RAJAE BELKHOU	Ecole Supérieure de Technologie, Fès.	Examineur
Pr. MOHAMMED EL HASSOUNI	Faculté des Sciences DEM, Fès	Rapporteur
Pr. MOHAMED FAID	I.A.V Hassan II, Rabat.	Rapporteur

DEDICACES

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES SŒURS ET FRÈRES

A TOUS MES AMIS.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail je remercie:

Monsieur **Mohammed EL KADIRI**, Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El-Mahrèz de Fès, pour avoir accepté de m'inscrire au sein la Faculté des Sciences Dhar El-Mahrèz pour continuer mes études doctorales.

Madame **Rajae ELAOUAD**, Directrice de l'Institut National d'Hygiène, pour l'intérêt qu'elle donne à la coopération internationale et à la recherche scientifique au sein de l'INH de Rabat.

Monsieur **Mohamed BENLEMLIH**, Professeur à la faculté des sciences DEM de Fès. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude pour avoir dirigé cette thèse. Ses encouragements et sa patience m'ont beaucoup aidé à surmonter toutes les difficultés. Je le remercie vivement d'avoir suivi et orienter ce travail.

Monsieur **Mohamed FAID**, Professeur, Chef du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir encadré pendant toutes mes études supérieures.

Monsieur **Larbi IDRISSE**, Chef du Département de Toxicologie de l'Institut National d'Hygiène de Rabat pour ses encouragements et ses remarques précieuses. Qu'il trouve ici l'expression de mes meilleures considérations.

Mr **Mohammed El HASSOUNI**, Professeur à la Faculté des Sciences DEM de Fès, pour sa disponibilité et pour avoir accepté de juger cette thèse.

Mme **Rajae BELKHOU**, Professeur à l'Ecole Supérieure de Technologie de Fès pour sa disponibilité et sa gentillesse et pour avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur **Abdeslam ASSEHRAOU**, Professeur à la Faculté des Sciences d'Oujda, pour sa fraternité, sa disponibilité et pour avoir accepté de juger cette thèse.

Mr **Abdelaziz BENJOUAD**, Professeur à la Faculté des Sciences Rabat-Agdal, pour sa disponibilité, ses remarques précieuses, son aide et pour avoir corrigé cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur **Edmond E. CREPPY**, Directeur du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée Université Victor Segalen Bordeaux 2, France, pour son entière collaboration et pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Madame **Anne-Marie BETBEDER**, Mlle **Isabelle BAUDRIMONT**, Mr **Arnaud COURTOIS** et toute l'équipe du Laboratoire de Toxicologie de l'Université Bordeaux 2 pour leur gentillesse et leur soutien au cours de mon séjour à Bordeaux.

Monsieur **Paolo AURELI**, Directeur du "Laboratorio Alimenti" de l'"Istituto Superiore di Sanità" (ISS) de Rome, Italie, pour son entière collaboration et pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire.

Madame **Marina MIRAGLIA**, Directrice du Département de Chimie des Céréales de l'ISS, Rome, Italie, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, ses encouragements et sa disponibilité.

Monsieur **Carlo BRERA**, Chercheur, Responsable de l'Unité des Mycotoxines à l'ISS pour avoir la gentillesse de diriger ma formation sur les mycotoxines, son entière collaboration, sa disponibilité et ses remarques précieuses.

Madame **Roberta ONORI** Chercheur à l'ISS, **Carla CATANO**, **Francesca DEBEGNAC**, **Simona ANGELINI** et tout le personnel du Département de Chimie des Céréales de l'ISS pour leur gentillesse et leur soutien au cours de mon séjour à Rome.

Monsieur **Jose-Miguel SORIANO**, Chercheur au Laboratoire de Toxicologie et Bromatologie de l'Université de Valence (Espagne) pour sa collaboration, sa gentillesse, sa disponibilité et son amitié.

Tout **mes collègues** de l'Institut National d'Hygiène de Rabat, en particulier le personnel du Département de Toxicologie et Hydrologie. Et mes **collègues chercheurs** du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie de l'IAV Hassan II de Rabat.

RESUME

Dans ce travail nous avons étudié la contamination des aliments commercialisés au Maroc par les mycotoxines. Pour cela, un total de 60 échantillons de céréales, 55 échantillons d'épices, 24 échantillons de fruits secs et 25 échantillons d'olives noires ont été prélevés dans différents points de vente des villes de Rabat et Salé. La détermination des mycotoxines a été faite par HPLC. Les résultats ont montré que respectivement 40%, 40% et 55% des échantillons analysés de maïs, de blé et d'orge sont contaminés par l'ochratoxine A (OTA). Les échantillons de maïs ont été analysés pour la co-occurrence naturelle des toxines de *Fusarium*. Les pourcentages de contamination des échantillons de maïs par la fumonisine B1 (FB1) et la zéaralénone (ZEN) sont respectivement de l'ordre de 50 et 15 %. Les résultats obtenus ont montré que les taux de certaines mycotoxines notamment l'OTA et la FB1 ont dépassé les limites maximales fixées par la réglementation européenne. Dans les épices, les résultats ont montré que les taux des aflatoxines totales dans le piment et le gingembre varient respectivement de 1,30 à 9,68 µg/kg et de 0,03 à 9,10 µg/kg. Dans les fruits secs et les olives noires, l'analyse a montré que 66,6 % et 36% sont respectivement contaminés par l'OTA. Dans le but de rechercher de nouvelles souches capables de réduire ou dégrader les mycotoxines, quatre ferments panaires traditionnels collectés de différentes régions du Maroc ont été essayés pour réduire les aflatoxines. Les Résultats ont montré une réduction de 92% pour l'AFG1 et 79,16 % pour l'AFB1 par le ferment L1. La capacité des bactéries lactiques à réduire l'AFB1 in vitro a été également étudiée. Les souches à tester ont été cultivées en présence de l'AFB1. Les Résultats ont montré que les souches de *Lactobacillus* peuvent réduire plus d'AFB1 que les souches de *Pediococcus* et *Leuconostoc* et que la réduction varie entre 1,80 à 44,89% d'AFB1 selon les souches étudiées. Ces résultats suggèrent que les souches de bactéries lactiques peuvent être exploitées dans des approches biologiques pour la détoxification des aliments contaminés par les aflatoxines.

Mots-Clés: *Mycotoxines. Occurrence. Aliments. Réduction. Bactéries lactiques. Fermentation panaire. Maroc.*

SUMMARY

In this work, the contamination of Moroccan foodstuffs with mycotoxins was studied. A total of 60 samples of cereals, 55 samples of spices, 24 samples of dried fruits and 25 samples of black olives were purchased from popular markets of Rabat and Salé and analyzed for mycotoxins by HPLC with fluorimetric detection. Results showed that 40, 40 and 55% of samples of corn, wheat and barley were respectively contaminated with ochratoxin A (OTA). Samples of corn were assayed for the co-occurrence of fumonisin B1 (FB1) and zearalenone (ZEN). The incidence of FB1 and ZEN in corn samples were respectively 50 and 15 %. In spices, AF analysis showed that total AF in paprika and ginger ranged respectively from 1.30 to 9.68 µg/kg and from 0.03 to 9.10 µg/kg. This is the first report on the natural co-occurrence of OTA, FB1 and ZEN in cereals from Morocco. Concerning OTA analysis in samples of dried fruits and black olives, results showed that 66.6% and 36% were respectively contaminated by OTA. Black olives samples were more contaminated by OTA, the overall median concentration was 1.43 µg/kg (range 0.62 to 4.8 µg/kg). In the 2nd part of this study we were interested to a biological process to remove mycotoxins. 4 traditional sourdough ferments were assayed against aflatoxins. Results showed a reduction of mycotoxins with percentages of 92 % for AFG1 and 79.16 % for AFB1 by the ferment L1. The ability of some strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan traditional sourdough ferments to reduce AFB was also studied in vitro. Results showed that *Lactobacillus* strains could remove more AFB1 than *Pediococcus* and *Leuconostoc* strains and the reduction of the initial amount of AFB1 ranged from 1.80 to 44.89 % AFB1 for all strains studied. These findings suggest that sourdough strains lactic acid bacteria can be exploited for an approach of detoxification of aflatoxins from contaminated foods.

Keywords: *Mycotoxins. Occurrence. Foodstuffs. Reduction. Lactic acid bacteria. Sourdough bread. Morocco.*

PUBLICATIONS

ARTICLES

- 1- **A. Zinedine**, S. Elakhdari, A. Chaoui, M. Faid, R. Belhcen, et M. Benlemlih. Aflatoxins Reduction in Sourdough Bread Fermentation. *Alimentaria* (2004) N° 353: 97-100.
- 2- **A. Zinedine**, M. Faid et M. Benlemlih. Activité anti-aflatoxinogénique des bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels marocains. *Rev. Méd. Pharm. Afr* (2004). V 18: 77-83.
- 3- **A. Zinedine**, A.M. Betbeder, M. Faid and M. Benlemlih, L. Idrissi and E.E. Creppy. Ochratoxin A determination in dried fruits and black olives from Morocco. *Alimentaria* (2004) N° 359: 73-76
- 4- **A. Zinedine**, M. Faid and M. Benlemlih. In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from sourdough bread. *Int. J. Agr. Biol*, (2005) Vol. 7, N°1: 67-70.
- 5- **A. Zinedine**, C. Brera, S. Elakhdari, C. Catano, F.R. Debegnac, S. Angelini, M. Faid, M. Benlemlih and M. Miraglia. The natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Int. J. Food Control* (2004) (Soumis)

COMMUNICATIONS ORALES

- 1- **A. Zinedine**, Faid M. et Benlemlih M. (2002): Mycotoxins reduction by acid lactic bacteria of sourdough bread. 1^{er} Congrès National de Biochimie. Société Marocaine de Biochimie. 9-11 Mai 2002. Faculté des Sciences Aïn-Chock Casablanca. Maroc.

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres
1	Effets mutagènes, tératogènes et cancérigènes des mycotoxines
2	Activité de l'eau (aw) nécessaire pour le développement de quelques moisissures
3	Propriétés physico-chimiques des aflatoxines
4	Principales mycotoxines produites par les espèces de <i>Fusarium</i>
5	Limites maximales pour les mycotoxines dans les aliments dans certains pays européens et les USA
6	Estimation du dégât économique des aflatoxines.
7	Principales différences entre le pain au levain et le pain à la levure
8	Coefficients molaires et longueurs d'ondes de l'AFB1 et l'AFG1
9	Analyse statistique des méthodes analytiques des mycotoxines
10	Cooccurrence naturelle de l'OTA, la FB1 et la ZEN dans les échantillons du maïs analysés
11	Concentrations de l'OTA dans les échantillons de blé et d'orge analysés
12	Occurrence des aflatoxines dans les échantillons du piment et de gingembre analysés
13	Occurrence des aflatoxines dans les échantillons du poivre et du cumin analysés
14	Concentrations de l'OTA dans les olives noires analysés
15	Concentrations de l'OTA dans les fruits secs analysés
16	Caractéristiques physico-chimiques des ferments panaires
17	Dénombrement des levures et des bactéries lactiques dans les ferments panaires traditionnels en ufc 10 ⁶ /g
18	Pourcentage des genres de bactéries lactiques dans les ferments panaires traditionnels analysés
19	Distribution des espèces de bactéries lactiques dans les ferments traditionnels panaires étudiés
20	pH et nombre des bactéries lactiques en culture mixte avec <i>A. parasiticus</i> NRRL2999
21	Pourcentages de réduction de la production de l'AFB1 par <i>A. parasiticus</i> NRRL2999
22	Pourcentage de réduction in vitro de l'AFB1 par les bactéries lactiques

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre
1	Biosynthèse de quelques mycotoxines dans les aliments.
2	Structures chimiques des aflatoxines
3	Principales voies de biotransformation de l'AFB1 dans l'organisme
4	Structure de l'ochratoxine A
5	Structure de la ZEN et de ses dérivés
6	Structure de la FB1
7	Structure de la patuline
8	Schéma montrant les principales étapes utilisées pour l'analyse des mycotoxines par HPLC
9	Pourcentage de réduction des aflatoxines par les ferments panaires traditionnels
10	Effet de la température sur la réduction de l'AFB1 par les bactéries lactiques
11	Effet du pH sur la réduction de l'AFB1 par les bactéries lactiques
12	Chromatogramme montrant les quatre pics des standards des aflatoxines
13	Chromatogramme des aflatoxines dans les échantillons d'épices
14	Chromatogrammes des aflatoxines dans les échantillons des épices (suite)
15	Chromatogrammes de l'OTA dans les échantillons des céréales analysées
16	Chromatogrammes de la ZEN dans un échantillon de maïs analysé
17	Chromatogrammes de trois injections différentes du standard de la FB1
18	Chromatogrammes de la FB1 dans trois échantillons de maïs (4, 5 et 20)
19	Chromatogrammes de la FB1 dans deux échantillons de maïs (M1 et M2)
20	Chromatogramme de la FB1 dans un échantillon de maïs (M4)
21	Chromatogramme de la FB1 dans un échantillon de maïs (M20)

ABREVIATIONS

- A:	<i>Aspergillus</i>
- AF:	Aflatoxine
- AFB1:	Aflatoxine B1
- AFB2:	Aflatoxine B2
- AFG1:	Aflatoxine G1
- AFG2:	Aflatoxine G2
- AFM1:	Aflatoxine M1
- AFM2:	Aflatoxine M2
- AFT:	Aflatoxines totales
- Aw :	Activité de l'eau
- DON :	Déoxynivalénol
- F:	<i>Fusarium</i>
- FB1 :	Fumonisine B1
- Hr :	Humidité relative
- L :	<i>Lactobacillus</i>
- Lc :	<i>Lactococcus</i>
- Ln :	<i>Leuconostoc</i>
- OTA :	Ochratoxine A
- P:	<i>Penicillium</i>
- ppm:	Partie par million
- ppb:	Partie par billion
- Pc :	<i>Pediococcus</i>
- Rc :	Pourcentage de recouvrement
- ZEN :	Zéaralénone

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies d'origine alimentaire constituent à l'heure actuelle l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. Leurs répercussions sur la santé et sur l'économie mondiale sont de plus en plus largement reconnues. Ces maladies sont causées par divers agents en particulier les microorganismes pathogènes.

En plus des virus et des bactéries pathogènes, les champignons toxigènes constituent un danger réel pour la santé de l'homme et de l'animal par la sécrétion de substances hautement toxiques au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments d'origine végétale ou animale. Ces substances qu'on regroupe sous le nom des mycotoxines sont répandues à tous les stades de la chaîne alimentaire. Elles ont une composition chimique très variable, ce qui fait que leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques sont extrêmement variées. La plupart sont hépatotoxiques, néphrotoxiques, génotoxiques ou immunosuppresseurs etc. Plus de 300 mycotoxines sont actuellement identifiées à l'échelle internationale, elles sont produites par quelques 200 variétés de champignons toxiques.

Vu les problèmes sanitaires et les pertes économiques causés par la contamination des cultures par les mycotoxines, un grand intérêt est actuellement attribué à travers le monde à ces substances pour que chaque pays ou chaque région se doive adopter une législation spécifique pour chaque mycotoxine et chaque aliment susceptible d'héberger des moisissures toxigènes dans le but de cerner les problèmes engendrés à long terme par ces substances.

CHAPITRE I : MYCOTOXINES DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES

I- INTRODUCTION

Les champignons toxiques produisent un certain nombre de métabolites secondaires nocifs en se développant sur les aliments. Ces produits qualifiés mycotoxines sont très toxiques pour l'homme et les animaux. Leur présence est fortement dépendante de nombreux facteurs.

Les mycotoxines (du grec mykês signifiant moisissure) sont des métabolites toxiques dont l'ingestion provoque une intoxication chez le consommateur à condition que leur concentration soit suffisamment élevée pour produire un effet. Ce sont des produits contaminant les denrées alimentaires d'origine animale ou végétale, notamment les aliments de base : céréales et oléagineux, elles sont répandues à tous les stades de la chaîne alimentaire.

Les troubles causées par ces substances se manifestent par des syndromes variés, il peut y avoir un effet spécifique toxique sur un organe bien déterminé, cependant la plupart provoquent des lésions graves d'un seul tissu ou de plusieurs tissus, mais c'est surtout le foie qui est le plus touché. D'autres effets peuvent apparaître tels les gastro-entérites, les hémorragies et les paralysies etc. Les mycotoxines sont généralement classées en trois groupes selon leurs effets toxiques (voir tableau 1) :

- Les mycotoxines mutagènes
- Les mycotoxines cancérogènes
- Les mycotoxines tératogènes

De ce fait la consommation d'aliments pollués par les mycotoxines pose un problème majeur de la santé publique.

**Tableau 1 : Effets mutagènes, tératogènes et cancérigènes des mycotoxines
(Dérache, 1989)**

Champignons	Mycotoxines produites	Mutagenicité	Tératogénicité	Cancérogénicité
<i>A. flavus</i>				
A. parasiticus	Aflatoxines	+	+	+
<i>P. urticae</i>	Patuline	+	?	?
<i>P. rubrum</i>	Rubratoxine	+	+	
<i>Penicillium sp</i>	Acide pénicillique	+		
	Ac. mycophénolique	+		
<i>A. versicolor</i>	Stérigmatocystine			+
<i>P. poae</i>	Trichothécènes	+	+	
<i>P. veridicatum</i>	Ochratoxine A		+	
<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxine A		+	
<i>P. islandicum</i>	Lutéoskirine		+	+

A : *Aspergillus*

P : *Penicillium*

II- DECOUVERTE DES MYCOTOXINES

Dès le moyen âge, les chroniques décrivent les effets mortels de l'ergot du seigle dont l'agent causal *Claviceps purpurea* est responsable de l'élaboration d'une toxine mortelle : l'ergotamine. Ensuite des études permettaient d'isoler du maïs contaminé par *Penicillium* l'acide pénicillique première mycotoxine identifiée.

En Angleterre (1960), l'ingestion d'une farine d'arachide importée du Brésil et contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de dindonneaux après l'apparition des premiers symptômes : perte de l'appétit, faiblesse des ailes et léthargie. Cet événement dénommé autrefois tout simplement « *Turkey-X- Disease* » a donné le départ d'une série d'études et de recherches physico-chimiques et toxicologiques sur les substances actives élaborées par les moisissures. Ainsi en 1960, le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle matière toxique.

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

D'autres travaux ont montré la contamination des olives par *Aspergillus flavus* et *A. ochraceus* producteurs respectifs d'aflatoxines et ochratoxines (Gourama *et al.* 1985), de même qu'avec une multitude d'autres espèces fongiques qui se sont avérées capables de produire des métabolites toxiques mis en évidence à l'aide de tests biologiques (Samane *et al.* 1991). Les investigations faites par Faid et Tantaoui-Elaraki (1989) ont mis à jour la toxinogénèse de deux moisissures les plus fréquentes sur fruits d'agrumes *Penicillium italicum* et *P. digitatum*. Kichou et Wasler (1993) ont signalé la présence de l'aflatoxine B1 dans l'alimentation destinée à la volaille.

Tantaoui-Elaraki et Bartine (1994) ont ensuite isolé des souches d'*A. flavus* productrices d'ochratoxine A sur diverses épices distribuées au Maroc.

III- CONDITIONS DE PRODUCTION DES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS

Toutes les récoltes poussant à des climats chauds et humides et exposées aux moisissures toxigènes peuvent être contaminées par les mycotoxines. C'est le cas notamment du maïs, des fruits à coque, des arachides, des graines de coton, des noix, des pistaches, des épices, du soja, du riz, des amandes, des fruits secs, du lait et ses dérivés et des céréales et leurs dérivés etc.

Certaines cultures sont moins favorables par rapport à d'autres pour la production d'une ou plusieurs mycotoxines par les champignons. Ceci est probablement dû à des facteurs génétiques. D'autres cultures comme les céréales offrent aux champignons de très bonnes conditions de développement vu leur richesse en glucides reconnus comme principales sources d'énergie. Le blé, l'orge, le seigle, l'avoine, le sorgho, le millet et le riz, apparaissent être moins susceptibles à la contamination fongique et la production d'aflatoxine par rapport au maïs.

Les moisissures responsables de l'altération des graines sont réparties en deux groupes écologiques :

- Les moisissures du champ : *Alternaria* et *Fusarium*
- Les moisissures de stockage : *Aspergillus* et *Penicillium*

Les mycotoxines peuvent être détectées dans les aliments à la suite d'une production par une souche toxigène, ceci nécessite un substrat favorable et une souche productrice de toxines ou bien à la suite d'une contamination indirecte provenant d'aliments contaminés et intégrés dans l'alimentation du bétail. La sécrétion par les moisissures de métabolites toxiques dans les aliments dépend de plusieurs

facteurs qui peuvent être intrinsèques (nature de la souche) ou bien extrinsèques (conditions de l'environnement).

- **Facteurs intrinsèques** : Concernant la nature de la souche, certaines moisissures sont toxigènes mais d'autres ne le sont pas. De plus au sein d'une même espèce toxigène, certaines souches sont fortement productrices de toxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindres. La toxinogénèse d'une moisissure peut dépendre du stade de développement de la souche productrice.

- **Facteurs extrinsèques** : Les facteurs de l'environnement qui contrôlent le développement de la toxinogénèse des moisissures sont nombreux à savoir la teneur en eau, l'humidité relative, le pH, la température ambiante, la composition du substrat en éléments nutritifs et sa richesse en graisses ou en azote et la compétition entre les différents micro-organismes :

- **Substrat**

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant exclusivement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base (oléagineux, céréales, produits laitiers etc.). Les glucides sont des sources de carbone les plus utilisés par les moisissures. La présence de quelques substances dans les aliments stimule la croissance des moisissures et la production des mycotoxines comme le saccharose et les acides aminés. La contamination d'une denrée alimentaire par les moisissures dépend de la nature du substrat en particulier de la nature des glucides disponibles.

- **Activité de l'eau (a_w)**

L' a_w joue un rôle primordial sur la croissance des moisissures en particulier sur la germination des spores et la croissance du mycélium. L'exigence et la tolérance des moisissures vis à vis de l'eau sont variables d'une souche à l'autre. Les moisissures sont classées en trois groupes :

- Les espèces hygrophiles dont les spores germent à plus de 90% et leur croissance optimale se situe à 100 % d'humidité relative (*Mucor* sp.).
- Les espèces mésophiles dont les spores germent entre 80 et 90% et leur croissance optimale se situe entre 95 et 100% d'humidité relative (*Alternaria* sp., *Penicillium* sp.).
- Les espèces xérophiles dont les spores germent à moins de 80% et leur croissance optimale se situe entre 95 et 100% d'humidité relative (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.).

Le tableau n° 2 résume les valeurs limites nécessaires pour le développement de quelques types de moisissures. Concernant les *Aspergillus*, l'aw optimale de leur croissance se situe entre 0,72 et 0,80 selon les espèces. Cependant la plupart des *Penicillium* pousse mieux à des aw comprises entre 0,8 et 0,90. Les espèces du genre *Fusarium* se développent à des aw entre 0,80 et 0,92.

Il est à noter que l'aw requise pour la production de mycotoxines est généralement plus faible que celle nécessaire pour la croissance des moisissures et la germination des spores. En effet, la formation des aflatoxines par *A. flavus* nécessite une valeur d'aw comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance du micro-organisme producteur peut avoir lieu à des valeurs d'aw plus basses (Troller, 1980).

- Température (T°) et pH

La température agit sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La température optimale pour la croissance des moisissures se situe entre 20 et 30 °C, cependant elles peuvent croître dans un vaste intervalle de T° allant de 4 à 40 °C. Des espèces thermophiles d' *A. fumigatus* peuvent croître même à des températures avoisinant 55°C. Les spores des moisissures sont également thermorésistantes. La majorité des spores supportent les températures normales de stérilisation (120°C pendant 20 min). En général, la température optimale pour la production des mycotoxines est inférieure à celle requise pour la croissance du micro-organisme producteur. Le pH du milieu est un facteur important dans la croissance des

moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses.

- Endommagement des graines

Les graines cassées ou fissurées constituent des foyers favorables pour le développement des moisissures qui après leur envahissement libèrent les toxines. Leur altération par les insectes et les acariens fournit également les conditions favorables pour la croissance et le développement des moisissures.

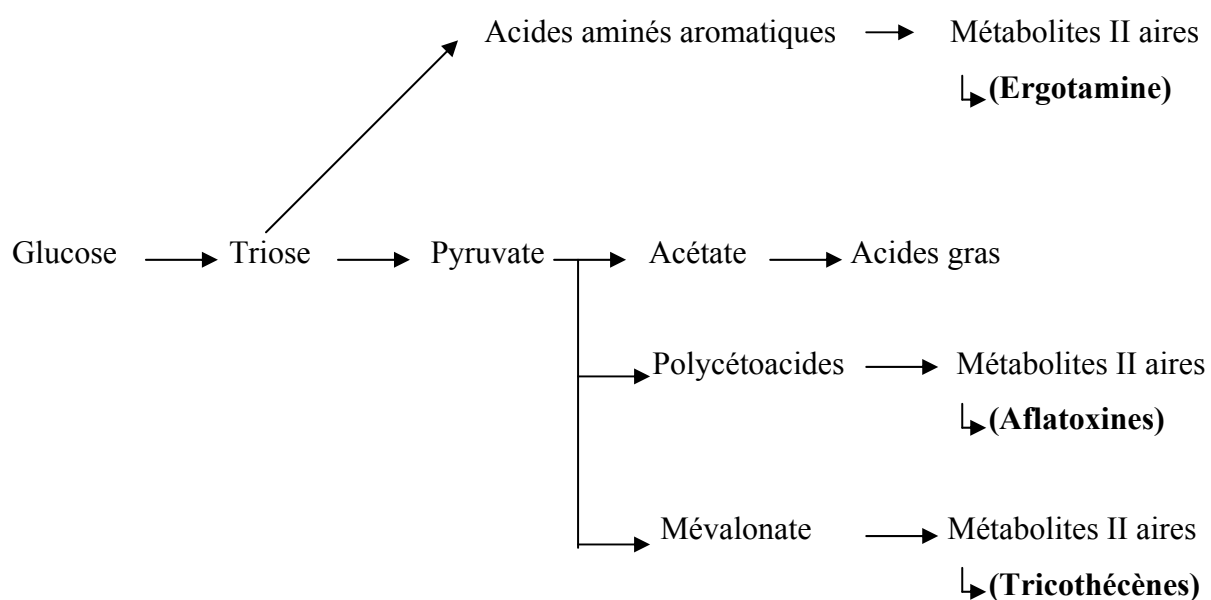
IV- BIOSYNTHESE DES MYCOTOXINES

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés pendant la phase stationnaire après les stades de multiplication et de croissance. Elles sont classées en polyacétoacides, terpènes et métabolites azotés selon leur origine biologique. D'après Steyn (1998), les aflatoxines sont formées à partir des polyacétoacides selon un processus complexe, l'ergotamine est formée à partir des peptides et des acides aminés. L'ochratoxine A est biosynthétisé à partir de la phénylalanine et le dihydroisocoumarine. Les thricothécènes sont produites à partir du mévalonate (Figure 1).

Tableau 2: Activité de l'eau (aw) nécessaire pour le développement de quelques moisissures (OMS, 1990)

Moisissures	Aw
<i>A. ochraceus</i>	0,83-0.87
<i>A. flavus</i>	0,78
<i>A. niger</i>	0,88
<i>P. cyclopium</i>	0,87 - 0,90
<i>Fusarium sp</i>	0,80 - 0,92

Figure 1 : Biosynthèse de quelques mycotoxines dans les aliments (Levral et vierling, 2001)



V- LES MYCOTOXINES EN ALIMENTATION HUMAINE ET ANIMALE

La production des mycotoxines peut avoir lieu dans les champs avant, au moment ou bien après récolte (stockage). Les espèces du genre *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. roseus*, *F. tricinctum* et *F. nivale*) constituent les principales moisissures productrices de toxines avant la récolte. Tandis que les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* telles que *A. flavus* et *A. parasiticus* sont des contaminants au moment du stockage. Alors que les espèces d' *A. clavatus* et d' *A. fumigatus* sont deux espèces qui n'attaquent que les graines endommagées et nécessitent une grande rétention des graines en humidité.

L'alimentation animale est essentiellement constituée de tourteaux oléagineux, de céréales, de fourrages ensilés, etc., tous substrats particulièrement propices au développement des moisissures. En élevages industriels, les animaux reçoivent une ration équilibrée et relativement identique chaque jour, ce qui favoriserait chez des animaux, génétiquement très proches, des intoxications chroniques si l'alimentation renferme des mycotoxines.

En alimentation humaine, le problème se pose différemment. Les habitudes alimentaires varient d'un point à l'autre du globe mais, à part quelques pays où sévire la famine, la grande diversification de notre alimentation nous empêche l'absorption régulière de doses suffisantes de mycotoxines pour être réellement dangereuses à court terme, mais qui peuvent l'être à long terme.

VI- LES AFLATOXINES

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires synthétisés par des souches d'*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987). Elles sont largement abondantes dans les oléagineux, les récoltes du coton et des céréales notamment le blé et le maïs. Le stockage de ces aliments dans des conditions humides ou chaudes peut augmenter la synthèse d'aflatoxines. Selon Diener *et al.* (1987),

l'écologie des moisissures productrices des aflatoxines est très complexe. En effet, *A. parasiticus* est un champignon mieux adapté au sol et proéminent chez l'arachide, alors que *A. flavus* est adapté à la vie aérienne des plantes (fleures) et il est dominant en particulier dans les cultures de maïs. Une distinction biochimique entre les souches productrices d'aflatoxines est que *A. flavus* produit seulement les aflatoxines B, alors que *A. nomius* et *A. parasiticus* produisent les aflatoxines B et G (Creppy, 2002).

L'aflatoxine B1 (AFB1) est la mycotoxine la plus étudiée. Cependant d'autres aflatoxines sont produites par les moisissures toxigènes notamment B2, G1 et G2 et les aflatoxines M. Les aflatoxines M1 et M2, dérivés respectifs des aflatoxines B1 et B2, apparaissent dans le lait et ses dérivés. Ces toxines ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait "Milk" des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Jaquet *et al.*, 1982). Certaines souches de moisissures sont capables de synthétiser les aflatoxines M directement dans une alimentation moisie (Bullerman, 1978). Il a été démontré que l'aflatoxine M1 peut contaminer le lait maternel humain (El-nezami *et al.*, 1995; Galvano *et al.*, 1996).

1- Propriétés physico-chimiques et biologiques des aflatoxines

1- 1 Structures des aflatoxines

Les aflatoxines sont des composés organiques de nature non protéique (figure 2). Leurs propriétés physico-chimiques (PM, Point de fusion, et rapport de front: Rf) sont représentées dans le tableau 3. L'AFB1 est un composé thermorésistant stable même à des températures de 250 °C pendant 30 minutes à l'état cristallisé. L'aflatoxine en présence des rayons UV émet une fluorescence bleue (AFB1 et AFB2) ou verte (AFG1 et AFG2). Par contre l'AFM1 émet une fluorescence bleue violette.

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques des aflatoxines, Le Rf est calculé sur gel de silice 60 (0.25 mm)

Aflatoxines	PM	Point de fusion (°C)	Rf Chloroforme/ méthanol (97/3)
AFB1	312	267	0.56
AFB2	314	303- 306	0.53
AFG1	328	257-259	0.48
AFG2	330	237-240	0.46
AFM1	328	299	0.40
AFM2	330	293	0.30

Figure 2 : Structures chimiques de quelques aflatoxines

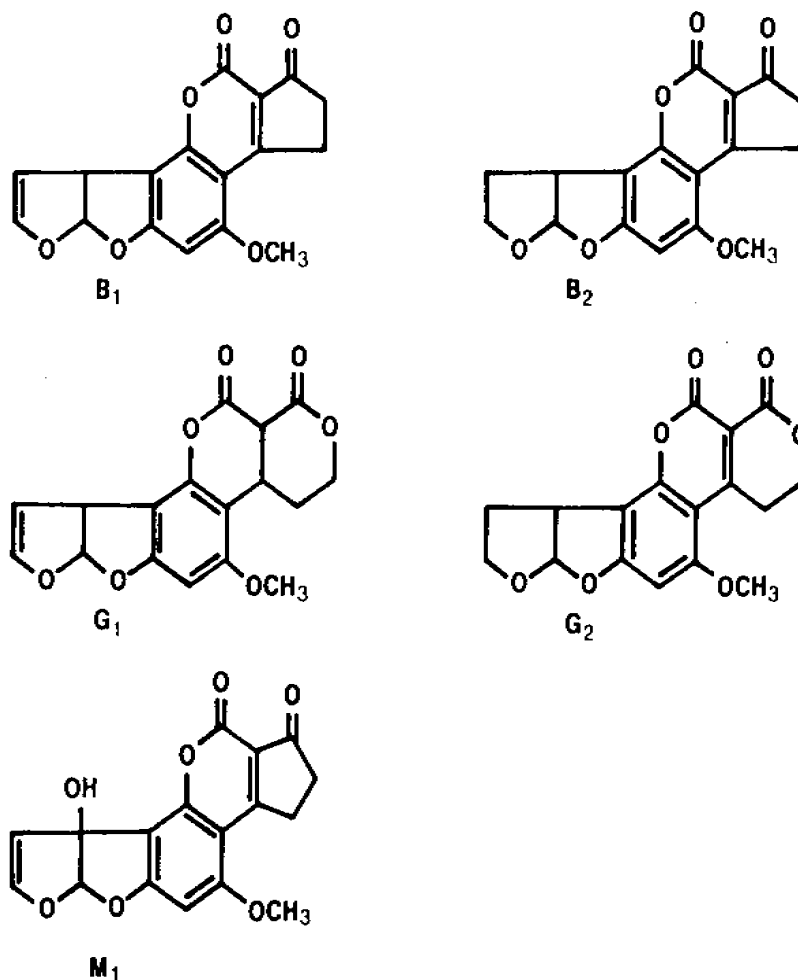


Fig 1: Structure of Aflatoxin B₁ and related aflatoxins.

1-2 Toxicité des aflatoxines

La découverte des aflatoxines a excité l'intérêt des scientifiques à l'égard de la toxicité de ces substances. Les premières observations ont révélé qu'à fortes concentrations, les aflatoxines sont des poisons violents, et qu'administrées à petites doses à des animaux du laboratoire, elles produisent un cancer du foie. Selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer, l'AFB1 est un cancérogène probable classé dans le groupe 1 (IARC, 1993a).

- Toxicité aiguë

La toxicité aiguë se caractérise par la dose létale DL50 qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée. Concernant les aflatoxines, ce type de toxicité est moins fréquent chez l'homme que chez les animaux. Chez le caneton, la DL50 des AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 est respectivement de l'ordre de 0,36, 0,78, 1,70 et 3,44 mg/kg (Hussein et Brasel, 2001).

- Toxicité chronique

La toxicité chronique des aflatoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles. Ce type de toxicité peut apparaître aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Des études épidémiologiques menées dans le Sud-est asiatique et en Afrique ont démontré que les cancers hépatiques sont beaucoup plus fréquents chez certains groupes de la population humaine dont le régime alimentaire est élevé en aflatoxines. D'après Hussein et Brasel (2001), plus de 250 milles décès annuels sont recensés en Chine et en Afrique subsaharienne et qui sont causés par des carcinomes hépatocellulaires attribués aux facteurs de risques comme l'ingestion journalière élevée en aflatoxines qui atteint 1,4 µg/kg et l'incidence du virus de l'hépatite B (VHB). Selon Herrman et Walker (1999), la virulence des aflatoxines chez des individus porteurs du VHB est nettement plus élevée que chez ceux qui ne le sont pas. L'AFB1 et le VHB peuvent agir en synergie, l'infection par le VHB induit les enzymes activatrices de l'aflatoxine en augmentant son pouvoir cancérogène potentiel (Chen *et al.*, 2001).

1-3 Effets antibactériens

L' AFB1 est considérée par plusieurs auteurs comme un antibiotique vu ses propriétés d'inhibition de la croissance bactérienne. L' AFB1 bloque la multiplication cellulaire chez les espèces sensibles à des concentrations létales. Alors qu'à des concentrations sublétales, elle produit des aberrations morphologique et physiologique. Les aflatoxines inhibent la croissance des bactéries par inhibition de la synthèse ou blocage de la réplication de l'ADN et par blocage de la synthèse protéique.

Chez *Escherchia coli*, l'arrêt de la synthèse de l'ADN et de la synthèse protéique sous l'effet de l'AFB1 ont été mis en évidence. Alors que chez *Bacillus megaterium* des déformations cellulaires se manifestent sous l'action des aflatoxines, ces modifications résultent de l'arrêt de la division cellulaire (Zuckerman *et al.*, 1968, cité par Khaddor, 1992).

1-4 Effets mutagènes

L'effet mutagène de l'AFB1 sur les bactéries a été démontré par plusieurs auteurs. La molécule de l'AFB1 peut s'intercaler entre les bases azotées de la molécule de l'ADN et se stabiliser à la suite d'une liaison covalente à l'ADN. Ce processus s'est manifesté *in vitro* chez *Bacillus subtilis* (Maher et Summers, 1970). D'autres auteurs ont suggéré que l'effet mutagène de l'AFB1 provoque un changement des paires de base chez *Salmonella typhimurium* (Garner et Wright, 1973). Aufray et Boutibonnes (1985) ont noté la formation de formes filamenteuses chez *Bacillus thuringiensis* après un traitement par l'AFB1.

Chez la cellule humaine, l'AFB1 n'est pas réactive ou mutagène par elle même, mais elle peut être activée en un époxyde très électrophile qui peut former des adduits à l'ADN. Ces adduits génèrent une mutation qui se situe sur le codon 249 et qui pourra être le point de départ d'un processus de cancérogenèse hépatique. Des résultats *in vivo* ont montré que l'AFB1 provoque très fréquemment cette mutation (Aguilar *et al.* 1993).

2- Métabolisme des aflatoxines dans l'organisme

Une fois dans l'organisme, l'AFB1 subit plusieurs réactions d'élimination à plusieurs niveaux. Ainsi dans la cellule hépatique l'aflatoxine est métabolisée par un arsenal enzymatique qui facilite son élimination par augmentation de ses propriétés hydrophiles (Fremy, 1982).

Il existe deux méthodes d'élimination de l'AFB1. Le processus d'hydroxylation constitue la voie principale qui conduit à la formation du dérivé hydroxylé de l'aflatoxine B1 qui est l'aflatoxine M1 (Jaquet *et al.*, 1982). Alors que par oxydoréduction, il y a formation de l'aflatoxicol qui est moins toxique et de pouvoir mutagène faible (Fremy, 1982). D'autres aflatoxines peuvent être formées à partir de B1, il s'agit notamment des aflatoxines B2a, H1, P1 et Q1.

Les aflatoxines ingérées sont rapidement absorbées par le tractus gastro-intestinal où elles vont commencer à être métabolisées ou détoxifiées au début dans les cellules muco-sales. L'AFB1 subit une bioconversion spécifique (figure 3) donnant formation à un métabolite majeur résultant d'une époxidation par le Cytochrome P450-dépendant : c'est l'AFB1- 8,9-époxyde. Ce produit interagit avec l'ADN formant des adduits (AFB-N7-Guanine) présumés impliqués dans l'activité carcinogène des aflatoxines. La fixation de cet époxyde sur les protéines joue probablement un rôle important dans la toxicité des aflatoxines (Richard, 1998).

Le complexe « aflatoxine – époxyde » formé peut réagir spontanément avec le glutathion par une glutathion-S-tranfêrase. Cette conjugaison est généralement considérée comme une importante voie de détoxification à côté des autres mécanismes donnant naissance notamment à l'aflatoxicol et aux autres dérivés M1, P1 et Q1 (Fink-Gremmels, 1998). L'élimination des aflatoxines de l'organisme inclut l'excrétion urinaire (AFM1, AFP1, AFQ1, AFB1-N7- guanine), l'excrétion biliaire (AFB1-glutathione) et l'excrétion laitière sous forme d'AFM1 chez les femelles des mammifères. Cette dernière constitue la principale voie d'exposition des nourrissons (Richard, 1998).

Figure 3 : Principales voies de biotransformation de l'AFB1 dans l'organisme (Richard, 1998)

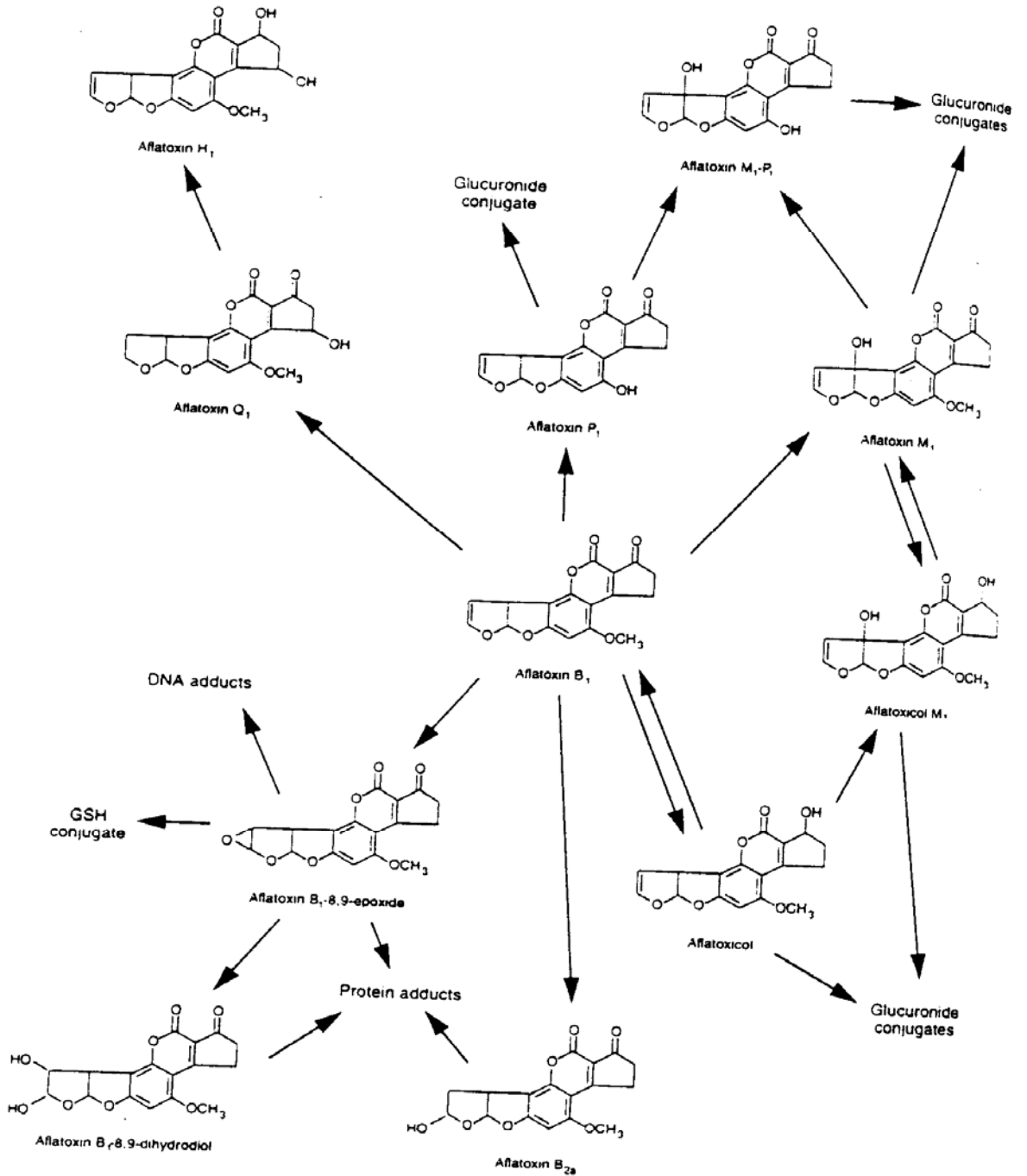


Figure 2. Biotransformation pathways of aflatoxin B₁.

VII- AUTRES MYCOTOXINES

A- LES OCHRATOXINES

1- Microorganismes producteurs

Les ochratoxines sont produites aussi bien par *A. ochraceus* et certaines espèces voisines que par des espèces du genre *Penicillium*. Elles ont été détectées dans le maïs, l'orge, le blé, l'avoine, les haricots, les pois moisis et les fruits secs. On les retrouve également sur les graines mal stockées, elles contaminent entre autres les céréales, les boissons (vins, jus de fruits, bière etc.) et par le biais de la chaîne alimentaire la viande de porc et de la volaille (Haumann, 1995).

La production des ochratoxines par les espèces d'*Aspergillus* ne paraît possible que dans des conditions de forte humidité et de température élevée (varga *et al.*, 1996), alors que certaines espèces de *Penicillium* sont capables de produire des ochratoxines même à des températures n'excédant pas 5°C (OMS, 1980).

2- Ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA, figure 4) est une mycotoxine découverte par Van der Merve *et al.*, (1965), elle est la principale toxine dangereuse dans son groupe. Elle est produite par *P. verrucosum* et par *A. ochraceus*. Elle peut être produite aussi par *A. niger*. Ces trois espèces diffèrent dans leurs niches écologiques, dans les denrées affectées ainsi que dans la fréquence de l'occurrence dans différentes régions géographiques (Creppy, 2002). En effet *P. verrucosum* croît seulement à des températures au dessous de 30°C et à une aw de 0,8 et contamine de ce fait les céréales et leurs dérivés dans les régions froides en particulier en Europe et au Canada (Creppy *et al.*, 1991, 1993). L'OTA est une mycotoxine principalement produite par les moisissures au cours des périodes de stockage (Scudamore *et al.*, 1999 ; Moss, 1986).

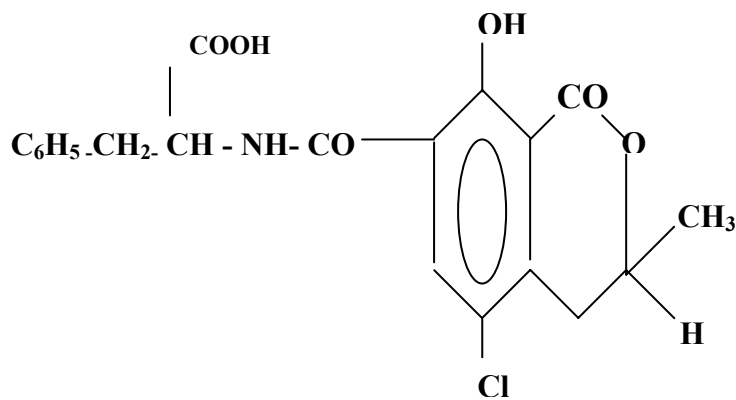


Figure 4: Structure de l'ochratoxine A

L'OTA est absorbée par le tractus gastro-intestinal. Sa distribution chez de nombreuses espèces se fait à travers la circulation sanguine vers les reins ; des petites concentrations se sont trouvées également dans le foie, le muscle et le tissu adipeux. Le transfert de l'OTA dans le lait a été démontré chez le rat, le lapin et l'Homme. Cependant chez les ruminants, grâce au métabolisme de l'OTA par la microflore digestive, une faible quantité d'OTA est transférée dans le lait (Creppy, 2002).

3- Toxicité de l'OTA

L' IARC (1993 b) a classé l'OTA dans le groupe 2B comme un carcinogène humain probable. La génotoxicité de l'OTA a été démontrée par Creppy *et al.* (1985). L'OTA provoque des lésions rénales importantes chez les animaux lors des intoxications chroniques tandis que les intoxications aiguës se caractérisent par des hémorragies et des diarrhées. L'OTA a été trouvée fréquemment à de hautes concentrations dans des échantillons de sang obtenus chez des personnes, vivant dans l'hémisphère Nord en particulier dans des pays du Balkan et affectées par une maladie connue sous le nom de la néphropathie endémique du Balkan (Pfohl-Leszkiewicz *et al.*, 2002). Des taux élevés en OTA ont été retrouvés également dans les aliments et les

sérums de patients néphropathes en Afrique du Nord notamment en Tunisie et en Algérie (Creppy, 1992 ; Maaroufi *et al.*, 1995).

Dans le but d'établir une association géographique avec la néphropathie endémique, Puntaric *et al.* (2001), ont montré que respectivement 75.8% et 33.3% des échantillons du blé et du maïs en Croatie étaient contaminés par de l'OTA. Les concentrations étaient variables d'un échantillon à l'autre et atteignent des taux élevés allant de 0.02 à 160 g/kg dans le blé et 0.02 à 40 g/kg dans le maïs.

4- Occurrence de l'OTA dans les aliments au Maroc

Au Maroc, les investigations relatives aux mycotoxines en général et à l'OTA en particulier restent assez limitées. Selon Le Tutour *et al.* (1983), l'analyse de 70 échantillons de blé prélevés dans différents points de vente par chromatographie sur couche mince (CCM), a montré qu'un seul échantillon s'est révélé contaminé par l'OTA à une concentration de 50µg/kg. Plutard, dans un travail soutenu par la Direction de la Répression des Fraudes et la Protection des Végétaux, 3 échantillons d'orge sur 75 échantillons analysés contenaient de l'OTA (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994).

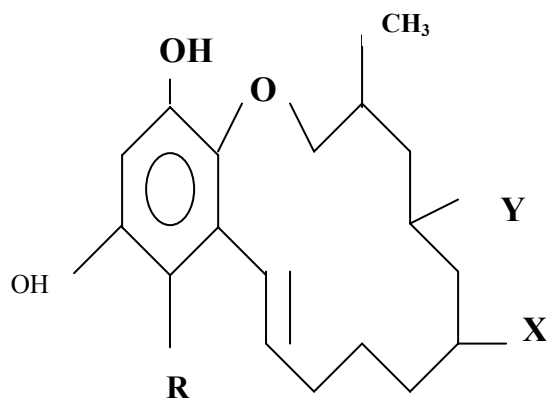
Récemment, des études préliminaires menées par Filali *et al.* (2001) ont montré la contamination du vin rouge par de l'OTA avec des concentrations allant de 0,028 à 3,24 µg/l et la contamination d'un jus de fruit par une concentration de 1,16 µg/l d'OTA. L'analyse de l'OTA dans le sérum a montré que la population marocaine est exposée à l'OTA quoique la concentration moyenne (0,29 µg/l) reste très inférieure à celle trouvée dans d'autres pays de l'Afrique du Nord en particulier la Tunisie (Filali *et al.*, 2002).

B - LA ZEARALENONE (ZEN)

1- Microorganismes producteurs et aliments contaminés

La ZEN [6-(hydroxy-6-oxo-*trans*-1-undecenyl)- β -acide résorcylique μ -lactone, (figure 5)] est une mycotoxine produite principalement par les espèces du genre *Fusarium* (tableau 4). C'est un contaminant naturel de certaines céréales, en particulier du maïs dans de nombreux pays d'Afrique et d'Europe, ainsi qu'aux Etats-Unis.

Quoique les *Fusarium* infectant les céréales produisent la ZEN avant la récolte, des études ont montré que cette toxine peut être produite à de hautes concentrations dans les graines de maïs destinées à l'alimentation animale pendant le stockage. (Pittet, 1998).



<u>X=</u>	<u>Y=</u>	<u>R=</u>	
O	H	H :	Zéaralénone
O	OH	H :	Hydroxy-8' zéaralénone
O	H	CHO :	Formyl-5 zéaralénone
OH	OH	H :	Dihydroxy-6',8 zéaralénone
OH	H	H :	Zéaralénols (α et β)

Figure 5: Structure de la ZEN et quelques-uns de ses dérivés

2- Toxicité de la ZEN

La ZEN et ses métabolites (α et β zéaralénols ; α et β zéaralanols) sont classés par l'IARC dans le groupe 3 (IARC, 1999). Selon Creppy (2002), la ZEN et ses métabolites ont montré une compétitivité pour fixer les récepteurs de l'œstrogène. A de hautes concentrations, la ZEN produit plusieurs altérations du système immunitaire. Elle produit également des altérations du tractus de reproduction chez des modèles expérimentaux (souris, rat, lapin...). La ZEN a montré une action œstrogène (Gonflement et rougissement de la vulve, prolapsus vaginal, accroissement de la taille de l'utérus, chaleurs anormales...) chez divers animaux domestiques (Creppy, 2002).

Concernant sa génotoxicité, la ZEN n'induit pas de mutations chez *S. typhimurium*, cependant elle provoque des aberrations chromosomiques dans les cellules ovariennes chez le hamster et elle induit la réparation SOS chez les bactéries (Ghédira-Chekir *et al.*, 1999).

La ZEN a été récemment évaluée par le comité mixte d'experts FAO/OMS (JECFA, 2000). Le comité a établi la consommation journalière provisoire maximale tolérable (PMTDI) pour la ZEN et ses métabolites (incluant l' α -zéaralanol) à 0,5 μ g/kg du poids corporel par jour.

C- LES FUMONISINES

1- Micro-organismes producteurs et aliments contaminés

Les fumonisines sont un ensemble de toxines produites par les espèces du genre *Fusarium* comme *F. verticillioides* (ou *F. moliniforme*) et *F. proliferatum* (Bottalico, 1998 ; Pittet, 1998 ; Creppy, 2002). Les espèces productrices de ces mycotoxines sont regroupées dans le tableau 4.

Les fumonisines contaminent fréquemment le maïs et les produits à base de maïs, mais elles contaminent aussi l'asperge, le riz, l'orge, le blé, la bière, le thé noir et les plantes médicinales (Scott et Lawrence, 1995; Kim *et al*, 2002).

2- Fumonisine B1

La fumonisine B1 (FB1), ou "le diester du 1,2,3 acide tricarboxylique propane" est la principale toxine dans ce groupe (figure 6). La FB1 a été détectée dans le maïs et ses produits de base à des concentrations élevées de l'ordre des mg/kg. Ces taux (ppm) ont été également reportés dans des aliments destinés à la consommation humaine. Selon Maragos et Richard (1994), la contamination du lait cru par la FB1 est possible, cependant aucun résidu de ces substances n'a été détecté dans le lait après administration orale ou intraveineuse.

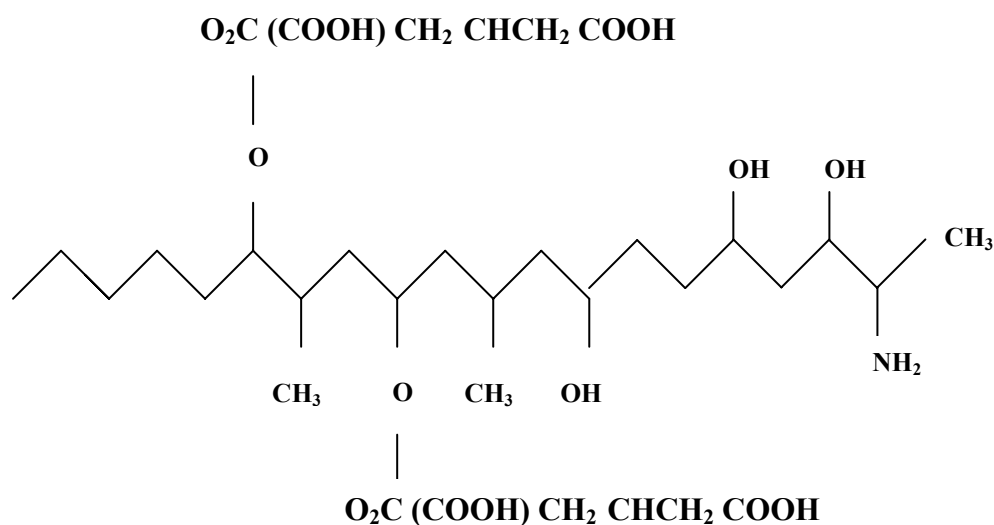


Figure 6: Structure de la FB1

3- Toxicité des fumonisines

La FB1 peut causer des mycotoxicoses aiguës chez les animaux de la ferme comme la leucoencephalomalacie chez les équidés et des oedèmes pulmonaires chez le

porc, la FB1 est également hépatotoxique et néphrotoxique pour le porc, le rat, la souris et le lapin (Dutton, 1996). L'IARC a déclaré les toxines produites par *F. moniliforme* comme des cancérogènes potentiels chez l'homme et les a classées dans le groupe 2B (IARC, 1993 c).

La FB1 est phytotoxique, elle endommage les membranes cellulaires et réduit la synthèse de la chlorophylle. Elle perturbe la biosynthèse des sphingolipides chez les plantes (Creppy, 2002). Elle inhibe la croissance cellulaire et altère le métabolisme lipidique chez *Saccharomyces cerevisiae* (OMS, 2000). Chez l'homme, il n'y a aucune confirmation de la toxicité aiguë des fumonisines, cependant une corrélation entre l'exposition aux fumonisines en Afrique du Sud et le cancer de l'œsophage a été suggéré (Norred et Voss, 1994).

D- LA PATULINE

La patuline est une mycotoxine produite par de nombreuses moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* dont *A. clavatus*, moisissure de la mycoflore des graines, *Penicillium expansum*, agent de pourriture des pommes entreposées. Elle peut être produite également par *Byssochlamys nivea* et *B. fulva*, champignons présents dans divers jus de fruits (Pittet, 1998). La patuline est un contaminant naturel des pommes endommagées et de leur jus, mais elle a été produite au laboratoire par d'autres variétés de moisissures sur les graines, sur des produits réfrigérés comme la viande et les fromages (Scott, 1991).

Sur le plan biologique, cette mycotoxine apparaît à petites doses comme un antibiotique à large spectre d'action, mais on l'a abandonnée à cause de sa toxicité. La patuline provoque des lésions au niveau des poumons, des reins et de la rate et, accessoirement, elle engendre des dégénérescences des neurones du cortex cérébral, d'où l'apparition de divers symptômes nerveux (Haumann, 1995).

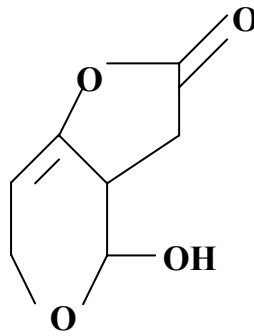


Figure 7 : Structure de la patuline

E- LES TRICHOHECENES

C'est une famille composée d'environ 148 composés, tous produits par de nombreuses espèces fongiques dont celles des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Cephalosporum*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Stachybotrys* (OMS, 1980). Les mycotoxines les plus étudiées dans ce groupe sont le déoxynivalénol (DON), les toxines T-2 et HT-2.

La toxine DON est une vomitoxine qui contamine les céréales en particulier le blé, l'orge, le maïs, le seigle, l'avoine, et le riz (Creppy, 2002). L'occurrence de la toxine DON est associée principalement avec *F. graminearum* et *F. culmorum* (Bottalico, 1998). La DON peut provoquer des effets adverses après administration. L'administration d'une dose aiguë est caractérisée par deux effets toxicologiques à savoir la perte de l'appétit et les vomissements.

Les toxines T-2 et HT-2 sont deux toxines produites sur les céréales (blé, orge, maïs, riz, avoine...) et les produits à base de céréales. Elles sont produites par de nombreuses espèces de *Fusarium* (Bottalico, 1998). La toxine T-2 est un inhibiteur potentiel de la synthèse protéique. Alors que la toxine HT-2 a pour cible le système immunitaire.

Tableau 4: Principales mycotoxines produites par les différentes espèces de *Fusarium* (Bottalico, 1998)

Espèces de <i>Fusarium</i>	Mycotoxines produites
<i>F. acuminatum</i>	T-2, HT-2, DAS, MAS, MON, NEO
<i>F. avenaceum</i>	MON
<i>F. chlamydosporum</i>	MON
<i>F. crookwellense</i>	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. culmorum</i>	DON, ZEN, NIV, FUS, ZOH, AcDON
<i>F. equiseti</i>	DAS, ZEN, ZOH, NIV, DAcNIV, MAS, FUS
<i>F. graminearum</i>	DON, ZEN, NIV, FUS, AcDON, DAcDON, DAcNIV
<i>F. heterosporum</i>	ZEN, ZOH
<i>F. moniliforme</i>	FB1
<i>F. oxysporum</i>	MON
<i>F. poae</i>	DAS, MAS, NIV, FUS, T2, HT2, NEO
<i>F. proliferatum</i>	FB1, BEA, MON, FUP
<i>F. sambucinum</i>	DAS, T2, NEO, ZEN, MAS
<i>F. semitectum</i>	ZEN
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2, HT-2, NEO, MAS, DAS
<i>F. suglutinans</i>	BEA, MON, FUP
<i>F. tricinctum</i>	MON
<i>F. venenotum</i>	DAS

AcDON: Mono-acétyldéoxynivalénol; **AcNIV:** Mono-acétylnivalénol; **BEA:** Beauvéricine; **DAcDON:** Di-acétyldéoxynivalénol; **DAcNIV:** Di-acétylnivalénol; **DAS:** Diacétoxyscirpénol; **DON:** Déoxynivalénol (vomitoxine); **FB1:** Fumonisine B1; **FUP:** Fusaproliférine; **FUS:** Fusarénone-X; **HT2:** HT2-toxine; **MAS:** Monoacétoxyscirpénol; **MON:** Moniliformine; **NEO:** Néosolaniol; **NIV:** Nivalénol; **T2:** T2-toxine; **ZEN:** Zéaralénone; **ZOH:** Zéaralénols (isomères α et β).

VI- REGLEMENTATIONS DES MYCOTOXINES

a- A l'échelle nationale:

Actuellement au Maroc, il n'y a pas des normes ou des limites réglementaires fixant les teneurs maximales des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale. Un projet de normalisation de ces toxines a été préparé vers la fin des années 90 par le comité interministériel pour le contrôle alimentaire et la répression des fraudes (CIPCARF) mais il n'a pas encore été adopté. Ce projet prévoit la normalisation des contaminants minéraux et organiques dans les aliments et fixe les concentrations maximales admissibles des mycotoxines dans certaines denrées destinées à l'alimentation humaine et animales :

- **Matières premières :** Pour les produits et matières servant à l'alimentation humaine, en aucun cas la concentration maximale en mycotoxines ne doit dépasser les valeurs suivantes :

- **Céréales et produits assimilés :**

- AFB1 : 5µg/kg dans les céréales
- Ochratoxines : 30µg/kg dans les céréales
- ZEN : 200 µg/kg dans les céréales

- **Produits laitiers :**

- AFM1 : 0,05 µg/kg (lait de toute nature)
- AFM1 : 0,03 µg/kg (lait pour enfants de moins de 3 ans)

- **Fruits et jus de fruits**

- Patuline : 50 µg/kg (cidre et jus de pomme)

- **Corps gras et oléagineux**

- AFB1 : 5µg/kg (huiles végétales vierges ou mélangées)
- AFB1 : 0,1µg/kg (arachides, pistaches, amandes etc.)
- ZEN : 200 µg/kg (huiles végétales)

- **Tous les autres aliments :** 10 µg /kg

• Produits concentrés

La concentration en aflatoxines des produits ayant subi une opération d'élimination de leur eau de constitution, ou d'une partie de celle-ci, peut être supérieure à celle de la matière première mise en œuvre, dans la limite de la quantité d'eau éliminée :

- Lait en poudre : AFM1 : 0,5µg/kg

- LAIT EN POUDRE (ENFANTS) : AFM1 : 0,3µG/KG

• Dérivés des céréales

Les farines et sons qui proviennent directement des céréales peuvent contenir des proportions en AFB1 différentes de celles des matières premières dont ils sont issus :

- Farine blanche de blé (farine fleur) : 3µg/kg d'AFB1

- Son du blé brut : 10 µg/kg d'AFB1

- Farine de blé complète : 5µg/kg

• Aliments de bétail

- AFB1 : 50 µg/kg : Aliments complets pour bovins, ovins et caprins (sauf animaux laitiers, veaux et agneaux)

- AFB1 : 20 µg/kg : Aliments pour porcins et volailles (sauf porcelest, poussins, cannetons et dindes)

- AFB1 : 20 µg/kg : Aliments suppléments pour animaux laitiers

- AFB1 : 10 µg/kg : Autres aliments complets pour animaux

b- A l'échelle internationale :

Plusieurs pays ont établi ou proposé des limites réglementaires concernant les mycotoxines dans les aliments. Depuis 1974, certains pays de l'UE ont arrêté des taux limites d'aflatoxines. En mars 1999, en collaboration avec l'OMS, La FAO a parrainé la 3^{ème} conférence mondiale sur les mycotoxines. La conférence a été organisée pour sensibiliser les décideurs aux risques sanitaires et aux effets économiques potentiels de

la contamination des denrées alimentaires et des produits d'alimentation animale, et de promouvoir l'harmonisation des réglementations et les procédures de contrôle et pour recommander des stratégies permettant d'évaluer, de prévenir et de lutter contre la contamination par les mycotoxines.

La nécessité de fixer des teneurs maximales en mycotoxines pour les aliments destinés à la consommation humaine et animale est généralement reconnue. Les pays de l'Union européenne ont édité un règlement pour limiter la présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine (CEE, 1998). La limite maximale admissible en aflatoxine B1 (ou des aflatoxines totales B et G) ne doit pas dépasser 2 μ g/Kg (ou 4 μ g/Kg pour les aflatoxines totales) dans les arachides, fruits à coque et fruits secs et leur produits de transformation ainsi que dans les céréales et leur dérivés.

Selon ce même règlement, la limite maximale pour l'aflatoxine M1 dans le lait est quant à elle fixée à 0,05 μ g/l sachant que l'on estime qu'au plus 1 à 3 % de l'aflatoxine B1 absorbée par une vache laitière est excrétée dans le lait sous forme d'aflatoxine M1 (Van Egmond, 1991).

En plus de ces limites communautaires, plusieurs pays du monde ont établi leurs limites propres à eux concernant les mycotoxines dans les aliments. Le tableau ci-dessous donne un aperçu sur les limites fixées par certains pays européens et les USA :

Tableau 5: Limites maximales pour les mycotoxines dans les aliments dans certains pays européens et les USA (Creppy, 2002).

Mycotoxine	Pays	LM (µg/kg ou µg/l)	Aliments
AFB1	Finlande	2	Tous
	Allemagne	2	Tous
	Pays-bas	5	Tous
	Belgique	5	Tous
	Portugal	25	Arachide
		5	Aliments pour enfants
		20	Autres
	Autriche	1	Tous
		2	Céréales, noix
	Suisse	1	Tous
		2	Maïs, céréales
	Espagne	5	Tous
	Luxembourg	5	Tous
	Irlande	5	Tous
Danemark	5	Tous	
Grèce	5	Tous	
AF totales: (AFB1, AFB2, AFG1, et AFG2)	Suède	5	Tous
	Norvège	5	Arachides, noix,
	Finlande	5	Tous
	Allemagne	4	Tous
		0,05	Enzymes et formulations
	G. Bretagne	4	Noix, fruits secs
	France	10	Tous
	Italie	50	Arachides
	Autriche	5 (B2+G1+G2)	Tous
		0,02 (M1+B1+B2+G1+G2)	Aliments pour enfants
	Suisse	5 (B2+G1+G2)	Tous
		0,01	Nourritures de bébés
USA	20	Tous	
Belgique	5	Arachides	
Bosnie	1 (B1+G1)	Céréales	
	5	Fèves, haricots	
AFM1	Suède	0,05	Dérivés laitiers liquides
	Autriche	0,05	Lait
	Allemagne	0,05	Lait
	Pays-bas	0,05	Lait
		0,02	Beurre
		0,02	Fromages
	Russie	0,5	
	Suisse	0,02	Aliments pour enfants
		0,05	Lait et dérivés
		0,25	Fromages

Tableau 5 (Suite):

Mycotoxine	Pays	LM (µg/kg ou µg/l)	Aliments
AFM1	Belgique	0,05	Lait
	USA	0,5	Lait
	Rép. Tchèque	0,1	Lait pour enfants
		0,5	Lait pour adultes
	France	0,03	Lait pour enfants
Bulgarie	0,05 0,5	Lait pour adultes	
Déoxynivalénol (DON)	USA	1000	Blé
	Russie	1000	Céréales
	Autriche	750	Blé
OchratoxineA (OTA)	Romaine	5	Tous
	Rép. Tchèque	1	Aliments pour enfants
		20	
	Danemark	5	Céréales
		25	Porc
	Autriche	5	Céréales
	Suisse	2	Céréales
	Grèce	20	Tous
	France	5	Tous
Pays-bas	0	Céréales	
Fumonisines (B1+B2)	Suisse	1000	Maïs
Zéaralénone (ZEN)	Roumanie	30	Céréales, huiles végétales
	Autriche	60	Céréales
	France	200	Céréales, huiles végétales
	Russie	1000	Céréales, huiles végétales
T2-toxine	Russie	100	Tous

LM : Limite maximale

AF : Aflatoxines

VII - IMPACT ECONOMIQUE DES MYCOTOXINES

Malgré les nombreuses recherches qui ont été faites sur l'aspect toxicologique et pathologique des mycotoxines chez les populations humaines et animales, sur leur implication directe ou indirecte dans l'apparition de certaines maladies telles les cirrhoses, les cancers ou certaines maladies nutritionnelles comme le kwashiorkor (Hendrickse, 1984) ou la maladie du kashin-Beck au Tibet en Inde (Jiambo et al., 1995), Peu de travaux ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact financier et économique des mycotoxines sur des populations spécifiques aussi bien dans les pays industrialisés que les pays développés.

Les conséquences économiques engendrées par les mycotoxines sont lourdes. Dans les pays d'Amérique du Nord, la productivité des animaux a connu des pertes énormes estimées à des milliards de dollars par année (Miller, 1998). L'impact financier des mycotoxines concerne non seulement les risques pour la santé de l'homme et les animaux domestiques, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation.

En s'appuyant sur des données recueillies en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande, Lubulwa et Davis (1994) ont essayé de donner une estimation du dégât économique annuel, réparti sur différents secteurs, provoqué par différents champignons et les aflatoxines (tableau 6). Ces auteurs ont estimé que 20 à 29 % de la production du maïs et même 22 à 45 % de la production d'arachide provenant de ces trois pays dépassent une concentration en aflatoxines de 50 µg/ kg et sont de ce fait soumis à des restrictions d'exportations vers les pays disposant des réglementations sur les limites des résidus de mycotoxines.

Tableau 6: Estimation du dégât économique en Millions de \$ Australiens, causé par différents champignons et les aflatoxines en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande en 1991 (Lubulwa et Davis, 1994)

Secteur	Nature des dégâts	Mais	Arachide	Maïs et Arachide
Dégradation du produit commercialisé	Détérioration de l'aspect extérieur des graines. Rancissure, perte du pouvoir germinatif.	70,9	36,8	107,7
Intoxication humaine	Cancer du foie primaire dû à l'aflatoxine	176,5	114,7	291,2
Intoxication des animaux domestiques (volaille, porc, bétail)	Diminution de croissance, stérilité, effets mutagènes, tératogènes, carcinogènes	71,7	6,2	77,9
Total		319,1	157,7	476,9

CHAPITRE II : PROCÉDES DE PREVENTION ET DE REDUCTION DES MYCOTOXINES DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES

I- Généralités

Les dégâts économiques et les problèmes de santé humaine et animale engendrés par les mycotoxines, à court ou à long terme, ont poussé les scientifiques à chercher des méthodes efficaces pour réduire les taux de ces substances dans les aliments ou bien empêcher leur production par les moisissures toxigènes

Comme la présence des moisissures dans les récoltes est un phénomène naturel, il serait impossible d'éliminer toute trace de mycotoxines des produits alimentaires. Cependant il est possible de minimiser la contamination en prenant des précautions au niveau de l'entreposage et la manutention des récoltes après la moisson et en inspectant rigoureusement les produits avant la mise sur le marché. La réduction des taux des mycotoxines relève à la fois du rôle des agriculteurs, des commerçants et des industriels.

Plusieurs procédés ont été étudiés afin de prévenir la contamination des matières premières par les mycotoxines. Chaque essai doit non seulement réduire la concentration des toxines mais aussi éviter que les produits de dégradation ne soient toxiques ou détériorent la qualité nutritionnelle des aliments traités. Selon Lopez-Garcia et Park (1999) un système de lutte intégré contre les mycotoxines doit se concevoir à trois niveaux de production:

1-Lutte avant récolte

Sous des climats type tropicaux chauds et humides jugés à risque, la prévention aux champs consiste en l'utilisation raisonnée d'insecticides, et ce dans le but de diminuer les lésions des plantes et réduire de ce fait les portes ouvertes à l'envahissement par les moisissures ou l'utilisation de fongistatiques inhibant la croissance des moisissures et empêchant la toxigénèse. La lutte contre les infestations d'insectes peut donc aider à éviter la prolifération des spores et la

production ultérieure des mycotoxines. Cependant ces essais sont très difficiles à mettre au point et restent peu concluants.

2-Lutte au moment de la récolte

Le moment de la récolte a une grande influence sur la production des mycotoxines. Pendant cette période, deux facteurs sont à contrôler : le lavage et le séchage. Ces deux pratiques jouent un rôle important dans la prolifération fongique pendant l'entreposage.

3-Lutte et décontamination après récolte

Les procédures appliquées au cours de la période d'entreposage constituent une barrière importante pour éviter l'exposition des consommateurs aux mycotoxines. Les procédés de décontamination doivent être efficaces sans rendre impropres à la consommation les denrées traitées, elles doivent être simples à mettre en œuvre et peu coûteux puisque le traitement peut concerner des tonnages importants.

Selon Park (1993), les trois procédés d'élimination des aflatoxines (physiques, chimiques ou biologiques) constituent les stratégies de lutte les plus courantes après récolte, les méthodes sont nombreuses et varient selon le type de mycotoxines, mais selon Galvano *et al*, (2001), l'efficacité de chaque approche doit être évaluée selon des critères spécifiques à savoir :

- Inactiver, détruire ou éliminer la toxine dans l'aliment,
- Ne générer aucun résidu toxique dans l'aliment,
- Ne pas altérer les propriétés technologiques et nutritionnelles de l'aliment,
- Etre techniquement et économiquement faisable.

II- Procédés physiques

Les méthodes physiques sont nombreuses, elles sont basées en général sur le lavage, le séchage, le broyage, le tri manuel, la séparation mécanique, le traitement par un choc thermique et la torréfaction.

- Traitement thermique

Les mycotoxines sont en général thermostables et elles résistent à tous les procédés utilisés pour l'élimination des micro-organismes (chauffage et stérilisation). Peers et Linsell (1975) observaient que les aflatoxines restent stables dans les arachides ou dans le maïs après un chauffage à 200°C pendant 30 minutes. Il est à noter que les traitements thermiques dépendent en grande partie d'autres facteurs tels la teneur de l'aliment contaminé en eau et de son pH (Rustom, 1997).

- Irradiation

L'irradiation a été considérée pour longtemps comme une solution possible de lutte contre les microorganismes. Des méthodes satisfaisantes pour l'élimination des mycotoxines ne sont pas encore mises au point. Cependant l'irradiation peut être envisagée pour lutter contre les moisissures toxigènes.

- Extraction

L'extraction des aflatoxines avec des solvants est un procédé qui a été étudié pour leur élimination des arachides contaminées. Cependant le matériel traité par cette méthode ne peut être destiné qu'aux animaux. Le rapport solvant/aliment est un élément crucial dans le procédé. Quoique toutes les traces d'aflatoxines puissent être éliminées sans aucun risque de formation de produits toxiques, ce procédé reste limité dû à son coût très élevé (Rustom, 1997).

- Adsorption

Certains produits possèdent des propriétés d'adsorption. Ils ont fait l'objet d'études pour évaluer leur capacité à éliminer les mycotoxines des aliments contaminés. Selon

Huwig *et al.* (2001), différents adsorbants ont été utilisés avec succès dans des procédés de détoxification des aliments de bétail contaminés par les mycotoxines. C'est le cas des argiles adsorbant les aflatoxines en particulier l'AFB1, le charbon actif adsorbant la plupart des mycotoxines, et finalement certains polymères comme la cholestyramine (résine échangeuse d'anions utilisée pour l'adsorption des acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal) adsorbant l'OTA.

III- Procédés chimiques

De nombreuses études ont évalué la capacité des substances chimiques à inactiver ou réduire certaines mycotoxines, cependant la plupart des études ont été axées sur les aflatoxines dans l'alimentation animale. D'autres recherches ont porté sur les propriétés protectrices d'autres substances contre les effets des mycotoxines. Il est à noter qu'actuellement le règlement européen interdit de décontaminer les aflatoxines par des procédés chimiques ou de mélanger des produits contaminés avec d'autres produits qui ne le sont pas dans l'intention d'abaisser la teneur jusqu'à la limite maximale admissible.

- Traitement à l'ammoniaque

L'ammonisation (traitement des denrées contaminées par l'ammoniaque) est la méthode chimique qui a fait l'objet des recherches les plus poussées. Selon Park (1993), le traitement à l'ammoniaque est une solution pratique et efficace pour la détoxification des aflatoxines dans les denrées alimentaires et l'alimentation du bétail.

Quoique la décontamination des aflatoxines par l'hydroxyde d'ammonium a montré une grande efficacité (plus de 99%) et a été utilisée avec succès aux USA, en France, au Sénégal, au Brésil, au Mexique et en Afrique du Sud, la FDA "*Food and Drug Administration*" n'autorise pas ce type de traitement comme solution de réduction des taux d'aflatoxines dans les aliments. L'inconvénient majeur de cette technique est le refus des aliments traités par le bétail.

- Bisulfites

Les bisulfites ont été ajoutés aux aliments pour inhiber les activités de certaines enzymes mais aussi pour retarder la croissance des micro-organismes. Doyle et Marth (1978) ont constaté que les bisulfites réduisent les taux des aflatoxines B1 et G1 d'environ 50 % après environ 5 jours de traitement et que cette durée peut être réduite à une journée si la température atteint 55° C au cours du procédé de traitement.

- Les antioxydants

La recherche des propriétés protectrices des substances anti-oxydantes contre les effets néfastes des mycotoxines a été largement étudiée. Les vitamines (A, D et E) et le sélénium ont donné des résultats positifs en inhibant la complexation des mycotoxines à l'ADN. Des résultats similaires ont été obtenus avec les riboflavines et des caroténoïdes (Galvano *et al.*, 2001).

IV- Procédés biologiques

Contrairement aux procédés chimiques et physiques, les procédés biologiques restent encore moins étudiés. Selon Lopez-Garcia et Park (1999), les méthodes biologiques ayant des propriétés de décontamination efficaces sont en général le résultat de composés spécifiques produits par des micro-organismes sélectionnés.

L'existence d'activité de dégradation des mycotoxines dans les graines de céréales stockés pendant l'hiver a été rapportée par plusieurs chercheurs. La toxine DON, les toxines T-2 et HT-2 peuvent être dégradées par les enzymes du blé et du maïs. Une réduction du taux de la toxine DON a été observée dans le blé stocké à une température de -18 °C, la stérilisation du blé par irradiation permet de prévenir cette réduction (Karlovsky, 1999). Ruhland *et al.* (1996) ont rapporté que les cellules du blé, du maïs, de la tomate et d'autres plantes transforment complètement l'OTA, la transformation inclue une hydrolyse, une méthylation et une hydroxylation. Karlovsky (1999) a aussi rapporté la possibilité de dégradation des mycotoxines en particulier

l'OTA, l'AFB1, la DON et la ZEN par la flore du tractus digestif des ruminants (porc, bovins).

Grâce aux informations recueillies dans le domaine de la biotechnologie sur les microorganismes et à l'accumulation des connaissances sur les capacités illimitées du catabolisme des populations microbiennes, plusieurs spécialistes se sont orientés récemment vers une approche microbiologique pour la détoxification des aliments contaminés par les mycotoxines. Cette approche consiste en une réduction ou une dégradation des mycotoxines par des microorganismes spécialisés (Bata et Lastzity, 1999). Les procédés biologiques ont plusieurs avantages:

- La destruction des toxines, leur réduction ou leur inactivation,
- L'inactivation des spores et du mycélium,
- La conservation de la valeur nutritionnelle de l'aliment,
- La conservation des propriétés physiques du matériel cru,
- Le coût faible du processus de décontamination.

Selon Bhatnagar (1991), la détoxification biologique des mycotoxines consiste en une transformation ou une dégradation enzymatique des toxines en produits moins toxiques. Une fois les microorganismes et les enzymes responsables de la détoxification sont découverts, les études doivent être focalisées sur le développement et l'optimisation des procédures sous diverses conditions.

1- Interactions entre les mycotoxines et les microorganismes

1-1 Dégradation des mycotoxines par les microorganismes producteurs.

Les moisissures toxigènes sont souvent capables de dégrader les mycotoxines qu'ils produisent pour les utiliser comme source d'énergie lorsque les conditions deviennent défavorables. Hamid et Smith (1987) et Doyle et Marth (1978) ont rapporté la dégradation des aflatoxines par *A. flavus*. Varga *et al.* (2000) ont montré la capacité

des souches *d'A. fumigatus* de dégrader l'OTA dans les milieux de cultures liquides. Par ailleurs, des souches *d'A. niger* CBS120.49 se sont montrées capables de dégrader l'OTA et l'ochratoxine α (OT α) dans les milieux liquides et solides en sécrétant une enzyme: la carboxypeptidase.

1-2 Dégradation de l'AFB1 par *Flavobacterium aurantiacum*

La première évidence de la capacité des bactéries à dégrader les molécules d'aflatoxines a été démontrée par Ciegler *et al.* (1966 a et b). Ces auteurs ont étudié l'effet d'un millier de micro-organismes comptant parmi elles des levures, des moisissures et des bactéries. Une seule souche a montré un effet de dégradation irréversible sur l'AFB1 dans des milieux solides et liquides. Il s'agit de *Flavobacterium aurantiacum*. Le pourcentage de dégradation totale était de 100% après 88h d'incubation.

Lillehoj *et al.* (1967) ont montré que la température optimale de dégradation de l'AFB1 par *F. aurantiacum* est de 35°C et le pH optimum de dégradation est de 6,75. Lillehoj *et al.* (1971) ont rapporté que l'ajout d'une préculture de 2.10^{10} cellules /ml d'une préculture de *F. aurantiacum* de 48 h dégrade 40% de l'AFM1 par simple contact, alors que l'incubation pendant 4 h dégrade complètement la toxine.

La dégradation des aflatoxines dans certains aliments par les micro-organismes et en particulier par *F. aurantiacum* a été rapportée également par Hao et Brackett (1988) et Line *et al* (1994). Cependant le mécanisme de leur dégradation n'est pas bien connu aussi bien leur devenir. Line et Brackett (1995) ont montré que l'addition d'une autre source nutritive (bouillon de trypticase) n'affecte pas la dégradation des aflatoxines indiquant que l'AFB1 est probablement dégradée par une voie métabolique secondaire.

2- Interactions entre Les bactéries lactiques et l'aflatoxine.

2-1- Effets de l'aflatoxine sur les bactéries lactiques.

L'effet de l'AFB1 sur les bactéries lactiques au cours de la fermentation a été étudié par plusieurs auteurs, en particulier l'effet d'inhibition des enzymes. Ce dernier dépend de la concentration de la toxine, de la nature des souches étudiées, et de la nature de l'enzyme en question. L'activité protéolytique chez *Lactococcus lactis* est inhibée par l'AFB1, l'inhibition est proportionnelle à la concentration de la toxine initiale utilisée (Mohran *et al*, 1984). Ces mêmes auteurs ont conclu qu'il n'ya aucun effet inhibiteur chez *Lactococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus casei*.

Sutic et Banina (1990) ont montré qu'en présence de l'AFB1, des souches de *L. casei*, *L. plantarum* et *S. thermophilus*, à métabolisme homofermentaire, ont commencé à produire énormément de gaz dans des milieux liquides à partir du glucose, du lactose, du sucrose et du galactose. Ces résultats suggèrent que le métabolisme hétérofermentaire survenu chez les espèces étudiées est essentiellement dû à l'AFB1.

Selon Khaddor (1992), l'AFM1 utilisée à une concentration de 1 µg/l n'a causé aucun effet sur la croissance des bactéries lactiques de la fermentation du "leben" et du yaourt. Cependant à une concentration de 5 µg/l, il y a inhibition de la croissance et de la production d'acide lactique chez *S. thermophilus*. Alors que chez *L. bulgaricus* il y a seulement diminution de la production d'acide. Selon le même auteur, les bactéries thermophiles sont plus sensibles à l'effet de l'AFM1 que les bactéries mésophiles cependant leur morphologie n'est pas affectée.

2-2- Réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques.

Au cours de la fermentation lactique, plusieurs espèces bactériennes ont montré des capacités dégradatives des aflatoxines (Blanco Jose *et al.*, 1988). Rasic *et al.* (1991) ont observé une diminution des taux d'AFB1 dans le yaourt et le lait acidifié. Les taux de L'AFB1 ajouté au lait avant fermentation à des concentrations allant de 600, 1000 et 1400 µg/kg ont été réduit respectivement de 97, 91 et 90 % dans le yaourt à pH 4.

Khaddor (1992), en étudiant la fermentation lactique du yaourt et du "leben" a montré que les bactéries lactiques dégradent l'AFM1 mais à des pourcentages variables et il a conclue que les bactéries mésophiles sont plus efficaces que les bactéries thermophiles. Les souches acidifiantes (*Lc. lactis* et *L. bulgaricus*) se sont montrées capables de dégrader l'AFM1 beaucoup plus que les souches aromatisantes.

Selon ce même auteur, la nisine produite par les souches de *Lc. Lactis* ne semble pas avoir un effet sur la dégradation de l'AFM1 et il a suggéré que l'effet des bactéries lactiques sur les aflatoxines est probablement dû à une dégradation enzymatique plutôt qu'à une élimination par acidification ou par une action des bactériocines telle la nisine.

CHAPITRE III : FERMENTATION PANAIRE TRADITIONNELLE

I- Introduction

Le pain, aliment de base aussi bien en ville qu'à la campagne, est obtenu par une technologie alimentaire des plus anciennes inventées par l'homme. Ce sont les Egyptiens qui furent les premiers à observer accidentellement la fermentation panaire après la levée de la pâte abandonnée au repos. Le pain a subi au cours de l'histoire des modifications quant à ses qualités organoleptiques que nutritionnelles grâce au progrès scientifique.

Au Maroc, la préparation du pain est essentiellement quotidienne et se fait d'une manière traditionnelle en milieu rural. La fermentation de la pâte est le résultat de l'association des levures et des bactéries lactiques. Par contre en ville la fermentation est devenue moderne, elle se base uniquement sur l'utilisation de la levure boulangère : *Saccharomyces cerevisiae*.

II – Les agents de la fermentation

1- Les levures

Les levures, micro-organismes eucaryotiques unicellulaires largement répandus dans l'environnement sont utilisés par l'homme depuis des millénaires. Le mot levure dérive du mot latin «levare » qui se définit par le principe qui fait lever le pain. C'est avec les travaux de Pasteur que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. Généralement on attribue aux levures boulangères des propriétés principales au cours de la fermentation à savoir:

- La libération de gaz lors de la dégradation des glucides ce qui entraîne une augmentation du volume du pain.
- Le développement de la texture et de la structure du pain ce qui se traduit par une bonne maturation de la pâte.

- La libération de substances aromatiques outre le CO₂ et l'éthanol, ce qui développe la flaveur caractéristique du pain.

L'espèce la plus connue dans la fermentation du pain industriel moderne est *S. cerevisiae*. Cependant d'autres espèces peuvent jouer des rôles plus ou moins importants notamment *Cryptococcus albidus*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces baillii* et des souches du genre *Candida*.

2- Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont largement utilisées en industrie agroalimentaire, leur métabolisme est toujours fermentaire, elles présentent souvent plusieurs auxotrophies pour les acides aminés, les acides nucléiques, les vitamines et certains acides gras et elles possèdent tous les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bio-conservation optimale, d'un arôme et d'une caractéristique des produits alimentaires fermentés (Coffey et Daly, 1994). De plus les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser les phytates et augmenter la biodisponibilité de certains minéraux comme le fer dans le pain fermenté (Faid et Tahiri-Hassani, 1994).

Les travaux de Faid *et al.* (1993) sur la fermentation panair traditionnelle marocaine ont permis d'isoler plusieurs espèces des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Des espèces du genre *Lactobacillus* ont été isolées lors de la fermentation acide du seigle en Allemagne par Spicher et Schröder (1978) et par Baber et Beuguena (1988) en Espagne.

D'autres chercheurs ont isolé des espèces du genre *Leuconostoc* à partir de la fermentation du « Dawadawa » préparé à base de céréales dans certains pays d'Afrique (Antaï et Ibrahim, 1986). Böcker *et al.* (1994) ont isolé des souches appartenant aux espèces *L. pontis*, *L. reuteri* et *L. sanfransisco* et des souches de l'espèce *Pediococcus pentosaceus* dans les levains du riz et du blé.

Les bactéries lactiques jouent plusieurs rôles au cours de la fermentation dont le principal est l'acidification de la pâte qui contribue au développement d'un goût typique du pain au levain. Les acides organiques (acide lactique ou acide acétique) produits lors du métabolisme homofermentaire ou hétérofermentaire peuvent atteindre des concentrations maximales respectives de l'ordre de 0.97 % et 0.30 % (Spicher, 1983). Au cours du métabolisme hétérofermentaire il y a production de gaz sous forme de CO₂ en quantité plus ou moins importante mais qui restent inférieures à celles produites au cours de la fermentation de la levure.

Les bactéries lactiques sont douées d'activités protéolytiques variées et complexes incluant des protéases et des peptidases intracellulaires et extracellulaires (Exterkate, 1983). Les protéines et les acides aminés libérés dans la pâte au cours de la fermentation panair jouent un rôle dans l'apparition d'arômes caractéristiques. La protéolyse dépend du temps de la fermentation, de la température, des espèces bactériennes et de la richesse de la farine en protéines (Spicher et Nierle, 1984).

III- Technologie panair et levains traditionnels

1-Technologie panair

La panification a pour objectif principal l'obtention d'une pâte levée qui après cuisson donne un produit appelé : pain. Selon (Testard, 1985), la panification se déroule en plusieurs phases successives :

- Pétrissage : Cette étape débute par un mélange de la farine, l'eau, le sel et les ferments. Cette étape a pour rôle la transformation de la farine en une pâte homogène. Les protéines du gluten forment un réseau de films élastiques, extensibles et imperméables.

- Le Pointage : C'est la première fermentation que subit une pâte, la pâte acquiert la force, le gluten subit une modification physique devenant plus élastique et moins extensible.

- La division et le façonnage : La pâte est ensuite divisée en pâtons façonnés et laissée pour subir une deuxième fermentation ou Apprêt.

- L'apprêt : il dure 1 à 3 heures, il dépend de plusieurs paramètres à savoir la quantité de levain, la température, l'hydratation de la pâte et le mode de pétrissage.

-La cuisson : Elle se fait entre 250 °C et 300°C, elle dure entre 10 et 45 minutes, la durée varie en fonction du volume des pâtons.

- Le Ressuage : Cette dernière étape consiste en un refroidissement du pain pour avoir une humidité bien équilibrée et une bonne conservation.

2-Levains traditionnels

La préparation des levains traditionnels est pratiquée au Maroc en milieu rural depuis des siècles et elle l'est toujours dans certains pays occidentaux (Italie, USA, Allemagne...) ainsi que dans les pays arabes. Même si les méthodes de préparation varient d'une région à l'autre ou d'un pays à l'autre, elles consistent en une culture mixte de levures et de bactéries lactiques. Plusieurs méthodes de préparation des ferments traditionnels sont utilisées, elles consistent en un mélange d'un matériel étranger ("leben", jus de citron, eau de rinçage du thé, ail...) avec de l'eau et de la farine à fermenter. Il est à noter que tous les pains obtenus ont tous un même goût acide.

Selon Tahri-Hassani (1996), la fermentation par les levains traditionnels préparés à partir du leben et du citron offre une meilleure biodisponibilité des minéraux et une amélioration des caractéristiques organoleptiques ce qui permettrait de résoudre certains problèmes nutritionnels. Faid *et al.* (1994) ont montré que *L. plantarum* et *L. brevis* sont très actives dans l'acidification, et de bons résultats de fermentation de la farine ont été obtenus lors de l'association de *L. brevis* avec *C. milleri* ou *S. cerevisiae*.

3- Caractéristiques du pain au levain

Le tableau 7 résume les différentes caractéristiques physico-chimiques du pain au levain. Quant aux caractéristiques aromatiques, l'acide lactique et l'acide acétique jouent un rôle important dans le développement des caractéristiques organoleptiques du pain. L'acide acétique est le composé responsable de l'arôme typique du pain au levain alors que l'acide lactique est responsable de la saveur acide.

De nombreux facteurs interviennent dans le goût et l'arôme du pain en particulier le type de la farine et les espèces microbiennes constituant le levain (Onno et Roussel, 1994). Selon Spicher et Stephan (1982), plusieurs groupes de substances jouent un rôle dans l'arôme du pain au levain et dont les origines sont les matières premières, le métabolisme fermentaire et les réactions de cuisson. Ces substances sont : les acides organiques, les esters éthyliques des acides organiques, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les composés sulfurés, etc.

4 - Interactions levures - bactéries lactiques

La fermentation panair traditionnelle est toujours due à l'interaction des levures et des bactéries lactiques. La levure boulangère *S. cerevisiae* est toujours contaminée par une flore de bactéries lactiques, celle-ci joue un rôle acidifiant de la pâte si la fermentation est maintenue à des températures relativement élevées par rapport à celles des levures.

Les interactions éventuelles entre ces deux populations ont trois origines possibles. Les modifications du milieu (abaissement du pH, production d'acide acétique...), la compétition pour un substrat en concentration limitante et finalement l'inhibition ou la stimulation de l'activité d'une flore envers l'autre (Onno et Roussel, 1994).

Gobetti *et al.* (1995) ont utilisé deux associations de levures et bactéries lactiques pour produire un pain acide en Italie. Les auteurs ont noté la production de grandes quantités de composés volatils, d'éthylacétate, d'acide lactique et d'acide

acétique lors de la combinaison des quelques espèces de bactéries lactiques (*L. brevis* et *L. plantarum* DC400) avec d'autres espèces de levures notamment *S. cerevisiae* et *S. exiguus*.

Meignen *et al.* (2001) ont caractérisé un pain obtenu par une combinaison mixte de *L. brevis* et *S. cerevisiae*. La fermentation combinée a entraîné une réduction de la production de l'éthanol mais une augmentation de la production du glycérol, de l'acide acétique et de 15 substances d'arômes dont de forts pourcentages du 3-méthyle 1-buthanal, du 3-méthyle 1-buthanol, du 2-méthyle 1-buthanol, d'éthyle lactate et du 2-phényle éthyle alcool. La forte production de ces composés aromatiques est probablement liée à l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Les acides aminés libérés sont utilisés par *S. cerevisiae* pour la production des alcools, une corrélation entre les concentrations des acides aminés et les composés aromatiques a été établie (Spicher et Nierle, 1988).

Tableau 7: Principales différences entre le pain au levain et le pain à la levure selon Onno et Roussel (1994)

Caractéristiques	Pain au levain	Pain à la levure
pH	3.8 - 4.6	5.3 - 5.8
Acide acétique (seigle)	0.25 - 0.30 %	-
Acide acétique (blé)	0.10 - 0.40 %	0.005- 0.04 %
Acide lactique (seigle)	0.8 - 0.9 %	-
Acide lactique (blé)	0.4 – 0.8 %	0.005 - 0.04 %
Conservation microbiologique	Bonne protection contre les bactéries et les fongiques	Sensible à l'action des bactéries et des moisissures
Aspects nutritionnels	Hydrolyse enzymatique assez forte. Activité optimale des phytates dégradant l'acide phytique	Hydrolyse enzymatique faible. Activité réduite des phytates

OBJECTIFS DU TRAVAIL :

Les principaux objectifs du présent travail sont :

- Etude de la contamination de certaines denrées alimentaires par les toxines de *Penicillium* (aflatoxines et OTA), et les toxines de *Fusarium* (ZEN et FB1).

- Etude de la réduction des aflatoxines par voie microbiologique (cas des bactéries lactiques)

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : DETERMINATION DES MYCOTOXINES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

I- Détermination des mycotoxines dans les céréales et les épices

-Principe

Le principe de la détermination des mycotoxines est basé sur leur extraction des aliments par des solvants organiques convenables et leur purification sur une colonne d'immuno-affinité (figure 8).

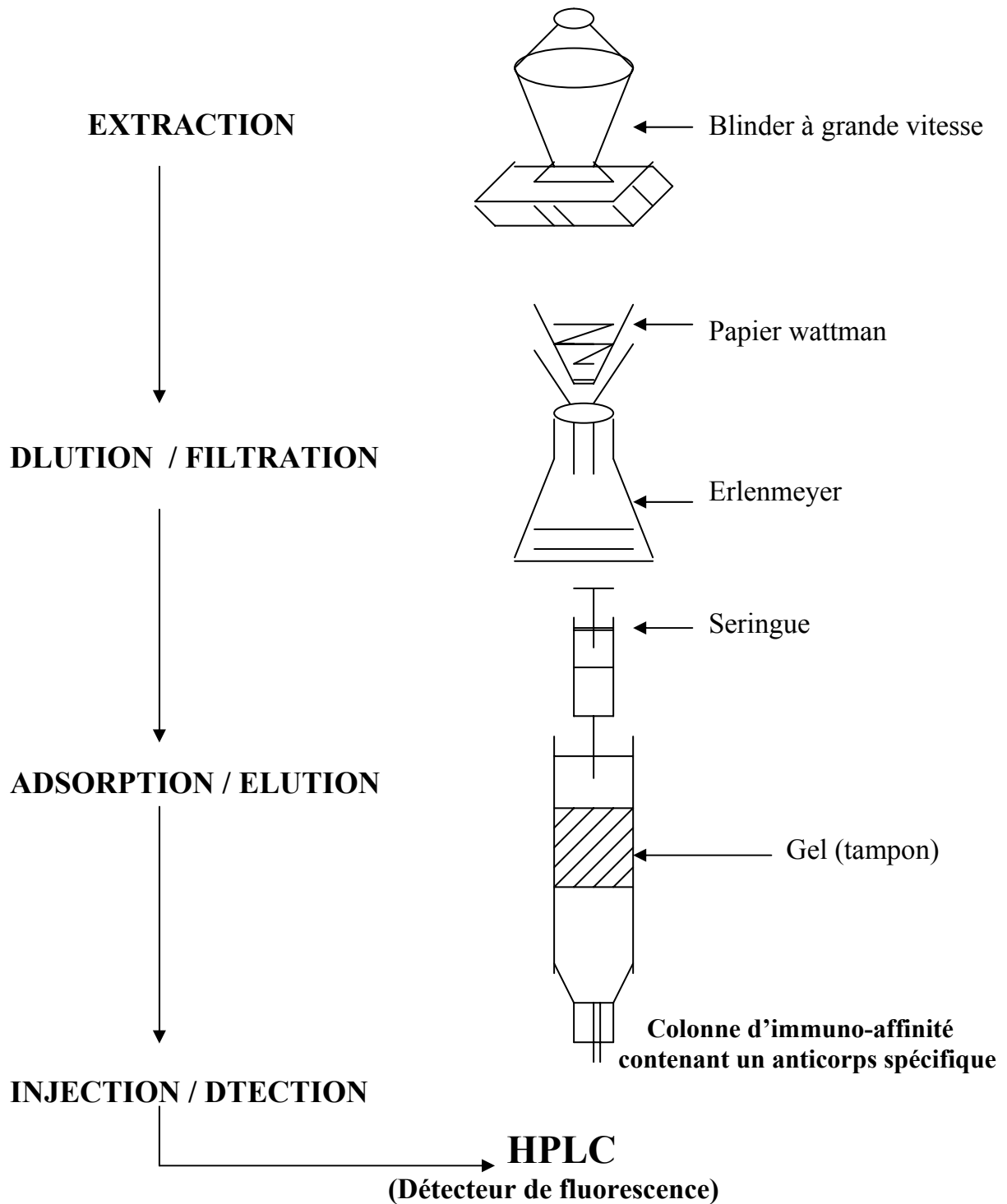
Les colonnes d'immuno-affinité contiennent chacune un anticorps très spécifique pour chaque mycotoxine recherchée et la purification de la mycotoxine dépend de son affinité à l'anticorps en question. Il est important de noter que l'anticorps peut être dénaturé par une température élevée et des changements de pH. Le tampon doit être toujours au dessus du gel et la colonne doit être conservée entre 2 et 8°C.

L'éluion de la toxine est effectuée par un éluant (solvant organique) dénaturant la liaison anticorps-antigène. L'identification et la quantification de la toxine dans l'éluat se fait finalement par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) couplé à un fluorimètre.

- Echantillonnage

Soixante (60) échantillons de céréales dont le blé (n=20), l'orge (n=20) et le maïs (n=20) et 55 échantillons d'épices dont le piment rouge (n=14), le poivre (n=15), le cumin (n=14) et le gingembre (n=12), commercialisées au Maroc, ont été prélevés sur les points de vente des villes de Rabat et Salé. L'échantillonnage a été effectué chez différents fournisseurs de telle sorte que les échantillons prélevés soient de différentes origines et ce dans le but d'avoir une hétérogénéité des prélèvements. Tous ces échantillons ont été transportés au « Laboratorio alimenti » de l'Institut Supérieur de la Santé (ISS) à Rome (Italie) pour l'analyse des mycotoxines.

Figure 8 : Schéma montrant les principales étapes utilisées pour l'analyse des mycotoxines par HPLC.



Selon les recommandations européennes récentes reportées par Miraglia et Brera (2000), l'analyse des mycotoxines dans les denrées alimentaires doit être ciblée par les investigateurs vu l'écologie des moisissures qui diffère d'une moisissure à une autre et la nature chimique propre de chaque aliment, ainsi selon ces recommandations nous avons procédé aux analyses suivantes :

- Détermination de l'OTA dans le maïs, le blé et l'orge.
- Détermination des aflatoxines dans le blé.
- Détermination de la ZEN et de la FB1 dans le maïs.
- Détermination des aflatoxines dans les épices
- Détermination de l'OTA dans les fruits secs et les olives noires.

I-1 Mycotoxines dans les céréales

a- Préparation des standards des mycotoxines

La préparation des standards des mycotoxines a été effectuée selon les procédures décrites dans le journal officiel AOAC international (2000). Les solutions diluées des mycotoxines sont peu stables, se dégradent à la lumière et doivent être renouvelées régulièrement. Les mycotoxines sont des substances potentiellement toxiques pour l'homme, la manipulation des standards doit être effectuée dans un laboratoire spécialisé équipé du matériel de protection adéquat (gants, hottes d'aspiration, masques etc.).

b- Détermination des mycotoxines dans les céréales

- Analyse de l'OTA

Les échantillons de céréales ont été analysés suivant une méthode validée et décrite par Yazdanpanah *et al.* (2001) avec quelques modifications. 25 g d'échantillon ont été extraits à grande vitesse par 100 ml du mélange eau- acétonitrile (60:40, v/v) en utilisant un blinder pendant 3 minutes, puis on effectue une filtration sur papier filtre wattman n°4. 4 ml du filtrat sont dilués par 44 ml d'une solution de tampon phosphate salin (PBS, pH 7,3 ; voir annexe). 46 ml du filtrat dilué ont été appliqués à une colonne d'immuno-affinité (Ochraprep[®], R-Biopharm Rhône LTD, Glasgow, Royaume-Uni)

contenant un anticorps spécifique de l'OTA. La colonne a été lavée par 10 ml d'eau bidistillée et l'air a été éliminé par une seringue jusqu'au sec. L'OTA a été éluée par application en premier de 1,5 ml de méthanol à 2% acidifié avec l'acide acétique glacial. L'éluât a été dilué avec 1,5 ml d'eau bidistillée et mélangé au vortex. 200 µl de l'éluât dilué ont été injectés à un HPLC équipé d'un injecteur automatique et un détecteur de fluorescence. La colonne C18 Kromasil KR100 (150 x 4.6 mm, 5µm) a été utilisée. La phase mobile utilisée était le mélange acétonitrile-eau (2%) acidifié avec l'acide acétique glacial (50 : 50, v/v). Le flux a été fixé à 1 ml.min⁻¹. Le fluorimètre a été opéré à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 333 et 460 nm. Le temps de rétention de l'OTA dans les conditions décrites ci-dessus est 5 min.

- Analyse de la ZEN

Les échantillons ont été analysés suivant une méthode validée au laboratoire (ISS, Rome). 25g d'échantillon broyés ont été extraits par 125ml d'acétonitrile à 75 % dans l'eau bidistillée en utilisant un blinder à grande vitesse pendant 2 minutes. Après filtration sur papier wattman n°4, 20 ml du filtrat ont été dilués par 80 ml d'eau bidistillée. 25 ml du filtrat dilué ont été appliqués à une colonne d'immuno-affinité (Easi-Extract[®] Zéaralénone, R-Biopharm Rhône LTD, Glasgow, Royaume-Uni) contenant un anticorps monoclonal spécifique de la ZEN. La colonne a été lavée par 10 ml d'eau bidistillée et l'air a été éliminé par une seringue jusqu'au sec. La ZEN a été éluée par application de 1,5 ml de méthanol. L'éluât a été dilué avec 1,5 ml d'eau bidistillée et mélangé au vortex. 100 µl de l'éluât dilué ont été injectés à un HPLC (même équipement que dans l'OTA). La phase mobile utilisée était le mélange acétonitrile-eau-méthanol (46:46:8 v/v/v) à un flux de 1 ml.min⁻¹. Le fluorimètre a été opéré à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 274 nm et 440 nm. Le temps de rétention de la ZEN dans les conditions décrites ci-dessus est 9.5 min.

- Analyse de la FB1

L'extraction de la FB1 a été faite selon une méthode AOAC décrite par Visconti *et al.* (2001). 25 g d'échantillon broyés ont été extraits par un mélange méthanol- acétonitrile-eau (25:25:50, v/v/v) en utilisant un blinder à grande vitesse pendant 4 minutes. Après filtration sur papier wattman n°4, 10 ml du filtrat ont été dilués avec 40 ml du PBS. Une colonne d'immuno-affinité (Fumoniprep, R-Biopharm Rhône LTD, Glasgow, Royaume-Uni) contenant un anticorps monoclonal spécifique des fumonisines (FB1, FB2 et FB3) a été conditionnée par 5 ml du PBS. 10 ml du filtrat dilué ont été appliqués à la colonne. La colonne a été lavée par 10 ml d'eau bidistillée et l'air a été éliminé par une seringue jusqu'au sec. La FB1 a été éluée par application en premier de 1,5 ml du méthanol. L'éluât a été dilué avec 1,5 ml d'eau bidistillée et mixé au vortex. La dérivation pré-colonne des extraits a été faite avec le mélange Ortho-Phtaldialdéhyde (OPA) / 2-mercaptoéthanol (MCE). Le réactif OPA/MCE est préparé chaque semaine en dissolvant 120 mg de l'OPA dans 3 ml du méthanol auquel on ajoute 15 ml du tétraborate de sodium (0.1M) et 150 ml du MCE. Le réactif est photosensible et doit être conservé à l'abri de la lumière. 450 µl du réactif OPA/MCE sont additionnés de 50 µl de l'extrait à analyser, mixés au vortex. Après 3 min, 100 µl sont injectés à un HPLC. Le système HPLC consiste en un injecteur automatique, un détecteur de fluorescence et une colonne C18 (150 x 4 mm, 5µm). La phase mobile utilisée était le mélange méthanol- dihydrogénophosphate de sodium à 0,1M (77 : 23, v/v) ajusté à un pH 3,35 avec 85% d'acide phosphorique. Le flux a été fixé à 1 ml.min⁻¹. Le fluorimètre a été opéré à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 335 nm et 440 nm. Le temps de rétention de la FB1 dans les conditions décrites ci-dessus est 6 min.

- Analyse des aflatoxines

Les échantillons ont été analysés en utilisant une méthode décrite par Roch *et al.* (1994). 50g d'échantillon ont été extraits par 250 ml du mélange acétone: eau (85:15 v/v) en utilisant un blinder à grande vitesse pendant 3 minutes. Après filtration sur papier wattman n°4, 5 ml du filtrat sont dilués par 95 ml d'une solution de tampon phosphate (PBS, pH 7.3). Une colonne d'immuno-affinité (Aflaprep[®], R-Biopharm

Rhône LTD, Glasgow, Royaume-Uni) contenant un anticorps spécifique des aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2) est conditionnée par 10 ml du tampon PBS. 50 ml du filtrat dilué ont été appliqués à la colonne à un flux de $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, la colonne a été lavée par 20 ml d'eau bidistillée et l'air dans la colonne a été éliminé par une seringue jusqu'au sec. Les aflatoxines ont été éluées par application en premier de 500 μl du méthanol. Ensuite, 1250 μl du méthanol ont été appliqués à la colonne et collectés par pression de l'air à travers la colonne. Après élution, l'éluât a été dilué avec 3250 μl d'eau bidistillée et mélangé au vortex. 100 μl de l'éluât dilué a été injecté à un HPLC (même équipement que dans le cas de l'OTA et la ZEN). La dérivation post-colonne a été effectuée avec la pyridine hydrobromide perbromide (PBPB) à 0.005 % dans l'eau bidistillée à un flux de $0.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La colonne C18 Phenomenex (250 x 4.6 mm, 5 μm) a été utilisée. La phase mobile utilisée était le mélange acétonitrile-eau-méthanol (17:54:29, v/v/v) à un flux de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Le fluorimètre a été opéré à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 365 nm et 435 nm. Le temps de rétention de l'AFB1 a été 7,8 min.

c- Détermination des aflatoxines dans les épices

Les aflatoxines dans les épices ont été analysées en utilisant une méthode officielle de l'AOAC international reportée par Stroka *et al.* (2000). 50 g d'échantillon ont été additionnés de 5g de NaCl et extraits par 300 ml du mélange méthanol / eau (80:20 v/v) en utilisant un blinder à grande vitesse pendant 3 minutes. Après filtration sur papier wattman n°4, 10 ml du filtrat sont dilués par 60 ml d'une solution de tampon phosphate (PBS, pH 7.3). Une colonne d'immuno-affinité (Aflaprep[®], R-Biopharm Rhône LTD, Glasgow, Royaume-Uni) est conditionnée par 10 ml du tampon PBS. 66 ml du filtrat dilué ont été appliqués à la colonne d'immuno-affinité à un flux de $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La colonne a été lavée par 15 ml d'eau bidistillée et l'air dans la colonne a été éliminé par une seringue jusqu'au sec. Les aflatoxines ont été éluées par application en premier de 1250 μl de méthanol à la colonne. L'éluât a été dilué avec 1750 μl d'eau bidistillée et mélangé au vortex. 100 μl de l'éluât dilué ont été injectés à un HPLC. Le système HPLC utilisé est le même que celui que nous avons utilisé pour l'analyse des aflatoxines dans les céréales.

II- Détermination de l'OTA dans les fruits secs et les olives noires de table

1- Echantillonnage

24 échantillons de fruits secs (raisins noirs, raisins blancs, figes et pruneaux) et 25 échantillons d'olives noires de table ont été prélevés sur les points de vente des villes de Rabat et de Salé. Les échantillons prélevés ont été transportés au Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, France, pour analyse de l'OTA.

2- Méthodes de dosage de l'OTA

2-1 Préparation des étalons de l'OTA

Des solutions d'OTA (Sigma-Aldrich, USA) ont été préparées dans le méthanol, les concentrations de l'OTA ont été vérifiées par détermination de la DO dans un spectrophotomètre UV. La quantité nécessaire a été évaporée au sec et ensuite dissoute dans la phase mobile indiquée ci dessous dans les conditions chromatographiques.

2-2 Détermination de l'OTA dans les fruits secs

L'analyse de l'OTA dans les fruits secs a été faite suivant la méthode décrite par Ospital *et al.* (1998). 10 g d'échantillon ont été extraits par une solution contenant 50 ml du chlorure de magnésium ($MgCl_2$, 0,4M), 30 ml de toluène et 30 ml d'acide chlorhydrique à 2N par agitation pendant 1h. Les deux phases ont été séparées par centrifugation (3000 g pendant 5 min). La phase organique a été récupérée, filtrée et évaporée à sec à l'aide d'un système rotavapeur Heidolph WB 2000 (Prolabo, France). L'extrait est dissous dans 1ml de chloroforme. Une cartouche (Sep-Pak Plus) a été lavée avec 10 ml de toluène et l'extrait a été appliqué à la cartouche. Cette dernière est ensuite lavée avec 10 ml du mélange toluène/méthanol (97:3; v/v) et l'OTA a été finalement élué par 10 ml du mélange toluène / acide acétique (90:10; v/v) à un flux de 1ml/min. L'éluât a été évaporée au sec et dissous dans 1 ml de la phase mobile.

2-3 Détermination de l'OTA dans les olives noires.

L' OTA a été extraite des olives noires suivant la méthode décrite par Maaroufi *et al.* (1995). 10 g d'un échantillon broyé ont été extraits par une solution contenant 50 ml de chloroforme et 10 ml d'acide chlorhydrique à 0,1M pendant 1h dans un shaker (Kunkel S250, IKA-Labortechnik, Allemagne). L'extrait a été filtré et le chloroforme évaporé avec un rotavapeur. La phase aqueuse a été dégraissée par le n-hexane qui va être éliminé par la suite. La phase aqueuse I^{aire} a été alcalinisée avec 10 ml du carbonate de sodium (NaHCO₃, 0,1N) et extraite une 2^{ème} fois avec 50 ml de chloroforme pendant 20 min. le chloroforme est ensuite éliminé et la phase aqueuse II^{aire} acidifiée avec l'HCl (0,1M) est extraite une 3^{ème} fois avec 50 ml de chloroforme pendant 20 min. Le chloroforme a été évaporé à sec à l'aide d'un rotavapeur. Le résidu sec obtenu est dissous dans 1 ml de la phase mobile.

2-4 Conditions chromatographiques

Le système HPLC consiste en une pompe (Bischoff Model A 2200), un autoinjecteur (Model 738, ICS: instrumentation, Consommable Service, France), un moniteur de fluorescence (Shimadzu Model RF-551) et un logiciel (PIC3[®], ICS). La colonne Spherisorb ODS 1 (250 x 4.6mm x 10 µm) a été utilisée. La phase mobile dégazée et filtrée à travers un filtre Millipore (0.45µm) consiste en 48% d'acétonitrile et 52% d'acétate de sodium –acide acétique 4mM (19/1: v/v). Le débit a été fixé à 1 ml/min. Le détecteur de fluorescence a été manipulé à des longueurs d'excitation et d'émission respectivement de l'ordre de 330 nm et 470 nm.

2-5 Confirmation de l'OTA

0,5 ml de l'extrait final ont été évaporés au sec et additionnés de 0,4 ml d'un tampon Tris (0,04 M), NaCl (1M) ajusté à pH 7,5. A cette solution, on ajoute 100 µl de l'enzyme carboxypeptidase (Sigma, Réf. C-0261, 100 U/ml) et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 3 heures. 50 µl de cette solution ont été analysés par HPLC sous les conditions chromatographiques citées en haut.

II - Décontamination des mycotoxines

La décontamination des mycotoxines a été faite selon les procédures internationales de l'IARC décrite par Castegnaro *et al.* (1991). À la fin des analyses, tout le matériel utilisé pour l'extraction des mycotoxines doit être décontaminé par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel dilué au 1/2) pendant toute la nuit sous une hotte de sécurité chimique. Un lavage normal par un détergent suivi par un rinçage avec de l'eau distillée doivent être effectués après décontamination.

III - Contrôle et assurance de qualité

Le contrôle de qualité des mycotoxines a été réalisé selon les recommandations décrites par Brera et Miraglia (1996). Pour chaque série d'analyse, des échantillons à analyser ont été fortifiés (spike) avec des concentrations bien déterminées des mycotoxines. Ensuite, une homogénéisation des échantillons est réalisée et le solvant est laissé évaporé pendant toute la nuit. Les échantillons fortifiés ont été analysés avec chaque série d'analyse pour déterminer le pourcentage de recouvrement pour chaque mycotoxine et chaque matrice.

• Pourcentage de recouvrement (Rc)

Le pourcentage de recouvrement (Rc) détermine l'efficacité de la méthode d'analyse après fortification de certains échantillons à analyser avec des quantités bien connues des mycotoxines. Après détermination des Rc, tous les résultats analytiques trouvés ont été corrigés en fonction des Rc obtenus. A l'échelle internationale, il est recommandé que les Rc acceptés doivent être situés entre 70 et 120 %.

$$\text{Rc \%} = \frac{\text{Cm (éch spk)} - \text{Cm (éch)}}{\text{C spk}} \times 100$$

- **Cm (éch spk)** : Concentration moyenne de la mycotoxine dans les échantillons fortifiés.

- **C_m (éch)** : Concentration moyenne de la mycotoxine dans les mêmes échantillons non fortifiés.
- **C_{spk}** : Quantité de mycotoxine ajoutée aux échantillons fortifiés.

• **Correction des résultats**

$$C_c (\text{éch}) = \frac{C_m (\text{éch})}{R_c} \times 100$$

- **C_c (éch)** : Concentration finale corrigée de l'échantillon.

• **Déviatiion du standard (SD) et Coefficient de variation (CV)**

Pour chaque échantillon d'une matrice donné, une série de trois analyses est effectuée, le coefficient SD représente la variabilité qui peut avoir lieu entre l'analyse simultanée des mêmes échantillons.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n-1}}$$

- **X_i** : Concentration de la mycotoxine pendant l'analyse « i »
- **X_m** : Moyenne des concentrations de la mycotoxine.
- **n** : Nombre d'analyse effectuée.

Le Coefficient de variation est :

$$Cv = \frac{SD}{X_m} \times 100$$

CHAPITRE II: ETUDE DES FERMENTS PANAIRES TRADITIONNELS

1- Collection des ferments

Quatre ferments panaires traditionnels ont été collectés de différentes régions rurales du Maroc et ont été transportés au laboratoire pour analyses microbiologiques, physico-chimiques et pour rechercher leur pouvoir de réduction des aflatoxines. Les différents échantillons de levains traditionnels ont été maintenus en activité par addition successive de la farine de blé et de l'eau distillée stérilisée et sont incubés à 30 °C jusqu'à la levée de la pâte.

2- Préparation du levain

La formule de base pour la préparation du levain est la suivante :

- Farine : 50g
- Eau distillée chauffée à 40°C : 30 ml
- Ferment panaire : 2 g
- Tous les ingrédients sont mélangés et la pâte est bien pétrie

3- Etude physico-chimique des ferments panaires

3- 1- Analyse du pH

5 g de chaque ferment à analyser sont mélangés avec 30 ml de l'eau distillée dans un erlenmeyer, puis sont homogénéisés. Le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre Type WTW, pH 521 (Allemagne)

3- 2- Pouvoir fermentaire

2 g du ferment à étudier sont mélangés avec 50 g de la farine et 30ml de l'eau distillée chauffée à 40°C. La pâte est introduite dans une éprouvette graduée de 250 ml et pressée pour occuper un volume précis. Les éprouvettes sont placées dans un bain-marie à 30°C. L'augmentation du volume traduisant l'activité des levains est notée après 6h de fermentation.

4- Etude microbiologique des ferments panaires traditionnels

4-1 Dénombrement des levures

Le dénombrement des levures a été fait sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, voir annexe). L'incubation se fait à 30°C pendant 48 h.

4-2 Dénombrement des souches de bactéries lactiques

Le dénombrement des lactobacilles a été effectué sur le milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS, voir annexe), alors que le dénombrement des pédiocoques et des leuconostocs est effectué sur le milieu hypersacharosé (voir annexe). Des souches de bactéries lactiques ont été isolées et purifiées par des repiquages successifs. Les souches purifiées sont conservées dans des tubes inclinés de la gélose MRS au réfrigérateur à 4 °C.

a- Identification des souches lactiques

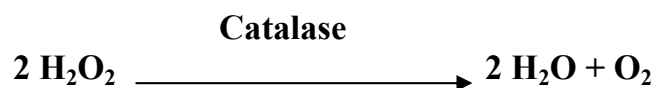
L'identification des isolats est basée sur des caractères cultureux, biochimiques et nutritionnels selon la méthode décrite par Sharpe (1979).

- Observation microscopique

Dans cette première étape, l'étude a consisté en une coloration de Gram des différentes souches isolées à partir des cultures jeunes. Leur aspect morphologique a été également observé (forme, taille...).

- Recherche de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie de la souche à étudier sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H₂O₂ à 11 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz.

- Croissance à différentes températures

Cette étape va nous permettre d'étudier le pouvoir de croissance des souches isolées à des températures différentes et de ce fait distinguer les bactéries mésophiles des thermophiles. Deux boîtes de pétri par souche contenant le milieu MRS sont incubées l'une à 45 °C et l'autre à 30°C. L'examen du pouvoir de croissance est observé après 48 h.

- Production de gaz

Elle est étudiée après culture de la souche dans des tubes contenant le milieu MRS par piqûre centrale en profondeur. L'incubation se fait à 30 °C pendant 48h. La production de gaz se manifeste par un détachement de la gélose du fond du tube.

- Désamination de l'arginine

Les souches sontensemencées dans des tubes contenant le bouillon MRS additionné de 0.3 % d'arginine monohydraté. L'incubation se fait à 30 °C pendant 48h. La révélation se fait par le réactif de Nessler (voir annexe). Lorsque la désamination de l'arginine a lieu, le milieu vire de la couleur rose à la couleur brune.

- Fermentation des sucres

Des solutions de différents sucres à 10 % (Maltose, Xylose, Galactose, Raffinose, Lactose, Mélibiose, Arabinose et Cellobiose) sont stérilisées par filtration. 0,5 ml de chaque solution de sucre est additionné à un milieu de base (voir annexe). Puis on ensemence par des cultures bactériennes jeunes. La lecture est faite après incubation pendant 48 h à 30°C par comparaison au témoin glucose et au témoin sans sucre. La fermentation des sucres se traduit par une production d'acide dans le milieu qui vire du pourpre au jaune. Dans le cas de l'esculine le milieu vire en noir (milieu à l'esculine voir annexe).

CHAPITRE III : ETUDE DE LA REDUCTION DES AFLATOXINES

I- Activité anti-aflatoxinogénique des bactéries lactiques

a- Microorganismes

Les souches d'*Aspergillus parasiticus* NRRL2999, productrices d'AFB1, que nous avons utilisées dans cette étude font partie de la collection des micro-organismes du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie de l'I.A.V Hassan II. Les bactéries lactiques étudiées sont : *L. brevis* Lb1; *L. casei* Lc12; *L. lactis* (Lb5 et Lb8); *L.* (Lb7 et Lb9); *L. rhamnosus* (Lb21, Lb31, et Lb50); *Ln. mesenteroides* Ln13; et *P. acidilactici* P55.

b- Conditions de culture

L'effet anti-aflatoxinogénique des bactéries lactiques a été étudié sur *A. parasiticus* NRRL 2999 dans le Bouillon Lab-Lemco-Tryptone (LTB, voir annexe) selon la méthode décrite par Coallier-Ascah et Idziak (1985). Des flacons de 100 ml contenant 50 ml du bouillon LTB ont été préparés et stérilisés à 120°C pendant 15 min, le pH du milieu est ajusté à 6,8 avant stérilisation. Chaque flacon inoculé par les spores d'*A. parasiticus* a étéensemencé par 0,1 ml d'une préculture d'environ 10³ufc/ml de la bactérie lactique à étudier. L'incubation a été faite à 28°C pendant 8 jours. Un bouillon LTB témoin inoculé uniquement par les spores d'*A. parasiticus* est réalisé et incubé dans les mêmes conditions.

c- Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué le 8^{ème} jour dans un milieu gélosé MRS, l'incubation est faite à 30°C pendant 48 h.

d- Mesure du pH

Le pH du bouillon LTBensemencé avec la combinaison entre *A. parasiticus* et la bactérie lactique à étudier est mesuré le 8^{ème} jour à l'aide d'un pH mètre Type Crison Micro pH 2000.

e- Extraction et quantification de l'AFB1

L'extraction de l'AFB1 a été faite selon la méthode décrite par Gizzarelli *et al.* (1993). La quantification de l'AFB1 a été faite par HPLC. Le pourcentage de réduction de production de l'AFB1 par *A. parasiticus* après 8 jours de croissance mixte avec la bactérie à étudier est déterminé par rapport à la concentration de l'AFB1 produite par *A. parasiticus* dans le bouillon LTB témoin. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'AFB1} = 100 \times [1 - (\text{aire du pic AFB1 de l'extrait} / \text{aire du pic AFB1 du témoin})]$$

II- Réduction des aflatoxines par les ferments panaires traditionnels

1- Préparation des étalons des aflatoxines

On pèse environ une quantité m d'AFB1 et d'AFG1 (Promochem, France) et on la dissout dans 100 ml du méthanol pour avoir une concentration finale qu'on vérifie à l'aide d'un spectrophotomètre UV. L'absorption (DO) de l'aflatoxine est mesurée à la longueur d'onde d'absorption maximale (Frayssinet et Fremy, 1991). La concentration finale de l'aflatoxine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{DO} \times \text{PM} \times 1000 / \epsilon$$

DO: Densité optique.

PM : Poids moléculaire.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire.

Le tableau 8 ci-dessous donne les différents coefficients molaires et les longueurs d'onde des deux aflatoxines étudiées B1 et G1 dans les différents solvants qui peuvent être utilisés.

Tableau 8 : Coefficients molaires et longueurs d'ondes de l'AFB1 et l'AFG1 (AOAC, 2000)

	AFB1	AFG1
PM	312	328
Méthanol	λ/ε : 360/21800	362/18000
Acétonitrile	λ/ε : 355/20600	360/17800
Benzène/acétonitrile	λ/ε : 348/19800	355/17100
Chloroforme	λ/ε : 360/20600	360/19500

2- Fortification de la farine par les aflatoxines

Deux échantillons de farine ont été contaminés artificiellement l'un par une solution d'AFB1 et l'autre par une solution d'AFG1 à une concentration finale de 240 µg/kg (d'AFB1 ou d'AFG1). Selon Jemmali et Lafont (1971), cette concentration en aflatoxines est considérée sans aucun effet sur les souches composant le levain traditionnel du pain. Ensuite on procède à l'évaporation du méthanol sous la hotte et à l'obscurité pendant toute la nuit. La farine ainsi contaminée par l'AFB1 ou l'AFG1 estensemencée avec les ferments récoltés et on procède à l'analyse des aflatoxines par HPLC après fermentation pendant 6 h à 30°C.

3 - Fermentation

Les farines contaminées artificiellement par l'AFB1 ou l'AFG1 sont inoculées par les ferments traditionnels selon la technique de préparation du levain. La fermentation dure 6 heures à une température de 30°C.

Trois essais de contrôle ont été préparés en parallèle, l'un est réalisé avec une farine contaminée avec les aflatoxines (l'AFB1 ou l'AFG1) et fermentée par la levure *S. cerevisiae*. Le 2^{ème} essai témoin a été réalisé avec une farine contaminée par les aflatoxines mais non fermentée, et finalement le 3^{ème} essai a été préparé par une farine contaminée par les aflatoxines, non fermentée, mais acidifiée par l'ajout de quelques gouttes d'acide lactique (1N) dans la pâte (farine, sel et eau distillée) pour obtenir un pH de 3,5.

4- Analyses des aflatoxines

Les aflatoxines ont été extraites et purifiées selon une méthode CEE (1992) relatives aux végétaux, publiée dans le "Journal Officiel de la Communauté Européenne N° L 327/54".

a- Extraction

50 g de la farine à analyser sont mélangés avec 25 ml d'eau distillée et extraits par 250 ml de chloroforme. Le tout est vigoureusement agité pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur. Le mélange est ensuite filtré sur un papier filtre wattman n°4 contenant du sulfate de sodium anhydre. L'extrait chloroformique est conservé à l'abri de la lumière.

b- Purification de l'extrait

Elle a été faite sur une colonne de gel de silice (Merk, Allemagne). La colonne est constituée d'un tube de verre de 2 cm de diamètre et de 40 cm de longueur équipé d'un robinet et comportant à sa partie supérieure une ampoule de 150 ml de volume. La laine de verre est placée à la base, la colonne a été remplie de chloroforme sur une hauteur de 20 cm. Ensuite, 5 g de sulfate de sodium anhydre ont été introduits dans la colonne de façon à obtenir une base pleine. D'autre part, 15 g de gel de silice 60 (Machery-Nagel, Allemagne) ont été mis dans du chloroforme et la suspension translucide obtenue est versée dans la colonne en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Après 1 h de repos, 15 g du sulfate de sodium anhydre ont été ajoutés avec précaution. Le chloroforme est alors drainé jusqu'à affleurement avec le sommet du sulfate de sodium.

50 ml de l'extrait chloroformique correspondant à 10g de produit de départ sont concentrés jusqu'à un volume d'environ 2-3 ml et déposés au sommet de la colonne, le récipient est rincé 3 fois par quelque ml de chloroforme qui sont également introduit dans la colonne. La colonne est d'abord lavée par 150 ml d'hexane ou d'éther de pétrole dépourvus de carbures benzéniques, puis par 150 ml d'éther diéthylique. Les

aflatoxines sont éluées par 150 ml de chloroforme-méthanol (97-3 : v/v). Le produit d'éluion est évaporé à sec au rotavapeur. La détermination quantitative est réalisée par HPLC.

c- Dosage des aflatoxines par HPLC

Le résidu sec obtenu est repris par 100 µl de méthanol et mélangé avec 50µl de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans un vial. Le vial est agité doucement et laissé reposer 5 min à l'obscurité. Puis, 10 µl ont été injectés dans un appareil HPLC muni d'un détecteur fluorimètre. La colonne utilisée est une colonne C18 (hypersil ODS) en phase inverse. La phase mobile est composée de l'acétonitrile / le méthanol / l'eau (15/15/70 : v/v/v). Le débit de la phase mobile est réglé à 1 ml /min. L'excitation est faite à 360 nm et l'émission est faite à 420 nm.

III- Réduction in vitro de l'AFB1 par les bactéries lactiques

1- bactéries lactiques utilisées

Les souches de bactéries lactiques utilisées dans ce test sont : *L. brevis* Lb1; *L. casei* Lc12; *L. lactis* (Lb5 et Lb8); *L. plantarum* (Lb7 et Lb9); *L. rhamnosus* (Lb44, Lb21, Lb31, Lb103 et Lb50); *Ln. mesenteroides* Ln13 et *P. acidilactici* P55.

2-Protocole expérimental

Le pouvoir de réduction in vitro de l'AFB1 par les bactéries lactiques isolées des ferments traditionnels a été étudié dans le milieu liquide (MRS). Une solution mère de l'aflatoxine B1 a servi pour contaminer artificiellement le milieu liquide MRS, la concentration finale de l'AFB1 dans le milieu MRS est de l'ordre de 5µg/ml. 100 ml du milieu MRS contaminé sontensemencés avec 0,1 ml d'une préculture des souches à étudier (10^3 ufc/ml). Après croissance à 30°C pendant 24 h, la culture est centrifugée à 5000g pendant 15 minutes, le surnageant est récupéré et analysé par HPLC pour la détection de l'AFB1 comme il est indiqué auparavant. Le pourcentage de réduction de l'AFB1 est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{AFB1 (\%)} = 100 \times [1 - (\text{Aire du pic AFB1 de l'extrait} / \text{Aire du pic AFB1 du témoin})]$$

3- Effet du pH du milieu

L'effet du pH du milieu de culture MRS contaminé avec 5 µg/ml de l'AFB1 est étudié par ajustement du pH initial avant la fermentation à des valeurs de pH (5,5), pH (4,5) et pH (3,0) à l'aide d'une solution stérile d'acide lactique (1N). Le milieu a été ensuite inoculé avec les souches utilisées. L'incubation est faite à 30°C pendant 24 h. L'AFB1 est ensuite analysé par HPLC.

4-Effet de La température

L'effet de la température sur la réduction de l'AFB1 par les isolats a été étudié dans les mêmes conditions décrites auparavant sauf que l'incubation des souches étudiées a été faite à trois températures différentes, 15°C, 25°C et 37°C.

5- Analyse statistique

Tous les essais dans cette étude ont été répétés 3 fois. L'analyse statistique des données a été faite en utilisant le *t-test de Student*.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I: DETERMINATION DES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS

I- Détermination des mycotoxines dans les céréales et les épices

1- Performance des méthodes analytiques

Les analyses statistiques des méthodes analytiques utilisées pour les analyses des mycotoxines dans les céréales et les épices sont représentées dans le tableau 9. Les pourcentages de recouvrement pour l'OTA, la ZEN et la FB1 dans les céréales et les aflatoxines dans les épices étaient bonnes et se situent dans les limites acceptables à l'échelle internationale (70-120%). Les coefficients de variation pour la reproductibilité des échantillons fortifiés varient entre 1,52 et 24,3%.

2- Les mycotoxines dans les céréales

- Analyse de l'OTA

Les résultats de la contamination des céréales par les mycotoxines sont regroupés dans les tableaux 10 et 11. Comme il est indiqué, 40, 55 et 40 % des échantillons totaux de maïs, d'orge et du blé analysés sont respectivement contaminés par l'OTA. Dans les échantillons d'orge, la concentration moyenne de l'OTA est de l'ordre de 0,09 µg/kg, alors que l'incidence de l'OTA varie entre 0,04 et 0,8 µg/kg. Dans les échantillons du blé, la concentration moyenne de l'OTA est de l'ordre de 0,17 µg/kg et les concentrations varient entre 0,04 et 1,73 µg/kg.

Dans les échantillons de maïs, la concentration moyenne de l'OTA est de l'ordre de 0,43 µg/kg, alors que la concentration élevée en OTA (7,22 µg/kg) a été enregistrée dans l'échantillon n°4. L'incidence de l'OTA dans les échantillons analysés varie entre 0,05 et 7,22 µg/kg.

Tableau 9 : Quelques performances des analyses statistiques des méthodes analytiques de l' OTA, la ZEN et la FB1 dans les céréales et des aflatoxines dans les épices.

Échantillon	Mycotoxine	Taux de fortification	Moyenne Rc (%)	SD ¹	CV (%) ²
<i>Orge</i>	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.11	96.56	0.005	4.50
		0.22	101.7	0.032	15.78
		0.12	94.16	0.021	17.8
<i>Maïs</i>	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.25	87.5	0.01	3.41
		0.7	98.14	0.125	16.6
		0.27	83.7	0.025	11.3
		0.1	82.3	0.011	9.10
<i>Blé</i>	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.16	85.5	0.013	9.28
		1.7	92.3	0.04	2.66
		0.8	94.4	0.012	1.52
<i>Maïs</i>	ZEN ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	25	116.12	6.04	24.28
		50	93.66	1.45	2.9
		10	92.3	0.88	9.73
<i>Maïs</i>	FB1 (mg/kg)	0.78	80.35	0.035	4.33
		0.93	82.5	0.075	8.3
<i>Poivre</i>	AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.1	84.2	0.036	4.5
<i>Gingembre</i>		2	87.5	0.12	7.12
<i>Piment</i>		4	97.1	0.25	6.23
<i>Cumin</i>		1	94.5	0.016	1.9
<i>Poivre</i>		0.12	85.6	0.01	8.5
<i>Gingembre</i>	AFGI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.3	81.3	0.012	3.4
<i>Piment</i>		4.5	92.4	0.45	10.2
<i>Cumin</i>		1.5	91.2	0.23	15.6

¹ Déviation du Standard,

² Coefficient de variation pour la reproductibilité.

Cette valeur (7,22 ppb) est nettement supérieure à la valeur maximale limite fixée par la réglementation des pays de l'Union Européenne concernant l'OTA dans les céréales. En France, en Suisse et au Danemark, la limite maximale de l'OTA dans les céréales recommandée est établie à 5 µg/kg (Creppy, 2002).

- **Analyse des AF dans le blé**

Concernant l'analyse des aflatoxines dans le blé, les résultats ont montré que dans tous les échantillons analysés, les aflatoxines ont été au dessous de la limite de détection (0,01 µg/kg) dans les conditions chromatographiques décrites auparavant.

- **Analyse de la ZEN**

L'analyse de la ZEN a été effectuée seulement dans les échantillons de maïs. Selon Brera (communication personnelle), la ZEN est une mycotoxine spécifique du maïs et des produits à base de maïs. Les résultats de la prévalence de cette toxine ont montré une contamination moins importante que celle de l'OTA. Seulement trois échantillons ont été contaminés par la ZEN soit un pourcentage faible de l'ordre de 15%. La concentration moyenne de la ZEN est de l'ordre de 2.09 µg/kg. Cette valeur est largement au dessous de la limite maximale fixée par la législation française (200µg/kg) concernant la ZEN dans les céréales et les huiles végétales (Creppy, 2002).

- **Analyse de la FB1**

Comme dans le cas de la ZEN, l'analyse de la FB1 a été effectuée dans les échantillons du maïs. La FB1 est un contaminant naturel du maïs et en particulier les produits à base de la farine du maïs ingrédient majeur de plusieurs aliments notamment les "cornflakes" et les farines destinés aux nourissants et aux jeunes enfants.

Les résultats ont montré que la FB1 contamine 50% des échantillons de maïs analysés, ce qui correspond à un pourcentage total de contamination de 50%. Des taux très élevés ont été trouvés dans l'échantillon 4 (5,96 mg/kg) et l'échantillon 10 (5,5 mg/kg). Les concentrations de la FB1 varient entre 0,01 et 5,96 mg/kg, alors que la concentration moyenne est de l'ordre de 0,96 mg/kg.

Ces valeurs dépassent largement la limite maximale (1 mg/kg) de FB1 recommandée par la réglementation Suisse dans le maïs (Creppy, 2002). Peu de pays ont fixé une réglementation concernant les fumonisines dans les céréales, cependant selon Brera (Communication personnelle), la limite qu'on recommande actuellement et qui est de 2 mg/kg, sera probablement fixée comme limite maximale réglementaire par les pays de l'Union Européenne.

- Co-occurrence des toxines d'*Aspergillus* et de *Fusarium*

En ce qui concerne la co-occurrence des toxines de *Fusarium* avec les toxines d'*Aspergillus*, 15 et 50 % des échantillons totaux de maïs étaient respectivement contaminés par la ZEN et la FB1. Tous les échantillons contaminés par l'OTA ont été contaminés par la FB1. Les concentrations les plus élevées de l'OTA (7,22 µg/kg) et de la FB1 (5,96 mg/kg) ont été enregistrées dans l'échantillon n°4. Cependant dans l'échantillon n°10 où la teneur élevée en FB1 était de l'ordre de 5,5 mg/kg, la co-contamination par l'OTA était relativement faible avec seulement une valeur de 0,11 µg/kg. Ces résultats suggèrent que la co-occurrence de l'OTA et la FB1 dans les échantillons de maïs analysés est due probablement à deux processus de contamination séparés par les moisissures toxigènes d'*Aspergillus* et de *Fusarium*.

Dans cette étude, nous avons trouvé également qu'un seul échantillon de maïs (n°7) a été contaminé par les trois mycotoxines avec des valeurs basses pour la ZEN (13,5 µg/kg) et OTA (0,05 µg/kg) et une valeur relativement élevée en FB1 (1,51 mg/kg). Notre étude constitue le premier rapport sur la co-occurrence de l'OTA et les toxines de *Fusarium* dans les céréales au Maroc.

Tableau 10: Cooccurrence naturelle de l'OTA, la FB1 et la ZEN dans les échantillons du maïs analysés.

Echantillons de maïs (n=20)	OTA (µg/kg)	FB1 (mg/kg)	ZEN (µg/kg)
1	-	1.15	16.50
2	-	1.00	11.8
3	0.1	2.61	-
4	7.22	5.96	-
5	0.28	0.28	-
6	0.54	0.01	-
7	0.05	1.51	13.5
8	0.27	0.60	-
9	0.05	0.70	-
10	0.11	5.50	-
Moyenne (µg/kg)	0.43	0.96	2.09
Echantillons Positifs (%)	40	50	15

Tableau 11 : Concentrations de l'OTA dans les échantillons de blé et d'orge analysés.

Orge (n=20)	OTA (µg/kg)	Blé (n=20)	OTA (µg/kg)
1	0,10	1	0,86
2	0,18	2	0,16
3	0,13	3	0,10
4	0,20	4	1,73
5	0,05	5	0,04
6	0,12	6	0,36
7	0,05	7	0,05
8	0,12	8	0,06
9	0,80		
10	0,05		
11	0,04		
Moyenne (µg/kg)	0,09		0,17
Échantillons positifs (%)	55		40

Le maïs est considéré parmi les cultures fragiles à haut risque de contamination par les moisissures toxigènes à la différence des autres céréales supposées plus résistantes à la contamination par les moisissures et la production des mycotoxines notamment l'orge et le blé (Jelinek *et al.*, 1989).

En effet, Scudamore *et al.* (1998), ont montré la co-occurrence de plusieurs mycotoxines à savoir la zéaralénone, la toxine DON, le nivalénol, la FB1 et la FB2, la moniliformine (toutes avec des taux élevés en mg/kg) ainsi que d'autres mycotoxines avec de faibles concentrations notamment les trichothecènes (15-acétoxy déoxynivalénol), les toxines T2 et HT-2 dans des échantillons de maïs provenant de l'Angleterre. Selon les mêmes auteurs, les fumonisines contaminent tous les échantillons de maïs et leurs dérivés, les taux de contaminations ont varié entre 8 et 32 mg/kg.

Park *et al* (2002), ont montré la co-occurrence de la FB1 avec l'AFB1 dans les échantillons de maïs provenant de la Corée du Sud, cependant les auteurs ont signalé l'absence de toute trace d'OTA dans les mêmes échantillons analysés.

Au Brésil, la région du Sud est connue par la haute incidence du cancer de l'œsophage ainsi que par la haute production et la consommation des produits à base de maïs. Les échantillons du maïs provenant de l'Etat de Santa Catarina destiné à la consommation humaine ont montré une contamination par les fumonisines B1, B2 et B3 respectivement de l'ordre de 3,2 , 3,4 et 1,7 mg/kg. *Fusarium verticillioides* était la souche prédominante dans tous les échantillons analysés (Van der Westhuizen *et al*, 2003).

En Egypte, El-Sayed *et al* (2003) ont montré la contamination des échantillons de maïs et des produits à base à base du maïs par plusieurs mycotoxines produites par *Fusarium* en particulier les fumonisines. Les niveaux de la contamination par la FB1 étaient faibles et variables d'un échantillon à l'autre, ils se situaient entre 0,01 et 0,78

mg/kg. Les auteurs ont montré aussi la réduction de la FB1 par simple cuisson du pain “Balady” à 450 °C, le taux de réduction a atteint 72,4%.

En Italie, Brera *et al* (2004) ont aussi étudié l’effet d’un processus industriel sur le devenir de la FB1 dans le maïs, les auteurs ont évalué en premier le niveau de la contamination de différents échantillons de maïs destinés à l’alimentation humaine et animale par la FB1, les résultats ont montré la contamination des échantillons de maïs analysés par des taux variables allant de 0,39 à 9,56 mg /kg. D’autres part, les auteurs n’ont signalé aucun effet du traitement thermique sur le niveau de contamination de la farine de maïs analysés.

Il est à noter que lorsque deux ou plusieurs mycotoxines contaminent à la fois le même aliment, les effets de ces toxines sur les consommateurs peuvent s’accroître vu la possibilité de réactions entre les différentes substances toxiques. En effet selon une recherche récente, Creppy *et al* (2004) ont investigué les différents effets combinés (antagonisme ou synergie) résultant de la contamination d’un aliment par plus d’une mycotoxine. Les auteurs ont conclu l’existence d’un effet de synergie entre l’OTA et la FB1 dans l’apparition d’une toxicité aiguë *in vivo*.

Au Maroc, les céréales occupent une importance primordiale, sociale, économique et nutritionnelle pour la population. Elles contribuent à environ 12% du produit brut généré par l’agriculture. Les marocains dépensent environ 25 % de leur revenu sur ces produits et on estime que le pays consomme en moyenne 6 millions de tonnes chaque année.

En 2010, la population marocaine aura besoin de 8,5 millions de tonnes de céréales pour satisfaire le marché intérieur (INRA, 2002). A cause des périodes de sécheresse qu’a connu le Maroc ces deux dernières décennies, la production céréalière a enregistré une diminution de 25 à 85 %, ce qui entraîne un approvisionnement d’autres pays étrangers pour satisfaire le marché national.

Le Maroc importe les céréales de plusieurs pays notamment de la France, du Brésil, des Etats Unies, de la Russie et de l'Australie. Actuellement on estime qu'environ 25 % des céréales produites actuellement à l'échelle internationale sont contaminées par des mycotoxines (Davegowda *et al.*, 1998).

Le Maroc est un pays méditerranéen caractérisé par un climat chaud et une humidité élevée favorisant la croissance des moisissures dans les zones côtières qui abritent environ 70% de la population totale. Les résultats que nous avons trouvés concordent avec les travaux déjà effectués sur l'OTA notamment ceux de Maaroufi *et al.* (1995), Miraglia *et al.* (1993, 1995), Miraglia et Brera (2000) et Beretta *et al.* (2002) qui ont montré que les céréales et leurs produits dérivés originaires des pays de la région méditerranéenne peuvent être contaminés par les mycotoxines (OTA, ZEN et FB1) vu le climat de la région caractérisé par une chaleur humide et une température élevée favorisant la croissance des moisissures toxigènes.

3- Les Aflatoxines dans les épices

L'incidence des aflatoxines dans les échantillons d'épices analysées est représentée dans les tableaux 12 et 13. Les résultats montrent la présence des aflatoxines dans les épices analysées avec des pourcentages variables : 94,62 %, 53,5%, 53,3%, et 17,82 % respectivement des échantillons du piment, du Gingembre, du poivre, et du Cumin.

- Les aflatoxines dans le piment et le gingembre

Les concentrations des aflatoxines totales varient respectivement de 1,3 à 9,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 0,03 à 9,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les échantillons de piment et de gingembre analysés. Dans les échantillons de piment, les incidences des AFB1, AFB2, AFG1, et AFG2 sont respectivement 100%, 92,8%, 100%, et 85,7 %. Alors que dans le gingembre, elles sont de 85,7 %, 50%, 50% et 28,5 %.

Tous les échantillons de piment et de gingembre sont contaminés par l'AFB1 avec des niveaux variant respectivement de 0,5 à 5,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 0,03 à 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 13 échantillons de piment, soit 92,8 % des échantillons totaux, sont contaminés avec un taux d'AFB1 variant entre 1 et 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, et 2 échantillons de gingembre, soit 16,6 % des échantillons totaux, sont contaminés par un taux d'AFB1 variant entre 1 et 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tableau 12 : Occurrence des aflatoxines dans les échantillons du piment et de gingembre analysés.

	AF (µg/Kg)				
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFT*
<i>1- Piment (n=14)</i>					
1	3,90	0,20	1,70	0,05	5,85
2	3,55	0,14	2,15	0,10	5,94
3	1,50	0,10	0,54	0,03	2,17
4	2,00	0,08	0,70	0,02	2,80
5	2,80	0,20	2,20	0,11	5,31
6	4,00	0,18	2,30	0,12	6,60
7	1,60	0,10	1,22	0,03	2,95
8	1,40	0,12	0,50	-	2,02
9	3,00	0,18	4,00	0,05	7,23
10	4,70	0,17	3,40	0,07	8,34
11	5,40	0,18	4,00	0,10	9,68
12	0,50	-	0,80	-	1,30
13	3,45	0,12	2,70	0,04	6,31
14	2,55	0,10	4,00	0,11	6,76
Échantillons positifs (%)	100	92,8	100	85,7	94,6
<i>2- Gingembre (n=12)</i>					
1	2,50	0,30	2,70	0,20	5,70
2	0,60	0,06	0,80	0,06	1,52
3	0,05	-	0,02	-	0,07
4	0,18	-	0,10	-	0,28
5	0,03	-	-	-	0,03
6	3,50	0,40	4,80	0,40	9,10
7	0,03	-	-	-	0,03
8	0,15	0,02	0,12	0,01	0,30
9	0,06	-	-	-	0,06
10	0,16	0,02	0,04	-	0,24
11	0,20	0,05	-	-	0,25
12	0,05	0,01	-	-	0,06
Échantillons positifs (%)	85,7	50	50	28,5	53,5

* AF : Aflatoxines totales

- Les aflatoxines dans le poivre et le cumin

Les taux des aflatoxines totales varient entre 0,04 et 0,55 µg/kg et entre 0,01 et 0,18 µg/kg respectivement dans les échantillons de poivre et de cumin. Les niveaux de l'AFB1 varient entre 0,03 à 0,3 µg/kg dans les échantillons de poivre, alors que dans les échantillons du cumin, les taux d'AFB1 varient entre 0,01 et 0,08 µg/kg.

Dans les échantillons de poivre, les incidences des AFB1, AFB2, AFG1, et AFG2 étaient respectivement de l'ordre de 46,6%, 20%, 73,3% et 73.3 %. Alors que dans les échantillons du cumin les incidences des AFB1, AFB2, AFG1, et AFG2 étaient respectivement de l'ordre de 57,1%, 7,1%, 7,1% et 0 %.

La contamination des épices par les mycotoxines a été rapportée dans des travaux antérieurs effectués dans le monde particulièrement en Egypte par Selim *et al.* (1996), en Ethiopie par Fufa et Urga (1996), au Portugal par Martins *et al.* (2001) et en Turquie par Karagöz (2001).

En Sultanat d'Oman, l'analyse de 105 échantillons d'épices (cumin, cannelle, girofle, poivre noir, gingembre) a montré la contamination par *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium*, *Rhizopus*, et *Syncephalastrum racemosum*. Cependant, les aflatoxines n'ont pas été détectées dans les épices analysées (Elshafie *et al.*, 2002).

Thirumala-Devi *et al* (2003) ont montré la contamination de 126 échantillons d'épices les plus utilisées en cuisine indienne par l'OTA avec des concentrations variant entre 15 et 102 µg/kg.

Fufa *et al* (1996) ont noté une forte contamination des épices provenant d'Addis Ababa (Ethiopie) par l'AFB1. Les niveaux d'AFB1 dans le « Shiro » et le poivre variaient respectivement de 100 à 500 µg/kg et de 250 à 525 µg/kg.

Tableau 13 : Occurrence des aflatoxines dans les échantillons du poivre et du cumin analysés.

	AF (µg/Kg)				
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFT *
<i>1- poivre (n=15)</i>					
1	0,06	0,01	0,05	0,05	0,17
2	0,30	0,03	-	-	0,33
3	-	-	0,15	0,40	0,55
4	-	-	0,02	0,07	0,09
5	0,04	0,01	0,06	0,06	0,17
6	-	-	0,03	0,14	0,17
7	-	-	0,05	0,06	0,11
8	0,04	-	0,10	0,12	0,26
9	-	-	0,20	0,24	0,44
10	-	-	-	-	-
11	0,03	-	0,02	0,10	0,15
12	-	-	0,05	0,08	0,13
13	0,04	-	-	-	0,04
14	0,13	-	-	-	0,13
15	-	-	0,12	0,13	0,25
Échantillons positifs (%)	46,6	20	73,3	73,3	53,3
<i>2- Cumin (n=14)</i>					
1					
2	0,07	-	-	-	0,07
3	0,08	0,05	0,05	-	0,18
4	0,03	-	-	-	0,03
5	0,01	-	-	-	0,01
6	0,02	-	-	-	0,02
7	0,03	-	-	-	0,03
8	0,01	-	-	-	0,01
	0,01	-	-	-	0,01
Échantillons positifs (%)	57,1	7,1	7,1	0	17,8

* AFT : Aflatoxines totales

En Egypte, Selim *et al* (1996) ont rapporté la contamination par l'AFB1 des plantes médicinales (49 µg/kg) et des épices (25 µg/kg) provenant du Caire et du Giza. En outre, El-Kady et al (1995) en analysant 24 types d'épices provenant d'Assiut, ont montré la contamination des échantillons de poivre, du carvi, du cumin, du fenouil, de la menthe par les aflatoxines et la stérigmatocystine, cependant l'OTA et la ZEN n'ont pas été détectés.

En France, Delcourt *et al* (1994) ont noté la contamination des échantillons de poivre noir et blanc d'une part par les moisissures toxigènes appartenant essentiellement aux espèces *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* et *A. ochraceus* et d'autre part par l'AFB1.

En Angleterre, la contamination de 157 échantillons des herbes et des épices incluant le cari, le poivre, le piment, la "chilli" en poudre, le gingembre, la cannelle et le coriandre par les aflatoxines a été étudiée par MacDonald et Castle (1996), les résultats ont montré que 95% des échantillons analysés contenaient moins de 10 µg /kg d'aflatoxines totales. La valeur maximale en aflatoxines totales a été retrouvée dans un échantillon de la "chilli" en poudre avec 48 µg/kg. Les mêmes auteurs ont montré que le taux des aflatoxines dans les épices n'a pas été réduit au cours de la cuisson par différentes méthodes.

Au Brésil, selon Gatti *et al* (2003), l'analyse de 115 échantillons de poivre noir a montré une grande incidence de contamination par les moisissures toxigènes avec une prédominance des souches d'*Aspergillus* productrices d'aflatoxines. Cependant les souches d'*Aspergillus ochraceus* productrices d'OTA ont été isolées avec de faibles pourcentages. Freire et al (2000), ont isolé du poivre blanc et noir 42 souches toxigènes appartenant essentiellement à *Aspergillus flavus* et *A. niger* mais aussi à *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *Emericella nidulans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. islandicum* et *P. glabrum*.

Actuellement, seuls quelques pays ont établi des normes réglementaires fixant les niveaux maxima concernant les aflatoxines dans les épices. En Italie, la valeur maximale autorisée dans les épices est établie à 40 µg/kg pour les aflatoxines totales et 20 µg/kg pour l'AFB1. En Uruguay, la limite maximale d'aflatoxines tolérable dans les épices est de l'ordre de 20 µg/kg. Alors qu'en Turquie, la limite recommandée d'AFB1 dans les épices est de l'ordre de 5 µg/kg (Martins *et al.*, 2001).

Dans la présente étude que nous avons menée, l'incidence des aflatoxines dans les échantillons de piment et de gingembre était élevée en comparaison avec les échantillons de poivre et de cumin.

La recherche des aflatoxines dans plusieurs échantillons de poivre et de cumin s'est révélée négative ou a permis de détecter des quantités faibles. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Bartine et Tantaoui-Elaraki (1997) qui ont trouvé que la croissance des souches de moisissures toxigènes d'*A. flavus* était très faible sur le curcumine, le poivre blanc et le poivre noir. Ces mêmes auteurs ont signalé aussi que les aflatoxines n'ont pas été détectées sur le poivre blanc et noir. Par ailleurs, des quantités très faibles d'aflatoxines ont été détectées dans le curcumine après 10 jours de croissance des souches toxigènes d'*A. flavus* à 25°C.

En général, certaines épices à l'état naturel constituent un milieu non favorable pour la croissance des moisissures et la production de mycotoxines. Selon Juglal *et al* (2002), les huiles essentielles du girofle et de la cannelle ont montré un effet inhibiteur sur la croissance d'*Aspergillus parasiticus* et de *Fusarium moniliforme*. L'addition des extraits du girofle dans les épices a montré une inhibition considérable de la production des aflatoxines. Cependant nous avons noté qu'au Maroc la plupart des épices commercialisées sont frauduleusement additionnées par d'autres produits comme la farine du blé (luxé) dans le gingembre et le piment tout en insistant sur un ajout volontaire d'un colorant artificiel pour procurer la couleur normal de l'épice.

Les épices sont dotées de propriétés de préservation et elles sont utilisées également comme antioxydants. Elles sont aussi utilisées en médecine traditionnelle, ce qui fait que leur valeur marchande est assez élevée dans le marché international.

Les épices sont produites par les pays ayant un climat tropical ou subtropical et dont la température, l'humidité et les précipitations sont importantes. Après leur récolte, les épices sont souvent laissées sur le sol dans une aire ambiante pour sécher. Ce qui constitue dans la majorité des cas des conditions idéales pour la croissance des moisissures et la production de mycotoxines (Martins *et al.*, 2001).

Les épices (poivre, piment, cumin, gingembre etc.) sont largement utilisées dans plusieurs pays du monde notamment en Afrique et en Asie. En cuisine marocaine, les épices sont utilisées notamment pour la préparation de plats chauds et délicieux comme les "Tagines et la Tangia", le "Couscous", ou encore "Rfissa" etc., et ce dans le but développer des goûts particuliers ou une couleur adorée. Vu leur propriété antimicrobienne, certaines épices sont utilisées aussi dans la conservation traditionnelle de certains aliments comme le "Kaddid", le "Kliaâ" etc.

II- Détermination de l'OTA dans les olives noires et les fruits secs

a- Olives noires

En ce qui concerne les échantillons d'olives étudiées, les résultats de l'analyse des échantillons sont regroupés dans le tableau 14. La concentration de l'OTA varie considérablement d'un échantillon à l'autre et se situe entre 0,62 to 4,8 µg/kg avec une moyenne de l'ordre de 1,43 µg/kg. L'OTA a été détectée dans 9 échantillons d'olives noires ce qui correspond à un pourcentage de contamination total de l'ordre de 36 %. Dans tous les autres échantillons, l'OTA a été au dessous de la limite de détection de l'appareil (0,01µg/kg). En comparaison avec les données dans d'autres pays voisins, Maaroufi *et al.* (1995) ont rapporté une contamination des olives en Tunisie par l'OTA atteignant une concentration très élevée de l'ordre 46830 µg/kg (l'équivalent de 46,8 ppm).

Au Maroc, la production des olives atteint 6,9 % de la production mondiale. Jusqu'à nos jours les agriculteurs marocains utilisent encore des méthodes traditionnelles pour récolter le fruit de l'olivier. La période de stockage du fruit dure assez longtemps à des températures ambiantes (20-25°C), ce qui engendre des pertes économiques énormes résultant de la dégradation de la qualité des olives fermentées.

Les olives noires de table sont préparées par un ancien processus qui consiste en un salage et un séchage. Les olives noires récoltées sont déposées dans des sacs. Le salage est effectué au fur et à mesure du remplissage des sacs par les olives par l'ajout du sel solide en surface. Les sacs seront déposés l'un sur l'autre, puis un matériel lourd (pierre) est déposé à la surface des sacs. Le liquide noir amer est évacué à l'extérieur des sacs par effet du poids et du salage.

Les micro-organismes impliqués dans les altérations post-récolte des fruits avant le processus de fermentation ont été étudiés par plusieurs auteurs. L'étude microbiologique du fruit après récolte a montré une charge microbienne faible à l'exception des levures et des moisissures (Asehraou *et al.*, 1992). La microflore

représentative était un ensemble d'espèces de moisissures qui peuvent être associées à des problèmes d'intoxications alimentaires dus aux mycotoxines.

L'occurrence des moisissures toxigènes dans les olives noires de table préparées par un processus traditionnel de fermentation non contrôlée est très possible. Les olives noires sont considérées parmi les cultures à haut risque de contamination par les mycotoxines. Gourama *et al.* (1985) ont isolé à partir des olives noires commercialisées au Maroc, des souches toxigènes d'*A. flavus* et d'*A. ochraceus* capables de produire les aflatoxines et les ochratoxines. Un nouveau processus pour contrôler et accélérer la fermentation des olives noires de tables a été mis au point au laboratoire par Asehrou *et al.* (1997) en utilisant un traitement immédiat des fruits juste après leur récolte. La croissance des moisissures ne peut pas atteindre des niveaux élevés pour produire les mycotoxines. Le point clé du nouveau processus est l'accélération de la pénétration du sel dans le fruit et l'inactivation des spores des moisissures. Vu la simplicité du processus, il peut être utilisé par toutes les unités de production sans aucune charge ajoutée.

b- Fruits secs

Les résultats de l'analyse de 24 échantillons de fruits secs (11 raisins, 5 figues et 8 prunes) sont résumés dans le tableau 15.

L'OTA a été détectée dans 10 échantillons de raisins secs, soit 92,5 % des échantillons totaux, les concentrations de l'OTA varient entre 0,02 et 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec une valeur moyenne de 0,096 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dans les échantillons de prunes, l'OTA a été détectée dans 100 % des échantillons avec une concentration moyenne de l'ordre de 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Alors que dans les échantillons de figues, l'analyse a montré que les concentrations de l'OTA étaient au dessous de la limite de détection. Par ailleurs, nous avons mis en évidence (dans tous les chromatogrammes des échantillons de figues analysés) la présence d'un pic juste avant le pic d'identification de l'OTA. Selon Creppy

(communication personnelle). Ces pics pourraient correspondre à des molécules d'ochratoxines probablement encore non identifiées. En effet, Les figues sont des fruits riches en phénylalanine. Le marquage radioactif de la phénylalanine par le ^{14}C a montré que cet acide aminé est un précurseur dans la biosynthèse des molécules d'ochratoxines (Harris et Mantle, 2001).

En comparaison avec d'autres recherches sur la prévalence des mycotoxines dans les fruits secs en Egypte, Zohri et Abdel-Gawad (1993) ont montré la contamination de fruits analysés par les moisissures toxigènes appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Pleospora*. Les auteurs ont aussi montré la contamination des échantillons d'abricots (50-110 $\mu\text{g}/\text{kg}$) et de figes (60-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) par l'OTA, cependant les autres mycotoxines recherchées (aflatoxines, citrinine, patuline, stérigmatocystine, diacétoxyscirpénol, toxine T2 et zéaralénone) n'ont pas été détectées.

D'après Abarca *et al* (2003), les moisissures responsables de la production de l'OTA sur les fruits secs appartiennent essentiellement aux *Aspergilli* noirs comme *A. niger* et *A. carbonarius*. Les souches de cette dernière espèce ont fort pouvoir de production de l'OTA sur les raisins secs prélevés du marché espagnol que les souches d'*A. niger* isolées.

En Grèce, Stefanaki *et al.* (2003) ont analysé l'OTA dans les fruits secs de la vigne servant pour la production du vin local, les résultats ont montré une contamination variable des deux variétés (currants et sultanas) avec des concentrations moyennes respectives de l'OTA de l'ordre de 1,3 et 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Selon Drusch et Ragab (2003), quoique les mycotoxines sont des contaminants naturels des aliments, elles se trouvent avec de faibles fréquences dans les fruits. Il a été démontré que la présence des moisissures sur les fruits n'est pas automatiquement associée avec la contamination par les mycotoxines.

Tableau 14 : Concentrations de l'OTA dans les olives noires analysés

Echantillons	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	0,85
2	2,5
3	0,73
4	0,67
5	4,8
6	1,24
7	0,79
8	0,75
9	0,62
Moyenne	1,43

Tableau 15 : Concentrations de l'OTA dans les fruits secs analysés

OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
<u>Raisins:</u>		<u>Prunes:</u>	
1	0,25	1	0,04
2	0,03	2	0,03
3	0,02	3	0,02
4	0,07	4	0,04
5	0,02	5	0,03
6	0,08	6	0,05
7	0,1		
8	0,3		
9	0,03		
10	0,06		
Moyenne	0,096		0,035

Les normes réglementaires européennes concernant l'OTA dans les fruits secs ont été fixées à 10 µg/kg (Abarca *et al*, 2003). Tous les échantillons de fruits secs analysés dans cette étude présentent des concentrations de l'OTA inférieures à 0,3 ppb et sont de ce fait au dessous des limites fixées par les pays de l'Union Européenne. Nos résultats concordent parfaitement avec ceux de Filali *et al*. (2001) qui ont montré que les jus de fruits et les boissons analysés originaires du Maroc sont peu contaminés par l' OTA à la différence de certains pays du Maghreb Arabe notamment comme en Tunisie où la contamination de certains aliments de base par l'OTA a atteint des niveaux critiques en relation probablement avec les problèmes de néphropathies.

Conclusion

Cette première partie de notre travail a montré la contamination de quelques denrées alimentaires commercialisées au Maroc (céréales, fruits secs et épices) par les mycotoxines en particulier par les aflatoxines, l'OTA, la ZEN et la FB1. Les niveaux de la contamination (dans le cas du maïs) ont dépassé les limites réglementaires fixées à l'échelle internationale.

L'économie marocaine dépend en grande partie de l'agriculture et, notamment, du développement des exportations des produits agroalimentaires vers les pays de l'Union européenne. Le renforcement des normes nationales et internationales en matière de qualité des produits agroalimentaires, la vigilance et l'exigence de plus en plus accrue du consommateur marocain et étranger en matière de qualité de ces produits, la concurrence internationale qui se fait de plus en plus rude (l'accord du GATT et les accords de libre échange de l'OMC) ainsi que et les accords bilatéraux de création de zones de libre échange unissant le Maroc avec plusieurs pays en particulier les Etats-Unis, font que le Maroc doit accorder un intérêt grandissant à la conformité de ces produits aux standards internationaux de salubrité. Pour se faire, il est impératif d'améliorer le système de surveillance et de contrôle qui permettra aux produits marocains de rester compétitifs sur le marché international.

CHAPITRE II: REDUCTION DES AFLATOXINES PAR VOIE MICROBIOLOGIQUE

A- ETUDE DES FERMENTS PANAIRES TRADITIONNELS

I- Etude physico-chimique

Les ferments panaires que nous avons étudiés ont été récoltés de différentes régions du milieu rural du Sud du Maroc. Ils servaient directement à la fermentation de la farine pour produire du pain acide traditionnel.

1- Mesure du pH

Les valeurs de pH relatives aux différents échantillons de levains varient entre 3,02 et 3,71 (tableau 16). Ces valeurs témoignent de la forte acidité des échantillons analysés qui sont naturellement fermentés. Ces résultats concordent avec ceux décrits par plusieurs auteurs ayant travaillé sur la fermentation panaire traditionnelle marocaine notamment Faid *et al.* (1993) et Tahri-Hassani (1996). Faid *et al.* (1994), en préparant le pain au laboratoire par des méthodes traditionnelles, ont montré que le pH du levain atteint une valeur de 3,20 pendant la quatrième génération.

Les études de Sugihara (1985) sur le pain Sanfransisco (USA) ont montré que le pH de la pâte atteint une valeur de 3,9 en fin de la fermentation. Ce type de pain américain est fermenté par une association entre des souches de levures et de bactéries lactiques de l'espèce *L. sanfransisco* connue par son pouvoir acidifiant important. D'autre part, le pain allemand fermenté par une combinaison de levures et de bactéries lactiques acidifiantes des espèces *L. brevis* et *L. plantarum* a atteint une valeur de pH 3,6 (Spicher, 1983).

Tableau 16 : Caractéristiques physico-chimiques des ferments panaires analysés

Ferment	pH	Pouvoir fermentaire (ml)
L1	3,71	85
L2	3,02	70
L3	3,25	130
L4	3,02	20

Ces résultats montrent que les ferments traditionnels marocains que nous avons étudiés ont un caractère acide. Les niveaux d'acidité atteints peuvent être expliqués par l'existence d'acides organiques tels l'acide lactique ou l'acide acétique dans le milieu produits par les microorganismes responsables de la fermentation de la pâte. Ces deux acides résultent de la dégradation directe des sucres de la farine et assurent un goût apprécié tout en jouant un rôle dans la conservation naturelle de la pâte obtenue. Le pH acide joue également un rôle dans l'extensibilité de la pâte et augmente l'activité des phytases libérées par les bactéries lactiques au cours de la fermentation ce qui entraîne une augmentation de la disponibilité des minéraux dans le pain.

Ce type de pain acide qui se produit encore au Maroc en milieu rural, mais qui est malheureusement absent en milieu urbain, est préféré pour ses caractéristiques organoleptiques notamment son goût acide et son arôme caractéristique. Selon Collar *et al.* (1992), Les bactéries lactiques montrent au cours de la fermentation panaire une grande affinité aux acides aminés qui sont rapidement métabolisés également par les levures pour produire les substances aromatiques.

2-Pouvoir fermentaire

Le pouvoir fermentaire est directement lié à la production de gaz par les microorganismes constituant les ferments en question au cours de la fermentation panaire. Cette production de gaz est attribuée en général aux levures mais aussi aux bactéries lactiques à métabolisme hétérofermentaire.

L'analyse du pouvoir fermentaire des ferments étudiés a montré une variabilité entre les échantillons analysés. Le tableau 16 montre que les ferments L1, L2, L3 et L4 ont des pouvoirs fermentaires respectifs de l'ordre de 85, 70, 130 et 20 ml. Cette variation peut être expliquée probablement par la différence de la composition microbiologique des ferments analysés.

Le pouvoir fermentaire dépend de l'activité des souches utilisées. L'association entre levures et bactéries lactiques au cours de la fermentation mixte entraîne une modification des caractéristiques physico-chimiques du pain en particulier le pouvoir fermentaire. Ainsi selon Faid *et al.*, (1993), l'association entre *S. cerevisiae* et *L. plantarum* a entraîné un pouvoir fermentaire de 122 ml alors que l'association entre *S. cerevisiae* et *L. brevis* a donné un pouvoir fermentaire de 48 ml.

II- Etude microbiologique

a- Dénombrement des levures

Les levures jouent un rôle primordial dans la fermentation panaière traditionnelle. Les niveaux de leur charge dans les ferments analysés sont présentés dans le tableau 16. Le Dénombrement des levures a montré une variabilité entre les échantillons analysés. Le ferment L3 est le plus chargé en levures avec une valeur maximale de $23 \cdot 10^7$ ufc/g, alors que le ferment L4 s'est avéré le moins chargé en levures avec une valeur minimale de $85 \cdot 10^5$ ufc/g. la moyenne des valeurs des quatre échantillons est d'environ 10^8 ufc/g.

Le ferment L4 que nous avons étudié a la particularité de contenir la plus faible charge en levures ($85 \cdot 10^5$ ufc/g), également son pouvoir fermentaire est faible (20 ml). Il est fort probable que la charge de ce ferment en bactéries lactiques hétérofermentaires produisant du gaz puisse être aussi faible.

Les résultats que nous avons trouvés concordent avec ceux rapportés par les chercheurs qui ont déjà investigué la fermentation traditionnelle marocaine. En effet, les travaux de Tahri-Hassani (1996) ont montré que la charge moyenne des levures dans les ferments était de l'ordre de 14.10^7 ufc/g.

Les travaux effectués par Faid *et al.* (1994) sur les ferments préparés au laboratoire ont montré que la numération des levures montre une variabilité d'un échantillon à un autre. Le ferment préparé à base du « leben » traditionnel marocain contient une population élevée en levures (environ 10^7 ufc/g à la 4^{ème} génération) en comparaison aux autres ferments préparés à base de produits végétaux tels le jus de citron ou l'ail.

Les levures identifiées par Tahri-Hassani (1996) appartiennent à 5 espèces dont deux majoritaires *S. cerevisiae* (35%) et *Candida milleri* (30%) et trois minoritaires à savoir *C. tropicalis* (19%), *Pichia saitoi* (10%) et *Debaryomyces hansenii* (6%)

En comparaison avec les travaux des chercheurs étrangers sur la panification traditionnelle, Sugihara (1985) a rapporté que la population des levures dans le levain de San Francisco atteint $2.5.10^7$ ufc/g.

La charge importante des levures dans les ferments traditionnels témoigne de leur rôle dans la levée de la pâte au cours de la fermentation. En effet, l'aspect spongieux du pain est attribué aux levures. Leur contribution à la production des caractéristiques organoleptiques est d'une grande importance.

b-Dénombrement des bactéries lactiques (tableau 17)

Pour les cocci, le ferment L2 a montré une charge minimale de l'ordre de 24.10^7 ufc/g, alors que le ferment L1 a montré la charge maximale de $77. 10^7$ ufc/g. Pour les bacilles, le ferment L3 a montré une charge minimale de $45. 10^7$ ufc/g, la

charge maximale est de l'ordre de $58 \cdot 10^7$ ufc/g. La charge moyenne des ferments analysés est respectivement de l'ordre de $39,5 \cdot 10^7$ ufc/g pour les cocci et $51,7 \cdot 10^7$ ufc/g pour les lactobacilles.

Les résultats rapportés par Faid *et al.* (1994) concernant la numération des bactéries lactiques dans les ferments produits au laboratoire ont montré que le taux de ces microorganismes était inférieur à celui des levures au cours de la première génération. Cependant ils commencent à dominer la flore totale dès la 4^{ème} génération excepté dans le ferment produit à l'aide du « leben » traditionnel où les levures sont dominantes pendant les quatre générations.

Pour les levains du pain de San Francisco, Sugihara (1985) a rapporté des charges des bactéries lactiques relativement élevées comprises entre $0,5$ et $1,5 \cdot 10^9$ ufc/g. Dans les levains pour pain au seigle, Spicher (1983) a rapporté des valeurs comprises entre $2 \cdot 10^7$ et $2 \cdot 10^8$ ufc/g.

Ces résultats montrent que la charge élevée des ferments analysés en bactéries lactiques témoigne du rôle joué par cette microflore dans le processus de fermentation panair traditionnelle, et justifie en particulier les valeurs bas du pH que nous avons trouvés dans les différents échantillons analysés.

Tableau 17 : Dénombrement des levures et des bactéries lactiques dans les ferments panaires traditionnels en ufc 10⁶/g.

Ferment	Bactéries Lactiques		
	Levures	Bacilles	Cocci
L1	15	480	770
L2	150	580	240
L3	230	450	260
L4	8,5	560	310
Contrôle	0,4	0,01	0,02

c- Identification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques isolées à partir des ferments étudiés ont été observées au microscope pour déterminer le Gram et la forme des cellules, puis après, elles ont subi la réaction de la catalase. Les bacilles et les cocci Gram positifs et qui sont dépourvus de catalase, ont été étudiées pour la production de gaz, la croissance à différentes températures (15 et 45 °C), et pour la dégradation de certains sucres selon la méthode décrite par Sharpe (1979).

La fermentation panair traditionnelle en milieu rural se fait à la température ambiante (en général de l'ordre de 28°C). La sélection naturelle fait que la majorité des ferments utilisés sont des ferments mésophiles. De plus, toutes les souches isolées de ces ferments étaient capables de croître à 15 °C.

La production du CO₂ permet de différencier entre les lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires. Dans notre étude (tableau 18), 49% des isolats totaux sont des lactobacilles dont 38% sont des homofermentaires et 11% sont des hétérofermentaires.

Les souches des leuconostocs et des pédiocoques représentent respectivement 33 % et 18 % de l'ensemble des isolats des quatre ferments étudiés. Sur le plan technologique, les espèces hétérofermentaires semblent être intéressantes que les homofermentaires puisqu'elles produisent du CO₂ et contribuent avec les levures à la levée de la pâte.

Les travaux de Faid *et al.* (1994) ont montré que les lactobacilles dominent la fermentation lactique dans les ferments produits au laboratoire avec des pourcentages respectivement de l'ordre de 75%, 61 % et 67,8 % pour les ferments produits à base du citron, du "leben" et de l'ail. Alors que Les espèces des genres *Pediococcus* et *Leuconostoc* ne sont que faiblement représentés avec des pourcentages respectifs de l'ordre de 2 % et 8 %. Selon les mêmes auteurs, les souches homofermentaires dominant la fermentation panair traditionnelle appartiennent à l'espèce *L. plantarum*, alors que les souches hétérofermentaires appartiennent à l'espèce *L. brevis*.

- Tests biochimiques et culturaux

Les tests biochimiques et culturaux nous ont permis d'identifier 50 souches de bactéries lactiques isolées des différents ferments analysés. Parmi les isolats totaux nous avons pu identifier 25 souches parmi le genre *Lactobacillus*, 16 souches parmi le genre *Leuconostoc* et 9 souches parmi le genre *Pediococcus* (Tableau 19).

- *L. brevis*

Les souches appartenant à cette espèce sont de métabolisme hétérofermentaire, elles fermentent le maltose, le xylose, le galactose, l'arabinose et désamine l'arginine.

Cette espèce représentait 9% des isolats totaux étudiés par Tahri-Hassani (1996). Faid *et al.* (1994) ont isolé cette espèce avec des taux variables respectivement de l'ordre de 15, 10 et 9 % dans les ferments traditionnels produits au laboratoire à partir du citron, "leben" et l'ail. Un procédé de fermentation traditionnelle mixte du pain a été optimisé en Italie avec l'association de *S. cerevisiae* et *L. brevis* (Meignen, 2001).

Tableau 18: Pourcentage des genres de bactéries lactiques dans les ferments panaires traditionnels analysés

Genre	Pourcentage
<i>Leuconostoc</i>	33
<i>Lactobacillus</i> (homofermentaire)	11
<i>Lactobacillus</i> (hétérofermentaire)	38
<i>Pediococcus</i>	18

Tableau 19 : Distribution des espèces de bactéries lactiques dans les ferments traditionnels panaires étudiés.

Espèce	Nombre	Pourcentage
<i>L. plantarum</i>	4	8
<i>L. brevis</i>	5	10
<i>L. casei</i>	2	4
<i>L. rhamnosus</i>	8	16
<i>L. lactis</i>	6	12
<i>Ln. mesenteroides</i>	9	18
<i>Ln. dextranicum</i>	7	14
<i>P. acidilactici</i>	9	18
Total	50	100

- *L. casei*

Elle se présente sous forme de bâtonnets courts généralement en paires. Les souches de cette espèce utilisent le maltose, le galactose, le lactose et le cellibiose. Cependant aucune souche n'utilise le raffinose, l'arabinose, le xylose et le melibiose.

Cette espèce représentait 8,7% des souches isolées par Faid *et al.* (1994) à partir d'un ferment produit à l'aide d'une farine fermentée spontanément. Elle a été aussi décrite auparavant par Spicher (1983) comme espèce naturelle de la fermentation du pain au seigle en Allemagne.

- *L. lactis*

Cette espèce est homofermentaire, son métabolisme se caractérise par la fermentation du maltose et de l'arabinose cependant elle n'est pas capable de désaminer l'arginine.

Cette espèce a été isolée par Faid *et al.* (1994) dans le ferment produit par une farine fermentée spontanément à un pourcentage de 8,7%. Cette espèce est fréquente naturellement dans les produits laitiers et elle est mineure chez les végétaux.

- *L. plantarum*

Cette espèce homofermentaire ne désamine pas l'arginine, elle fermente le maltose, le galactose, le lactose et le cellibiose.

Cette espèce existait dans tous les ferments étudiés par Faid *et al.* (1994) à des proportions élevées de l'ordre respectivement de 25 %, 13,3% et 31,8 % dans les ferments à base du citron, du leben traditionnel et de l'ail. Cette espèce est décrite par plusieurs auteurs comme la plus active dans la fermentation panair traditionnelle (Lonner et Preve-Akesson, 1988).

- *L. rhamnosus*

Cette espèce est particulièrement caractérisée par la fermentation du rhamnose, elle a été considérée pour longtemps comme une sous espèce de *L. casei*. Vu la faible proportion de cette espèce dans les différents levains étudiés, elle est difficile de lui attribuer un rôle technologique dans la fermentation panair traditionnelle. Cependant

L. rhamnosus fait partie intégrante de la flore intestinale autochtone humaine et on la trouve rarement chez les animaux (Baumgartner *et al.*, 1998).

- *Ln. mesenteroides*

Cette espèce se présente sous forme de cocci en diplocoques ou en chaînettes à métabolisme hétérofermentaire. Les souches de cette espèce fermentent l'arabinose, le maltose, le saccharose, le galactose, le ribose et le tréhalose. Cette espèce a été isolée par Azar *et al.* (1977) du levain Iranien de Shangak. Cette espèce a été isolée par Faid *et al.* (1994) des levains panaires traditionnels marocains.

- *Ln. dextranicum*

Cette espèce produit du CO₂ et ne désamine pas l'arginine, elle fermente le maltose le galactose, le cellibiose, le mélizitose et ne croit pas à 45°C. Elle a été isolée par plusieurs auteurs notamment par Faid *et al.* (1994) et Tahri-Hassani (1996). Les *Leuconostocs* sont moins acidifiantes que les lactobacilles et les *pediocoques* et jouent un rôle probablement dans les premières phases de la fermentation.

- *P. acidilactici*

Cette espèce supporte des valeurs d'acidité élevées. De ce fait, elle domine les phases finales des fermentations végétales (olives, pain, ensilages...). Cette espèce ne produit pas de CO₂, ne désamine pas l'arginine, elle fermente le maltose, le xylose, le raffinose, le mellibiose l'arabinose et le cellibiose et elle croit à 45 °C. Elle a été isolée par Faid *et al.* (1994) des levains préparés au laboratoire et par Tahri-Hassani (1996) des levains traditionnels marocains.

B- ETUDE DE LA REDUCTION DES AFLATOXINES

I- Effet des ferments panaires sur les aflatoxines

a- Fermentation de la farine contaminée

La méthode de fermentation que nous avons adoptée est celle effectuée dans le milieu rural au Maroc avec de légères modifications à savoir les proportions en sels, et en inoculum selon le protocole introduit par Faid *et al.* (1994). La farine que nous avons utilisée dans l'essai de fermentation est analysée au préalable par HPLC pour la recherche des traces d'aflatoxines.

b- Analyse des aflatoxines

La quantification des aflatoxines dans la farine fortifiée après 6 h de fermentation a été faite par HPLC. Les réductions les plus élevées des taux initiaux d'AFB1 et d'ABG1 ont été obtenues avec le ferment (L4), elles sont respectivement de l'ordre de 79.16 % et 91.66 % (figure 9).

Des réductions des taux d'AFB1 et d'AFG1 ont été observées également avec les ferments L2 et L1. Les pourcentages respectifs sont de l'ordre de 33.33% et 58.33 % pour l'AFB1, 50% et 70.8% pour l'AFG1. Cependant le ferment (L3) a montré le faible taux de réduction de l'AFB1 (20.8%) et l'AFG1 (41.6%).

En comparaison avec l'essai à la levure boulangère *S. cerevisiae* (6.25% pour l'AFB1 et 1.25% pour l'AFG1), Les ferments traditionnels ont montré une réduction élevée des taux d'aflatoxines après 6 h. Ce qui suggère qu'un processus de détoxification est probablement mis en jeu au cours de la fermentation par des microorganismes spécifiques autres que les levures et en particulier *S. cerevisiae*.

Quand l'acide lactique a été ajouté à la farine non inoculée, des réductions faibles des taux de l'AFB1 (1.2%) et de l'AFG1 (2.7%) ont été observées. Ceci suggère que

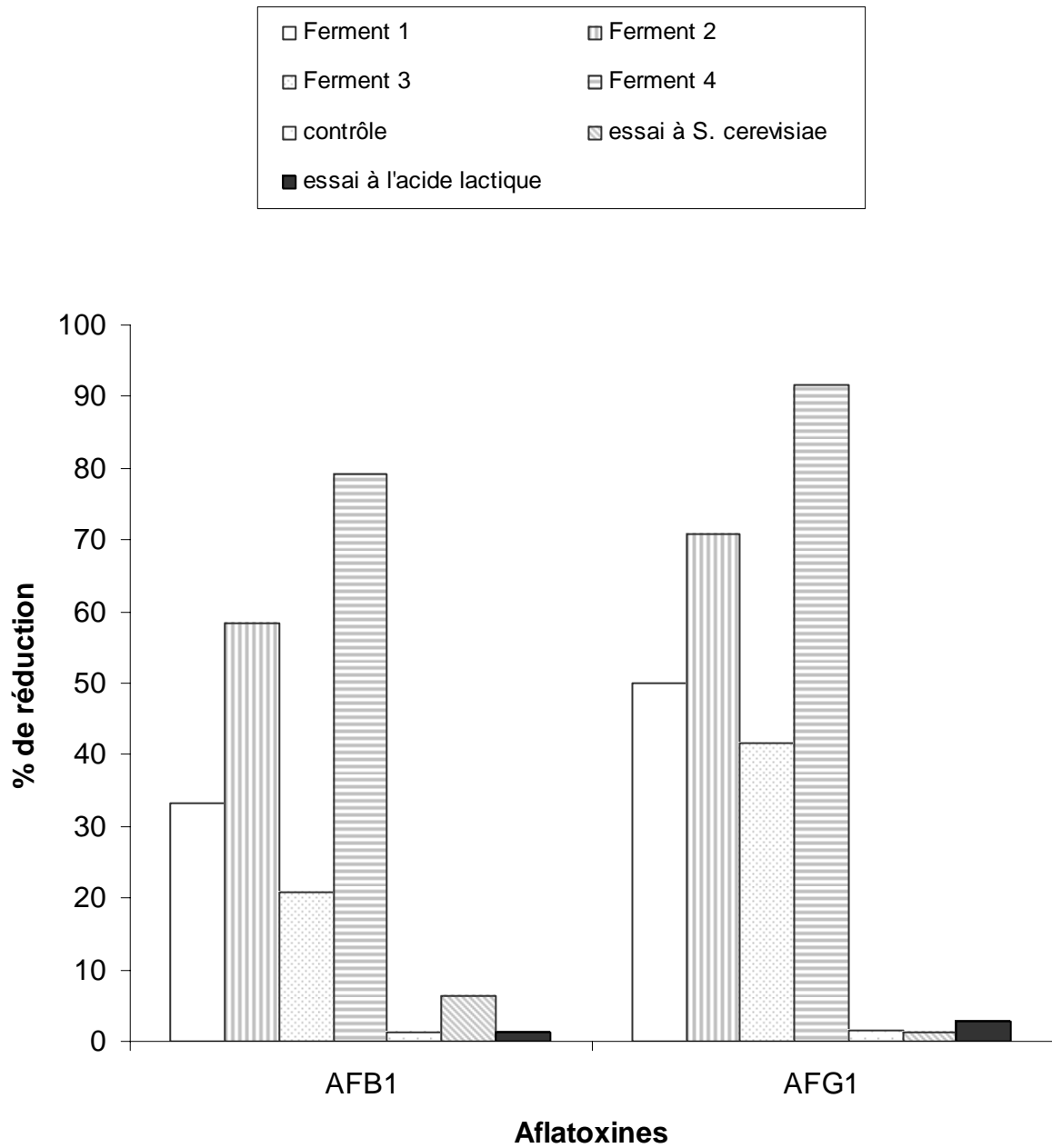
l'acide lactique ne joue aucun rôle dans le processus d'élimination des aflatoxines au cours de la fermentation panaire traditionnelle.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de l'acide lactique sur les aflatoxines. Cependant des résultats variables ont été obtenus. Ciegler *et al.* (1966 b), en ajoutant de l'acide lactique à une concentration de 10 % (v/p) pour décontaminer les graines du maïs, ont constaté une réduction considérable de l'aflatoxine. Cependant, Coallier-Ascah et Idziak (1985) n'ont par ailleurs constaté aucun effet de l'acide lactique ni sur la biosynthèse ni sur la biodégradation des aflatoxines.

L'essai non inoculé par les ferments a permis de réduire faiblement le taux des toxines. L'AFG1 et l'AFB1 ont été réduites respectivement avec des pourcentages de l'ordre de 1,6% et 1,16%. Ceci suggère que la réduction des taux d'aflatoxines après fermentation est due essentiellement à l'effet des ferments panaires traditionnels.

D'après plusieurs études antérieures (Faid *et al.*, 1993, Faid *et al.*, 1994 et Tahri-Hassani, 1996), les ferments panaires traditionnels marocains sont une association symbiotique entre levures et bactéries lactiques. Jusqu'à nos jours, aucune étude n'a montré la capacité des levures en général et *S. cerevisiae* en particulier à réduire les aflatoxines. Par ailleurs, plusieurs études préliminaires ont montré la capacité des bactéries lactiques à complexer ou à dégrader les molécules de l'aflatoxine.

Figure 9: Pourcentage de réduction des aflatoxines par les ferments panaires traditionnels



II- Activité anti-aflatoxinogénique des bactéries lactiques.

Les résultats du dénombrement des souches de bactéries lactiques et de la mesure du pH pendant le 8^{ème} jour en croissance mixte avec *A. parasiticus* sont représentés dans le tableau 20. Le nombre des bactéries lactiques en fin de croissance et les valeurs du pH atteints dans le bouillon LTB varient d'une souche à l'autre.

En ce qui concerne les combinaisons des bactéries lactiques avec la moisissure toxigène, nous avons noté que *L. casei* Lc12 a montré la meilleure croissance ($25,8 \cdot 10^7$ ufc/ml) en présence d'*A. parasiticus*, alors que *L. plantarum* Lb7 a montré la faible croissance avec un nombre atteint de $3,2 \cdot 10^7$ ufc/ml après huit jours de croissance mixte. Quant aux valeurs du pH, le pH le plus bas (3,4) a été obtenu lors de la combinaison de *L. lactis* Lb8 avec la moisissure, cependant le pH le plus haut (4,5) a été obtenu avec les souches *Ln. mesenteroides* et *L. lactis* Lb5. Cette variabilité est le résultat d'une compétitivité entre les bactéries lactiques et la moisissure mais également le résultat de la spécificité de chaque souche utilisée.

Les pourcentages d'inhibition de la production de l'AFB1 par *A. parasiticus* sont représentés dans le tableau 21. Les réductions enregistrées dans cette étude sont variables d'une bactérie lactique à l'autre. Elles sont comprises entre 1.24 et 80.5 %.

La réduction maximale de la biosynthèse de l'AFB1 a été enregistrée par *L. lactis* Lb5, le pourcentage d'inhibition de la production atteint environ 80.5%. Cette réduction est aussi importante dans le cas de croissance d'*A. parasiticus* en présence de *L. rhamnosus* Lb31 (69.25 %), de *L. lactis* Lb8 (60.24 %), de *L. rhamnosus* Lb21 (60.2 %) et de *L. rhamnosus* Lb50 (58 %). Les souches *L. brevis* Lb1, *L. casei* Lc12, *L. plantarum* Lb7, *L. plantarum* Lb9, *Ln mesenteroides* Ln13 et *P. acidilactici* P55 ont entraîné de faibles pourcentages de réduction de la production de l'AFB1 allant 1.24 % à 5.5 %.

Tableau 20: pH et nombre des bactéries lactiques en culture mixte avec *A. parasiticus* NRRL2999.

Culture	Bactéries lactiques en ufc/ml x 10 ⁷	pH
<i>L. brevis</i> Lb1 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,8	3,6
<i>L. casei</i> Lc12 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	25,8	3,7
<i>L. lactis</i> Lb5 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	5,8	4,5
<i>L. lactis</i> Lb8 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	10,8	3,4
<i>L. plantarum</i> Lb7 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	3,2	4,2
<i>L. plantarum</i> Lb9 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	9,7	4,3
<i>L. rhamnosus</i> Lb21 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	4,6	3,7
<i>L. rhamnosus</i> Lb31 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,4	3,9
<i>L. rhamnosus</i> Lb50 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	9,8	4,1
<i>Ln. mesenteroides</i> Ln13 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,25	4,5
<i>P. acidilactici</i> P55 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	15,8	3,6

Tableau 21: Pourcentages de réduction de la production de l'AFB1 par *A. parasiticus* NRRL2999 après culture mixte avec les bactéries lactiques

Culture	% de réduction
<i>L. brevis</i> Lb1 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	3,41
<i>L. casei</i> Lc12 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	1,24
<i>L. lactis</i> Lb5 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	80,5
<i>L. lactis</i> Lb8 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	60,24
<i>L. plantarum</i> Lb7 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	5,5
<i>L. plantarum</i> Lb9 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	5,45
<i>L. rhamnosus</i> Lb21 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	60,2
<i>L. rhamnosus</i> Lb31 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	69,25
<i>L. rhamnosus</i> Lb50 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	58
<i>Ln. mesenteroides</i> Ln13 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	3,21
<i>P. acidilactici</i> P55 + <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	2,15

Les propriétés antifongiques et antiaflatoxinogéniques des espèces de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* sp ont été décrites par plusieurs auteurs notamment par Karunaratne et al. (1990). Wiseman et Marth (1981) en étudiant la croissance et la production d'aflatoxines par *A. parasiticus* en présence de *Lc. lactis subsp. lactis*, ont noté la présence d'une compétition réciproque entre les deux microorganismes. Elgendy et Marth (1981) ont rapporté qu'une combinaison en culture mixte simultanée entre *L. casei* et *A. parasiticus* réduit la production de l'AFB1. Gourama et Bullerman (1995 a,b) ont confirmé l'action inhibitrice des espèces des bactéries lactiques sur la germination des spores d'*A. flavus subsp. parasiticus* et sur la production d'aflatoxines.

Batish *et al.* (1989) ont testé les activités antifongiques de 19 souches lactiques contre *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *Rhizopus stolonifer*, et *Rhizopus sp.* Ils ont conclu que *Lc. lactis subsp diacetylactis* DRC1 et *S. thermophilus* 489 avaient une action inhibitrice importante de toutes les cultures fongiques. D'autres part, *A. fumigatus* était l'espèce la plus sensible.

Gizzarelli *et al.* (1993), en étudiant l'effet des bactéries lactiques sur la production des aflatoxines par *A. parasiticus*, ont montré la présence d'une interaction compétitive entre les deux groupes de micro-organismes dont le mode dépend des conditions expérimentales et de la nature des micro-organismes compétitifs. Les auteurs ont montré que les souches de *Lc. lactis* en culture mixte avec *A. parasiticus* montrent une réduction de la production des aflatoxines B1 et G1 respectivement de l'ordre de 88 % et 100 %, alors que les souches de *Lc. cremoris* montrent une réduction de la production des AFB1 et AFG1 respectivement de l'ordre de 44% et 22%.

Cependant, selon les mêmes auteurs, les souches de *L. casei* ont montré une stimulation de la production par *A. parasiticus* des aflatoxines B1 et G1 de l'ordre de 527 % et 140% respectivement. Par ailleurs, les souches de *L. fermentum* et *L. casei*

n'ont pas présenté une interaction régulière vis à vis de la croissance d'*A. parasiticus* et la production des AFB1 et AFG1.

Dans le but de connaître le mécanisme d'action par lequel les bactéries lactiques agissent sur les moisissures toxigènes en inhibant totalement ou en réduisant la production des aflatoxines, plusieurs investigations ont été menées auparavant. Certains auteurs pensent que l'effet inhibiteur est probablement dû à la diminution du pH, à l'accumulation de l'acide lactique ou la production de substances actives.

Coallier-Ascáh et Idziak (1985) ont suggéré qu'une substance synthétisée pendant la phase exponentielle par *Lc. lactis* est responsable de l'inhibition de la production d'aflatoxine par *A. flavus*. Une purification partielle de la dite substance indiquait qu'il s'agirait probablement d'un composé thermostable de faible poids moléculaire.

En outre Gourama et Bullerman (1997) ont montré que *L. casai pseudopantarum* 371 inhibe totalement la biosynthèse de l'AFB1 et l' AFG1 par *A. flavus subsp. parasiticus* NRRL 2999 dans un milieu liquide et que cette activité inhibitrice disparaît complètement après traitement thermique à 100°C pendant 10 min ou sous l'action d'une enzyme protéolytique.

Dans une autre étude, Batish *et al.* (1991) ont démontré que la culture de *S. lactis subsp. lactis* à 30°C pendant 48 à 72 h produit le maximum d'une substance inhibitrice (polypeptide) contre *A. fumigatus*.

Karunaratne *et al.* (1990) ont étudié l'inhibition de la croissance des moisissures et la production d'aflatoxine par *Lactobacillus sp.* Ces auteurs ont utilisé trois espèces (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *L. plantarum*) et ont conclu une inhibition de la croissance de toutes les moisissures utilisées. Selon ces auteurs, cette inhibition est due probablement à l'action du pH et la croissance des espèces compétitives.

L'action de l'acide lactique sur l'inhibition de la production d'aflatoxines par les moisissures a également fait l'objet de plusieurs recherches. En effet Coallier-Ascah et Idziak (1985) ont suggéré que cet acide n'est pas un facteur inhibiteur de la biosynthèse des aflatoxines.

D'autres recherches menées par ElGazzar *et al.* (1987) ont montré que l'acide lactique à un pH de 4,5 n'a pas d'effet sur la croissance des moisissures. Cependant une augmentation de la concentration de l'acide lactique entraîne une diminution de la production d'AFG1.

III- Réduction in vitro de l' AFB1 par les bactéries lactiques

a- Essai de fermentation

Plusieurs stratégies ont été reportées dans la littérature pour l'élimination ou l'inactivation des mycotoxines dans les aliments contaminés (Galvano *et al.*, 2001). Plusieurs spécialistes sont aujourd'hui pour l'opinion que la meilleure approche pour la décontamination des mycotoxines soit une réduction ou une dégradation par des microorganismes spécialisés (Bata et Lastztity, 1999).

L'essai de réduction de l'AFB1 par les souches de bactéries lactiques isolées des ferments panaires est représenté dans le tableau 22. Les pourcentages de réduction après fermentation varient de 1.8% à environ 45%.

Les souches de *L. rhamnosus* réduisent l'AFB1 avec des pourcentages variant entre 23,01 à 44,89 %. Les souches *L. lactis* Lb5 et Lb8 réduisent 16,81 et 20,26% d'AFB1 respectivement. Alors que la souche *L. casei* Lc12 réduit environ 22,28 % d'AFB1, et la souche *L. brevis* Lb1 réduit environ 4,46 % d'AFB1. Les souches *L. plantarum* Lb7 et Lb9 réduisent respectivement 2,14 et 5,21% d'AFB1. Alors que les souches *Ln. mesenteroides* Ln13 et *P. acidilactici* P55 réduisent respectivement 2,15 % et 1.80 % d'AFB1.

La souche *L. rhamnosus* Lb50 réduit plus d'AFB1 que les autres souches isolées des ferments panaires testées au cours de cette étude. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés antérieurement sur les interactions entre les bactéries lactiques et les aflatoxines et notamment ceux ayant utilisé *L. rhamnosus* GG et Lc705 (El- nezami *et al.*, 1998 a,b) et *L rhamnosus* Lc^{1/3} (Peltonen *et al.*, 2001).

Tableau 22: Pourcentage de réduction in vitro de l'AFB1 par les bactéries lactiques (pH 6.5 à 30°C).

Souche	% de réduction de l'AFB1 ± SD*
<i>Lactobacillus brevis</i> Lb 1	4.46 ± 1.0 ^c
<i>Lactobacillus casei</i> Lc12	22.28 ± 1.3 ^{a,b}
<i>Lactobacillus lactis</i> Lb5	16.81 ± 0.2 ^d
<i>Lactobacillus lactis</i> Lb8	20.26 ± 0.4 ^{a,b}
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb7	2.14 ± 0.2 ^c
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb9	5.21 ± 0.7 ^c
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lb 44	25.27 ± 1.5 ^{a,b}
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lb 21	23.01 ± 1.3 ^{a,b}
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lb 31	31.12 ± 0.9 ^f
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lb 103	30.77 ± 0.4 ^f
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lb 50	44.89 ± 2.1 ^e
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Ln 13	2.15 ± 0.5 ^c
<i>Pediococcus acidilactici</i> P5	1.80 ± 0.1 ^c

* Chaque valeur est la moyenne de trois essais d'analyses répétées ± SD (déviation standard). Les résultats portant la même lettre ne montrent aucune différence significative à $p < 0,05$.

Les souches *L. casei* Lc12, *L. lactis* Lb5 et *L. lactis* Lb8 réduisent d'AFB1 à des taux moyens (16.81 à 20.26 %). Cependant d'autres souches utilisées dans ce travail comme les souches *L. plantarum*, *P. acidilactici* P55, *Ln. mesenteroides* Ln33 et *L. brevis* Lb1 réduisent de faibles taux d'AFB1 (1.8 à 5.21%). Haskard *et al.* (2001) ont rapporté que des cellules viables de *L. lactis subsp lactis* et *L. casei Shirota* (YIT 901) réduisent respectivement 59 % et 21.8% d'AFB1.

Selon Megalla et Mohran (1984), l'effet de *Lc. lactis* ATCC 11454 sur le devenir de l'aflatoxine B1 dans un lait fermenté, a montré la transformation de cette toxine étudiée en deux métabolites, l'aflatoxicol (R₀) moins toxique que l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2a qui est un produit non toxique.

b- Effet des facteurs externes

Dans le but d'étudier l'effet des facteurs externes sur la réduction des aflatoxines, nous avons sélectionné certaines souches qui ont donné une réduction notable de l'AFB1 supérieure ou égale à 10%. Les souches sélectionnées appartiennent à trois espèces à savoir *L. lactis*, *L. casei* et *L. rhamnosus* il s'agit notamment de *L. casei* Lc12, *L. lactis* Lb5, *L. lactis* Lb8, *L. rhamnosus* Lb21, *L. rhamnosus* Lb31, *L. rhamnosus* Lb21, *L. rhamnosus* Lb103 et *L. rhamnosus* Lb50. Les souches sélectionnées ont été cultivées en présence de l'AFB1 mais à des valeurs de température et de pH variables.

b-1 Effet du pH

L'effet du pH sur la réduction de l'AFB1 a été représenté dans la figure 11. Les résultats ont montré que les taux de réduction maximale de l'AFB1 enregistrés à une valeur de pH 5,5 sont nettement supérieures aux taux trouvés aux valeurs de pH 3 et pH 4,5 pour toutes les souches de bactéries lactiques étudiées.

Chez les souches de l'espèce *L. rhamnosus*, les pourcentages de réduction de l'AFB1 à pH 5,5 pour les souches *L. rhamnosus* Lb21, *L. rhamnosus* Lb31, *L.*

rhamnosus Lb21, *L. rhamnosus* Lb103 et *L. rhamnosus* Lb50 étaient respectivement de l'ordre de 21%, 19%, 28%, 29% et 43 %.

Chez les espèces du genre *L. lactis*, les pourcentages de réduction de l'AFB1 à pH 5,5 étaient respectivement de l'ordre de 17% et 15% pour les souches *L. lactis* Lb5 et *L. lactis* Lb8. Alors que chez *L. casei* Lc12, le taux de réduction est de l'ordre de 20%

Le maximum de réduction de l'AFB1 à pH 5,5 a été enregistré par la souche *L. rhamnosus* Lb50 (43%). Cependant avec la même souche nous avons enregistré de faibles pourcentages de réduction de l'AFB1 aux pH 3 (3.4%) et pH 4,5 (4,5%).

b-2 Effet de la température

L'effet de la température sur la réduction de l'AFB1 a été représenté dans la figure 10. Les résultats ont montré que, comme dans le cas du pH, les taux de réduction maximale de l'AFB1 enregistrés à une température de 25°C sont nettement supérieurs aux taux trouvés à des températures de 15 et 37°C pour toutes les souches de bactéries lactiques étudiées.

Chez les souches de l'espèce *L. rhamnosus*, les pourcentages de réduction de l'AFB1 à 25°C pour les souches *L. rhamnosus* Lb21, *L. rhamnosus* Lb31, *L. rhamnosus* Lb21, *L. rhamnosus* Lb103 et *L. rhamnosus* Lb50 étaient respectivement de l'ordre de 25%, 23%, 31%, 31% et 45 %.

Chez les espèces du genre *L. lactis*, les pourcentages de réductions de l'AFB1 à 25°C étaient respectivement de l'ordre de 17 et 20 % pour les souches *L. lactis* Lb5 et *L. lactis* Lb8. Alors que chez *L. casei* Lc12, le taux de réduction est de l'ordre de 22%

Le maximum de réduction de l'AFB1 à 25°C a été enregistré par la souche *L. rhamnosus* Lb50 (45%). Cependant avec la même souche nous avons enregistré des taux faibles de réduction de l'AFB1 à des températures de 15 °C (5,5%) et 37°C (25%).

Figure 10: Effet de la température sur la réduction de l'AFB1 par les bactéries lactiques. Les barres d'erreurs représentent les déviations du standard.

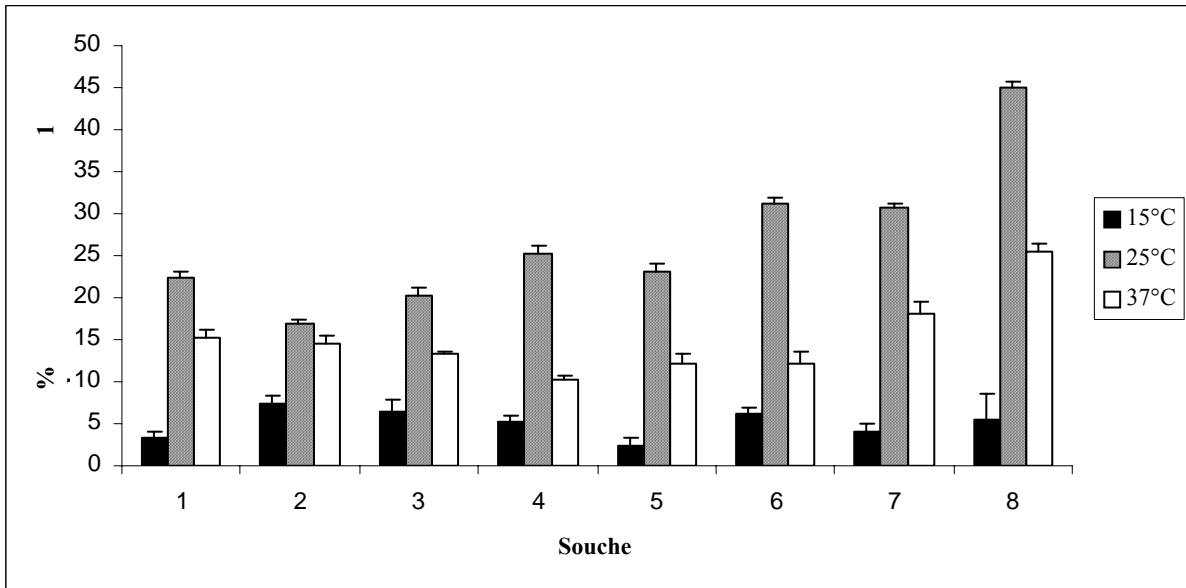
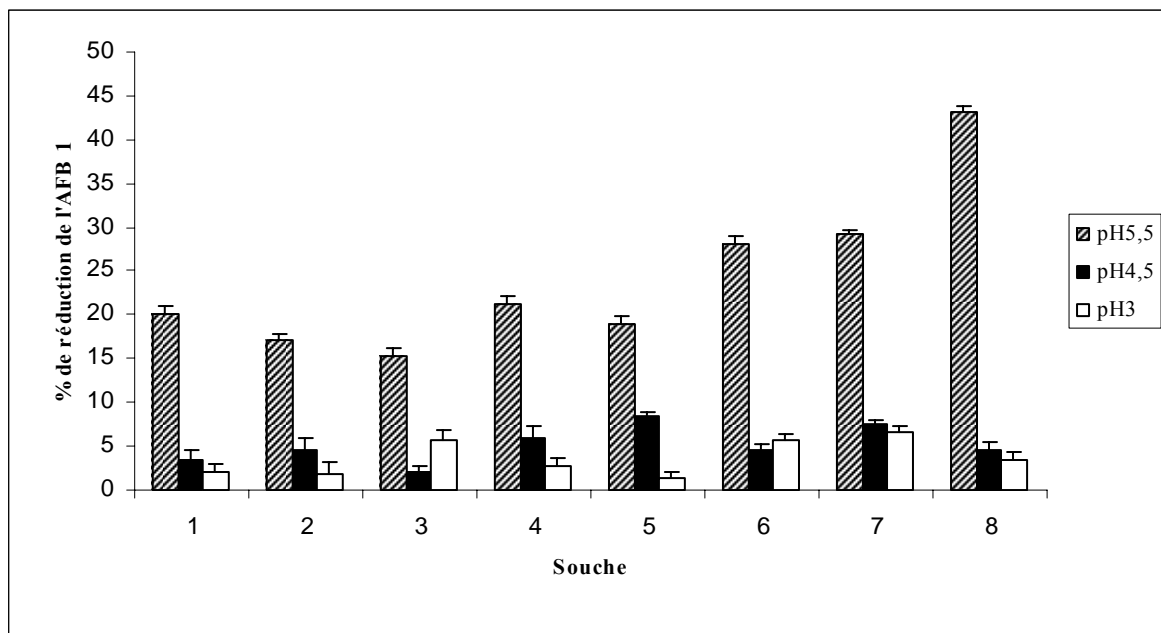


Figure 11: Effet du pH sur la réduction de l'AFB1 par les bactéries lactiques. Les barres d'erreurs représentent les déviations du standard.



1: *L. casei* Lc12; 2: *L. lactis* Lb5; 3: *L. lactis* Lb8; 4: *L. rhamnosus* Lb21; 5: *L. rhamnosus* Lb31; 6: *L. rhamnosus* Lb21; 7: *L. rhamnosus* Lb103; 8: *L. rhamnosus* Lb50.

Nos résultats concernant les effets du pH et de la température sur la réduction de l'AFB1 par les souches de bactéries lactiques étudiées, suggèrent une relation de dépendance entre le processus microbiologique étudié (réduction de l'AFB1) et certains facteurs extrinsèques à savoir le pH du milieu et la température d'incubation. Cette relation serait probablement typique d'une action enzymatique.

Smiley et Draughon (2000) ont déjà mis en évidence une voie de dégradation enzymatique de l'AFB1 par *F. aurantiacum*. Dans le but de déterminer le mécanisme de dégradation de l'AFB1 par *F. aurantiacum*, ces auteurs ont montré que l'extrait protéique de cette bactérie a une action sur l'AFB1. Le traitement de cet extrait par la DNase I et la protéinase K et l'effet combiné de différents pH sur l'action dégradative de l'extrait protéique a permis aux auteurs de suggérer que la dégradation de l'AFB1 est due à une enzyme dont le pH optimum est de 7.

Dans le but de suggérer une voie biochimique possible par laquelle *F. aurantiacum* dégrade l'AFB1, D'souza et Brackett (2000) ont montré une augmentation du pourcentage de dégradation après l'ajout de certains cations (Ca^{2+} et Mg^{2+}). Ces cations sont des cofacteurs importants de plusieurs déshydrogénases et décarboxylases qui interviennent au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs.

L'ion Mg^{2+} est connu par son rôle stabilisateur des membranes, maintient l'intégrité structurale des protéines et des acides nucléiques, stabilise les ribosomes, agit comme cofacteur avec l'ATP et active des enzymes (Heaton, 1990). Alors que le Ca^{2+} joue un rôle important dans la structure et le fonctionnement de plusieurs enzymes. Le Ca^{2+} est aussi un cofacteur de la γ -carboxyglutamate décarboxylase. La décontamination chimique de l'aflatoxine nécessite une décarboxylation et une réduction avec libération de produits non toxiques.

Il est possible selon D'souza et Brackett (2000) que la réduction du groupe furanne ait lieu pendant la dégradation de l'AFB1 par *F. aurantiacum*. Un autre

mécanisme de dégradation peut avoir lieu avec production de composés décarboxylés moins toxiques et qui sont solubles dans l'eau et dans le chloroforme avec production de CO₂ (Line *et al.*, 1994).

D'souza et Brackett (2001) ont investigué l'effet de substances inhibitrices du système enzymatique mis en jeu dans la dégradation de l'AFB1 par *F. aurantiacum*, ce qui aiderait probablement dans son identification, sa purification et sa caractérisation. D'autres enzymes peuvent intervenir dans ce mécanisme notamment les cytochromes P450 monooxygénase et les peroxydases (Hamid et Smith, 1987 ; Doyle *et al.*, 1982).

D'autres recherches menées auparavant ont montré que les bactéries lactiques du yaourt sont capables de transformer l'AFB1 en aflatoxine B_{2a} non toxique (Megalla et Hafez, 1982). Hafez et Megalla (1982) ont montré également que l'ensilage a un potentiel de détoxification de l'AFB1. Rasic *et al.*, (1991) ont montré aussi que la fermentation du lait contaminé artificiellement par les bactéries lactiques réduit la quantité initiale de l'AFB1.

Selon El-nezami *et al.* (1998 a), les souches de bactéries lactiques sont capables de dégrader l'AFB1 dans les milieux liquides contaminés. En effet, *L. rhamnosus* GG et *L. rhamnosus* Lc 705 réduisaient des taux élevés d'AFB1 (80%) par un processus rapide.

El-nezami *et al.* (2000) ont montré que *L. rhamnosus* GG et *L. rhamnosus* Lc 705 forment des complexes avec l'AFB1, ceci a pour conséquence une réduction de l'absorption de l'AFB1 à travers la muqueuse duodénale. Ces auteurs suggèrent que la fixation de l'AFB1 par les bactéries lactiques est une voie prometteuse pour réduire la biodisponibilité de l'AFB1 en particulier dans les aliments contaminés.

Pierides *et al.* (2000) ont testé l'interaction de six souches de bactéries lactiques (*L. acidophilus* LA1, *L. gasseri* ATCC 33323, *L. rhamnosus* GG, *L. lactis* spp.cremoris ARH74, *L.rhamnosus* LC 705 et *L. rhamnosus* 1/3) avec les molécules de l'AFM1 dans le lait reconstitué. Les souches étudiées ont été d'abord testées dans un tampon phosphate (PBS), ensuite dans le lait contaminé. Les auteurs ont conclu que la dégradation des aflatoxines est plus nette chez *L. rhamnosus* GG et *L. rhamnosus* Lc 705 que chez les autres souches utilisées. D'autre part, l'élimination de l'AFB1 était encore plus grande que celle de l'AFM1. Ceci est probablement dû au fait que l'AFM1 est plus polaire que l'AFB1 et sa solubilité est grande dans les solutions aqueuses.

Kankaanpää *et al.* (2000), en étudiant l'effet des deux souches probiotiques *L.rhamnosus* Lc 705 et *L. rhamnosus* GG sur l'AFB1, ont suggéré que les molécules d'aflatoxine se fixent sur la paroi cellulaire des bactéries lactiques. Haskard *et al.* (2001) ont montré que la fixation de l'AFB1 à la surface de la paroi bactérienne est rapide et réversible. L'AFB1 peut être libérée après des lavages aqueux répétés de la paroi cellulaire.

Ce phénomène de complexation et de libération des molécules d'aflatoxines par les composants de la paroi cellulaire a été mis en évidence également chez les bifidobactéries et les bactéries lactiques par Peltonen *et al.* (2001). En effet, ces auteurs ont étudié l'interaction de 20 souches de bifidobactéries et de bactéries lactiques (12 *Lactobacillus*, 5 *Bifidobacterium* et 3 *Lactococcus*) avec l'AFB1. Après incubation à 37°C pendant 24 h, les auteurs ont remarqué que 5,6 à 59,7 % du taux d'AFB1 est complexé par les souches testées. Deux souches de *L. amylovorus* et une souche de *L. rhamnosus* ont été capables de complexer plus de 50% d'AFB1.

Quoique le mécanisme de réduction ou de dégradation de l'AFB1 par les bactéries lactiques soit encore méconnu, il a été suggéré qu'au début de leur interaction les molécules d'aflatoxines se complexent aux composés de la paroi cellulaire bactérienne. Haskard *et al.* (2001) ont suggéré que la fixation de l'AFB1 à la paroi se

fait par des liaisons faibles non covalentes telle une complexation avec les sites hydrophobes à la surface de la paroi bactérienne.

Dans des travaux récents, les interactions entre d'autres mycotoxines et des souches lactiques ont été étudiées par El-nezami *et al.* (2002). Les auteurs ont montré que les souches de *L. rhamnosus* GG et *L. rhamnosus* Lc-705 sont capables de réduire la ZEN et son dérivé l' α -zéaralenol après une réaction instantanée avec les bactéries.

Turbic *et al.* (2002) ont montré que les souches *L. rhamnosus* réduisent l'AFB1 (77-99%) et l'OTA (36-76 %) avec des pourcentages variables. Parallèlement, de faibles quantités (9-28%) d'autres substances aromatiques comme la caféine, la vitamine B12 et l'acide folique ont été réduites par les mêmes souches. Les auteurs ont suggéré qu'un processus de détoxification est probablement déclenché par les souches de *L. rhamnosus* quand elles entrent en contact des molécules des mycotoxines.

Les réactions mises en jeu au cours de la compléxation (adsorption) et la libération (désorption) de l'AFB1 à la surface des bactéries ont été investiguées par Lee *et al* (2003). Les cellules viables ainsi que les cellules tuées par traitement thermique de *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705, et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS ont été incubées dans une solution PBS contenant des concentrations variables de l'AFB1 (0.0017 à 13.3 μ g/ml). Les auteurs ont montré l'existence d'une relation linéaire entre le taux d'adsorption spécifique de l'AFB1 et la concentration d'AFB1 utilisées pour toutes les bactéries étudiées et que le traitement thermique des cellules altère les propriétés d'adsorption de la surface de la paroi bactérienne.

Dans une récente étude, El-nezami *et al* (2004) ont montré que les cellules viables de *Lactobacillus rhamnosus* GG ainsi que les cellules tuées par traitement thermique ou par acidité ont une grande capacité d'adsorption de la ZEN. Dans le but d'identifier le type des interactions chimiques mises en jeu dans ce phénomène, les cellules de cette souche ont été le sujet d'un ensemble de traitements chimiques et

enzymatiques. Les auteurs ont noté une diminution significative du taux d'adsorption de la ZEN après prétraitement des cellules viables et les cellules tuées par le m-périodate suggérant que la ZEN se fixe sur les composés carbohydatés de la paroi cellulaire. Cependant le prétraitement avec la pronase E n'a montré aucun effet sur la capacité d'adsorption de la ZEN par les cellules viables.

Dans une autre étude similaire, Lahtinen *et al* (2004) ont investigué les réactions impliquées dans l'adsorption de l'AFB1 à la surface de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Dans le but de connaître exactement les composés qui peuvent être mis en jeu au cours de la complexation, les auteurs ont montré que l' AFB(1) se complexe au peptidoglycane de la paroi cellulaire de la bactérie étudiée.

Conclusion

Cette étude démontre la capacité de certaines souches de bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels marocains appartenant essentiellement aux espèces *L. rhamnosus*, *L. lactis* et *L. casei* à réduire la concentration initiale de l'AFB1 dans le bouillon MRS. Les souches de *L. rhamnosus* réduisent les taux de l'AFB1 avec des pourcentages élevés en comparaison avec les autres souches *Lactobacillus sp.* utilisées dans ce travail. Les espèces *L. lactis* et *L. rhamnosus* isolées des ferments panaires traditionnels marocains ont montré également un pouvoir de réduction de la production de l'AFB1 par *A. parasiticus* NRRL 2999.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées au Maroc dans la fabrication artisanale et la conservation de produits alimentaires comme le pain traditionnel et les produits laitiers artisanaux (leben). De plus, divers procédés biotechnologiques ont été élaborés avec succès en utilisant des souches de bactéries lactiques pour la fermentation et la conservation de certains aliments comme les olives, le citron ou bien pour la stabilisation des différents déchets émanant de l'industrie agroalimentaire (Faid *et al*, 1995,1997 ; Kherrati *et al*, 1998) pour produire un ingrédient riche en protéines pour l'alimentation animale.

Vu les effets bénéfiques des bactéries lactiques, micro-organismes classés actuellement parmi les probiotiques, notamment les effets bénéfiques des lactobacilles sur la santé humaine (Goldin et Gorbach, 1984) en égard à leurs propriétés nutritionnelles, leurs propriétés de conservation par la sécrétion de bactériocines, leurs stimulation du système immunitaire et leurs effets sur la stabilisation de la flore intestinale et leurs effets antitumoraux (Isolauri *et al*, 1998), leurs capacités de dégradation de composés toxiques comme la linamarine du manioc (Giraud et Raimbault, 1994) etc.

Ces micro-organismes bénéfiques doivent être intégrées dans des procédés de détoxification des aliments susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines et réduire la biodisponibilité de ces toxines dans la diète de la population marocaine généralement inconsciente des problèmes de santé engendrés à long terme par ces toxines.

CONCLUSION GENERALE ET PESPCTIVES

Dans ce travail nous avons évalué la contamination par certaines mycotoxines de certains aliments commercialisés au Maroc. Les résultats montrent que certaines denrées analysées sont contaminées:

- D'une part par les mycotoxines produites par les moisissures dites du champ appartenant essentiellement au genre *Fusarium*, responsables de la production des mycotoxines avant récolte, il s'agit notamment de la ZEN et de la FB1.

- D'autre part par les mycotoxines produites par les espèces de moisissures toxigènes dites de stockage appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* et qui sont responsables de la sécrétion des toxines pendant l'entreposage (après récolte). Il s'agit en particulier des aflatoxines et de l'OTA.

La quantification des taux des mycotoxines par HPLC nous a permis de constater que la contamination de certains aliments dépasse les normes réglementaires fixées par la législation européenne en particulier l'OTA et la FB1. En ce qui concerne la co-occurrence des mycotoxines, nous avons trouvé que certains échantillons analysés du maïs sont contaminés par plus d'une mycotoxine, et nous avons montré que la contamination par l'OTA et la FB1 résulte de deux processus de contaminations séparés par les souches d'*Aspergillus* et/ou *Penicillium* d'une part et les souches de *Fusarium* d'autre part.

Dans le but de rechercher de nouveaux procédés pour la détoxification des aliments contaminés par les mycotoxines, nous avons étudié l'effet des ferments panaires et des souches sélectionnées sur les aflatoxines. Les résultats ont montré que certaines souches de bactéries lactiques appartenant aux espèces *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. lactis* sont capables de réduire l'AFB1 in vitro. Ces résultats suggèrent que ces souches peuvent être utilisées dans des processus biologiques de détoxification des mycotoxines. L'étude de l'effet de certains facteurs extérieurs comme la température et

le pH a montré que les bactéries lactiques étudiées réduisent l'AFB1 probablement par voie enzymatique.

En perspectives il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments à analyser (produits à base de maïs, produits destinés aux enfants et aux bébés, fromages, lait en poudre, lait pasteurisé, café, boissons...) et de rechercher d'autres toxines (DON, T-2, et HT-2) pour réactualiser les connaissances sur la contamination des aliments marocains par les mycotoxines et déterminer la dose de prise journalière (daily intake) pour chaque mycotoxine. Il est également intéressant d'étudier le degré d'exposition de la population marocaine aux mycotoxines en analysant ces toxines dans les produits biologiques en particulier dans le sérum et dans le lait maternel d'une population cible.

L'établissement d'un bilan de connaissances sur la contamination des produits agricoles marocains par les mycotoxines et le renforcement du contrôle de ces produits au niveau national, nous permettraient de rassembler des données pour l'information et la sensibilisation des autorités nationales, ainsi que les producteurs (agriculteurs, industriels...) et les organisations civiles de défense des droits des consommateurs. Les résultats obtenus constitueront un ensemble de données qui serviront dans le lancement d'un projet national pour la réglementation des mycotoxines dans les aliments et la protection du consommateur marocain et étranger d'éventuels effets toxiques chroniques associés aux mycotoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Castella G et Cabanes FJ (2003)** *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *J Food Prot.* 66(3) : 504-506.
- **Aguillar F, Hussain SP et Cerutti P (1993)** Aflatoxin B1 induces the tranversion of G--T in codon 249 of the p 53 tumour suppresser in human hepatocyte. *Proc Nat Acad Sci* , 90: 8586- 8590.
- **Antaï SP et Ibrahim MH (1986)** Microorganisms associated with african locust fermentation for dawadawa production. *J Appl Bacteriol*, 61:145-148.
- **AOAC (2000)**. Preparation of standards for mycotoxins. AOAC International Official Methods of analysis. Chapter 49. *Natural Toxins*, p 4-5.
- **Asehraou A, Faid M et Jana M (1992)**. Physico-chemical properties and the microflora of Moroccan table black olives. *Grasas y Aceites*, 43 (3): 130-133.
- **Asehraou A, Mohieddine S, Faid M et Seghrouchni M (1997)**. Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and moulds in fermenting olives. *Grasas y Aceites*, 48 (2): 68-73.
- **Auffray Y et Boutibonnes P (1985)** Prophage induction and filamentation in *Bacillus thuringiensis* caused by the genotoxic mycotoxin aflatoxin B1. *Mycopathologia*, 91: 159-163.
- **Azar M, Ferguson T et Ghasseni H (1977)** Microbiological aspect of shangak bread. *J Food Sci Technol*, 14: 251-253.
- **Baber S et Beuguena R (1988)** Microflora de la mesa panaria. Vaislamiento identification y evaluation de las propiedades funcionales de microorganismos de la masa madre. *Rev Agr Technol Aliment*, 28(1) :67-78.
- **Bartine H et Tantataoui-Elaraki A (1997)** **Growth and toxinogenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices.** *J Environm Pathol Toxicol Oncol*, 16: 61-65.
- **Bata A et Lastztity R (1999)** Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 223-228.
- **Bhatnagar D, Lillehoj EB et Bennett JW (1991)** Biological detoxification of mycotoxins. In: Smith JE, Henderson RS Ed°, *Mycotoxins and Animal Foods*, Boston: CRC press, 816-826.
- **Batish VK, Grover S et Ram L (1989)** Screening lactic acid starter cultures for antifungal activity. *Cult Dairy Prod J*, 24 (2): 21-25.

- **Batish VK, L Ram et S Grover (1991)** Interaction of *S. Lactis subsp. diacetylactis* DRC-1 with *A. parasiticus* and *A. fumigatus* in milk. *Cult Dairy Prod J*, 26 (1) 13-14.
- **Baumgartner A, Kueffer M, Simmen A et Grand M (1998)** Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from foodstuffs, humans and technology. *Lebensm-Wiss u-Technol*, 31: 489-494.
- **Beretta B, De Domenico R, Gaiaschi A, Ballabio C, Galli CL, Gigliotti C et Castani P (2002)**. Ochratoxin A in cereal-based baby foods: Occurrence and safety evaluation. *Food Add Contam*, 19 (1):70-75.
- **Blanco Jose L, Dominguez L, Gomez-Lucia E, Garayzobal JFF, Goyache J et Suarez G (1988)** Experimental aflatoxin production in home made yoghurt. *Z Lebensm Unters Forsh*, 186: 323-326.
- **Böcker G, Stolz P et Hammes WP (1994)** Progress in sourdough fermentation. *Actes du colloque Lactic 94* Caen 7-9 Sep: 133-142
- **Bottalico A (1998)** *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *J Plant Pathol*, 80 (2): 85-103.
- **Brera C et Miraglia M (1996)** Quality assurance in mycotoxin analysis. *Microchem J*, 54: 465-471.
- **Brera C, Debegnach F, Grossi S et Miraglia M. (2004)** Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B1 in dry milling corn fractions. *J Food Prot*, 67(6):1261-1266.
- **Bullerman LB (1978)** Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J Food Prot*, 42: 65-86.
- **Castegnaro M, Barek J, Fremy JM, Lafontaine M, Miraglia M, Sansone EB, Telling GM (1991)** Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. *IARC scientific publication* n° 113, Lyon, France.
- **CEE (1992)** Détermination de l'aflatoxine B1 par chromatographie liquide haute performance. Directive 92/95/CEE de la commission du 09 Novembre 1992 modifiant l'annexe de la 7ème directive 76/372/CEE portant fixation de méthodes d'analyses communautaires pour la contrôle officiel des aliments. *J Off Comm Eur*, N° L 327/54 du 13/11/1992.
- **CEE (1998)** Commission regulation (EC) n° 1525/98 of 16 july amending regulation (EC) N° 194/97 of 31 january 1997 setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Communities*, 201: 43-46.

- **Chen SY, Chen CJ, Chou SR, Hsieh LL, Wang LY, Tsai WY, Ahsan H et Santella RM (2001)** Association of Aflatoxin B1–albumin adduct levels with hepatitis B surface antigen status among adolescents in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarker*, 10 (11): 1223-1226

- **Ciegler A, Lillehoj B, Peterson RE et Hall HH (1966 a)** Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl Microbiol*, 14: 934-939.

- **Ciegler A, Peterson RE, Lagoda AA et Hall HH (1966 b)** Aflatoxin production and degradation in 20 L fermentors. *Appl Microbiol*, 14: 826-833.

- **Coallier-Ascah J et Idziak EE (1985)** Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. *Appl Env Microbiol*, 49 : 163- 167.

- **Coffey A et Daly C (1994)** Lactic acid bacteria in the preservation of foods. *Actes du colloque Lactic 94*. 7-9 Sept Caen, France: 17-24.

- **Collar C, Mascaros AF et Benedito de Barber C (1992)** Amino acid metabolism by yeasts and lactic acid bacteria during bread dough fermentation. *J. Food Sci.* 57 (6): 1423-1427.

- **Creppy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S et Frayssinet C (1985)** Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand breaks evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol Lett*, 28: 29-35.

- **Creppy EE, Betbeder AM, Gharbi A, Counord J, Castegnaro M, Bartsch H, Moncharmont P, Fouillet B, Chambon P et Dirheimer G (1991)** Human ochratoxicosis in France. In "Castegnaro M, Plestina M, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (Eds)". Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumors, Vol (115). *IARC Scientific Publications*, Lyon. pp: 145-151.

- **Creppy EE (1992)** Human ochratoxicosis in northern Africa, correlation with cases of nephropathy. Report of a network from Tunisia and Algeria. *14th mycotoxin workshop, Giessen*, pp: 68-69.

- **Creppy EE, Castegnaro M, Grosse Y, Meriaux J, Manier C, Moncahrmont P et Waller C (1993)** Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et Région Rhône-Alpes. In "Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (Eds)" Human ochratoxicosis and its pathologies. Vol (231). *Colloque INSERM / John Libbey Eurotext*, pp: 148 -158.

- **Creppy EE (2002)** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*, 127: 19-28.

- **Creppy EE, Chiarappa P, Baudrimont I, Borracci P, Moukha S, Carratu MR (2004)** Synergistic effects of fumonisin B(1) and ochratoxin A: are in vitro

cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity ? *Toxicology*, 201(1-3):115-23.

- **D'souza DH et Brackett RE (2000)** The influence of divalent cations and chelators on aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum*, *J Food Prot*, 63 (1): 102- 105.

- **D'souza DH et Brackett RE (2001)** Aflatoxin degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and Seryl and Sulphydryl group Inhibitors. *J Food Prot*, 64 (2): 268-271.

- **Davegowda G, Raju MVLN et Swang HVLN (1998)** Mycotoxins: novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs*, 70: 12-15.

- **Delcourt A, Rousset A, Lemaitre JP . (1994)** Microbial and mycotoxic contamination of peppers and food safety. *Boll Chim Farm*, 133(4):235-238.

- **Dérache R (1989)** Toxicité des champignons. In "Toxicité et Sécurité des Aliments" *Techniques et Documentations Lavoisier*. Paris pp: 199-231.

- **Diener UI, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LJ et Klich MA (1987)** Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Rev Phytopathol* 25: 249-270.

- **Doyle MP et Marth EH (1978)** Bisulfites degrades Aflatoxins: Effect of temperature and concentration of bisulfite. *J Food Prot*, 41: 891-896.

- **Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE et Marth EH (1982)** Physical, Chemical and Biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J Food Prot*, 45: 964- 971.

- **Drusch S et Ragab W (2003)** Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J Food Prot*, 66(8):1514-1527.

- **Dutton MF (1996)** Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol Ther*, 70: 137-161.

- **El Gazzar FE, Rusul G et Marth EH (1987)** Growth and aflatoxins production by *A. parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different initial pH values . *J Food Prot*, 50: 940-944.

- **Elgendy SM et Marth EH (1981)** Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *L. casei*. *J Food Prot*, 44 (3) : 211-212.

- **El-Kady IA, El-Maraghy SS et Eman Mostafa M (1995)** Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiol (Praha)*, 40(3):297-300.

- **El-nezami HS, Nicoletti G, Neal GE, Donohue DC et Ahokas J (1995)** Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol*, 33:173-179.
- **El-nezami H, Kankaapää P, Salminen S et Ahokas J (1998 a)** Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind food carcinogens. *Food Chem Toxicol*, 36: 321-326.
- **El-nezami H, Kankaapää P, Salminen S et Ahokas J (1998 b)** Physico-chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J Food Prot*, 61: 466-468.
- **El-nezami H, Mykkänen H, Kankaapää P, Salminen S et Ahokas J (2000).** Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to Remove Aflatoxin B1 from the chicken Duodenum. *J Food Prot*, 63: 549-552.
- **El-nezami H, Polychronaki N, Salminen S et Mykkanen H (2002).** Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade lactobacillus strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Appl Environ Microbiol*, 68 (7): 3545-3549.
- **El-nezami H, Polychronaki N, Lee YK, Haskard C, Juvonen R, Salminen S et Mykkanen H (2004).** Chemical Moieties and Interactions Involved in the Binding of Zearalenone to the Surface of *Lactobacillus rhamnosus* Strains GG. *J Agric Food Chem*, Jul 14; 52(14):4577-4581.
- **El-Sayed AM, Soher EA et Sahab AF (2003)** Occurrence of certain mycotoxins in corn and corn-based products and thermostability of fumonisin B1 during processing. *Nahrung*, 47(4):222-225.
- **Elshafie AE, Al-Rashdi TA, Al-Bahry SN et Bakheit CS (2002)** Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. *Mycopathologia*. 155(3):155-160.
- **Exterkate FA (1983)** The proteolytic system of starter streptococci: the crucial point in cheesemaking. *Neth Milk Dairy J*, 37: 94-96.
- **Faid M et Tantaoui-Elaraki A (1989)** Production of toxic metabolites by *Penicillium italicum* and *P. digitatum* isolated from citrus fruits. *J Food Prot*, 52 (3): 194-197.
- **Faid M, Boraam F, Achbab A et Larpent JP (1993)** Yeast-Lactic acid bacteria interaction in Moroccan sour-dough bread fermentation. *Lebensm Wiss u-Technol* 26: 443- 446.

- **Faid M, Boraam F, Zyani I et Larpent JP (1994)** Characterization of sourdough bread ferments made in the laboratory by traditional methods. *Z Lebensm Unters Forsch.* 198: 287-291.

- **Faid M et Tahiri-Hassani S (1994)** Phytases production by lactic acid bacteria in sourdough fermentation. In "Actes du Colloque LACTIC 94: Les bactéries lactiques. Quelles souches pour quels marchés? ". 7- 9 Sept. Caen, France. p 427.

- **Faid, M., H. Karani, A. Elmarrakchi, A. Achkari-Begdouri, (1995).** A biotechnological process for the valorization of fish waste. *Bioresource Technology*, 49: 237-241

- **Faid, M., A. Zouiten, A. Elmarrakchi, A. Achkari-Begdouri, (1997).** Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient. *Food Chemistry*, 60(1): 13-18.

- **Filali A, Ouammi L, Betbeder M, Baudrimont I, Soulaymani R, Benayada A et Creppy EE (2001)** Ochratoxin A in beverages from Morocco : a preliminary survey. *Food Add Contam*, 18. (6): 565-568.

- **Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayada A, Soulaymani R et Creppy EE (2002)** Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Hum & Experim Toxicol*, 21: 241-245.

- **Fink-Gremmels J (1998)** Mycotoxins: Mechanisms of action at the molecular level. *Mycotoxins and Phycotoxins-Developpements in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, ed by M. Miraglia, H. van Egmond, C. Brera, and J. Gilbert. USA: 247-261.

- **Frayssinet C et Fremy JM (1991)** Dosage des mycotoxines. Dans «Techniques d'Analyses dans les Industries Agroalimentaires : Analyse des constituants alimentaires ». Vol : (4) 2^{ème} Ed° Cordonnateur : JL Multon. Ed° Lavoisier. Tec. Doc. Paris.

- **Freire FC, Kozakiewicz Z et Paterson RR (2000)** Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 149(1):13-19.

- **Fremy JM (1982)** Aflatoxines et produits laitiers. *Bull Lab Vét*, 6 : 57-64.

- **Fufa H et Urga K (1996)** Screening of aflatoxins in Shiro and ground red pepper in Addis Ababa. *Ethio Med J*, 34: 243-249.

- **Galvano F, Galofaro F et Galvano G (1996)** Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products : a worldwide review. *J Food Prot*, 59: 1079- 1090.

- **Galvano F, Piva A, Ritlen A et Galvano G (2001)** Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *J Food Prot*, 64 (1): 120 -131.

- **Garner L et wright P (1973)** Chemical evidence for the formation of active aflatoxin M1 metabolite by hamster lever microsomes. *FEBS letters*, 36: 261-264.
- **Gatti MJ, Fraga ME, Magnoli C, Dalcero AM et da Rocha Rosa CA (2003).** Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food Addit Contam*, 20(12):1120-1126.
- **Ghédira-Chekir L, Maaroufi K, Creppy EE et Bacha H (1999)** Cytotoxicity and genotoxicity of zearalenone: prevention by vitamin E. *J Toxicol Toxin Rev*, 18: 355-368.
- **Giraud E et Raimbault M (1994)** Les bactéries lactiques et la détoxification : dégradation de la linamarine du manioc. In "Actes du Colloque LACTIC 94: Les bactéries lactiques. Quelles souches pour quels marchés? ". 7- 9 Sept. Caen, France.
- **Gizzarelli S, Croci L, Toti L, Maiolatesi R, Micco C, Desiderio C, Miraglia M et Brera C (1993)** Effect of lactic acid bacteria on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in laboratory conditions. *Microbiol Alim Nutr*, 11: 187-193.
- **Gobetti M, Simonetti MS, Corsetti A, Santinelli F, Rossi J et Damiani P (1995)** Volatile compound and organic acid production by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology*, 12: 497-507.
- **Goldin BR et Gorbach SL (1984)** The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *J Clin Nutr*; 39 : 756-761.
- **Gourama H, Tantaoui-Elaraki A et Fares M (1985)** Toxinogènèse et activité lipolytique de souches d'*Aspergillus flavus* et d'*A. ochraceus* isolées des olives . *Actes Ins Agr Vét*, 5: 51-57.
- **Gourama H et Bullerman LB (1995 a)** Antimycotic and Antiaflatoxigenic effect of lactic acid bacteria: A review. *J Food Prot*, 57 (11): 1275-1280.
- **Gourama H et Bullerman LB (1995 b)** Inhibition of growth and Aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J Food Prot*, 58 (11): 1249-1256.
- **Gourama H et Bullerman LB (1997)** Antiaflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *Int J Food Microbiol*, 34: 131-143.
- **Hafez AH et Megalla SE (1982)** The potential value of silage in detoxifying Aflatoxin B1. *Mycopathologia*, 79: 31-34.

- **Hamid AB et Smith JE (1987)** Degradation of aflatoxin by *A. flavus*. *J Gen Microbiol*, 133: 2023-2029.
- **Hao YY et Brackett RE (1988)** Removal of aflatoxin B1 from peanut milk inoculated with *F.aurantiacum*. *J Food Sci*, 53: 1384- 1386.
- **Harris JP et Mantle PG (2001)** Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58: 709-716.
- **Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanää PE, Salminen S et Ahokas JT (2001)** Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria *Appl Environ Microbiol*, 67 (7): 3086-3091.
- **Haumann BF (1995)** Eradicating mycotoxins in foods and feeds. *INFORM*, 6 (3): 248-257.
- **Heaton FW (1990)** Role of magnesium in enzyme systems p: 119-133. In "H Sigel and A Sigel Ed°, Metalions in biological systems" V 26 Marcel Dekker Inc., New-York.
- **Hendrickse RG (1984)** The influence of aflatoxins on child Health in the tropics with particular reference to kwashiorkor. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 78: 427-435.
- **Herrman JL et Walker R. (1999)** Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *Food Nutr Agr*, 23: 17-24.
- **Hussein HS et Brasel JM (2001)**. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
- **Huwig A, Freimund S, Käppeli O et Dutler H (2001)** Mycotoxin detoxification of animal feed by different sorbents. *Toxicol lett* , 122: 179-188.
- **IARC (1993 a)** Aflatoxins *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France. Vol 56. pp. 359-362.*
- **IARC (1993 b)** Ochratoxin A *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France. Vol 56. pp. 489-521.*
- **IARC (1993 c)** Toxins derived from *Fusarium moniliforme*. Fumonisin B1, B2 and fusarin C *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to*

humans. Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France. Vol 56. pp. 445-466.

- **IARC (1999) Overall evaluations of carcinogenicity to humans. IARC monographs, pp. 1-36.**

- **INRA (2002)** Caractérisation du climat et stratégies de lutte contre les effets de la sécheresse au Maroc. Note interne pour le Ministère de l'Agriculture. Département d'Agronomie, INRA, Maroc.

- **Isolauri E, Salminen E et Salminen S (1998)** Lactic acid bacteria and Immune Modulation. In "Lactic acid bacteria. Microbiology and functional Aspects" 2nd Ed° S.Salminen and A. von Wright. Marcel Dekker, Inc. USA.

- **Jaquet J, Lafont J et Lafont P (1982)** Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française*, 42 : 63-67

- **Jelinek CF, Pohland AE, Wood GE (1989)** Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update, *J AOAC Int*, 72: 223-230.

- **JECFA (2000)** Position paper on zearalenone, Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food additives and contaminants. 20-24 Mars, 32 Ed°, Pekin, Chine.

- **Jemmali M et Lafont P (1971)** Evolution de l'aflatoxine B1 au cours de la panification. *Cah Nut Diét*, 7: 319- 322.

- **Jiambo Y, Dianjun S et Zhiwu W (1995)** Determination of toxin T-2 in the staple food from the sick families in kashin-Beck Diseases areas. *Chin J Endemiol*, 14: 146-149.

- **Juglal S, Govinden R et Odhav B (2002)** Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *J Food Prot*, 65(4): 683-687.

- **Kankaanpää P, Tuomola E, El-Nezami N, Ahokas J et Salminen S (2000)** Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *L. rhamnosus* GG in a caco-2 model. *J Food Prot*, 6 (3): 412-414.

- **Karagöz S (2001)** Growth and Aflatoxin production of *Aspergillus flavus* on some spices marketed in Turkey. *Mycotoxin Research*, 17 (5): 2-8.

- **Karlovsy P (1999)** Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat Toxins*, 7: 1-23.

- **Karunaratne A, Wezenberg E et Bullerman BL (1990)** Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *J Food Prot*, 53: 230-236.

- **Khaddor M (1992)** Interactions entre l'aflatoxine M1 et les bactéries lactiques du leben et du yaourt. Thèse du DES. Faculté des sciences. Université Med V. Rabat.
- **Kherrati B., Faid M., Elyachioui M. et Wahmane A. (1998)**. Process for recycling slaughterhouse waste land by products by fermentation. *Bioresource Technology* Vol.63, p 75-79.
- **Kichou F, Wasler MM (1993)** The natural occurrence of aflatoxin B1 in Moroccan poultry feeds. *Vet Hum Toxicol*, 35: 105-108.
- **Kim EK, Scott PM, Lau BP et Lewis DA (2002)** Extraction of fumonisins B1 and B2 from white rice flour and their stability in white rice flour, cornstarch, cornmeal and glucose. *J Agr Food Chem*, 56: 3614-3620.
- **Kurtzman CD, Horn BW et Hesseltine CW (1987)** *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 174-158.
- **Lafont P (1970)** Mycotoxines et alimentation. *Cah Nut Diét*, 5: 41-45.
- **Lahtinen SJ, Haskard CA, Ouwehand AC, Salminen SJ et Ahokas JT (2004)**. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *L. rhamnosus* strain GG. *Food Add Contam*, 21(2):158-164.
- **Lee YK, El-Nezami H, Haskard CA, Gratz S, Puong KY, Salminen S et Mykkanen H (2003)** Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. *J Food Prot*, 66(3):426-30.
- **Le Tutour B, Tantaoui-Elaraki A et Belhelba A (1983)** Recherche de l'aflatoxine B1, de l'ochratoxine A et de la Zéaralénone dans les farines de blé. *Actes Inst Agro Vét*; 3: 65-69.
- **Leyral G et Vierling E (2001)** Microbiologie et Toxicologie des aliments. 3^{ème} Edition. Lavoisier, Paris, France.
- **Lillehoj EB, Ciegler A et Hall HH (1967)** Aflatoxin B1 uptake by *F.aurantiacum* and resulting toxic effects. *J Bacteriol*, 93: 464-471.
- **Lillehoj EB, RD Stubblefield, GM Shanon et Shotwell OL (1971)** Aflatoxin M1 removal from aqueous solutions by *F. aurantiacum*. *Mycopathol Mycol Appl*, 45: 259-266.
- **Line JE, Brackett RE, et Wilkinson RE (1994)** Evidence for degradation of aflatoxin B1 by *F. aurantiacum*. *J Food Prot*, 57: 788 -791.

- **Line JE et Brackett RE (1995)** Factors affecting aflatoxin B1 removal by *F. aurantiacum*. *J Food Prot*, 58 : 91-94.
- **Lonner C et Preve-Akesson K (1988)** Effects of lactic acid bacteria on the properties of sour dough of wheat flour bread. *Food Microbiology*, 6 :19 -35.
- **Lopez-Garcia R et Park D (1999)** Systèmes de gestion intégrée des mycotoxines. 3^{ème} conférence internationale mixte FAO / OMS / PNUE sur les mycotoxines. 3-6 Mars. Tunis, Tunisie.
- **Lubulwa ASG et JS Davis (1994)** Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts. In "Stored-product Protection". E. Highley, E.J. Wright, H.J. Banks and B.R. Champ (Eds) CAB international. UK: 1017-1042
- **Maaroufi K, Achour A, Betbeder AM, Hammami M, Ellouz F, Creppy EE et Bacha H (1995)**. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: A correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch Toxicol*, 69: 552-558.
- **MacDonald S et Castle L. (1996)** A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Addit Contam*, 13(1):121-8.
- **Maher VM et Summers WC (1970)** Mutagenic action aflatoxin B1 on transforming DNA and inhibition of DNA template activity in vitro. *Nature*, 225: 68-70.
- Martins ML, Martins HM et Bernardo F (2001). **Aflatoxins in spices marketed in Portugal.** *Food Add Contam*, 18 (4): 315-319.
- **Maragos CM et Richard JL (1994)** Quantification and stability of fumonisins B1 and B2 in milk. *J AOAC Int*, 77: 1162-1167.
- **Megalla SE et Hafez AH (1982)** Detoxification of Aflatoxin B1 in acidogenous yogurt. *Mycopathologia*, 77: 89-91.
- **Megalla SE et Mohran MA (1984)** Fate of Aflatoxin B1 in fermented dairy products. *Mycopathologia*, 88: 27-29.
- **Meignen B, Onno B, Gélinas P, Infantes M, Guilois S et Cahagnier B (2001)** Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiol*, 18: 239-245.
- **Miller DL (1998)** Global significance of mycotoxins: Mycotoxins and Phycotoxins-Developpements in Chemistry, Toxicology and Food Safety, Ed° M. Miraglia, H. Van Egmond, C. Brera, and J. Gilbert. USA, pp: 3- 15.

- **Miraglia M, Brera C, Corneli S et De Dominicis A, (1993)** Ochratoxin A in Italy: status of knowledge and perspectives. In "Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (Eds)" Human ochratoxicosis and its pathologies. Vol (231). *Colloque INSERM / John Libbey Eurotext*, pp: 129-139.
- **Miraglia M, De Dominicis A, Brera C, Corneli S, Cava E, Menghetti E, et Miraglia E (1995)**. Ochratoxin A levels in Human milk and related food samples: an exposure assessment. *Natural Toxins*, 3: 436-444.
- **Miraglia M et Brera C (2000)**. Mycotoxins in Grains and Related Products.. In "Food Analysis by HPLC". Leo ML Nollet 2nd eds. Marcel Dekker, Inc. New York. Chapter n° 12. pp: 493-522.
- **Mohran MA, Megalla SE et Said MR (1984)** Effect of aflatoxin B1 on the proteolytic activity of some lactic acid bacteria. *Mycopathologia*, 86: 99-101.
- **Moss MO (1986)** Mode of formation of Ochratoxin A. *Food Add Contam*, 13: 5-9.
- **Norred WP et Voss KA (1994)** Toxicity and role of fomonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J Food Prot*, 57: 522-527.
- **OMS (1980)** Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. publications. De l'OMS. Genève. pp 142
- **OMS (1990)** Selected mycotoxins : Ochratoxins, Trichthecens, ergot. Environmental Health Criteria 105. WHO publications. Geneva. pp 263.
- **OMS (2000)** Fumonisin B1. Environmental Health Criteria, 219. WHO publications. Geneva. pp 150.
- **Onno B et Roussel P (1994)** Technologie et microbiologie de la panification au levain. Dans « Bactéries lactiques », Tome II. Cordonnateurs : H. Roissart et F.M. Luquet. Ed° Lorica : 293- 321.
- **Ospital M, Gazabeil GM, Betbeder AM, Tricard C, Creppy EE et Medina B (1998)** Ochratoxine A dans les vins. *Revue Française d'Oenologie, Mars/Avril*, 169: 16-18.
- **Park DL (1993)** Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Add contam*, 10: 49-60.
- **Park JW, Kim EK, Shon DH, Kim YB (2002)** Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Addit Contam*, 19(11):1073-1080.

- **Peers FG et Linsell CA (1975)** Aflatoxin: contamination and its heat stability in Indian cooking oils. *Trop Sci*, 17: 229-232.
- **Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J et Salminen S (2001)** Aflatoxin B1 binding by Dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Dairy Sci*, 84: 2152-2156.
- **Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN et Castegnaro M (2002)** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors : a review on etiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Add Contam*, 19 (3): 282-302.
- **Pierides M, El-Nezami H, Peltonen K, Salminen S et Ahokas J (2000)** Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a Food Model . *J Food Prot*, 63 (5): 645- 650.
- **Pittet A (1998)** Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- an update review. *Rev Méd Vét*, 149: 479-492.
- **Puntaric D, Bosnir J, Smit Z, Skes I et Baklaic Z (2001)** Ochratoxin A in corn and Wheat. Geographical association with endemic nephropathy. *Croatian Med J*, 42 (2): 175-180.
- **Rasic JL, Skrinjar M et Markov S (1991)** Decrease of aflatoxin B1 in yogurt and acidified milks. *Mycopathologia*, 113: (2) 117-119.
- **Richard JL (1998)** Mycotoxins, Toxicity and Metabolism in Animals- A system Approach Overview. *Mycotoxins and Phycotoxins-Developpements in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, Ed by M. Miraglia, H. van Egmond, C. Brera, and J. Gilbert. USA: 363- 397.
- **Roch OG, Blunden G, Coker RD et Nawaz S (1994)**. The validation of a solid phase clean-up procedure for the analysis of aflatoxins in groundnut cake using HPLC. *Anal Food Clin Methods*, 93-98.
- **Ruhland M, Engelhardt G, Schafer W et Wallnoeffer PR (1996)** Transformation of the mycotoxin Ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cells suspension cultures of wheat and maize. *Nat Toxins*, 4: 254-260.
- **Rustom IYS (1997)** Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59: 57-67.
- **Samane S, Tantaoui-Elaraki A et Essadaoui M (1991)** Mycroflora of Moroccan greek style black olives. II Toxigenesis . *Microbiol Alim Nutr*, 9 :335-352.

- **Scott PM (1991)** Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. *In: Cereal grains-mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.* Chelkowski J. Ed°, Elsevier, Amsterdam, 529-572.
- **Scott PM et Lawrence GA (1995)** Analysis of beer for fumonisis. *J Food Prot*, 58 (12): 1379-1382.
- **Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT (1998)** Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit Contam*, 15(1):30-55.
- **Scudamore KA, Patel S et Breeze V (1999)** Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Add Contam*, 16: 281-290.
- Selim MI, Pependorf W, Ibrahim MS, El-sharkawy S et Kashory ES (1996). **Aflatoxin B1 in common Egyptian Foods.** *J AOAC Int*, 79: 1124-1129.
- **Sharpe ME (1979)** Identification of the lactic acid bacteria. Identification methods for microbiologists. 2nd Ed. Skinner F.A., Lovelock D.W. (eds) *Soc Appl Bact Technol Ser*, 14: 233 -259.
- **Smiley RD et Draughon FA (2000)** Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *F.aurantiacum* is enzymatic. *J Food Prot*, 63 (3): 415-418.
- **Spicher G (1983)** Baked goods. In *Biotechnology. Vol 5 Food and feed production with microorganisms.* Ed. Rehm H.G., Reed.G. Verlag chemie. Weinheim.
- **Spicher G et Nierle W (1984)** The microflora of sourdough XX, The influence of yeast on the proteolysis during sourdough fermentation. *Z Lebensm-unters Und Forsh*, 179: 102-109.
- **Spicher G et Nierle W (1988)** Proteolytic activity of sourdough bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 28: 487-492.
- **Spicher G et Schröder R (1978)** The microflora of sourdough. IV. The species of rod shaped lactic acid bacteria. *Z Lebensm Unters Und Forsch*, 168: 342-354.
- **Spicher G et Stephan G (1982)** *Handbuch sanerteig ; Biologie, Biochemie, Technologie.* Editions BBV, Hamburg. Allemagne.
- **Stefanaki I, Foufa E, Tsatsou-Dritsa A, Dais P (2003)** Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Addit Contam*, 20(1):74-83.
- **Steyn PS (1998)** The biosynthesis of mycotoxins. *Rev Méd Vét*, 149, 6: 469-478.

- **Stroka J, Anklam E, Jörissen U et Gilbert J (2000)** Immuno-affinity column clean-up with liquid chromatography post column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. *JAOAC Int*, 83: 320-340.
- **Sugihara TF (1985)** Microbiology of bread making. In Microbiology of fermented foods Vol. 1 Ed. Brian J.B. Wood. Elsevier Applied Sciences Publishers. London and New York.
- **Sutic M et Banina A (1990)** Influence of Aflatoxin B1 on gas production by lactic acid bacteria. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 10 (3) : 149-153
- **Tahri-Hassani S (1996)** Effet de la fermentation panaière mixte sur les phytates de la farine. Thèse de DES. Faculté des Sciences Ben Msik Sidi Othmane Université Hassan II. Casablanca.
- **Tantaoui-Elaraki A (1977)** Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* du Maroc. *Homme Terre et Eaux*, 6 (24) :79-86.
- **Tantaoui-Elaraki A, Benabdellah L, Majdi M, Elalaoui MR et Dahmani A (1994)** Recherche des mycotoxines dans les denrées alimentaires distribuées au Maroc. *Actes Inst Agro Vét*, 14: 11-16.
- **Tantaoui-Elaraki A et Bartine H (1994)** Fungal load of selected spices and their contamination by toxigenic *Aspergillus* species. *Microbiol Alim Nutr*, 12 :231-236.
- **Testard C (1985)** Que fait tu le boulanger? Ploermel, Ed° Co-pain et Gallo-pain (2):1017-1042.
- **Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Emmanuel KE, Larondelle Y et Reddy DV (2003)**. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Addit Contam*, 20(4):417-420.
- **Troller JA (1980)** Influence of aw on micro-organisms in foods. *Food Techno*, 34-76.
- **Turbic A, Ahokas JT et Haskard CA (2002)** Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit Contam*, 19 (2): 144-152.
- **Van der Merwe KJ, Steyn PS, et Fourie L (1965)** Mycotoxins, Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *J chemical Society*, 5:7083-7088.

- **Van der Westhuizen L, Shephard GS, Scussel VM, Costa LL, Vismer HF, Rheeder JP et Marasas WF (2003)** Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Agric Food Chem*, 51(18): 5574-5578.
- **Van Egmond H (1991)** Mycotoxins. In “Residues and contaminants in milk and milk products”; *IDF Special issues*, 9101: 131-145.
- **Varga J, Kevei E, Rinyu E, Terzen J, Kozakiewicz Z (1996)**. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *App Environm Microbiol*, 4461- 4464.
- **Varga J, Kriswtina R. et Téren J (2000)** Degradation of Ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int J Food Microbiol*, 59: 1-7.
- **Visconti A, Solfrizzo M et De Girolamo A (2001)** Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and cornflakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. *J AOAC Int*, 84(6): 1828-1837.
- **Wiseman DW et Marth EH (1981)** Growth and aflatoxin production by *A. parasiticus* when in the presence of *S. lactis*. *Mycopathologia*, 73: 4-7.
- **Yazdanpanah H, Miraglia M, Calfapietra FR et Brera C (2001)** Natural occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in corn and barley from Mazandaran and Golestan in north provinces of Iran. *Mycotoxin Research*, 17: 21-30.
- **Zohri AA et Abdel-Gawad KM (1993)** Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. *J Basic Microbiol*, 33(4): 279-288.

ANNEXES

1- Milieux de Culture

- **Milieu MRS (pH 6,5)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes:

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium trihydraté	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05
Agar-agar	15g

- **Gélose PDA (pH 4,5)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes:

Infusion de pomme de terre	100g
Dextrose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1 l

- **Milieu Hypersaccharosé (pH 6,8)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes:

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	3g
Bactocasitone	2,5g
Saccharose	150g
Phosphate dipotassique	2g
NaCl	1g
Sulphate de magnésium	0.2g
AgarAgar	15g
Eau distillée	1 l

- **Milieu de base des sucres (pH 6)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes:

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Tween 80	1ml
Citrate d'ammonium	2g
Acétate de Sodium	5g
Sulfate de magnésium	0,1g
Sulfate de manganèse	0.05g
Hydrogénophosphate bisodique	2g
Pourpre de bromocrésol	0.15g
Eau distillée	1 l

● **Milieu à l'esculine (pH 7,4)**, Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes:

Peptone tryptique de caséine	10g
Extrait de levure	5g
Acétate de sodium	5g
Tween 80	1ml
Sulfate de manganèse	0.05 g
Sulfate de manganésium	0.2g
Esculine	5g
Citrate de fer ammoniacal	0.5g
Eau distillée	1 l

● **Bouillon Lab-Lemco-Tryptone (pH 6,8)** : Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes:

Glucose	1g
Extrait de levure	1g
Tryptone	1g
Extrait de viande	1g
NaCl	0,5g
Na ₂ HPO ₄	0,2g
Eau distillée	100 ml

2- Réactifs et solutions

● **Réactif de nessler**

Solution A

Iodure mercurique	50g
Iodure de potassium	36,5g
Eau distillée	1 l

Solution B

Potasse en pastilles	150g
Eau distillée	1 l

Triturer les deux sels de la solution A au mortier en ajoutant de l'eau distillée puis mélanger les deux solutions A et B en partie égales.

● **Solution Tampon Phosphate (PBS, pH 7,3)**

NaCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
KCl	0,2 g/l

● **Solution PBPB (Pyridine hydrobromide perbromide)**

PBPB	50 mg
Eau bidistillée	1 l

Ce réactif est sensible à la lumière, il faut le conserver à l'obscurité et renouveler sa préparation tous les 10 jours.

Figure 12 : Chromatogramme des quatre standards des aflatoxines B1 (3,77ppb), B2 (1,15 ppb), G1 (3,96ppb) et G2 (1,25 ppb)

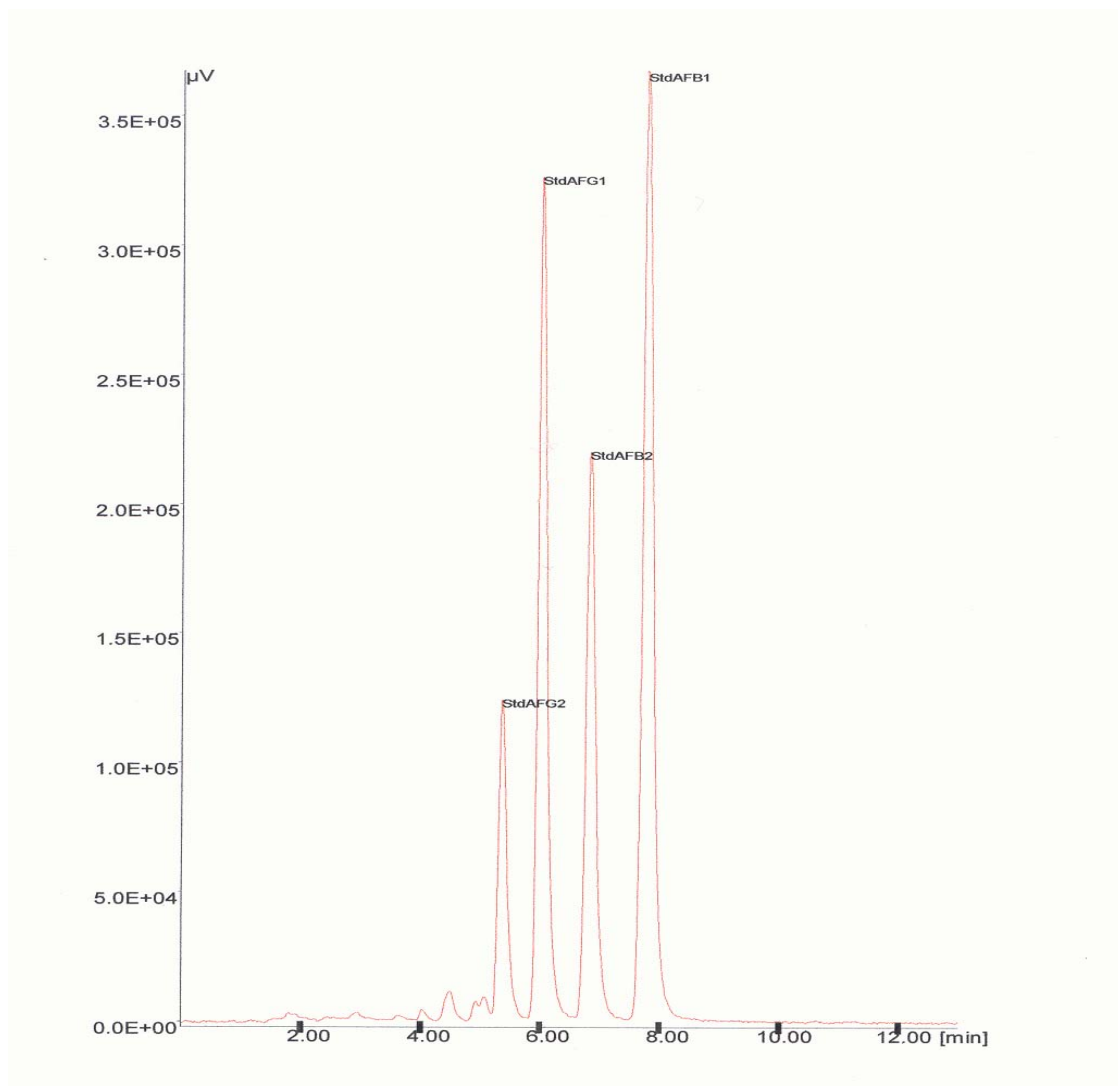


Figure 13: Chromatogramme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les échantillons d'épices analysées.

- En rouge: Chromatogramme de l'échantillon n°11 du piment
- En bleu: Chromatogramme de l'échantillon n° 6 du gingembre
- En jaune: Chromatogramme de l'échantillon n°2 du poivre
- En vert: Chromatogramme du mélange des standards des aflatoxines

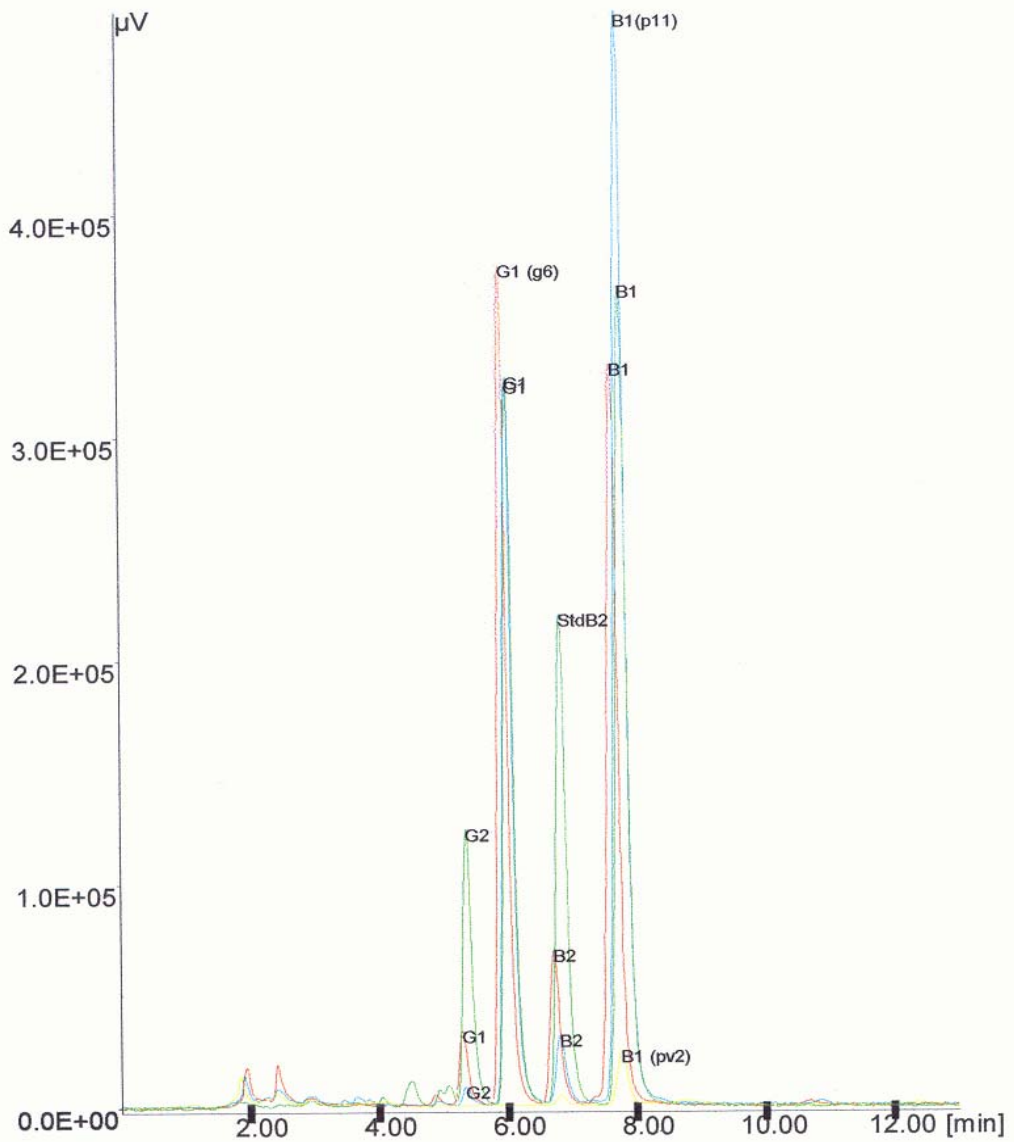


Figure 14 : Chromatogrammes des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les échantillons des épices analysées.

- En bleu: Chromatogramme de l'échantillon n°11 du piment
- En rouge: Chromatogramme de l'échantillon n° 6 du gingembre
- En vert: Chromatogramme de l'échantillon n°2 du poivre

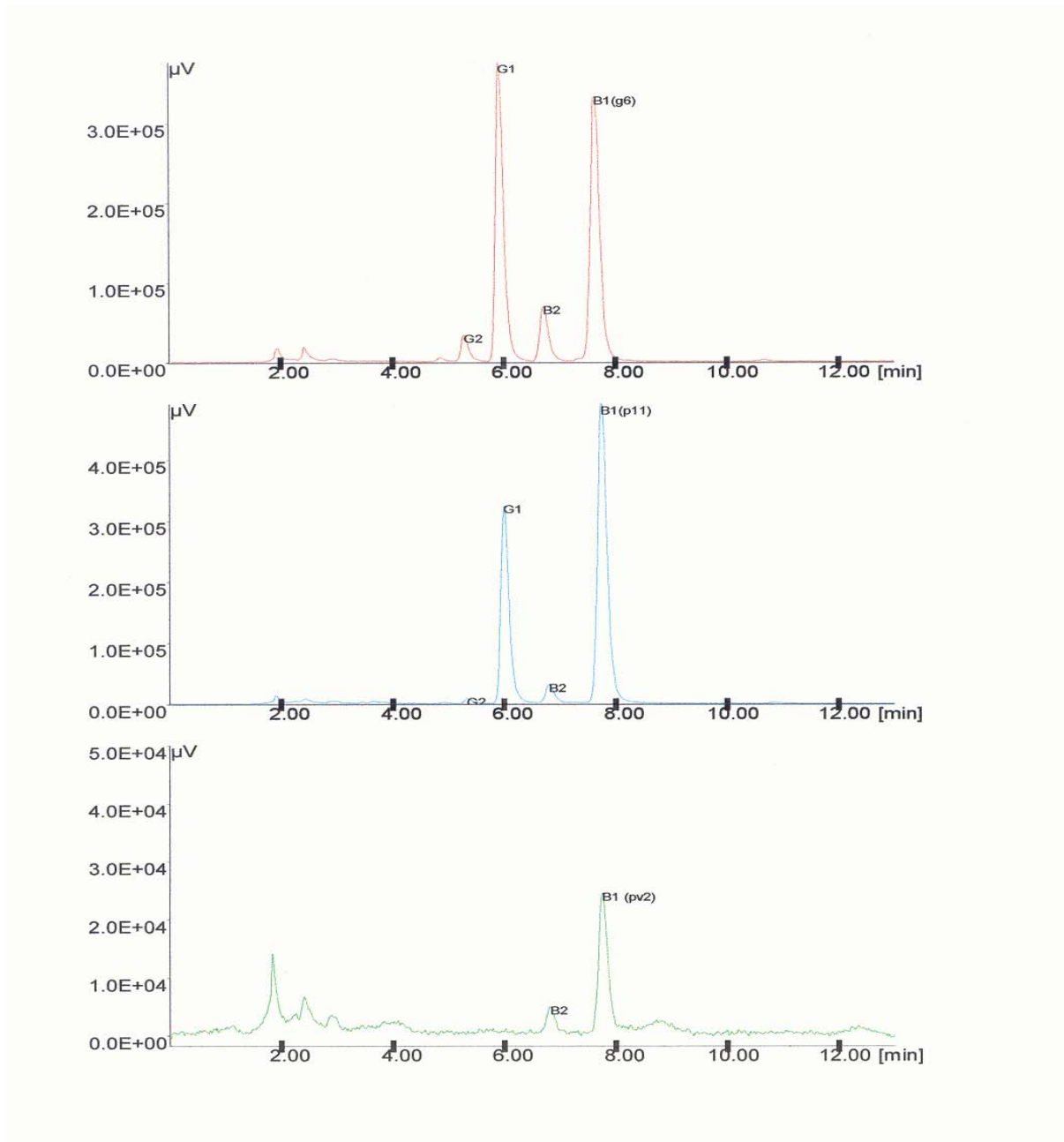


Figure 15: Chromatogramme de l'OTA dans les échantillons des céréales analysées.

- En bleu: Chromatogramme de l'échantillon n°4 du maïs (7,22 ppb)
- En rouge: Chromatogramme de l'échantillon n° 10 du blé (1,73 ppb)
- En vert: Chromatogramme du standard de l'OTA (0,78 ppb)

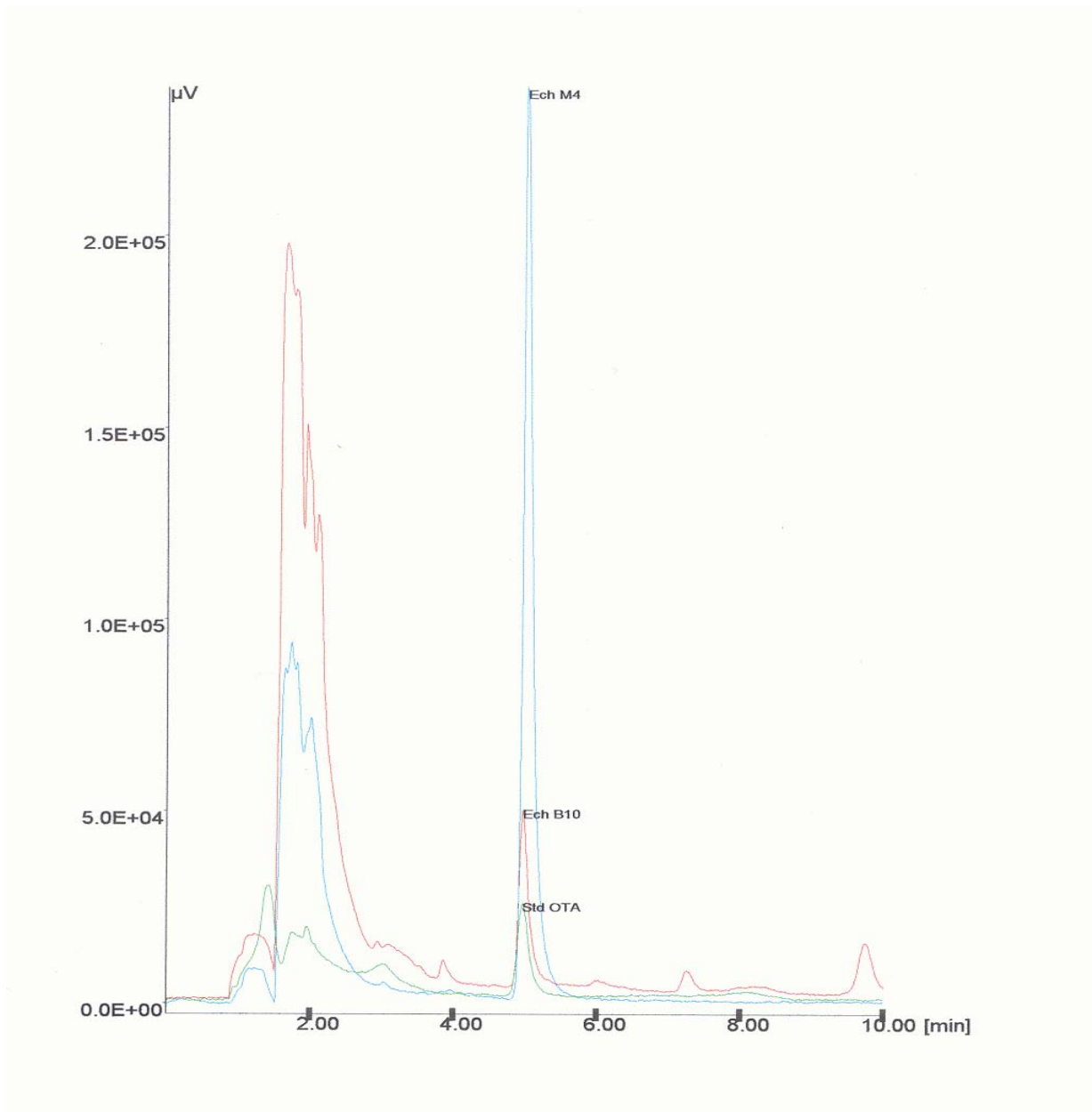


Figure 16: Chromatogramme de la ZEN dans un échantillon de maïs M16.

- En rouge: Chromatogramme d'un échantillon du maïs (13,5 ppb)
- En bleu: Chromatogramme du standard de la ZEN (200 ppb)

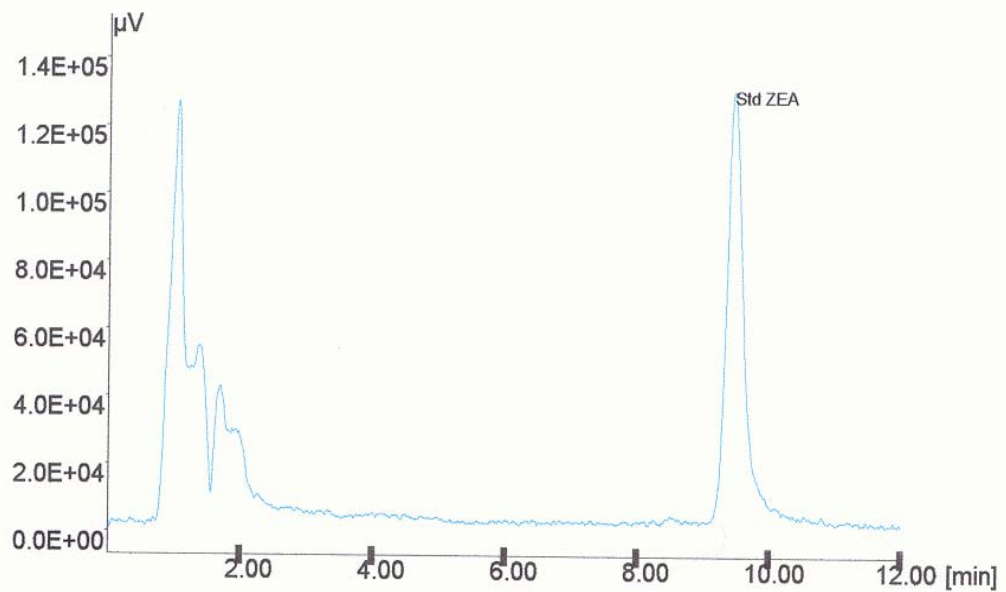
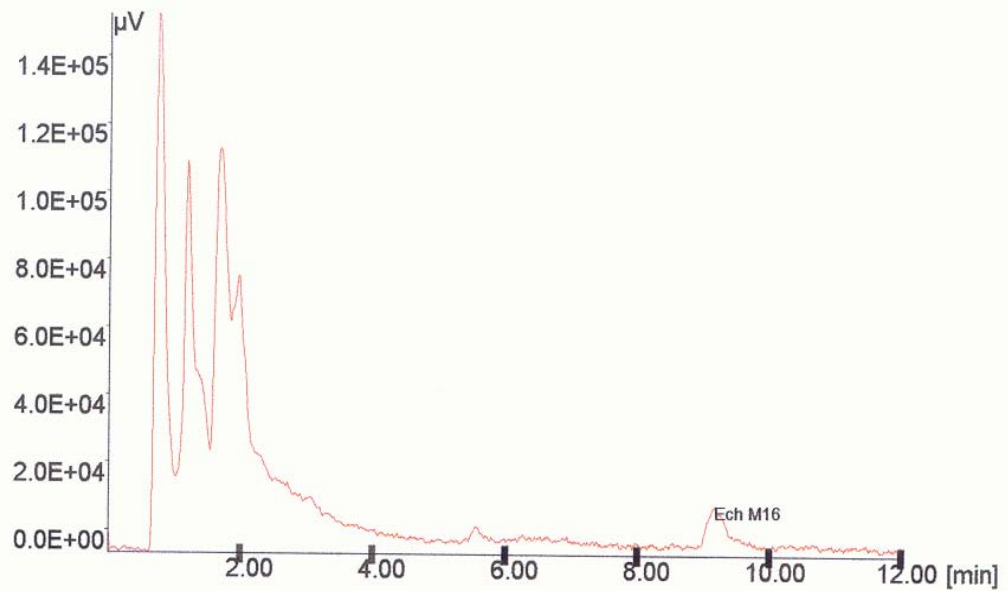
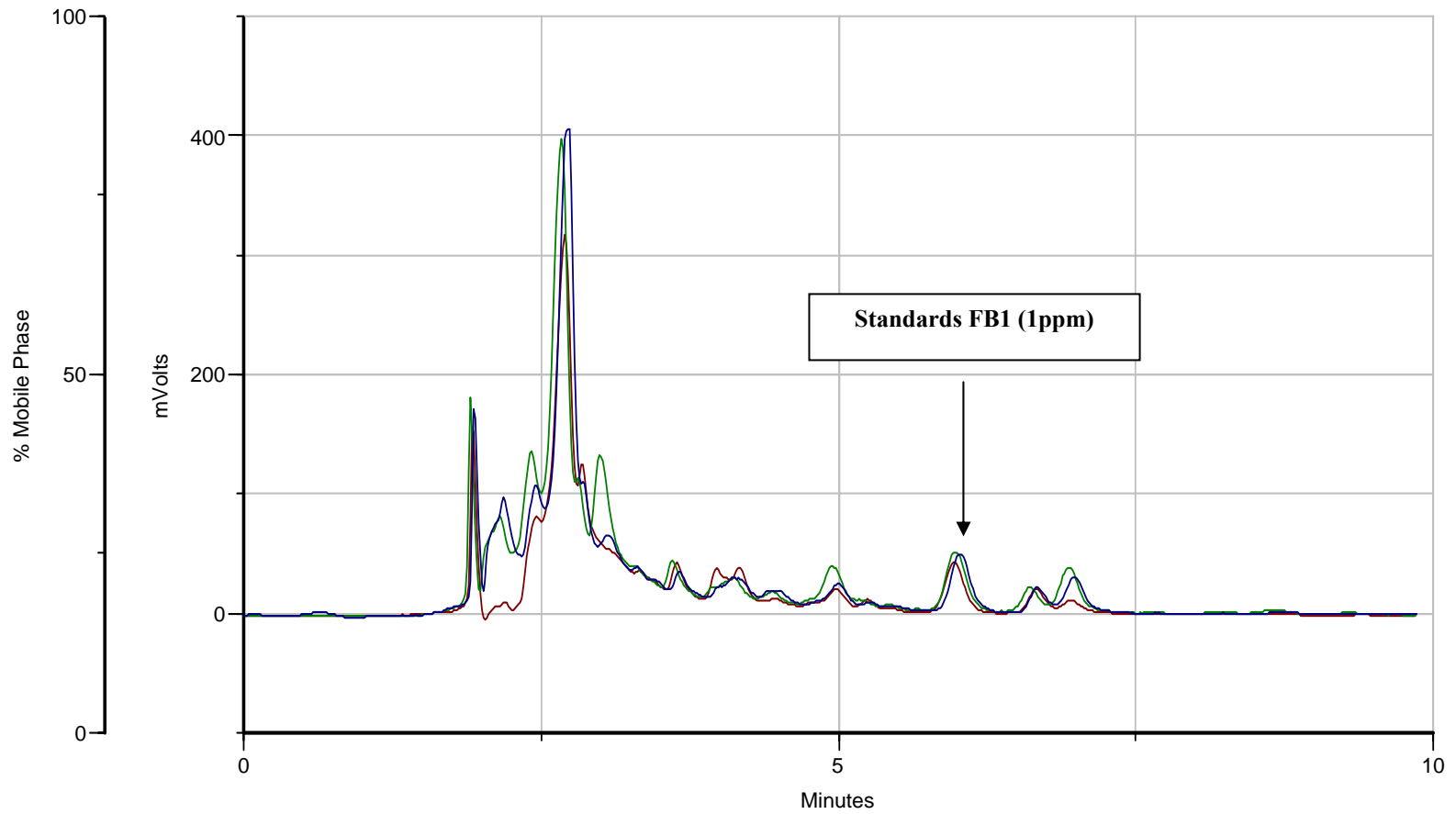


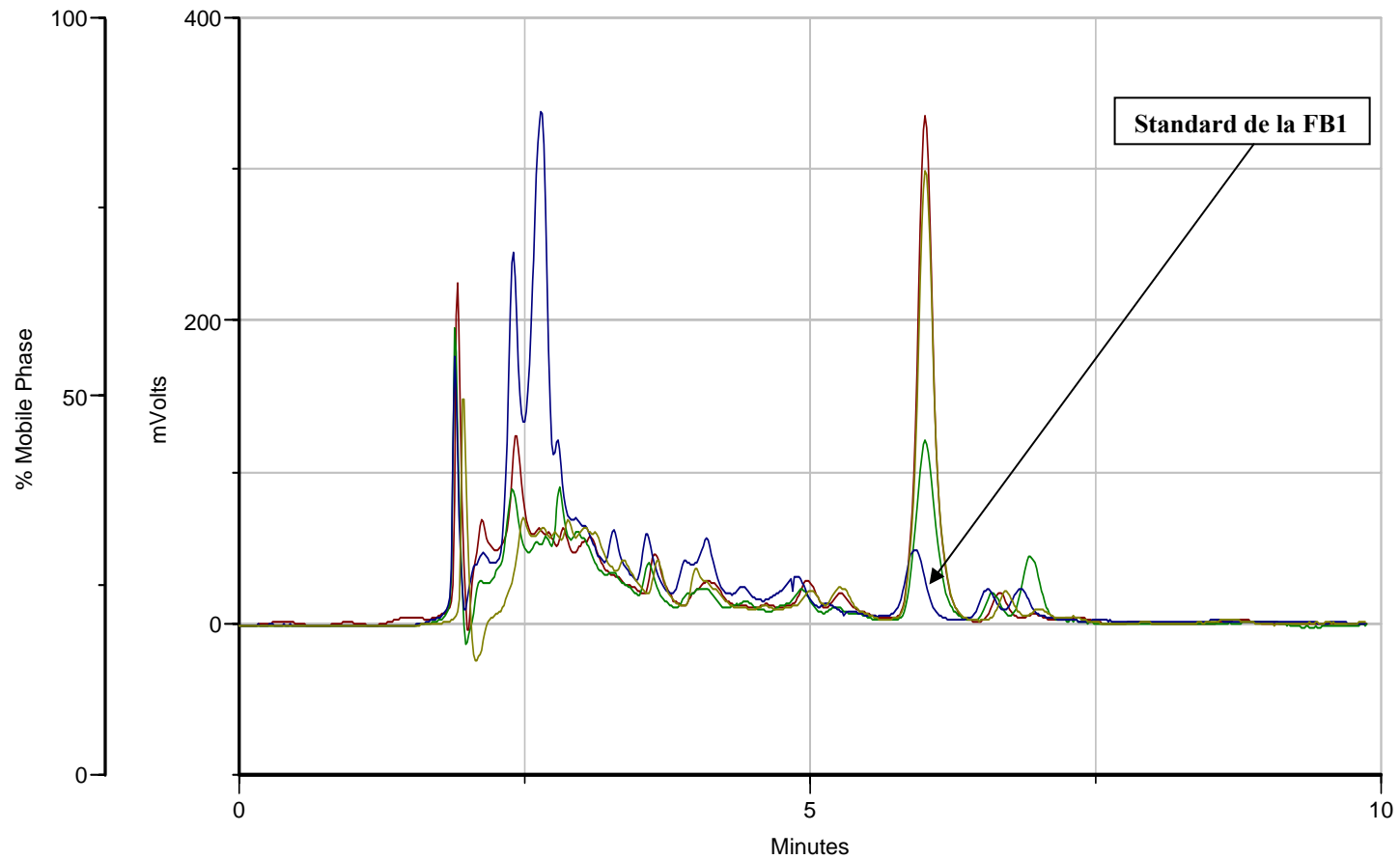
Figure 17: Chromatogramme de trois injections différentes du standard de la FB1



- c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spettrofluorimetro : stdFB1 0.133ug/ml: Inj. Number: 11
- c:\gilson\unipoint\07ott03b.001\07ott03b.gdt : Spettrofluorimetro : std FB1 0.133ng/ml: Inj. Number: 1
- c:\gilson\unipoint\07ott03b.001\07ott03b.gdt : Spettrofluorimetro : std FB1 0.133ng/ml: Inj. Number: 2

Figure 18: Chromatogramme de la FB1 dans trois échantillons de maïs M4, M5 et M20

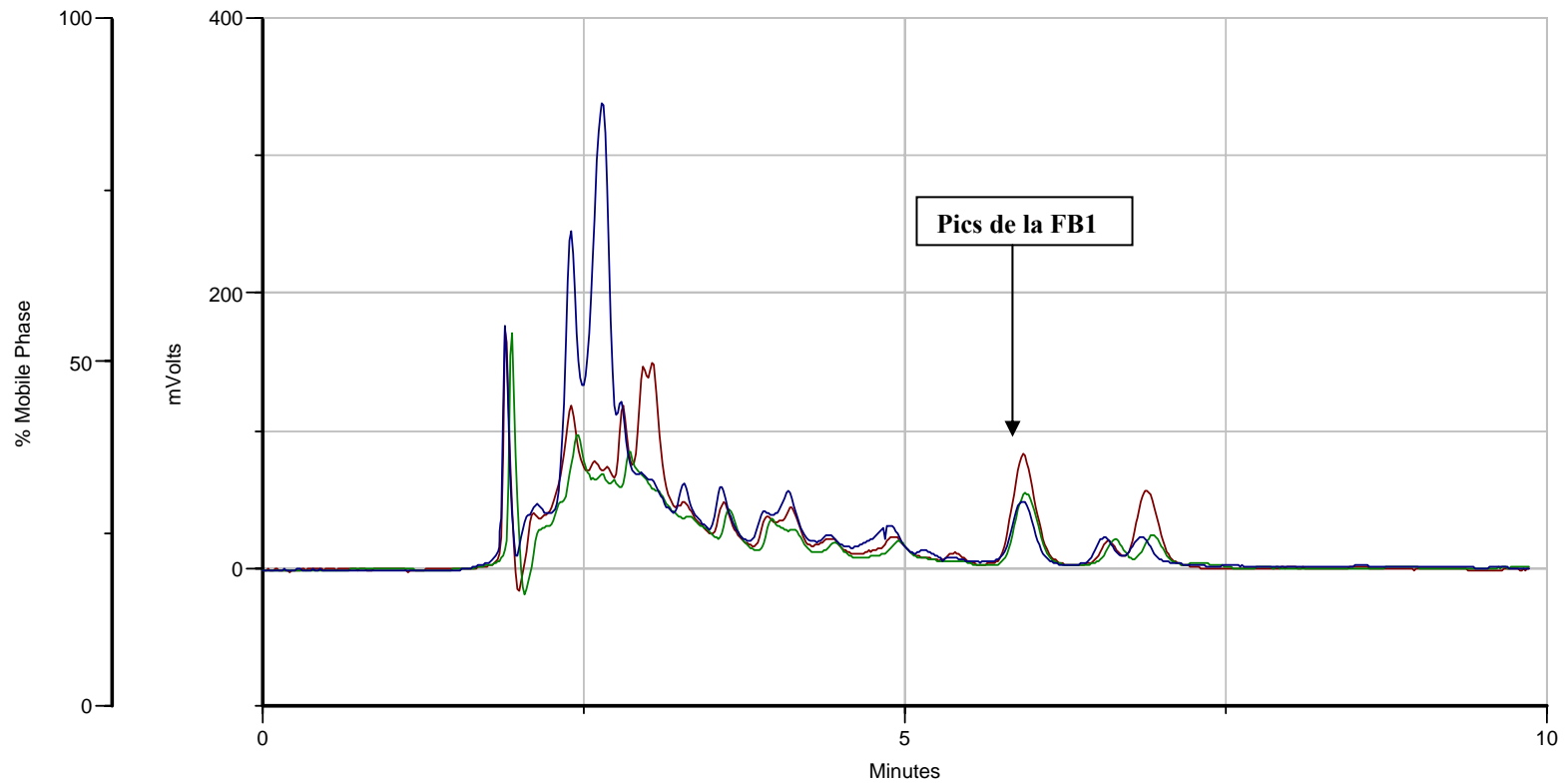
- En bleu: Standard de la FB1 (1ppm)
- En vert: Echantillons de maïs M5 (2,61 ppm)
- En rouge: Echantillons de maïs M4 (5,96 ppm)
- En Jaune: Echantillons de maïs M20



- c:\gilson\unipoint\07ott03.001\07ott03.gdt : Spettrofluorimetro : M4: Inj. Number: 2
- c:\gilson\unipoint\07ott03.001\07ott03.gdt : Spettrofluorimetro : M5: Inj. Number: 3
- c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spettrofluorimetro : stdFB1 0.133ug/ml: Inj. Number: 1
- c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spettrofluorimetro : M20: Inj. Number: 9

Figure 19: Chromatogramme de la FB1 dans deux échantillons de maïs M1 et M2

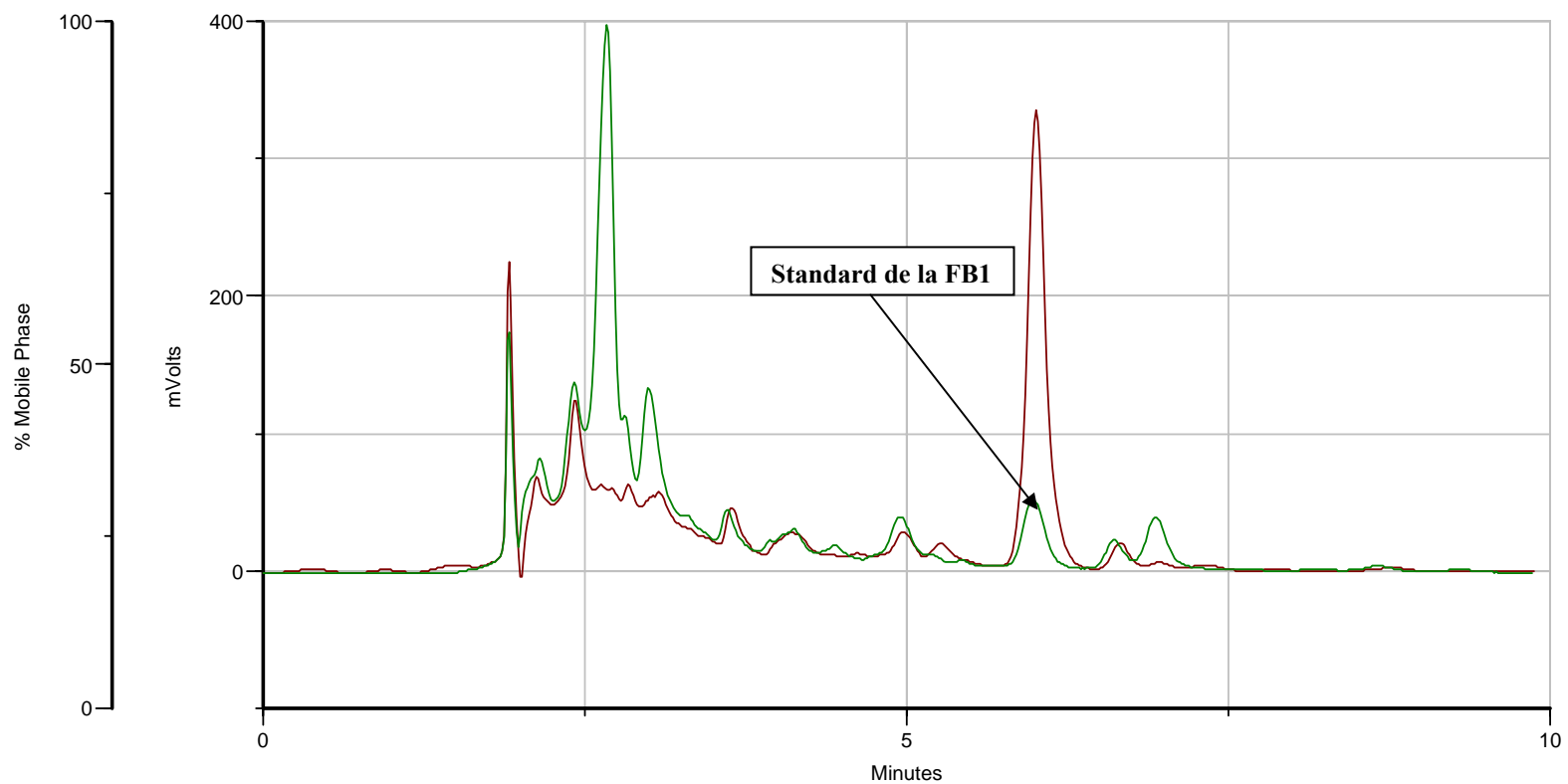
- En bleu: Standard de la FB1 (1 ppm)
- En vert: Echantillons de maïs M1 (1,15 ppm)
- En rouge Echantillons de maïs M2 fortifié avec la FB1 (1,5 ppm)



c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spettrofluorimetro : M1: Inj. Number: 2
c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spettrofluorimetro : spkM2: Inj. Number: 4
c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spettrofluorimetro : stdFB1 0.133ug/ml: Inj. Number: 1

Figure 20: Chromatogramme de la FB1 dans un échantillon de maïs M4

- En vert : Standard de la FB1 (1 ppm)
- En rouge: Echantillons de maïs M4 (5,96 ppm)

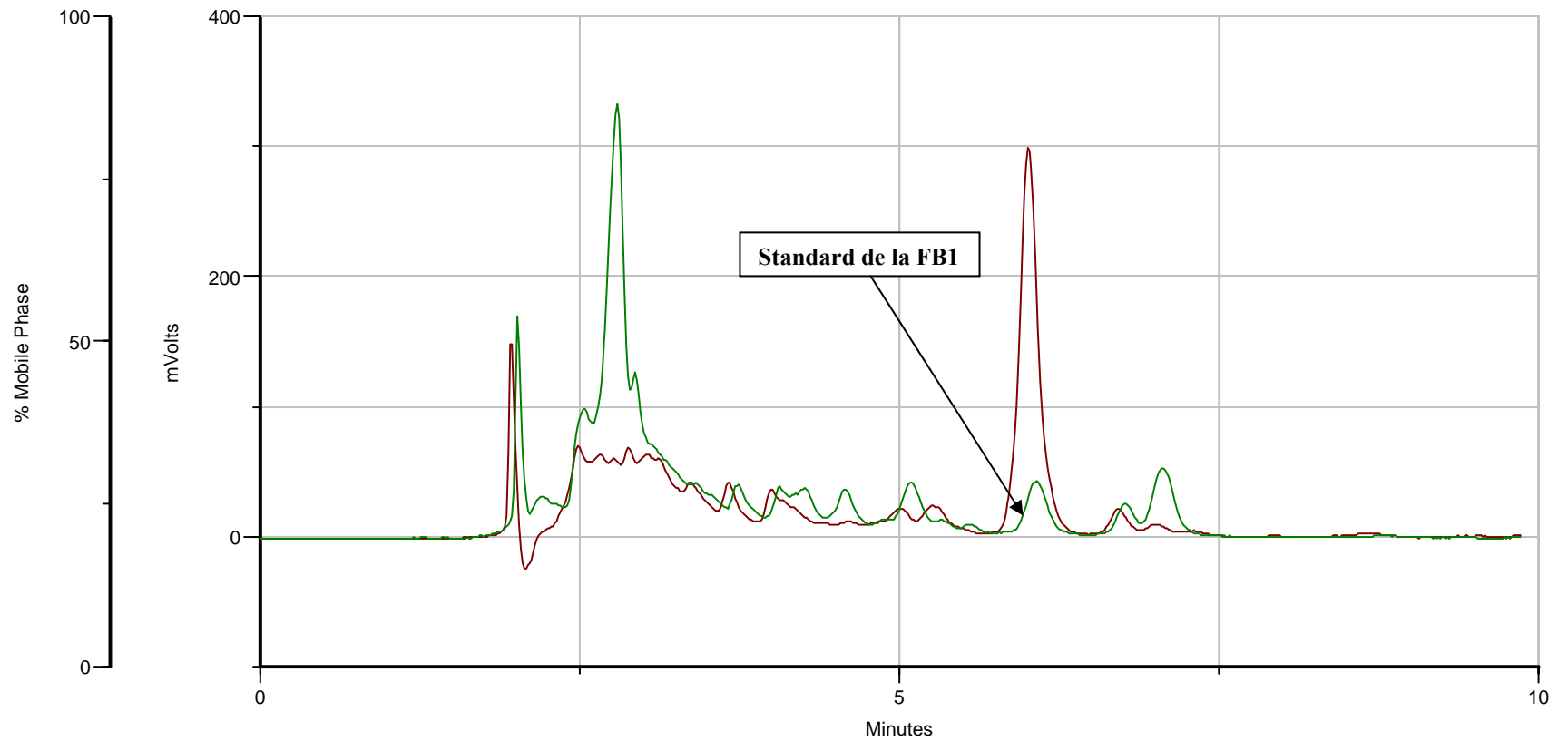


c:\gilson\unipoint\07ott03.001\07ott03.gdt : Spettrofluorimetro : M4: Inj. Number: 2
c:\gilson\unipoint\07ott03b.001\07ott03b.gdt : Spettrofluorimetro : std FB1 0.133ng/ml: Inj. Number: 1

Figure 21: Chromatogramme de la FB1 dans un échantillon de maïs M20

- En vert : Standard de la FB1

- En rouge: Echantillons de maïs M20 (5,5 ppm)



c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spetrofluorimetro : M20: Inj. Number: 9

c:\gilson\unipoint\08ott03.001\08ott03.gdt : Spetrofluorimetro : stdFB1 0.133ug/ml: Inj. Number: 10