

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**

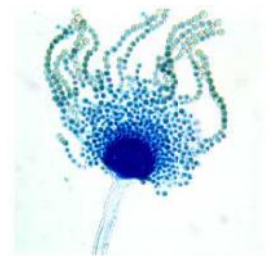


**Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**

**Mémoire**  
**Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**  
**En : Sciences biologiques**  
**Option : Alimentation Humaine et Qualité des Produits**



**Thème :**



**Essais d'inhibition de la croissance et de la production des aflatoxines  
d'*Aspergillus flavus* sur une matrice alimentaire en présence de la  
poudre et des extraits phénoliques des margines d'olives**

**Présenté par :**

**ABERKANE Fetta**

**DAHMANE Kahina**

**Devant le jury :**

**M<sup>me</sup> SENOUSI-GHEZALI C.**

**M<sup>me</sup> OULARBI-SENANI N.**

**M<sup>me</sup> ALMI-SEBBANE D.**

**M<sup>me</sup> MOHAMDI-MESSAOUDI D.**

**Maitre assistante classe A**

**Maitre assistante classe A**

**Maitre assistante classe A**

**Maitre assistante classe A**

**UMMTO**

**UMMTO**

**UMMTO**

**UMMTO**

**Présidente**

**Promotrice**

**Examinatrice**

**Examinatrice**

**Année universitaire**  
**2015-2016**

## **Remerciements**

*En préambule à ce mémoire, nous tenons particulièrement à exprimer nos profonde gratitude à **M<sup>me</sup> OULARBI-SENANI N.**, maitre assistante de classe A à l'UMMTO, en nous proposant ce sujet et qui a mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail, et pour sa patience et sa disponibilité pour nous avoir accompagnées et guidées durant notre travail.*

*Nous tenons à remercier **M<sup>me</sup> SENOUSI-GHEZALI C.**, maitre assistante de classe A à l'UMMTO, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Nous exprimons aussi nos respectueux dévouements aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail :*

- **M<sup>me</sup> MOHAMDI-MESSAOUDI D.**, maitre assistante de classe A à l'UMMTO ;*
- **M<sup>me</sup> ALMI-SEBBANE D.**, maitre assistante de classe A à l'UMMTO.*

*Notre reconnaissance et nos remerciements vont aussi à **M<sup>r</sup> METNA B.** et **M<sup>me</sup> ALI AHMED D.** qui nous ont orientés pour la réalisation de l'étude statistique.*

*Enfin, que tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de nos profondes sympathie.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

- ✓ *mes très chers parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu tout au long de ces années d'études jusqu'à la faculté, pour tout l'amour qu'ils m'ont donné et que dieu les protège ;*
- ✓ *mes chers frères, qui m'ont toujours supporté ;*
- ✓ *toute ma famille paternelle et maternelle ;*
- ✓ *tous mes amis (es) qui m'ont soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, en leur espérant une bonne continuation dans leurs travaux ;*
- ✓ *ma binôme Kahina et toute sa famille ;*
- ✓ *toute la promotion 2015/2016*

*Fetta*

# *Dédicaces*

*Ce modeste travail est dédié à :*

- ✓ *mes très chers parents pour avoir toujours cru en moi et pour les sacrifices qu'ils ont fait pour mon éducation, la confiance et l'amour qu'ils m'ont toujours donné et qu'ils me donnent encore ;*
- ✓ *mes chères sœurs et cher frère, qui m'ont toujours supporté ;*
- ✓ *ma grande famille ;*
- ✓ *mes très chers amis qui m'ont soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, en leur espérant une bonne continuation dans leurs études ;*
- ✓ *ma binôme Fetta avec qui j'ai eu le plaisir de réaliser ce travail ;*
- ✓ *et à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*Kahina*

# *Plan de travail*

## Sommaire

Liste des abréviations

Index des tableaux et des figures

	Pages
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	01
<b>PARTIE 01 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. La contamination fongique des matrices alimentaires.....</b>	<b>03</b>
1.1. Les mycotoxines et les moisissures dans les matrices alimentaires.....	03
1.2. Facteurs influençant le développement des mycotoxines dans les aliments.....	04
1.3. Le genre <i>Aspergillus</i> .....	06
1.4. Les aflatoxines.....	10
1.5. Approche de décontamination.....	18
<b>II. Margine .....</b>	<b>21</b>
2.1. Origine des margines.....	21
2.2. Les caractéristiques physico-chimiques des margines.....	22
2.3. Caractéristiques microbiologiques des margines.....	23
2.4. Problématique environnementale des margines.....	24
2.5. Traitement des margines .....	24
2.6. Valorisation des margines.....	26
<b>PARTIE 02 : Partie expérimentale</b>	
<b>I. Matériel .....</b>	<b>28</b>
1.1. Matériel végétal.....	28
1.1.1. L'échantillon de margine.....	28
1.1.2. Provenance du maïs et du blé.....	28
1.2. La souche fongique testée.....	28
1.3. Appareillage.....	28
1.4. Produits chimiques.....	29
<b>II. Méthodes – Partie biochimique.....</b>	<b>29</b>
2.1. Caractérisation physicochimique des margines.....	29
<b>III. Méthodes – Partie microbiologique.....</b>	<b>35</b>
3.1. Déshydratations des margines et obtention d'une poudre .....	35
3.2. Préparation des pré-cultures.....	35
3.3. Tests préliminaires.....	35
• Etude du pouvoir producteur d'Aflatoxines .....	35
3.4. Tests antifongiques et antiaflatoxinogènes « <i>in vitro</i> ».....	36
3.4.1. Détermination de la CMI, biomasse et nature de l'activité de la poudre et extrait phénoliques des margines.....	36

3.4.2. Détermination de l'activité anti-aflatoxinogène.....	36
3.4.2.1. Extraction des aflatoxines à partir du milieu SMKY.....	40
3.4.2.2. Détection par CCM.....	40
3.5. Tests antifongiques et antia-flatoxinogènes « <i>in situ</i> ».....	38
3.5.1. Test préliminaire .....	38
3.5.2. Choix de la matrice alimentaire.....	38
3.5.3. Traitement du maïs.....	38
3.5.4. Effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre de margine et des extraits phénoliques sur le maïs contaminés par <i>Aspergillus flavus</i> .....	39
3.5.4.1. Extraction des aflatoxines du maïs.....	40
3.5.4.2. Détection des aflatoxines par CCM.....	40
3.6. Analyse statistique des résultats.....	40
IV. Résultats et discussion .....	41
4.1. Résultats et discussion de l'étude physicochimique des margines .....	41
4.2. Résultats et discussion de l'étude microbiologique <i>in vitro</i> et <i>in situ</i> .....	45
4.2.1. Résultats du test <i>in vitro</i> .....	45
4.2.1.1. Résultats du criblage de la production d'aflatoxines sur milieu CAM de la souche testée .....	45
4.2.1.2. Résultats de la détermination de la CMI, biomasse et nature de l'activité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines.....	46
4.2.1.3. Résultats du test anti-aflatoxinogène.....	49
4.2.2. Résultat du test <i>in situ</i> .....	50
4.2.2.1. Choix de la matrice alimentaire .....	50
4.2.2.2. Humidité.....	52
4.2.2.3. Résultats de l'effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs contaminés par <i>Aspergillus flavus</i> .....	52
Conclusion et perspectives.....	60

Références bibliographiques

Annexes

## LISTE DES ABREVIATIONS

**a<sub>w</sub>** : Activité de l'eau.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AF (B1, B2, G1, G2 et M1)** : Aflatoxines (B1, B2, G1, G2 et M1).

**AFB**: Aflatoxine blue.

**AFG**: Aflatoxine green.

**AFM** : Aflatoxine bleu-mauve.

**APCI** : Ionisation chimique à pression atmosphérique.

**BSA**: Albumine sérique bovine (Bovin Sérum Albumine).

**CAM**: Milieu de noix de coco (Coconut Agar Medium).

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**CEC** : Capacité d'échange cationique.

**CMI**: Concentration minimale inhibitrice.

**CPA** : Acide cyclopiazonique.

**DBOs** : Demande biologique en oxygène.

**DCO** : Demande chimique en oxygène.

**DL50** : Dose létale médiane.

**ESI** : Ionisation par électronébuliseur (Electrospray).

**ELISA** : La méthode immune-enzymatique (Enzyme-linked immunosorbent assay).

**EP**: Extrait phénolique.

**GPC** : Chromatographie en phase gaz.

**H.E**: Huiles essentielles.

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

**IAC**: Chromatographie d'affinité (Immuno-affinity chromatography).

**IARC**: Centre international de recherche sur le cancer (International agency for research on cancer).

**ITS** : Infection transmissible sexuellement.

**LLE:** Extraction liquide – liquide.

**μS:** Microsiemens.

**mS :** Millisiemens.

**MS:** Matière sèche.

**MMS:** Matière minérale sèche.

**MES:** Matière en suspension.

**MVS:** Matière volatile sèche.

**MG:** Matière grasse.

**MM :** Margine moderne.

**PDA:** La gélose dextrosée a la pomme de terre (Potato dextrose agar).

**PDB:** Potato dextrose broth.

**pH:** Potentiel hydrogène.

**P.O.U :** protéine d'organisme unicellulaire.

**PP :** Polyphénols.

**ppm :** milligramme/litre.

**SMKY:** Semi synthétique liquid medium.

**SPE:** phase d'extraction solide (Solid-phase extraction).

**spp :** Espèce.

**ST:** Sucres totaux.

**TE:** Teneur en eau.

**UV:** Ultrat- violet.

**VHB:** Hépatite B.

.

## INDEX DES FIGURES

N°	Intitulés	Pages
1	La micromorphologie du genre <i>Aspergillus</i>	8
2	Structure chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1,	11
3	Représentation schématique de la régulation et de biosynthèse de l'AF avec les modes d'action potentiels des groupes majeurs des inhibiteurs	21
4	Différentes filières de valorisation des margines	27
5	Diagramme d'extraction des polyphénols à partir des margines	33
6	Revers jaune orangé (observé à l'oeil nu). Culture d' <i>Aspergillus flavus</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CAM à 28 °C.	45
7	Mise en évidence sous lumière UV à 366nm de la production des aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C	46
8	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i> par la poudre de margine après 7 jours d'incubation à 28°C sur milieu PDB	46
9	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i> par l'extrait phénolique après 7 jours d'incubation à 28°C sur milieu PDB	47
10	Histogramme de la biomasse du mycélium en présence de la poudre des margines	47
11	Histogramme de la biomasse du mycélium en présence de l'extrait phénolique	48
12	Photographie du chromatogramme obtenu sur les extraits d'aflatoxines de la souche test <i>A. flavus</i> (révélation à l'UV à 366nm)	49
13	Absence de croissance de la souche <i>Aspergillus flavus</i> sur les différentes variétés de blé après incubation à 28°C pendant 21 jours	51
14	Croissance de la souche <i>Aspergillus flavus</i> après incubation à 28°C pendant 3 jours	51
15	Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la croissance d' <i>Aspergillus flavus in situ</i> après une incubation de 7 jours	54
16	Effet de la poudre de margine sur la croissance de la souche <i>A. flavus in situ</i> après 7 jours d'incubation à 28 ± 02°C	55
17	Effet de l'extrait phénolique des margines sur la croissance de la souche <i>A. flavus in situ</i> après 7 jours d'incubation à 28 ± 02°C	55
18	Photographie de chromatogramme obtenue sur les extraits d'aflatoxines de la souche test <i>A. flavus</i> (révélation à l'UV)	57
19	Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la germination du maïs après humidification et ajout de concentration	58

## INDEX DES TABLEAUX

N°	Intitulés	Pages
I	Les principaux agents fongiques responsables de la production de mycotoxines dans les denrées agricoles dans le monde	3
II	Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire	4
III	Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide kojique par les principales espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	10
IV	Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines	12
V	Teneurs maximales pour les aflatoxines dans des denrées alimentaires selon les réglementations de la commission européenne (1881/2006, 1126/2007, CE105/2010).	17
VI	Les moyens de lutte pour chaque période	18
VII	Composition des margines	23
VIII	Technologies de traitement appliquées sur les margines	25
IX	Les différents appareils utilisés	29
X	Caractérisation physicochimique des margines modernes	41
XIII	Pourcentages (%) d'inhibition de la poudre des margines sur la souche <i>A.flavus</i> après 7 jours d'incubation	56
XIV	Pourcentages (%) d'inhibition de l'extraits phénolique des margines sur la souche <i>A.flavus</i> après 7 jours d'incubation	56

## Résumé

Cette présente étude a pour objectifs l'analyse physicochimique des margines et l'étude de l'activité antifongique de la poudre et des extraits phénoliques (EP) de margines vis-à-vis d'une souche pathogène, *Aspergillus flavus in vitro* et *in situ* (sur maïs). La caractérisation physicochimique des margines a démontré leurs richesses en eau et en matière sèche. La teneur en eau est de  $92 \pm 0,05\%$  et la teneur en matière sèche est de  $82,7 \pm 0,83\text{g/l}$ , avec une forte teneur en composés phénoliques qui est de  $5,58 \pm 0,5 \text{ g/l}$  et aussi en sucres totaux qui est de  $13,84 \pm 0,98 \text{ g/l}$ , et de faibles teneurs en matière grasse et en protéines. L'essai de l'inhibition fongique par la poudre et les EP des margines vis-à-vis d'*Aspergillus flavus in vitro* et *in situ* a démontré le pouvoir antifongique de ces deux échantillons test. Le test *in vitro* sur les deux milieux PDB et SMKY ont démontré une diminution de la croissance du mycélium fongique en présence des concentrations croissantes de poudre et de l'EP des margines dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) est de  $0,5 \text{ g/ml}$  pour la poudre de margines et de  $1000 \text{ ppm}$  pour l'EP. Les résultats obtenus par CCM n'ont révélé aucune production d'aflatoxines pour toutes les concentrations testées aussi bien pour la poudre que pour les EP des margines par rapport au témoin. Les résultats obtenus *in situ* montrent bien une diminution logique du diamètre de croissance d'*Aspergillus flavus* avec la poudre et l'EP des margines dont la CMI est de  $0,8 \text{ g/ml}$  pour la poudre et de  $1000 \text{ ppm}$  pour l'extrait phénolique. . Les résultats obtenus par CCM n'ont révélé aucune production d'aflatoxines pour toutes les concentrations testées aussi bien pour la poudre que pour les EP des margines par rapport au témoin. Les résultats obtenus par CCM n'ont révélé aucune production d'aflatoxines pour les concentrations de  $0,4 \text{ g/ml}$ ,  $0,6\text{g/ml}$  et  $0,8\text{g/ml}$  de  $1000 \text{ ppm}$  pour la poudre et EP de margines respectivement.

**Mots clés :** Margine, extrait phénolique, activité antifongique, aflatoxine, concentration minimale inhibitrice.

## Abstract

This present study has for objectives the physicochemical analysis of olive mill wastewater and the study of the antifungal activity of powder and the phenolics extracts (PE) of olive mill wastewater against *Aspergillus flavus* (*in vitro*) and (*in situ*). The physicochemical characterization of olive mill wastewater demonstrated their richness in water and in dry matter. The water content is  $92 \pm 0.05\%$  and the content in dry matter is  $82.7 \pm 0.83\text{g/l}$  with a high phenolic content in compounds which is  $5.58 \pm 0.5 \text{ g/l}$  and totals sugar which is  $13.84 \pm 0.98 \text{ g/l}$ , and low fat and proteins contents. On the other hand powder and the phenolics extracts demonstrated the antifungal power against *Aspergillus flavus in vitro* and *in situ*. The *in vitro* test on PDB et SMKY medium demonstrated a decrease effect corresponding to the growth of the fungal mycelium in the presence of increasing concentration of the powder and the PE of olive mill wastewater was observed whose minimum inhibitory concentration (CMI) is  $0.5 \text{ g/ml}$  for the powder and of  $1000 \text{ ppm}$  for the PE. According to the results obtained by CCM no production of aflatoxins was observed for all the concentrations tested as well for the powder and the PE of olive mill wastewater with regard to the control. The results obtained *in situ* showed a logical decrease of the diameter of growth of *Aspergillus flavus* in the presence of the powder and the PE. The CMI were  $0.8 \text{ g/ml}$  and of  $1000 \text{ ppm}$  for the powder and EP respectively. The aflatoxin production was inhibited at  $0.4 \text{ g/ml}$  and  $1000 \text{ ppm}$  for the powder and EP of olive mill wastewater respectively.

**Key words:** Olive mill wastewater, phenolic extract, antifungal activity, aflatoxins, minimum inhibitory concentration.

# INTRODUCTION

## **INTRODUCTION GENERALE**

Le développement des moisissures à la surface et dans les produits destinés à l'alimentation est très souvent constaté, en particulier dans les denrées stockées. Or l'étalement dans le temps de la consommation et l'augmentation des transports internationaux des denrées alimentaires nécessitent de plus en plus la réalisation de stocks (LECLERC, 2005). Ce n'est que vers le début du 20ème siècle que les propriétés toxiques de ces champignons commencent à être soupçonnées.

Les champignons toxiques produisent un certain nombre de métabolites secondaires nocifs qualifiés de mycotoxines, ces dernières représentent un danger pour la santé publique, soit directement lorsqu'elles sont présentes dans l'alimentation humaine, soit de manière indirecte lorsqu'elles contaminent la chaîne alimentaire via l'alimentation du bétail (BEJAOU, 2005). Selon la FAO, au moins 25% des cultures alimentaires sont contaminées par les mycotoxines au moment où la production agricole des produits de base soutient à peine la croissance de la population mondiale (NAFEES, 2009). Dans les pays industrialisés, des normes strictes sur les produits importés ont été adoptées pour cerner les problèmes engendrés par ces substances. Tandis que les pays en développement ne sont pas encore protégés contre les aliments contaminés (CANADAS, 2006). En raison de ces mesures, les produits les plus contaminés risquent d'être orientés vers les marchés où la législation est moins contraignante.

*Aspergillus flavus* est parmi les souches fongiques qui sont responsables de la contamination des productions céréalières par la production des aflatoxines. Ces substances peuvent occasionner des effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques (KLICH et BENNETT, 2001 ; LI *et al*, 2016).

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, comporte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et d'autre part, pour la protection de l'économie du pays. Actuellement l'utilisation des extraits et des substances naturelles comme les huiles essentielles et les polyphénols notamment celle extraites des margines (SENANI et MOULTI-MATI, 2012) dans la lutte antifongique contre les moisissures des céréales (maïs, blé, ...), retient de plus en plus l'attention des chercheurs (SULTANA *et al*, 2015).

La margine est un résidu généré par l'industrie oléicole comme sous produit. De nombreuses études ont mis l'accent sur le traitement et la valorisation des margines.

Parallèlement aux recherches réalisées sur le traitement des margines, des études de valorisation ont été effectuées, vu leur richesse en éléments nutritifs minéraux et organiques comme les polysaccharides et les composés phénoliques qui se caractérisent par leur pouvoir antioxydants et antimicrobien (NADOUR *et al*, 2015).

L'objectif de ce travail est :

- l'analyse de quelques paramètres physicochimiques des margines issues d'une huilerie utilisant le système de centrifugation à trois phases ;
- l'essais d'inhibition de la croissance, la sporulation et la production des aflatoxines par *Aspergillus flavus in vitro* et *in situ* sur matrice alimentaire (maïs) par l'utilisation de la poudre et des extraits phénoliques des margines.

***PARTIE 1***  
***Synthèse bibliographique***

## I. La contamination fongique des matrices alimentaires

### 1.1. Les mycotoxines et les moisissures dans les matrices alimentaires

Les mycotoxines, produits du métabolisme secondaire des champignons filamenteux, sont potentiellement présentes dans toutes les denrées alimentaires susceptibles d'être un support de la croissance de champignons toxigènes. Les groupes de mycotoxines qui se retrouvent le plus souvent dans les produits agricoles sont les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (KUMAR *et al*, 2008). Les champignons responsables de la contamination pendant le stockage des denrées sont en général des organismes saprophytes dont la croissance peut être évitée par modification de leur environnement hydrique : de nombreuses techniques de séchage et de stockage permettant de limiter le développement des champignons dans les récoltes sont ainsi connues et pratiquées (MURPHY *et al*, 2006). En revanche, la contamination au champ des produits récoltés dépend de l'association des champignons avec les plantes et repose donc sur une relation écologique symbiotique, commensale ou parasitique (PITT, 2006). Les champignons producteurs de mycotoxines les plus courants appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (KABAK *et al*, 2006). Le genre *Fusarium* inclut un nombre important d'espèces pathogènes responsables de maladies destructives notamment chez les céréales. Quant aux champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, sont le plus souvent associés aux récoltes stockées, certaines de ces espèces peuvent aussi être pathogènes ou commensaux dans les plantes cultivées (PITT *et al*, 2000 ; MURPHY *et al*, 2006). Les principaux agents fongiques responsables de la production de mycotoxines dans les denrées agricoles dans le monde sont représentés dans le tableau I.

**Tableau I : Les principaux agents fongiques responsable de la production de mycotoxines dans les denrées agricoles (MURPHY *et al*, 2006).**

Mycotoxines	Principaux agents responsables	Denrées alimentaires				
		Céréales à paille	Maïs	Coton	Arachide	Fruits à coque
<b>Trichothécènes et Zéaralénone</b>	<i>Fusarium graminearum</i>	X	X			
	<i>Fusarium culmorum</i>	X	X			
<b>Fumonisines</b>	<i>Fusarium verticillioides</i>		X			
	<i>Fusarium proliferatum</i>		X			
<b>Aflatoxines</b>	<i>Aspergillus flavus</i>	X	X	X	X	X
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	X			X	

Au champs, la contamination par les mycotoxines est consécutive à l'infection des plantes par les agents pathogènes. Il est cependant reconnu qu'il n'existe pas de relations stables entre niveaux de symptômes sur les organes atteints et niveaux de contamination par

les toxines. Deux éléments expliquent ce constat. Le premier est la variabilité génétique (inter- et intraspécifique) des agents pathogènes : un niveau de symptôme donné peut être provoqué par des espèces ou souches ayant des capacités de production des mycotoxines très différentes (XU *et al*, 2008). Le second correspond au fait que la production de toxines est liée à un processus métabolique à multiples fonctions, dont l'existence n'est pas vitale pour l'agent pathogène, et dont l'activation répond à des caractéristiques de son environnement (incluant l'interaction avec la plante hôte) (CARY et CALVO, 2008). L'infection comme la production des toxines dépendent de deux grands types de déterminants agissant en interaction : les caractéristiques climatiques, d'une part, et les pratiques agricoles, d'autre part (CHAMPEIL *et al*, 2004).

## 1.2. Facteurs influençant la production des mycotoxines dans les aliments

### 1.2.1. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux affectant la production de mycotoxine sont d'origine physique, chimique ou biologique (MITCHELL *et al*, 2004). Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante (LACEY, 1986), en effet leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un facteur simple. Le tableau II ci-dessous représente quelques facteurs environnementaux qui peuvent influencer la production de mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire (HESELTINE, 1976).

**Tableau II: Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire (HESELTINE, 1976).**

Facteurs	Au champ	A la récolte	Pendant le Stockage
<b>Physique</b>			
- Humidité	+	+	+
Rapidité de séchage	-	+	+
Ré humidification	-	+	+
Humidité relative	+	+	+
- Température	+	+	+
- Dommages mécaniques	+	+	+
- Mélange de grains	-	+	+
- Temps	+	+	+
<b>Chimique</b>			
- CO <sub>2</sub>	-	-	+
- O <sub>2</sub>	-	-	+
- Nature du substrat	+	-	+
- Nutrition minérale	+	-	+
- Traitement chimique	-	-	+
<b>Biologique</b>			
- Stress de la plante	+	-	+

- Vecteurs invertébrés	+	-	+
- Infection fongique	+	-	+
- Différences entre les variétés des plantes	+	-	+
- Différences entre les souches fongiques	+	-	+
- Charge en spores	+	+	+
- Système microbiologique	+	-	+

+ : effet

- : pas d'effet

Les deux facteurs physiques essentiels qui influencent la croissance des moisissures et la production de mycotoxines sont la température et l'humidité (PANAGOUE *et al*, 2003 ; KOSEGARTEN *et al*, 2016). En effet, les champignons de champs exigent typiquement une haute teneur en humidité dans le substrat (22-30 %) par rapport aux champignons de stockage (13-18 %) (SAMSON *et al*, 2005). Chaque espèce ou isolat a son niveau optimal d'humidité ou activité de l'eau ( $a_w$ ) et de température pour la production de mycotoxines. Ces optima peuvent différer sensiblement de leurs optima pour la croissance. A côté de l' $a_w$  et la température, le pH peut avoir un effet critique pour la croissance fongique et la production de mycotoxines (GARCIA *et al*, 2012). La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9 avec une  $a_w$  entre 0,85 à 0,98, à une température optimale comprise entre 20°C et 30 °C (REBOUX, 2006).

### 1.2.2. Influence du substrat

La toxinogénèse dépend de la croissance du champignon et de la composition chimique du substrat. En effet, les céréales et les oléagineux, plus riches en hydrates de carbone et en lipides, sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (MAGAN et ALDRED, 2007 ; DA CRUZ CABRAL *et al*, 2013). Ainsi, la biogénèse des aflatoxines, de l'ochratoxine A, de la stérigmatocystine et de l'acide pénicillique (c'est-à-dire les dérivés de la voie des polycétoacides), est plus importante dans les milieux riches en glucides et en lipides que dans les milieux à forte teneur en protides (MURPHY *et al*, 2006 ; SULTANA *et al*, 2015). La production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est favorisée par certains sucres: le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose. En outre, *Aspergillus parasiticus* ne produit pas d'aflatoxines dans un milieu peptoné riche en sel (PAPP *et al*, 2002). Mais il peut y avoir des interactions plus ou moins spécifiques entre certains composés d'origine végétale ou fongique. Ainsi, le fait que le soja ne se prête pas à l'accumulation d'aflatoxines peut s'expliquer par la présence d'acide phytique qui complexe le zinc, indispensable à la biosynthèse des aflatoxines (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999).

### **1.2.3. Autres facteurs**

Les micro-organismes « de concurrence » peuvent affecter la production de mycotoxines sur les produits agricoles. Ils peuvent augmenter ou gêner la formation des mycotoxines en changeant le métabolisme de l'organisme producteur, par la concurrence vis à vis du substrat et la production des composés inhibiteurs (LACEY, 1986). Les interactions avec d'autres micro-organismes peuvent également être différentes dans les différentes conditions environnementales (MARIN *et al*, 1998, CAIRNS *et al*, 2003).

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans les champs. Ils peuvent s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (LIPPS et DEEP 1991), les fongicides utilisés (MOSS et FRANK, 1985), la variété de la plante (GOLINSKI *et al*, 1996) et les différences géographiques (LANGSETH *et al*, 1995). En outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxine comme cela a été proposé par EDWARDS (2003).

## **1.3. Le genre *Aspergillus***

### **1.3.1. Définition**

Les espèces d'*Aspergillus* spp. sont très répandues dans la nature et tout particulièrement dans le sol où elles contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (SCHEIDEGGER et PAYNE, 2003 ; BLUMA *et al*, 2008). Elles sont par ailleurs utilisées dans plusieurs domaines (agriculture, biotechnologie et santé) en exerçant des rôles bénéfiques comme la production de métabolites utiles (enzymes, protéines et acides).

En revanche, les *Aspergillus* sont capables de provoquer des dégâts importants, notamment ceux liés aux contaminations des denrées alimentaires (PITT *et al*, 2000). Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (SCHEIDEGGER et PAYNE, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines, les ochratoxines et la patuline, ont une incidence économique et sanitaire. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (SMITH et MOSS, 1985). Cependant, de récentes études ont montré que ces toxines peuvent aussi être produites par plusieurs autres espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Seule une partie de ces champignons mycotoxinogènes peut présenter un risque, car les autres n'en produisent que de très faibles quantités de toxines ou bien elles sont rarement rencontrées dans l'alimentation (PITT, 2000).

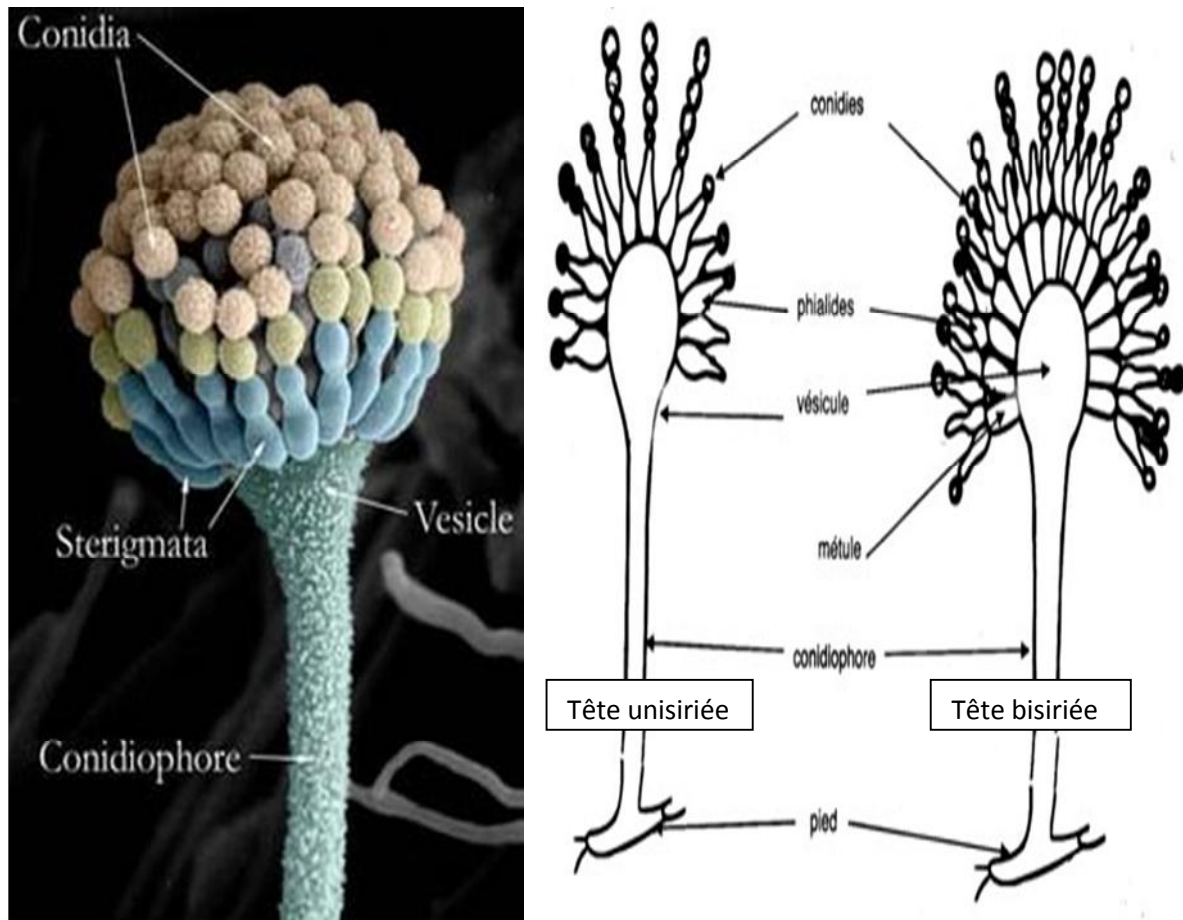
Etant donné son importance économique extrême liée à ses effets utiles et nuisibles, plusieurs ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus* en général et à sa taxonomie et sa phylogénie en particulier (SAMSON *et al*, 2006).

### **1.3.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre *Aspergillus***

Les ouvrages intitulés «The genus *Aspergillus* » de RAPER et FENNELL (1965) et « Fungi and Food Spoilage » de PITT et HOCKING (1997), constituent une référence pour l'étude des caractères morphologiques des *Aspergillus*. Ces champignons ont une forme caractéristique et des couleurs vives qui les rendent parfois aisément identifiables. L'identification morphologique des espèces appartenant au genre *Aspergillus* est basée sur l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques suivants:

- L'aspect de la colonie: la couleur de la partie aérienne est le critère de base qui permet de distinguer les espèces du genre *Aspergillus*. L'autre aspect est la texture de la colonie qui peut être floconneuse, veloutée, etc ;
- l'aspect et la couleur du revers de la colonie qui peut parfois être caractéristique d'une espèce ;
- la production des sclérotés (amas mycéliens durs), de forme, de taille et de couleur caractéristiques ;
- la vitesse de croissance du mycélium ;
- la taille, l'ornementation, la couleur et la forme des conidies ;
- la forme et la taille des vésicules ;
- la présence ou l'absence des stérigmates (métules) ;
- la longueur des conidiophores et leur aspect.

Les espèces de ce genre présentent un thalle cloisonné portant de nombreux conidiophores longs, érigés vers le haut, non ramifiés, qui se terminent par une tête sphérique appelée vésicule, de forme globuleuse ou claviforme. Les phialides, ou cellules conidiogènes en forme de bouteille, sont formées soit, directement sur la vésicule, on parle alors de tête unisériée, soit sur des cellules spécialisées appelées métules (stérigmates), on parle de tête bisériée (figure 1). Les conidies et les conidiophores sont produites en quantité très abondante. Certaines espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de former des amas mycéliens durs, appelés sclérotés, qui aident le champignon à survivre dans des conditions hostiles (WICKLOW et SHOTWELL, 1983 ; NESCI *et al*, 2009). Peu d'espèces du genre peuvent se reproduire sexuellement en formant des asques. Les formes sexuées sont rattachées aux genres suivants: *Emericella*, *Eurotium* *Petromyces* et *Sclerocleista* (RIBA, 2008).



**Figure 1 : La micromorphologie du genre *Aspergillus***  
[www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml](http://www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml).

### 1.3.3. *Aspergillus* section *Flavi*

Les membres d'*Aspergillus* section *Flavi* (groupe d'*A. flavus*) occupent des niches écologiques très diverses. Les espèces de cette section peuvent être présentes dans la nature soit comme des saprophytes dans le sol ou comme des parasites des plantes, des insectes et des animaux (HORN et DORNER, 1994). Dans cette section, *A. flavus* et *A. parasiticus* retiennent le plus d'attention car elles sont non seulement pathogènes pour certaines plantes (arachides, maïs et coton), mais elles produisent aussi des aflatoxines (SMITH et MOSS, 1985; SULTANA *et al*, 2015).

#### 1.3.3.1. Les espèces de la section *flavi* et leurs mycotoxines

Dans la clé synoptique publiée en 1981 par CHRISTENSEN, 14 espèces et 4 variétés ont été décrites. Cette clé est basée sur l'étude des caractères cultureux et morphologiques, dont la couleur des têtes conidiennes, la croissance à 37°C et les dimensions des conidiophores, des vésicules et des conidies. De très nombreuses études ont été menées sur ce groupe (SAMSON

et PITT, 2000). D'après SAMSON *et al.* (2006), il y'a 18 espèces appartenant à la section *Flavi*.

Ces espèces développent des couleurs allant du jaune-vert à brun (BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2015). Seules trois espèces, *Petromyces alliaceus*, *P. albertensis* et *A. lanosus*, ont une morphologie semblable au groupe d'*A. ochraceus* avec des conidies jaunes à ocre. Ces 3 espèces étaient classées auparavant dans la section *Circumdati* (groupe d'*A. ochraceus*) mais les données de la biologie moléculaire ont permis leur reclassement dans la section *Flavi*.

Les critères d'identification des espèces de la section *Flavi* sont actuellement basés sur la morphologie, le profil des mycotoxines produites et l'analyse des séquences de l'ADNr (SAMSON *et al.*, 2006). L'analyse des séquences ITS des isolats a montré qu'*Aspergillus* section *Flavi* forme 3 clades (*A. alliaceus*, *A. flavus* et *A. tamarii*) qui peuvent être distingués par la couleur des colonies et leur composition en ubiquinones (RIGO *et al.*, 2002; SAMSON *et al.*, 2006). *Aspergillus flavus* est une espèce génétiquement très complexe et a été subdivisée en deux catégories, selon les caractères morphologiques et génétiques, et le profil de production des mycotoxines (RIBA, 2008).

Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première catégorie produit des sclérotés grands, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm (COTTY, 1997). Selon GEISER *et al.* (2000) et NESCI *et al.* (2008), *A. flavus* est divisé en deux groupes non distincts morphologiquement. Le groupe I comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le groupe II comprend uniquement le type « S » capable de produire les aflatoxines B et G. Ces auteurs ont suggéré que les isolats de type « S » (groupe II) méritent d'être considérés comme une nouvelle espèce (GEISER *et al.*, 2000). D'après HUA SUI-SHENG (2002) et NESCI *et al.* (2008), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des producteurs et des non producteurs. Par contre, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les quatre types d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) mais pas l'acide cyclopiazonique (CPA) comme le montre le tableau III (DORNER *et al.*, 1984; VARGA *et al.*, 2003 ; BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2015).

**Tableau III: Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide kojique par les principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (VARGA *et al*, 2003).**

Espèce	Aflatoxines		Acide Cyclopiazonique	Acide Kojique
	B	G		
<i>A. flavus</i> groupe I	+	-	±	+
<i>A. flavus</i> groupe II	+	±	+	+
<i>A. oryzae</i>	-	-	±	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	+
<i>A. sojae</i>	-	-	-	+
<i>A. nomius</i>	+	+	-	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	-	+
<i>A. tamarii</i>	-	-	+	+
<i>A. caelatus</i>	-	-	-	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+	+

**+ : producteur.**

**-: non producteur.**

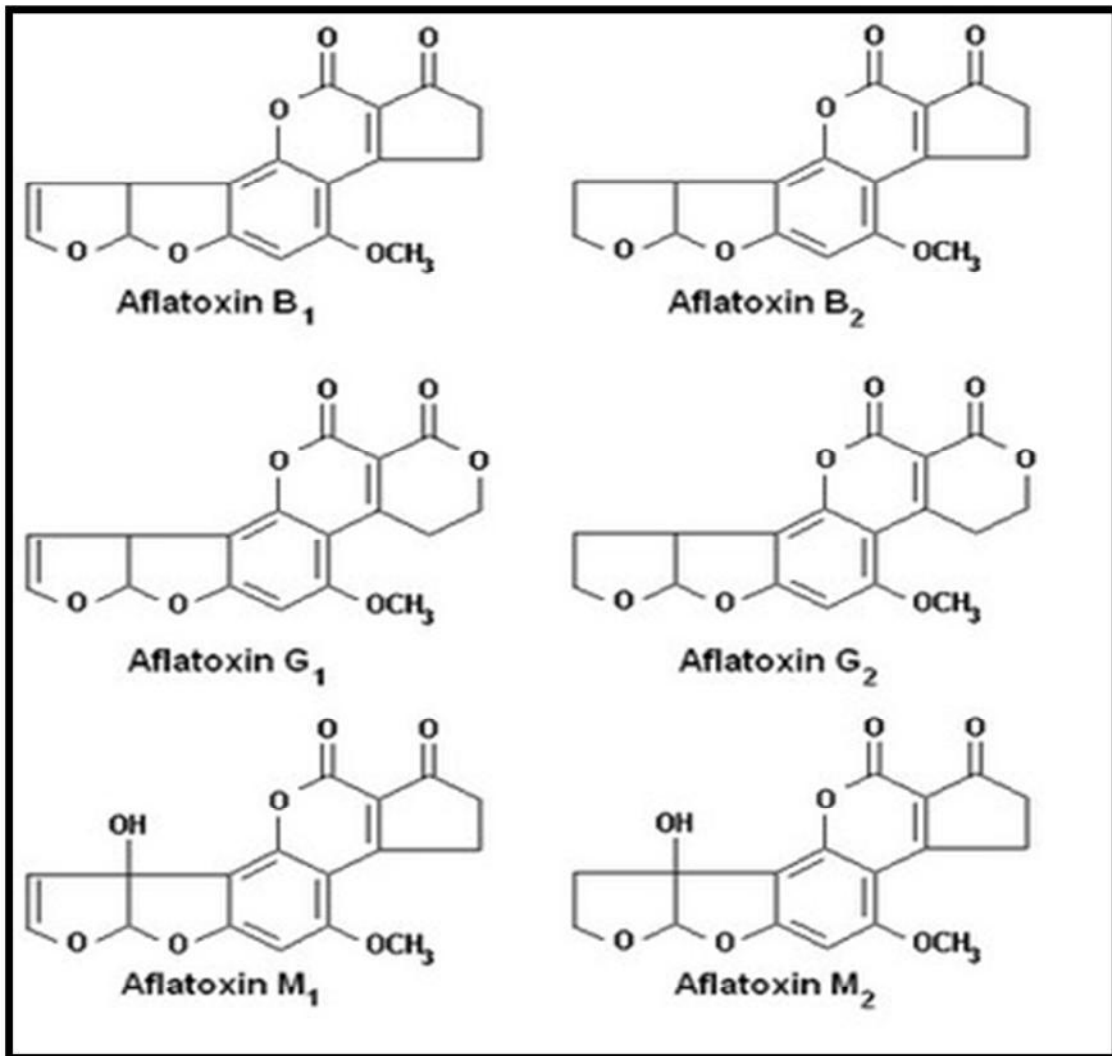
**± : production variable selon les souches.**

#### 1.4. Les aflatoxines

##### 1.4.1. Origine et propriété physico-chimique des aflatoxines

Les études conduites sur la matière première qui avait été à l'origine de la « maladie X du dindon » en Angleterre, aboutirent à l'isolement de la moisissure responsable, *Aspergillus flavus*, et à la caractérisation des aflatoxines (BLOUT, 1961 ; EDITE BEZERRA DA ROCHA *et al*, 2014). A l'état actuel on connaît, du point de vue structure, au moins 16 aflatoxines (COLE ET COX, 1981 ; PAPP *et al*, 2002) dont les principales sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFG1, l'AFG2 et l'AFM1 (Figure 2). Elles sont produites principalement par les espèces du genre *Aspergillus* dont, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* et *A. pseudotamarii*. Les quatre principales aflatoxines détectées dans les produits végétaux contaminés sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFG1 et l'AFG2. L'AFB1 est partiellement métabolisée en un dérivé hydroxylé, communément appelé "Milk Aflatoxin 1" ou aflatoxine M1 (AFM1), lors de l'ingestion de produits contaminés. Les aflatoxines posent un risque pour la santé humaine et animale (PARK et LIANG, 1993). Le Centre international de la recherche sur le cancer (IARC) a

classé l'aflatoxine B1 dans le groupe 1 (cancérogène humain) et l'AFM1 dans le groupe 2 (cancérogène humain probable) (ANONYME1, 1993).



**Figure 2 : Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1, M2 (DUTTON *et al*, 1985)**

Les aflatoxines sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (Aflatoxine B) ou des lactones hexatomiques (Aflatoxine G) (ASTORECA *et al*, 2011). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur les noyaux. Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau (10-20 mg/litre), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires à polaires (chloroforme et méthanol). La fluorescence intense des aflatoxines, une fois exposées à des longueurs d'ondes ( $\lambda = 365$  nm) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme).

L'aflatoxine de type B (AFB = AF « blue ») donne une fluorescence bleue et l'aflatoxine de type G (AFG = AF « Green »), donne une fluorescence verte (EDITE BEZERRA DA ROCHA *et al.*, 2014). L'AFM1 donne une fluorescence bleu-mauve. Cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification. Les propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines sont résumées dans le tableau IV.

**Tableau IV: Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (COLE et COX, 1981 ; DUTTON *et al.*, 1985 ; COLE et SCHWEIKERT, 2003 ; EL KHOURY, 2007)**

Aflatoxines	Formule brute	Masse moléculaire g/mol	Point de fusion	Absorption maximale à la lumière UV dans le méthanol	
				$\lambda$ max (nm)	E
<b>B1</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	312,3	268-269 (Cristallisation dans le chloroforme)	265 360-362	12 400 21 800
<b>B2</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub></b>	314,3	286-289 (Cristallisation dans un mélange de chloroforme et de pentane)	265 360-362	12 100 24 000
<b>G1</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub></b>	328,3	244-246 (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol)	265 360-362	9 600 17 700
<b>G2</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub></b>	330,3	237-240 (Cristallisation dans une solution d'acétate d'éthyle)	265 360-362	8 200 17 100
<b>M1</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub></b>	328.3	299 (cristallisation dans une solution de méthanol)	265 357	14 150 21 250
<b>M2</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub></b>	330,29	293	264 357	12 000 22 000

#### **1.4.2. Facteurs influençant la production d'aflatoxines**

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (ATAS *et al*, 2012 ; MARIN *et al*, 2013). Il s'agit d'un phénomène d'une grande complexité qui dépend d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. Les stress thermique, hydrique (sécheresse) et physique (lésions causées par les insectes) favorisent la contamination par les moisissures et la synthèse de mycotoxines (DOWD, 1998 ; MARIN *et al*, 2013). Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont :

- activité de l'eau supérieure à 0,83;
- température comprise entre 25 et 40°C ;
- la présence d'oxygène ;
- le développement du champignon sur des plantes stressées ;
- la présence d'insecte et de graines abimées ;
- le stockage en milieu chaud et humide ;
- la Composition du substrat : en effet la composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*. En effet la présence de l'acide phytique complexe le zinc indispensable à la biosynthèse des aflatoxines, alors que la proline stimule cette production (TABUC, 2007).

#### **1.4.3. Effets toxiques des aflatoxines**

L'effet toxique des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique, le mode d'administration, la composition de l'alimentation. L'AFB1 est la plus toxique suivie, par ordre décroissant de toxicité, par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité des aflatoxines G1, B2 et G2 est respectivement de 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB1 (COLE et COX, 1981). Ainsi la DL50 par voie orale varie de 0,3mg/kg de poids corporel chez le caneton et 9mg/kg de poids corporel chez la souris. Ingérée en grande quantité, l'aflatoxine peut être responsable de toxicités aiguës. Elle se caractérise généralement par la mort rapide des animaux. Ils présentent alors un foie décoloré et augmenté de volume (hépatotoxicité) ; les reins présentent des signes de glomérulonéphrite et les poumons sont congestionnés (GERALDINE *et al*, 2008 ; BROCHARD et LE BACLE, 2009).

Les aflatoxines sont tératogènes et mutagènes (LIANG ZHI-HONG *et al*, 2008 ; GEORGIADOU *et al*, 2012). L'effet tératogène est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de développement, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (VESELY *et al*, 1983 ; SUNG-HYE CHO *et al*, 2008).

Toutefois, la propriété toxique majeure de l'AFB1 est son pouvoir cancérigène (BAIRD *et al*, 2006 ; DAOHONG ZHANG *et al*, 2009). En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux (VINOD *et al*, 2008 ; CURTIS *et al*, 2009). Pour cette raison, elle est classée dans le groupe I des molécules cancérigènes chez l'homme par l'IARC (ANONYME1, 1993; REDDY *et al*, 2009).

#### **1.4.4. Métabolisme et mécanisme d'action des aflatoxines**

Lors de l'exposition orale chez les mammifères, les aflatoxines sont adsorbées au niveau du duodénum. Les aflatoxines sont véhiculées dans l'organisme à partir d'une fixation sur les protéines plasmatiques (CASTEGNARO *et al*, 1999, BROCHARD et LE BACLE, 2009). Elles subissent un métabolisme hépatique intense principalement réalisé par l'intervention des cytochromes P450 hépatiques. Les autres voies de métabolisme de l'AF B1 comprennent la voie de la prostaglandine H-synthétase et la voie de la lypo-oxygénase. Deux enzymes présentes à des concentrations élevés dans le tissu pulmonaire.

Sous contrôle des cytochromes P450, l'AFB1 est transformée dans l'organisme en plusieurs métabolites dont un dérivé époxyde (AFB1-8,9- époxyde), principal responsable de l'effet mutagène et cancérigène de l'AFB1 et AFM1, communément appelé «Milk Aflatoxin1 » (BADEA *et al*, 2009 ; LI JUAN-JUAN *et al*, 2010). Les autres métabolites comprennent notamment l'AFQ1, l'AFP1, l'Aflatoxicol. La détoxification de l'AFB1-8,9-époxyde se fait essentiellement via la conjugaison au glutathion assurée par la glutathion-Stransférase (GST). Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile sous forme conjuguée au glutathion ou de glucuro-conjugué. L'AFB1 est aussi éliminé par voie urinaire sous forme inchangée ou sous forme métabolisée, notamment AFM1, ou sous forme de dérivés conjugués ou adduits à l'ADN (BROCHARD et LE BACLE, 2009). L'exposition des nourrissons à l'AFM1à partir du lait maternel a été notée dans les pays en développement (MAGOHA *et al*, 2014)

Les effets toxiques aigus ainsi que les effets cancérigènes et mutagènes de l'AFB1, implique une liaison covalente de l'AFB1-8,9- époxyde avec l'ADN, l'ARN et les protéines. Cela se répercute au niveau de la synthèse d'enzymes clés impliquées dans des réactions

métaboliques essentielles (STARK, 2001). L'AFB1-8,9- époxyde a une affinité très marquée pour l'ADN avec lequel il produit des adduits préférentiellement avec la guanine en position N7 (PAPP *et al*, 2002). L'AFB1 est époxydé soit en dérivé exo, soit en dérivé endo. Seule la forme exo se fixe sur la guanine pour donner un adduit. La présence des adduits à l'ADN est à l'origine de mutations. Il s'agit essentiellement de transversions G et T où la guanine est remplacée par la thymine. Approximativement 55% des hépatocarcinomes présentent une mutation de type AGG →AGT dans le codon 249 du gène p53 suppresseur des tumeurs.

C'est ainsi que l'on observe un effet immunosuppresseur, des troubles de la coagulation, une diminution de la digestion de graisses et de la cellulose ainsi que de la nécrose et de la stéatose hépatique (LEBLANC et SAINT-HILAIRE, 2002 ; LI *et al*, 2016).

Il existe des preuves suffisantes de la cancérigénicité de ses molécules chez l'homme et l'animal. Certains scientifiques considèrent que chez l'homme, les aflatoxines n'agiraient pas comme cancérogènes primaires, mais plutôt comme suppresseur des réactions immunitaires à médiation cellulaire favorisant le nombre de porteurs de VHB (Virus d'Hépatite B). Les effets immunotoxiques semblent être dus à l'altération de la synthèse des acides nucléiques et de protéines accompagnée d'une diminution de la prolifération et de la production de cytokines. Parmi d'autres multiples effets néfastes des aflatoxines, on retrouve un découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (BROCHARD ET LE BACLE, 2009; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009).

De nombreuses études épidémiologiques et les tests de génotoxicité ont confirmé le rôle déterminant des aflatoxines, en particulier AFB1 et dans une moindre mesure AFM1, dans l'induction du cancer hépatique. Des études plus poussées sont en cours pour en déterminer plus précisément les mécanismes d'action (PFOHL-LESZKOWICZ, 2009). Le risque de cancer lié aux aflatoxines peut être accru jusqu'à 60 fois en présence du virus de l'hépatite B et en cas de malnutrition (HERMAN, 1999; LEBLANC et SAINT- HILAIRE, 2002). Cela laisse supposer une sensibilité particulière des couches les plus pauvres des populations (PERAICA *et al*, 1999). En effet plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à expliquer le risque élevé de développement de carcinomes hépatocellulaires lors de l'exposition simultanée au virus de l'hépatite B (VHB) et aux aflatoxines (FERNANDEZ *et al*, 1997; CURTIS *et al*, 2009). D'après WILD *et al* (1992) une ingestion de 1,4µg d'AFB1 associée au virus d'hépatite B constitue un risque de développement de cancer.

#### **1.4.5. Méthodes d'extraction et de caractérisation des aflatoxines**

L'une des étapes cruciales pour la détermination qualitative ou quantitative de différentes mycotoxines est la préparation d'échantillons et la préconcentration d'analytes sont généralement extraites d'échantillons moulus (cas des solides), soumis à une agitation ou trituration après ajout de solvants organiques polaires ou apolaires purs ou en mélange (eau, acétonitrile, méthanol, éthanol, chloroforme, acétate d'éthyle, dichlorométhane) (KRSKA et JOSEPHS, 2001). La tendance de ces dernières années pour la préparation d'échantillons réside dans la minimisation de l'utilisation de solvants, particulièrement les solvants chlorés et ceux qui sont nocifs à l'environnement et à la santé. Aussi, la miniaturisation des procédures analytiques est-elle envisagée de manière à réduire à une plus petite dimension la prise d'échantillon et les solvants tout en maintenant l'efficacité de l'approche analytique. La purification de l'extrait est souvent une étape inévitable dans l'analyse des mycotoxines. Elle repose sur les techniques d'extraction liquide - liquide (LLE), sur l'utilisation des colonnes à phase solide (solid-phase extraction [SPE]) ou des colonnes d'immunoaffinité (immunoaffinity column [IAC]). (JINAP *et al*, 2012; HUYBRECHTS *et al*, 2013).

Pour l'analyse des mycotoxines habituellement présentes à l'état de traces, c'est-à-dire en quantité minime (ppm), soit inférieure au  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Il existe une panoplie de méthodes catégorisées en deux groupes : les méthodes rapides de criblages comme les méthodes immunologiques et la chromatographie sur couche mince (CCM) et les méthodes quantitatives comme les chromatographies liquides ou gazeuses (HPLC et GC), basées essentiellement sur la séparation chromatographique des molécules puis leur détection par fluorimétrie ou spectrométrie. (JINAP *et al*, 2012 ; HUYBRECHTS *et al*, 2013). Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permettent l'analyse de très faibles quantités d'échantillons. Ces techniques sensibles sont excessivement coûteuses et elles nécessitent un personnel qualifié (SAQER, 2009 ; MONBALIU, 2009). D'autres méthodes plus récentes utilisent le principe de l'immunoanalyse type ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) et autorisent suivant leur configuration soit une détection de type présence ou absence (résultat qualitatif), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine (LEMING LIN *et al*, 1998 ; HUONG *et al*, 2016).

### 1.4.6. Réglementation

Les aflatoxines sont les mycotoxines les plus réglementées. Dans le cadre du règlement 1881/2006, 1126/2007, 105/2010CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'homme, des teneurs maximales ont été fixées pour les aflatoxines B1, B2, G1, G2 sont présentées dans le Tableau V.

**Tableau V : Teneurs maximales pour les aflatoxines dans des denrées alimentaires selon les réglementations de la commission européenne (1881/2006, 1126/2007, CE105/2010).**

Denrées alimentaires	Teneurs maximales en Aflatoxines (µg/kg)	
	B1	B1+B2+G1+G2
Fruits séchés et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4
Toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés	2	4
Maïs destiné à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5	10
Arachides destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	8	15
Arachides, fruits à coque et produits dérivés de leur transformation, destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4

## 1.5. Approche de décontamination

### 1.5.1. Procédés de lutte contre la production de mycotoxines dans les matrices alimentaires

Les mycotoxines posent un problème important universel et de santé publique, notamment pour l'agriculture, et les sciences économiques (KOSEGARTEN *et al*, 2016). Le maïs et les céréales en générale sont susceptibles d'être contaminés par les moisissures et les mycotoxines (SCHMIDT *et al*, 1985 ; HUONG *et al*, 2016). Pour pouvoir lutter contre ces contaminations, il faut savoir à quel moment elles se développent au cours de l'élaboration d'un produit. Ainsi, il est possible de définir cinq moments privilégiés: lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation et enfin lors de la consommation par l'être humain. Les moyens de lutte pour chaque période définie sont consignés dans le tableau VI (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999, YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002).

**Tableau VI : Les moyens de lutte pour chaque période (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999 YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002).**

Période définie	Solutions proposées
<b>Au champs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- créer des plantes résistantes ;</li> <li>- limiter le développement par l'emploi de fongicides ;</li> <li>- arrosage adapté ;</li> <li>- apport en minéraux.</li> </ul>
<b>À la récolte</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- veiller à la maturité du grain ;</li> <li>- inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés ;</li> <li>- éviter les récoltes par temps humide.</li> </ul>
<b>Au stockage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contrôle périodique ;</li> <li>- maintenir une bonne température ;</li> <li>- contrôler l'humidité ;</li> <li>- détruire les produits contaminés ;</li> <li>- une bonne aération des silos.</li> </ul>
<b>À la transformation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contrôle mais, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures.</li> </ul>
<b>À la consommation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- éliminer les aliments contaminés ;</li> <li>- variation du barème de cuisson.</li> </ul>

### **1.5.2. Les différents modes de décontamination**

Un procédé de décontamination des aliments destinés à l'alimentation humaine ou animale doit être efficace sans les rendre impropres à la consommation. Il doit être simple d'utilisation et peu coûteux car la décontamination peut concerner des quantités importantes. Le processus est d'autant plus difficile à appliquer que la contamination est souvent très hétérogène. Il n'existe pas de méthode universelle qui puisse convenir pour traiter l'ensemble des mycotoxines. En effet les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation, etc.) ne détruisent pas ou peu les mycotoxines (HARRIS et STAPLES, 1992). Les méthodes de détoxification connues à ce jour sont d'ordre :

- **physique**

La décontamination physique inclue plusieurs pratique notamment le lavage, séchage, tri et séparation des poussières, des coques ou des peaux qui sont le lieu essentiel de la contamination (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002) ;

- **chimique**

Les inhibiteurs chimiques de moisissures correspondent au traitement à l'ammoniaque sous pression, addition de propionate, de formaldéhyde, d'hydrure de calcium, d'hydroxyde de sodium, de chlorure de sodium, hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène ou de tout autre inhibiteur de moisissures (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002 ; REDDY *et al*, 2008)

Les fongicides sont largement utilisés dans la lutte chimique contre les champignons phytopathogènes, avec des résultats avérés sur l'incidence des maladies ; en revanche, les effets de l'application de fongicides sur la production de mycotoxines sont contradictoires et parfois irréguliers. Plusieurs fongicides sont utilisés spécifiquement contre des champignons producteurs de mycotoxines : les triazoles, metconazoles et tébuconazoles, sont efficaces contre la fusariose et l'accumulation de désoxynivalénol dans les grains de blé (EDWARDS, 2004). Le moment de l'application semble jouer un rôle crucial dans l'efficacité du contrôle : pour les céréales, l'efficacité est maximale au début de l'anthèse et décroît rapidement avant et après ce stade (BEYER *et al*, 2006).

Pour ce qui est des aflatoxines, l'effet des fongicides est plus incertain, de sorte qu'actuellement il n'y a aucune recommandation de fongicide pour lutter contre la contamination (ABBAS *et al*, 2009) ;

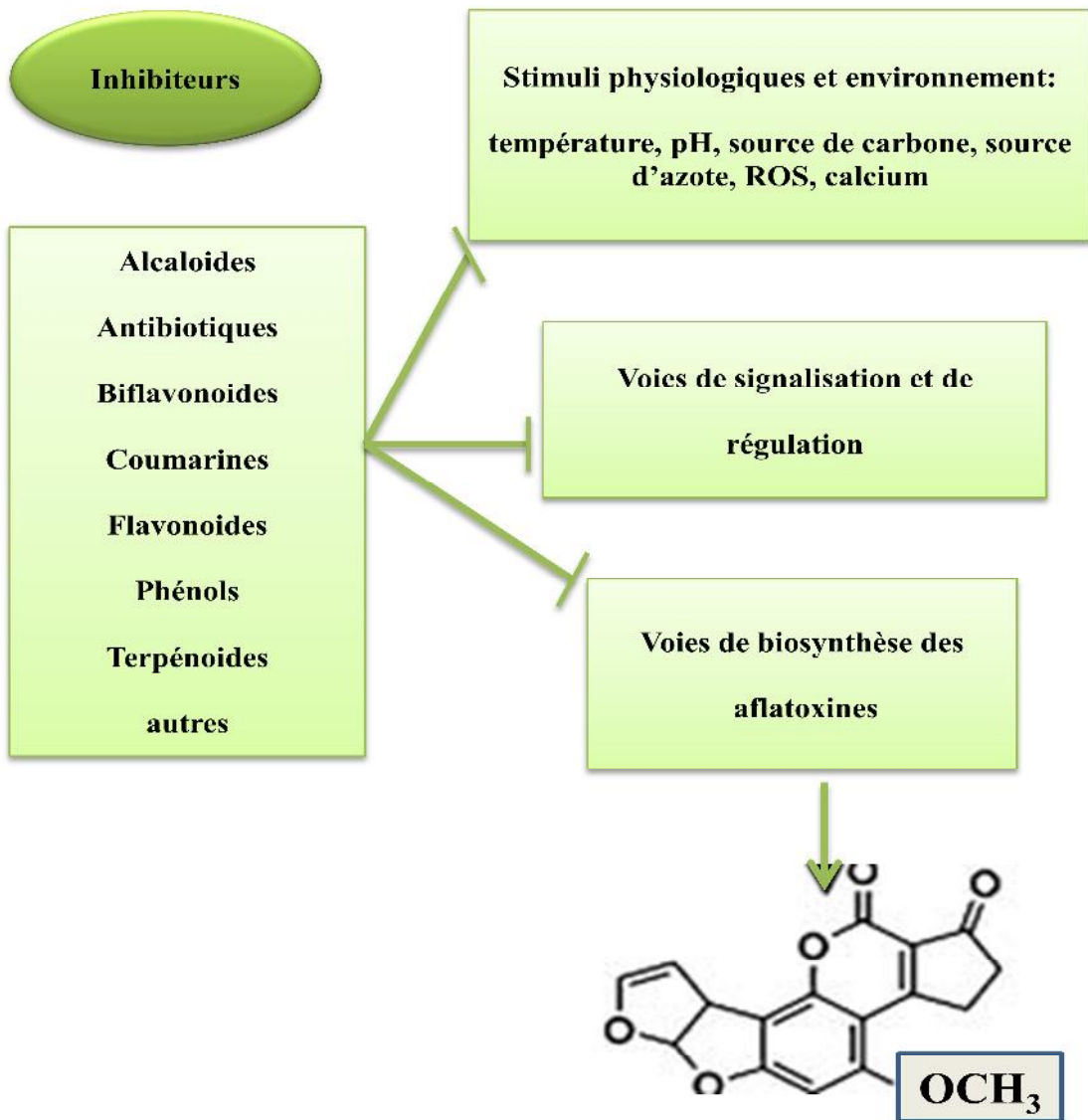
- **microbiologique**

Le procédé de détoxification microbiologique par le biais d'agents biologiques qui consiste en l'ajout de certaines bactéries comme exemple *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma virens* et *Bacillus subtilis* (REDDY *et al*, 2009) et certaines souches de bactéries lactiques (bifidobactéries) sont capables de se lier et de détoxifier les mycotoxines (biodégradation) et réduire leur production, ces agents ont aussi un effet sur la croissance des espèces productrices (HASKARD *et al*, 2000 ; CHINAPHUTI et AUKKASARAKUL, 2008). En effet les espèces citées ci-dessus ont démontré respectivement 93%, 80% et 68% de réduction de la croissance d'*A. flavus* et de 83,7%, 72,2% et 58% de réduction d'AFB1 (REDDY *et al*, 2009). Des recherches sont actuellement effectuées afin de développer de nouvelles classes de ligands naturels des mycotoxines. Ainsi, les glucomannanes issus de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines (LI JUAN-JUAN *et al*, 2010) ;

- **biologique**

Enfin, on sait depuis longtemps que de nombreux produits naturels, notamment des huiles essentielles et extraits de plantes comestibles ou médicinales, ont des propriétés antifongiques. Ces plantes représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs. La littérature est riche en exemples d'inhibitions de la croissance ou de la synthèse de toxines par des produits d'origine végétale, particulièrement en ce qui concerne *Aspergillus*. Le girofle, le neem, l'ail, le gingembre, le poivre, les plantes aromatiques (menthe, sauge, laurier, origan), la moutarde, l'anis, le cumin et l'oignon sont des exemples de plantes produisant des substances antifongiques. Actuellement, ces produits ne sont pas utilisés à grande échelle pour protéger les cultures ; leur utilisation pour la protection des récoltes contre les toxines de stockage est un peu plus répandue (REDDY *et al*, 2010).

Selon ROBERT *et al* (2008), les inhibiteurs de la biosynthèse de l'AF agissent à trois niveaux: (1) modulent les facteurs physiologiques et environnementales affectants la biosynthèse de l'aflatoxine, (2) inhibent les circuits de signalisation des voies biosynthétiques, ou (3) inhibe directement l'expression des gènes ou l'activité des enzymes (figure 3)



**Figure 3: Représentation schématique de la régulation et de biosynthèse de l'AF avec les modes d'action potentiels des groupes majeurs des inhibiteurs (ROBERT *et al*, 2008).**

## II. Margine

### 2.1. Origine des margines

Le processus de trituration des olives produit principalement l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon (huile secondaire extraite par des solvants organiques) et engendre deux résidus l'un liquide, les margines et l'autre solide, les grignons. Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (DI-GIOVACCHINO *et al*, 1988 ; HAMDY *et al*, 1992).

Les margines sont composées de 40 à 50% de l'eau végétale qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (NEFZAOUY, 1987 ; EL ABASSI *et al*, 2011).

Elles sont à l'origine un liquide rougeâtre sombre, en raison d'une série de processus enzymatique, se dégrade et se transforme en margine, liquide noir et nauséabond, fortement polluant (YAAKOUBI *et al*, 2009 ; NADOUR *et al*, 2015). La qualité et la quantité de la margine générée est variable, elle dépend du système d'extraction, de la variété d'olive, le taux de maturation, les facteurs climatiques et de l'eau utilisée. En moyenne 1m<sup>3</sup> de margine est générée par tonne d'olives triturées et la charge polluante moyenne est de 70 kg de DCO par tonne d'olives.

## **2.2. Les caractéristiques physico-chimiques des margines**

Les margines ont une couleur brune rougeâtre, d'aspect trouble. Ces effluents ont une forte charge saline et sont très acides avec un pH de 4 à 5,5 (NEFZAOU, 1987 ; YALCUK *et al*, 2010) et une forte conductivité (ZBAKH et AL ABBASSI, 2012). Ces eaux comportent approximativement 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de substances minérales (RAMOS-CORMENZANA, 1986 ; NOUBIH *et al*, 2007).

La composition chimique des margines est très complexe et hétérogène. Elles contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA, 1992 ; ESMAIL *et al*, 2015).

Les margines contiennent des quantités significatives en sels minéraux dont 80% sont solubles et 20% insolubles (RANALLI, 1991a). D'après FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA (1992), les éléments les plus représentatifs sont le potassium, les carbonates, les phosphates et le sodium.

Les margines comportent aussi deux fractions organiques une soluble et l'autre insoluble (HAMDI, 1991a ; OBIED *et al*, 2005). Cette fraction est constituée essentiellement de :

- Sucres avec une teneur qui varie entre 2 et 8% (HAMDI, 1993) dont les plus abondants sont les composés lignocellulosiques et des pectines (FERNANDEZ DIAZ, 1983 ; NADOUR *et al*, 2012, 2015), et les sucres simples tel que : Arabinose, Galactose et Glucose (DERMECHE *et al*, 2013 ; NADOUR *et al*, 2015).
- Composés azotés (1,2 à 2,4%) représentés principalement par les protéines. Les acides aminés les plus abondants sont les acides Aspartiques et Glutamiques, la Proline et la Glycines (CAPASSO *et al*, 2002a ; JAIL *et al*, 2010).
- Vitamines du groupe D et la vitamine PP (SALVEMINI, 1985 ; AISSAM, 2003).
- Les acides organiques (0,5 à 1,5%) dont les plus importants sont l'acide lactique, malique et fumarique (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA 1981 ; TSILOULPAS *et al*, 2002).

- Les acides gras (0,02 à 1%) dont les plus importants sont l'acide oléique (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA, 1981 ; TSILOULPAS *et al*, 2002).
- Les composés phénoliques qui sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction (RANALLI, 1991a ; ACHAK *et al*, 2008 ; ESMAIL *et al*, 2015). Ils sont composés d'acides phénoliques, alcools phénoliques et des polymères phénoliques (BORJA *et al*, 1995).

**Tableau VII: Composition des margines, cité par ZBAKH et ABBASSI (2012)**

Paramètre	Gamme des valeurs
<b>pH</b>	4,7 – 5,7
<b>Conductivité (mS/cm)</b>	5 – 41
<b>DCO (g/l)</b>	16,5 – 190
<b>DBO (g/l)</b>	41,3 – 46
<b>Résidus sec (g/l)</b>	11,5 – 102,5
<b>Matière organique (g/l)</b>	16,7 – 81,6
<b>Matière grasse (g/l)</b>	1,64 – 9,8
<b>Polyphénols (g/l)</b>	0,002 – 11,5
<b>Sucres (g/l)</b>	1,3 – 8,79
<b>Acides organiques (g/l)</b>	0,78 – 1
<b>Azote totale (g/l)</b>	0,06 – 0,95
<b>Matière minérale (g/l)</b>	0,06 – 0,95

### 2.3. Caractéristiques microbiologique des margines

Les études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes. Donc, ces effluents ne posent aucun problème hygiéno-sanitaire (RANALLI, 1991a). Des analyses microbiologiques ont montré que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (AISSAM *et al*, 2002). Ces micro-organismes supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristiques de ces effluents, et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques. Parmi les levures, on trouve *Trichosporium cutaneum*, *Cryptococcus albidus* ainsi que les genres *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* (RAMOS-CORMENZANA, 1986 ; AISSAM *et al*, 2002 ; FADIL *et al*, 2003).

La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus candidus*, et *Alternaria sp* (MILLAN *et al*, 2000). La flore bactérienne regroupe les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à Gram-négatif. Le genre *Pseudomonas sp*. Ainsi que *Bacillus megaterium* ont été décrits.

#### **2.4. Problématique environnementale des margines**

Le rejet des margines reste jusqu'à présent un problème écologique prépondérant ainsi qu'un redoutable souci pour les pays producteurs d'huile d'olive où de larges volumes qui se situent entre 7 et 30 million m<sup>3</sup> sont produits dans des intervalles de temps très brefs s'étendant de Novembre Jusqu'à Avril. (FIORENTINO *et al*, 2003 ; DERMECHE *et al*, 2013).

L'absence de méthodes de traitement adaptées pousse les propriétaires d'huileries à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle ou à surcharger avec ces substances toxiques un réseau d'égouts pas adapté. (BEN YAHIA *et al*, 2003)

Les margines ne sont pas toxiques pour l'homme (RANALLI, 1991a), par contre, ils posent de sérieux problèmes de pollution des eaux, des sols et de l'air par leur concentration élevée en matières organiques et en polyphénols qui sont responsables de leur coloration noire et qui ont des propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes (MORENO *et al*, 1987 ; ESMAIL *et al*, 2015). Des études de toxicité et de biodégradabilité ont montré que les composés phénoliques et les composés tanniques sont toxiques et difficilement biodégradables (CASA *et al*, 2003).

#### **2.5. Traitement des margines**

Jusqu'à nos jours, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment (JEGUIRIMA *et al*, 2012).

Différents procédés de traitements ont été proposés, tels que les traitements aérobies et anaérobies. Cependant ces méthodes présentent plusieurs inconvénients qui rendent leur mise en œuvre très difficile et coûteuse (KAPELLAKIS *et al*, 2008).

Les processus thermiques sont les moyens principaux pour les traitements de grandes quantités de margines. Néanmoins, du fait que ces effluents contiennent des quantités élevées en eau, leur traitement thermique n'est pas économiquement viable bien que la combustion des margines concentrées avec du grignon d'olive a été étudiée.

Les différents procédés de traitement proposés peuvent être subdivisés en trois grands groupes, utilisés seuls ou combinés. Ils sont représentés dans le tableau (Tableau VIII).

**Tableau VIII: Technologies de traitement appliquées sur les margines**

Type de traitement	Procédé	Principe	Références
<b>Traitements physiques</b>	<b>Evaporation naturelle Ou (lagunage)</b>	Autoépuration naturelle des margines dans des bassins de profondeur (0,7 à 1,5m) par des processus de fermentation aérobies et anaérobies.	ROIG <i>et al</i> , 2006
	<b>Evaporation forcée</b>	Faciliter l'évaporation des margines grâce aux panneaux évaporateurs.	EL HAJJOUJI, 2007
	<b>Concentration thermique</b>	Elévation du taux de matières sèches des margines à environ 70%.	RANALLI <i>et al</i> , 2003
	<b>Séchage</b>	Assuré par les fumées issues de la combustion de noyaux broyés ou de grignons asséchés.	CELMA <i>et al</i> , 2007
	<b>Incinération</b>	Evaporation de la phase aqueuse des margines dans un four ; et la transformation du résidu solide en cendres.	RANALLI <i>et al</i> , 2003
<b>Traitements physicochimiques</b>	<b>Coagulation-floculation</b>	Agglomération et décantation des particules en suspension des margines par l'injection de produits tensioactifs ou certains coagulants.	ACHAK <i>et al</i> , 2008
	<b>Electrocoagulation</b>	Elimination de certaines pollutions des margines par utilisation des électrodes en fer ou en aluminium avec addition de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et de chlorure polyaluminium (PAC) comme un aide coagulant.	TEZCAN <i>et al</i> , 2006 KHOUIFI <i>et al</i> , 2007
	<b>Adsorption sur le charbon actif</b>	Eliminer une grande proportion de la demande chimique résiduelle.	GALIATSATOU <i>et al</i> , 2002 YAHYAOUY, 2012
<b>Traitements biologiques</b>	<b>Traitements anaérobies</b>	Transformation des substances organiques présentes dans les margines en méthane par des bactéries anaérobies en limitant les dégagements de mauvaises odeurs.	ARDA <i>et al</i> , 2010
	<b>Traitements aérobies</b>	Dégradation de la matière organique des margines par les microorganismes en présence d'oxygène en la transformant en CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O et en masse cellulaire.	EL HAJJOUJI <i>et al</i> , 2007 MICHAILEDIS <i>et al</i> , 2011

## **2.6. Valorisation des margines**

Les margines sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques. Ce critère a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de leur valorisation aussi bien à l'échelle de laboratoire qu'à l'échelle industrielle, cité par ABU KHAYAR *et al* (2013).

Cette valorisation d'une part, a pour objectif d'éliminer les composés phénoliques et d'autre part, d'utiliser les margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et voire même de génie civil (LEVIS-MENZI *et al*, 1992 ; DE LA CASA *et al*, 2009).

L'importance quantitative de ces effluents reflète la diversité des domaines de leur valorisation comme le montre la figure 4. L'utilisation des margines comme fertilisant pour les sols et les cultures est une pratique courante qui permet de résoudre partiellement le problème de leurs élimination (PARADES *et al*, 1999 ; ROIG *et al*, 2006).

La valorisation agricole des margines par compostage a pour but essentiel de fixer les éléments fertilisants sur un substrat carboné au cours d'un processus aérobie, pour les restituer au sol en fonction des besoins des plantes (NEFZAOU, 1987 ; ROIG *et al*, 2006).

Les margines peuvent servir aussi comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes (AGUELIRA *et al*, 2008).

Plusieurs techniques de traitement des margines par voie anaérobie peuvent être améliorées pour permettre leur valorisation. Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés de valorisation, ce qui nécessite une étape de prétraitement afin d'extraire les composés phénoliques (HAMDI, 1996 ; DE MARCO *et al*, 2007). Par ces procédés, les margines peuvent donc être revalorisées en eau d'irrigation (eau traitée), en bioénergie tels que la production de biométhane (FEDORAK et HRUDEY, 1984 ; BLIKA *et al*, 2009), de bioéthanol (MASSADEH et MODALLAL, 2008), de biohydrogène et en alimentation de bétail (LEULMI, 2011).

Certains de ces traitement sont récents, il s'agit en particulier de la récupération des composés aromatiques et phénoliques, et des polysaccharides pour leurs utilisation comme source de fibres alimentaires (DERMECHE *et al*, 2013 ; NADOUR *et al*, 2015), ainsi que l'étude des propriétés biologiques de composés phénoliques tels que les activités antibactériennes (ESMAIL *et al*, 2015), l'activité anti-oxydante de l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (LAFKA *et al*, 2011) et l'activité anti-inflammatoire (BITLER *et al*, 2005).

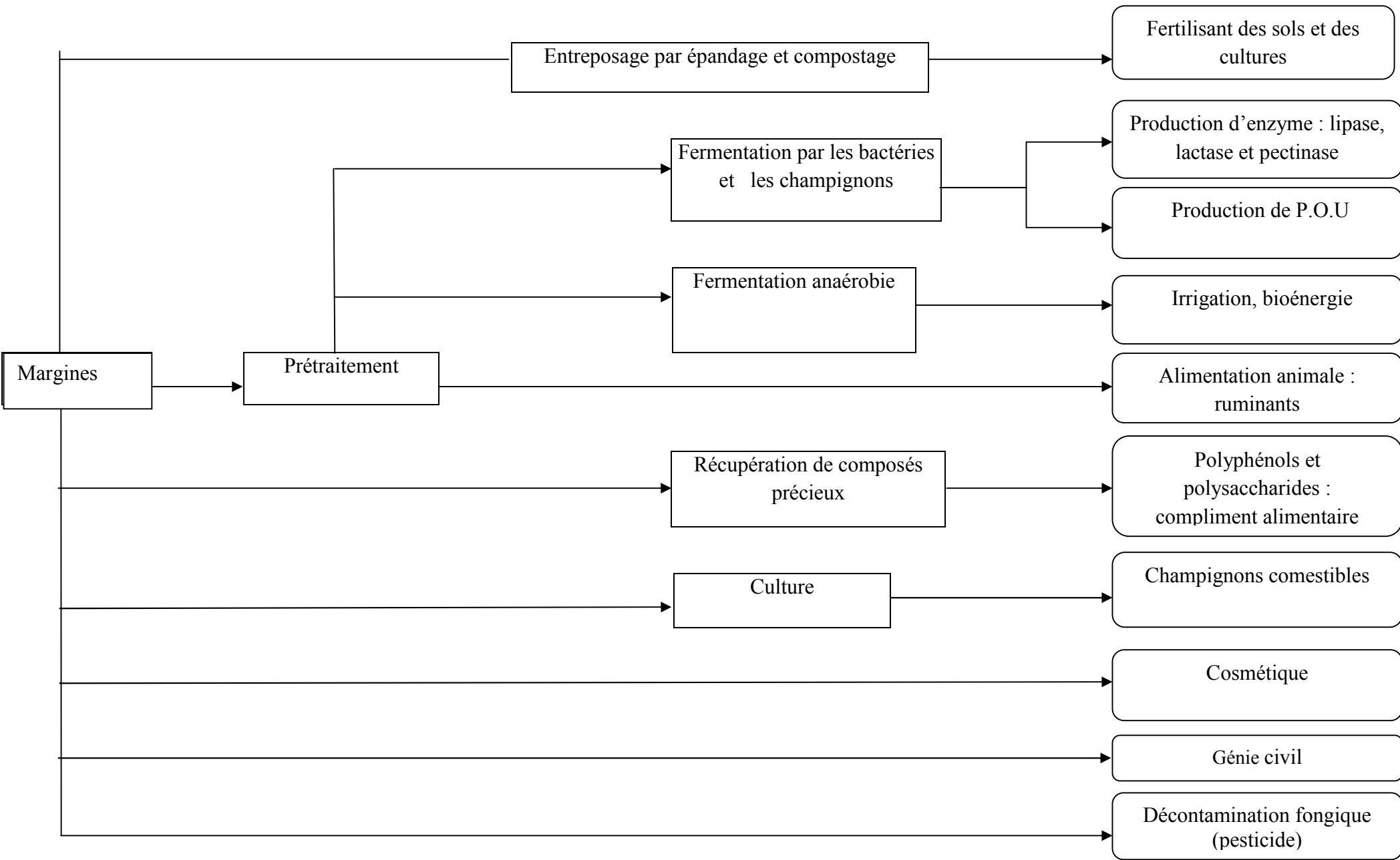


Figure 4 : Différentes filières de valorisation des margines

***PARTIE 2***  
***Partie expérimentale***

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie appliquée et au niveau du laboratoire commun de microbiologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

## **Matériel et méthodes**

### **I. Matériel**

#### **1.1. Matériel végétal**

##### **1.1.1. L'échantillon de margine**

Les margines ayant fait l'objet de notre étude proviennent d'une huilerie moderne située à Ath yenni de la wilaya de tizi-ouzou. Celles-ci proviennent de la campagne oléicole 2015/2016. Les olives triturées sont de la variété *Chamlal*. Les margines ont été recueillies dans des bouteilles en plastique à partir des bassins de décantation, acheminées rapidement au laboratoire, ces dernières ont subi une filtration puis conservées dans des flacons de 500ml au congélateur à -20°C jusqu'à leurs utilisations (ESMAIL *et al*, 2014).

##### **1.1.2. Provenance du maïs et du blé**

C'est essentiellement un maïs commercialisé (LE NORD), vendu en vrac.

Le blé est fourni par une entreprise privée : Moulins Industriels du Sebaou (MIS).

Les échantillons de maïs et de blé sont, ensuite fractionnés en petites quantités (100g) et placés dans des sacs en papier, scellés et maintenus au réfrigérateur à +4°C jusqu'à leurs utilisations (EL-SHANAWANY *et al*, 2005).

#### **1.2. La souche fongique testée**

La souche utilisée dans les tests fait parti des moisissures appartenant au genre *Aspergillus* qui est pathogène et contaminant. Il s'agit d'*Aspergillus flavus* fourni par le laboratoire de recherche de microbiologie de la faculté de biologie de Tizi-Ouzou. La souche est conservée à -20°C en présence du glycérol à 20% (ISIK *et al*, 1999). Le repiquage de la souche est effectué sur milieu PDA inclinée et sur boîte de Petrie.

#### **1.3. Appareillage :**

Les différents appareils utilisés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Les différents appareils utilisés.

Appareils	Firmes
<b>Agitateur magnétique</b>	HANNA INSTRUMENTS
<b>Agitateur magnétique à plaque chauffante</b>	LABINCO
<b>Autoclave</b>	PBINTERNATIONAL
<b>Bain-marie thermostaté</b>	MEMMERT
<b>Balance</b>	DENVER INSTRUMENTS
<b>Balance de précision</b>	PIONEER™
<b>Microcentrifugeuse à eppendorf</b>	MICROCENTAUR MSE/SANYO
<b>Centrifugeuse</b>	SIGMA
<b>Conductimètre</b>	HANNA INSTRUMENTS
<b>Etuve</b>	BINDER
<b>Humidimètre</b>	DENVER INSTRUMENTS
<b>PH mètre</b>	HANNA INSTRUMENTS
<b>Spectrophotomètre UV-Visible</b>	JENWAY 6320D
<b>Vortex</b>	FISHERBRAND

#### 1.4. Produits chimiques :

Les différents produits chimiques utilisés sont :

**Acides :** Acide gallique (MERCK), acide chlorhydrique (HCL) (SIGMA ALDRICH).

**Solvants :** Acétate d'éthyle, acétone, chloroforme, hexane, méthanol (PANREAC, LABOSI).

**Autres produits :** Folin-Ciocalteu, réactif de Bradford, Albumine Sérique Bovine (BSA), carbonate de sodium, glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (SIGMA ALDRICH).

**Milieus de culture** (annexe 2) : PDA : Pomme de terre, Dextrose, Agar

CAM: Coconut Agar Medium

PDB: Potato Dextrose Broth

SMKY: Semi synthetic liquid medium

## II. Méthodes – Partie biochimique

### 2.1. Caractérisation physicochimique des margines :

La caractérisation physicochimique des margines issues de l'huilerie utilisant le système de centrifugation à trois phases a été basée sur l'étude des paramètres suivants :

Acidité (pH), conductivité, matière sèche (MS), teneur en eau (TE), matière minérale sèche (MMS), matière volatile sèche (MVS), matière en suspension (MES), matière grasse (MG), polyphénols (PP), sucres totaux (ST) et protéines.

Avant de procéder au dosage des différents paramètres physicochimiques. L'échantillon de margine est filtré à l'aide d'une passoire et centrifugé (3000g/min à 4C°). Pour la détermination de pH, MS, TE, MMS, MVS, MES, l'échantillon de margine est utilisé sans filtration et centrifugation.

### **2.1.1. Acidité (pH)**

L'acidité des margines est évaluée en mesurant le pH (potentiel d'hydrogène). Cette dernière mesure la concentration d'une solution aqueuse en protons en déterminant ainsi le degré d'acidité ou de basicité de la solution (BUCK *et al*, 2002).

Après étalonnage du pH mètre, l'électrode de mesure est plongée dans un bécher contenant un volume de 100ml de margines bien homogénéisées et on note le pH (REJESEK, 2003).

### **2.1.2. Conductivité**

La conductivité est la capacité d'une solution à faire passer le courant électrique. Elle est exprimée par microsiemens par centimètre ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ou par millisiemens par centimètre ( $\text{mS}/\text{cm}$ ) (ANONYME 2, 2013).

Après étalonnage du conductimètre, la sonde est plongée dans un bécher contenant 100ml de margines bien homogénéisées.

La valeur donnée par le conductimètre correspond à la conductivité des margines en prenant en considération la température à laquelle la mesure a été faite, elle est exprimée en  $\text{mS}/\text{cm}$  (REJESEK, 2003).

### **2.1.3. Teneur en eau et en matière sèche**

La matière sèche (MS) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines (AISSAM, 2003).

Elle est déterminée selon le protocole suivant :

Peser une capsule en porcelaine vide, introduire 20ml de margines dans cette dernière et peser l'ensemble. Placer la capsule contenant les margines dans une étuve à  $105\text{C}^\circ$  jusqu'à obtention d'une masse constante. Après refroidissement, procéder à la détermination de la teneur en matière sèche.

La teneur en matière sèche est calculée par la formule suivante :

$$[\text{MS}] \text{ (g/l)} = (\text{M}_2 - \text{M}_0)1000/\text{VE}$$

**MS** : Teneur en matière sèche (g/l).

**M<sub>0</sub>** : Masse de la capsule vide (g).

**M<sub>2</sub>** : Masse de la capsule et des margines après séchage (g).

**VE** : volume de margines (ml).

La teneur en eau (TE) est la proportion effective d'eau contenue dans les margines. Elle est déterminée par la formule suivante :

$$TE(\%) = (M_1 - M_2)100 / (M_1 - M_0)$$

**TE** : Teneur en eau.

**M<sub>0</sub>** : Masse de la capsule vide (g).

**M<sub>1</sub>** : Masse de la capsule et des margines avant séchage (g).

**M<sub>2</sub>** : Masse de la capsule et des margines après séchage (g).

#### **2.1.4. Teneur en matière minérale et en matière volatile sèche**

La teneur en matière minérale sèche ou cendres, est déterminée par perte de masse à partir de la matière sèche par l'incinération dans un four à moufle à 550C° pendant 2h (FAYE, 2010).

Après calcination, il y'a obtention des cendres blanches ou grises claires. L'échantillon est ensuite refroidi dans un dessiccateur et pesé dès qu'il atteint la température du laboratoire. La teneur en matière minérale sèche est donnée par la formule suivante :

$$[MMS](g/l) = (M_3 - M_0)1000 / VE$$

**M<sub>0</sub>** : Masse de la capsule vide (g).

**M<sub>3</sub>** : Masse de la capsule après calcination à 550C° (g).

**VE** : Volume de margines (ml).

La matière volatile sèche représente la fraction organique de la matière sèche qui disparaît au cours de la calcination de cette dernière à 550C°. Elle est déterminée en faisant la différence entre les concentrations de la MS et de la MMS et représentée par la formule suivante :

$$[MVS](g/l) = [MS] - [MMS]$$

#### **2.1.5. Teneur en matière en suspension**

La matière en suspension correspond à des particules de faibles tailles et/ou de densité, ce qui limite leur chute par gravité. Elle comprend des fractions organiques et minérales (LEFRANCOIS, 2007).

Elle est obtenue soit par filtration sur une membrane poreuse de 0,45µm, soit par centrifugation (2800 à 3200g/15min).

La teneur en MES des margines est déterminée selon le protocole suivant :

Après centrifugation de 100ml de margines à une vitesse de 3200g/15min, séparer le liquide surnageant par siphonage sans perturbation du dépôt, puis transvaser le culot déposé au fond du tube à centrifuger dans une capsule en porcelaine préalablement séchée à 105C° et pesée. Rincer le tube à centrifuger avec de l'eau distillée et recueillir les eaux de lavage avec le culot dans la capsule, puis évaporer l'eau de la capsule au bain- marie et sécher a l'étuve à 105C° jusqu'à obtention d'une masse constante. Laisser refroidir au dessiccateur et peser à nouveau. Recommencer les opérations de séchage, refroidissement et de peser jusqu'à ce qu'il n'y aura pas de différence entre deux pesées successives (RODIER, 1996).

La teneur en MES est calculée par la formule suivante :

$$[\text{MES}] \text{ (g/l)} = (\text{M}_1 - \text{M}_0)1000/\text{VE}$$

**M0** : Masse de la capsule vide (g).

**M1** : Masse de la capsule pleine après dessiccation à 105C° (g).

**VE** : Volume de margines (ml).

#### **2.1.6. Teneur en matière grasse**

La matière grasse (MG) constitue un groupe hétérogène, dont la propriété commune est d'être insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques.

La teneur en matière grasse a été estimée par dosage gravimétrique :

La matière grasse est extraite des margines traitées et acidifiées à (pH=2) par l'hexane et après évaporation du solvant (RODIER, 1996).

Elle est déterminée selon le protocole suivant :

Après traitement, acidification et centrifugation des margines (3800g/20min), le surnageant est récupéré dans un bécher puis versé dans une ampoule à décanter.

Après l'ajout de 100ml d'hexane, les phases se séparent par décantation, la phase aqueuse est récupérée dans un bécher et la phase du solvant est coulée dans un ballon lavée, séchée et pesée. L'évaporation du solvant se fait à l'aide du rotavapor à T = 60C° jusqu'à l'élimination complète de l'hexane. Le poids est pris après refroidissement.

La teneur en matière grasse est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{MG}](\text{g/l}) = (\text{P}_2 - \text{P}_1)1000/\text{V}$$

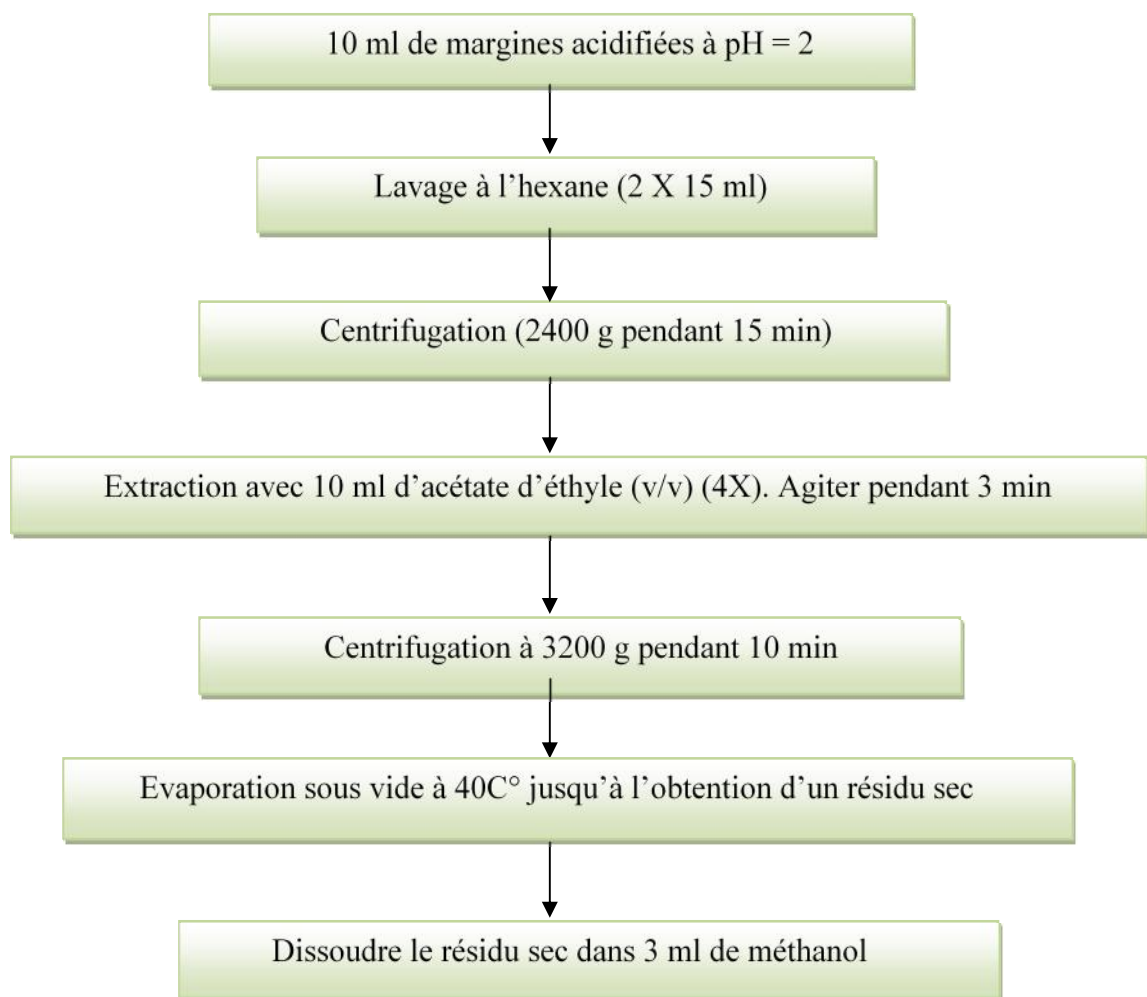
**P1** : Masse du ballon vide (g).

**P2** : Masse du ballon plus le solvant après évaporation et refroidissement (g).

### 2.1.7. Teneur en polyphénols

#### 2.1.7.1. Extraction des polyphénols

Le protocole d'extraction des polyphénols à partir des margines est basé sur la méthode décrite par DE MARCO *et al* (2007) modifiée ; dont les principales étapes sont résumées dans la figure 5. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle. Mais d'abord, il y'a une étape d'acidification avec l'HCl, c'est une étape très importante pour la précipitation des protéines et la rupture des liaisons établies entre les composés phénoliques aux composants des parois cellulaires ainsi que l'hydrolyse des phénols complexes en phénols simples. Il y'a aussi une étape de délipidation dans le but d'éliminer la matière grasse.



**Figure 5: Diagramme d'extraction des polyphénols à partir des margines (DE MARCO *et al*, 2007).**

#### 2.1.7.2. Détermination de la teneur en polyphénols

La teneur en polyphénols a été estimée par méthode de Folin-Ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965), qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $WO_4^{2-}$ ) et phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ) du réactif de Folin par les

groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (CICCO *et al*, 2009). Les solutions de l'échantillon à doser et la gamme étalon ont été préparées de la même manière et dans les mêmes conditions (annexe 1) :

Dans des tubes a essai : 125µl de chaque dilution de margines ont été mesurés, auxquels on rajoute 500µl d'eau distillée puis 125µl du réactif de Folin.

Six minutes plus tard : 1,25ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium (NaCO<sub>3</sub>) à 7% sont additionnés au milieu réactionnel (la préparation est dans l'annexe 1) puis on complète à 3 ml avec l'eau distillée après avoir bien agité.

Après 60mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 760nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait.

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme  $y = ax$ , réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents d'acide gallique. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0 – 100µg/ml).

#### **2.1.8. Teneur en sucres totaux**

Les sucres totaux ont été dosés par la méthode de DUBOIS *et al* (1956). Tout les sucres réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orangée stable.

Dans chaque tube à essai 2ml de la dilution de l'échantillon plus 1ml de la solution phénol à 5% et 5ml de d'acide sulfurique à 96% avec une bonne agitation.

Après 10mn d'incubation à température ambiante, et une autre incubation dans un bain marie à 30C° jusqu'à apparition d'une couleur jaune-orangée, L'absorbance a été mesurée à 492nm au spectrophotomètre UV-Visible contre un blanc. Les échantillons et la gamme étalon sont préparés de la même manière et dans les mêmes conditions. La teneur en sucres totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec une solution de glucose (0 - 50µg/ml) annexe 1.

#### **2.1.9. Teneur en protéines**

La teneur en protéines des margines a été estimée par la méthode de Bradford dont le principe est la fixation du réactif de Bradford sur la protéine en formant un complexe (colorant-protéine) de couleur bleue (BRADFORD, 1976).

Dans chaque tube à essai 1ml de l'échantillon et 5ml du réactif Bradford (sa préparation dans l'annexe). Après 10mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 595nm au spectrophotomètre UV-Visible contre un blanc. Les échantillons et la gamme étalon sont préparés de la même manière et dans les mêmes conditions. La teneur en protéines est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la BSA (0 - 40µg/ml) annexe 1.

### **III. Méthode - Partie microbiologique**

Cette partie est consacrée pour l'étude de l'effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la croissance, la sporulation et la production des aflatoxines par *Aspergillus flavus*

#### **3.1. Déshydrations des margines et obtention d'une poudre**

Après décongélation, les margines sont sous forme liquide. Afin de les concentrer sous forme d'une poudre, elles ont subi le procédé de séchage suivant :

Les margines brutes sont séchées à l'étuve : Une quantité de 15 ml de margine déposés dans des cristallisoirs en verre, portées à une température de 80°C pendant 3 heures jusqu'à l'obtention d'une poudre, après grattage la poudre est récupérée dans des boîtes stériles.

#### **3.2. Préparation des pré-cultures**

Pour la standardisation de l'inoculum de départ, une méthode photométrique (ATWAL, 2003 ; ANONYME 3, 2008) a été employée. A partir d'une culture de moisissure pure sur milieu PDA, les spores sont raclées à l'aide d'une anse, l'ance est déchargée dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9% additionnée de 0,1% de Tween-80 stérile selon la méthode de LOPPEZ-MALO *et al* (2005). La suspension de spores est homogénéisée, l'opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique comprise entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm. La densité mesurée à 625nm est équivalente à  $1 \times 10^8$  spores/ml. L'inoculum peut être ajusté s'il est trop dense avec de l'eau physiologique stérile. À partir de là, on effectue une série de dilutions afin d'obtenir la charge de spores voulue pour les essais.

La densité de spores peut être aussi confirmée par comptage sur cellule de Malassez (ANONYME 3, 2008).

#### **3.3. Tests préliminaires**

- **Etude du pouvoir producteur d'Aflatoxines**

Le criblage de la souche *Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxines est réalisé par détection de fluorescence à 365 nm sur milieu de culture à base de noix de coco, selon la

technique décrite par DAVIES *et al* (1987) et FENTE *et al* (2001). La souche fongique est ensemencée par point central sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (FENTE *et al*, 2001). Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de la noix de coco, donnent une fluorescence visible sous lumière U.V (365 nm) surtout sur le revers de la colonie (DAVIES *et al*, 1987). En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les souches productrices d'aflatoxines développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visible sous la lumière U.V (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour.

### **3.4. Tests antifongiques et anti-aflatoxinogènes « *in vitro* »**

#### **3.4.1. Détermination de la CMI, biomasse et nature de l'activité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la biomasse ont été déterminés selon la méthode de MOHAMMEDI *et al* (2010). 10ml de milieu Pomme de terre liquide (PDB) ont été mis dans chaque erlenmeyer dans lesquelles des quantités requises de poudre et d'extrait phénolique (EP) des margines ont été ajoutées séparément. 02 gouttes de Tween-80 ont été additionnées au milieu, de façon à obtenir les concentrations finales 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4 g/ml, 0,5g/ml pour la poudre de margine, et des concentrations finales 125ppm, 250 ppm, 500 ppm, 800 ppm et 1000 ppm pour les EP. Les erlens ont subi une pasteurisation en respectant un barème [température- temps] de 72°C pendant 20 minutes (KAMENI *et al*, 2002). Après refroidissement, les erlens ont été aseptiquement inoculés avec un disque de 5 mm de diamètre d'une culture de 7 jours d'*Aspergillus flavus*. Des témoins sans poudre et sans extrait phénolique des margines sont effectués, les essais ont été répétés trois fois. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours.

La CMI correspond à la première concentration à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée. Les poudres et les EP des margines sont dites fongicides lorsqu'elles tuent la moisissure et fongistatiques lorsqu'elles inhibent sa croissance (MOHAMMEDI *et al*, 2010).

Pour la détermination de la biomasse par poids sec a été effectuée pour les concentrations testées de la poudre ainsi que les EP des margines, le contenu des erlens est filtré sous vide avec un papier filtre Wathman N°01. Les mycéliums ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée, séchés à 105°C, jusqu'à poids constant et enfin le mycélium sec est pesé (DELGADO-VIRGEN et GUZMAN-DE-PEÑA, 2009).

#### **3.4.2. Détermination de l'activité anti-aflatoxinogène**

L'activité anti-aflatoxinogène a été déterminée selon la méthode de SRIVASTAVA *et al* (2007). 10ml de milieu SMKY (Semi synthetic liquid medium) ont été mis dans chaque erlenmeyer dans lesquelles des quantités requises de poudre et EP des margines ont été ajoutées séparément. 02 gouttes de Tween-80 ont été additionnées au milieu, de façon à obtenir les concentrations finales 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4 g/ml, 0,5g/ml pour la poudre de margine, et des concentrations finales 125ppm, 250 ppm, 500 ppm, 800 ppm et 1000 ppm pour les EP. Les erlens ont subit une pasteurisation en respectant un barème [température-temps] de 72°C pendant 15 minutes (KAMENI *et al*, 2002).). Après refroidissement, les erlens ont été aseptiquement inoculés avec un disque de 5 mm de diamètre d'une culture de 7 jours d'*Aspergillus flavus* selon la méthode décrite par BLUMA et ETCHEVERRY (2008). Des témoins sans poudre et sans EP des margines sont effectués, les essais ont été répétés trois fois. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours.

#### **3.4.2.1. Extraction des aflatoxines à partir du milieu SKMY**

L'extraction des AFB1 a été effectuée selon la méthode de NABNEY et NESBITT (1965) avec quelques modifications.

Le contenu des erlens est filtré sous vide avec un papier filtre Wathman N°01. Les mycéliums ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée. Les filtrats sont récupérés et mis dans des tubes falcons de 50ml contenant 15ml de méthanol (HUYBRECHTS *et al*, 2013) puis écrasés à l'aide d'une spatule. La macération dure 1 à 2 heures, les extraits d'aflatoxines sont obtenus après centrifugation des échantillons à 12 000 tours pendant 15 minutes. Les surnageants (extraits) sont récupérés puis conservés à +4°C dans des eppendorfs préalablement stérilisés. Ces étapes sont effectuées à l'abri de la lumière.

#### **3.4.2.2. Détection par CCM**

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire, en se basant sur le phénomène d'adsorption et de partage. La méthode utilisée pour la détection des aflatoxines par CCM est celle décrite par l'A.O.A.C (Official Method of Analysis). Des plaques (20 x 20cm, 0.20mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F ont été utilisées. Le solvant de développement est un mélange de chloroforme/acétone (90/10, v/v) (CALVO *et al*, 2004 ; ROMINA *et al*, 2008 ; ROCHA VIELA *et al*, 2009, SENANI et MOULTI-MATI, 2012).

Des fractions de 25 µl sont appliquées soigneusement en évitant d'abimer la surface de chaque plaque. Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de

séparation des aflatoxines. Le développement des chromatogrammes est effectué dans une cuve (25 x 25 x10cm) préalablement saturée avec le système de solvant de développement. Après migration, les plaques sont retirées et séchées. Les aflatoxines sont détectées en plaçant les plaques sous lumière UV (366nm) (SRIVASTAVA *et al*, 2008). Les aflatoxines B apparaissent sous forme de tache bleue. Une comparaison des rapports frontaux (Rf) des extraits avec ceux des témoins et de l'intensité de la fluorescence des taches permet de confirmer la présence d'aflatoxines et d'apprécier les quantités produites.

### **3.5. Tests antifongiques et anti-aflatoxinogènes « *in situ* »**

#### **3.5.1. Tests préliminaires**

La concentration en poudre et EP des margines qui est nécessaire pour qu'elle exerce son pouvoir antibactérien dans une matrice alimentaire doit être supérieure à celle appliquée « *in vitro* ».

BURT (2004) a suggéré que les valeurs des CMI de la poudre et EP des margines obtenues « *in vitro* » doivent être affectées d'un coefficient correcteur allant de 2 à 100, pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire.

Le choix du coefficient correcteur a été établi après avoir procédé à des tests préliminaires. Nous avons jugé utile de multiplier les valeurs des CMI, par un coefficient de 2.

Les tests préliminaires ont permis d'optimiser certains paramètres notamment les concentrations de poudre et d'extrait phénolique des margines à utiliser, la matrice alimentaire à contaminer : blé ou maïs.

#### **3.5.2. Choix de la matrice alimentaire**

*Aspergillus flavus* est le principal agent de contamination du maïs (BATTILANI *et al*, 2016). Les conditions spécifiques de la température, de l'humidité relative et de la teneur en eau présentent lors du stockage de maïs peuvent contribuer à sa détérioration rapide, suite à la croissance fongique. La présence des micromycètes pourrait être attribuée essentiellement à la contamination du maïs par des espèces d'*Aspergillus* (PITT et HOCKING, 2009). Ces dernières peuvent provoquer la décoloration des grains, le changement de leurs caractéristiques chimiques et nutritionnelles, la réduction de la germination et leurs contaminations par des mycotoxines (FRANZOLIN, 1999).

#### **3.5.3. Traitement du maïs**

##### **3.5.3.1. Méthode de détermination de l'humidité**

La mesure de l'humidité de l'échantillon a été effectuée sur une prise d'essai de 10g, broyée, pesée et mise dans un humidimètre réglée à 130°C pendant 10 à 12 minutes. (SULTANA *et al*, 2015)

L'humidité en pourcentage (%) est affichée sur l'écran de l'humidimètre.

### **3.5.3.2. Ré-humidification du maïs**

Pour cette expérience, pour obtenir des grains d'une teneur en eau supérieure à 0,430 (30%, base humide), il a été nécessaire de ré-humidifier le maïs en ajoutant une quantité d'eau selon la formule suivante :

$$X = 100 (H_f - H_i) / (100 - H_f)$$

**X** : Quantité d'eau en ml à ajouter pour 100g de maïs.

**H<sub>f</sub>** : Humidité finale

**H<sub>i</sub>** : Humidité initiale

Les grains de maïs ont été trempés dans de l'eau distillée stérile pendant environ 24 h, à température ambiante (0 à 20°C). Le maïs doit reprendre l'apparence et la consistance d'un maïs naturellement humide (SULTANA *et al*, 2015).

### **3.5.3.3. Broyage et stérilisation du maïs**

Les grains de maïs ont été broyés à l'aide d'un robot jusqu'à l'obtention des grains réduits.

L'échantillon de maïs broyé, a été conditionné dans un bocal en verre fermé hermétiquement, mis dans un autoclave réglé à une température de 120°C pendant 20 min. Cette stérilisation a pour but d'éviter des signes de contamination (SULTANA *et al*, 2015)

### **3.5.4. Effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs contaminés par *Aspergillus flavus***

Dans cette expérience le choix s'est porté sur une humidité de 30% (HESSELTINE *et al*, 1966), afin d'atteindre cette humidité, des concentrations appropriées de poudre et d'extrait phénolique des margines ont été préparées dans de l'eau distillée de façon à obtenir les concentrations finales 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4 g/ml, 0,5g/ml pour la poudre de margine, et des concentrations finales 125ppm, 250 ppm, 500 ppm, 800 ppm et 1000 ppm pour les EP et rajoutées aux grains de maïs broyés dans des conditions stériles et placés dans des boîtes de pétries stériles.

Des piqûres centrales ont été faites pour le dépôt de 100µl d'une suspension de spores contenant 10<sup>6</sup> spores/ml. Des témoins sans poudre et extrait phénolique des margines sont

effectués et incubés à 28°C pendant 7 jours. Le diamètre des colonies de la croissance fongique ont été mesuré chaque jours ainsi que l'estimation du pourcentage d'inhibition par rapport au témoin sans poudre ou extraits phénoliques des margine selon la formule suivante décrite par LI *et al*, 2016:

$$\% \text{ d'inhibition} = \{1 - \text{DP (mm)} / \text{DT (mm)}\} \times 100$$

**DP** : Diamètre des cultures traitées par la poudre et les extraits phénoliques des margines.

**DT** : Diamètre des cultures témoins non traitées par la poudre et les extraits phénoliques des margines.

La CMI dans le maïs a été définie comme la concentration de poudre et extrait phénolique des margines qui ont inhibé le développement du mycélium sur le maïs.

#### **3.5.4.1. Extraction des aflatoxines du maïs**

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM, les cultures de maïs ont subit une extraction au méthanol (HUYBRECHTS *et al*, 2013).

Les contenues des boites de pétrie sont fragmentés à l'aide d'un emporte pièce du centre vers la périphérie, ensuite introduit dans des tubes coniques de 50 ml, l'extraction des aflatoxines est réalisée par l'addition de 20 ml de méthanol, toute en écrasant afin de faciliter l'extraction.

Après une macération de 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 4000g, le surnageant est concentré à l'étuve à 50°C jusqu'à un volume final de 2ml, ce dernier est conservé à l'abri de la lumière et à une température de 4°C pour une analyse ultérieure.

#### **3.5.4.2. Détection des aflatoxines par CCM**

La révélation des aflatoxines par CCM a été réalisée selon la méthode décrite auparavant.

### **3.6. Analyse statistique des résultats**

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  SD (déviation standard). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de variance ANOVA sur le logiciel Statistica. Ce test nous donne le degré de signification P où est conclue que la différence :

- n'est pas significative si  $p > 0,05$  ;
- est significative si  $0,05 > p > 0,01$  ;
- est hautement significative si  $0,01 > p > 0,001$  ;
- est très hautement significative si  $p < 0,001$ .



# *Résultats et Discussion*

IV. Résultat et discussion

4.1. Résultats et discussion de l'étude physicochimique des margines

Les résultats de la caractérisation physicochimique des margines issues de l'huilerie utilisant le système de centrifugation à trois phases (margines moderne : MM) sont regroupés dans le tableau X

Tableau X : Caractérisation physicochimique des margines modernes

Paramètre	Margine
pH	4,88 ± 0,09
Conductivité (mS/cm)	12,2 ± 0,13
MS (g/l)	82,7 ± 0,83
TEE (%)	92 ± 0,05
MMS (g/l)	13,55 ± 0,18
MVS (g/l)	68,72 ± 0,79
MES (g/l)	8,9 ± 0,22
Matière grasse (g/l)	10,57 ± 0,19
Polyphénols (g/l)	5,58 ± 0,5
Sucres totaux (g/l)	13,84 ± 0,98
Protéines (g/l)	2,31 ± 0,06

Les valeurs du tableau représentent la moyenne de trois mesures ± écart type.

4.1.1. Le pH

La valeur enregistrée est de 4,88, elle se situe dans la limite de la fourchette de l'intervalle de (4,7 – 5,7) cité par ZBAKH et EL ABBASI (2012), cette valeur est proche de celle trouvée par ESMAIL *et al.* (2013) pour des margines marocaines.

Ces résultats montrent que nos margines sont des effluents très acides. Cela est dû à la présence des acides organiques comme les acides phénoliques (HAMDI, 1993) et les acides gras comme l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidique (AMARAL *et al.*, 2008 ; ASFI *et al.*, 2012), ainsi qu'à la fermentation des sucres (HAMDI,

1991). Et aussi peut être expliqué par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (ABEER *et al*, 2013).

#### **4.1.2. La conductivité**

La conductivité des margines dépend de leur teneur en sels minéraux (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012). Les résultats obtenus pour les margines issues de l'huilerie moderne sont de l'ordre de  $[12,2 \pm 0,13]$  mS/cm. Ces résultats sont proches des résultats obtenus par DANILAKIS *et al* (2011) pour des margines issues d'une huilerie localisée à Patras (Grèce) qui est de 11,28mS/cm. et sont supérieurs par rapport aux résultats obtenus par ACHAK *et al* (2008) pour des margines de la région de Marrakech (Maroc) qui est de l'ordre de 8,4mS/cm.

AISSAM (2003) et ACHAK *et al* (2011) ont mentionné que cette différence en conductivité des margines est due à la richesse naturelle des olives en sels minéraux, ainsi que leur conservation au niveau des usines avant leurs trituration.

#### **4.1.3. Teneur en matière sèche**

La teneur moyenne en matière sèche (MS) pour les margines issues de l'huilerie moderne sont de l'ordre de  $[82,7 \pm 0,83]$  g/l. Cette valeur est proche de celle trouvée par ESRA *et al* (2001) pour des margines issues d'une huilerie située à Istanbul (Turquie) qui est de  $[78,2 \pm 13,6]$  g/l, et supérieure par rapport à la valeur citée par DANELLAKIS *et al* (2011) pour des margines issues d'une huilerie située à Patras (Grèce) qui est de  $[64,68 \pm 1,03]$  g/l et par rapport à celle trouvée par ACHAK *et al* (2007) qui est de  $[56,75 \pm 2,51]$  g/l.

Les variations de la teneur en matière sèche peuvent être dues à des paramètres climatiques et géologiques, à des variations botaniques, au stade de maturation de l'olive et au procédé d'extraction d'huile (LEULMI, 2011).

#### **4.1.4. Teneur en eau**

Les résultats obtenus se situent dans l'intervalle de (83 – 94%) cité par NOUBIH *et al* (2007) qui sont de l'ordre de  $[92 \pm 0,05]$  %.

Les taux d'humidité élevés des margines s'expliquent par l'eau existant habituellement dans les olives d'une part, et d'autre part, par l'eau ajoutée au cours du processus d'extraction d'huile d'olive (PROCIDA et CECCON, 2006).

#### **4.1.5. Teneur en matière minérale et en matière volatile sèche**

La teneur moyenne des margines modernes (MM) en matière minérale sèche (MMS) est de l'ordre de  $[13,55 \pm 0,18]$  g/l ce qui est équivalent à 16,38 g/100g de poudre de margines. Cette valeur est proche de celle trouvée par MEKKI *et al* (2007) pour des margines

tunisiennes qui est de  $[10 \pm 0,43]$  g/l, et supérieure par rapport à la valeur trouvée par ACHAK *et al* (2009) pour les margines de la région de Marrakech (Maroc) qui est de l'ordre de  $[5,29 \pm 0,05]$  g/l. Cette différence est expliquée par le degré de maturation et la variété des olives (LEULMI, 2011).

La teneur des MM en matière volatile sèche (MVS) est de l'ordre de  $[68,72 \pm 0,79]$  g/l ce qui est équivalent à 83,1 g/100g de poudre de margine. Cette valeur est proche de celles trouvée par HAMDY (1993) pour des margines issues d'une huilerie localisée à Sfax (Tunisie) qui est de l'ordre de 55g/l, et supérieur à celles rapportées par SABBAH *et al* (2009) pour des margines de la région de Marrakech (Maroc) qui sont de l'ordre de  $[11 \pm 1,12]$  g/l.

Cette différence est due aux conditions climatiques, méthodes d'extraction de l'huile d'olive ainsi qu'au temps de stockage des olives avant leur trituration (LEULMI, 2011).

#### **4.1.6. Teneur en matière en suspension**

Les margines étudiées sont riches en matière en suspension (MES), la teneur est de l'ordre de  $[8,9 \pm 0,15]$  g/l et elle est équivalents à 10,76 g/100g de poudre de margine. Cette valeur est proche de celle rapportées par FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA (1992) pour des margines Espagnoles qui est de l'ordre de 9g/l, et inférieur à celle rapportée par ESRA *et al* (2001) pour des margines issues d'une huilerie issues à Istanbul qui est de  $[27,6 \pm 5,1]$  g/l.

La différence dans la teneur en (MES) est peut être due à des paramètres climatiques et géologiques, à des variations botaniques, au stade de maturation de l'olive et au procédé d'extraction d'huile (LEULMI, 2011).

#### **4.1.7. Teneur en matière grasse**

La teneur moyenne en matière grasse (MG) résiduelle présente dans les MM étudiées est de l'ordre de  $[10,57 \pm 0,19]$  g/l, elle est équivalente à 12,78 g/100g de poudre de margine. Cette valeur est très proche de celle de l'étude de BILKA *et al.* (2009) par la méthode gravimétrique pour des margines issues d'une huilerie localisée à Patras (Grèce) qui est de  $[10,78 \pm 1,39]$  g/l.

La différence dans la teneur en matière grasse est en relation avec la qualité et le degré de maturation des olives (AMARAL *et al*, 2008).

#### **4.1.8. Teneur en polyphénols**

Ces effluents sont caractérisés par la richesse en composés phénoliques, la teneur enregistrée pour les MM étudiées est de  $[5,58 \pm 0,5]$  g/l ce qui est équivalent à 6,74 g/100g de

poudre de margine. Cette valeur dépasse largement la limite de la législation environnementale qui est de  $[0,5 \times 10^{-3}]$  g/l pour les polyphénols (PINTO *et al*, 2005). Cette valeur est proche aussi de celle trouvée par TZIOTZIOS *et al* (2007) pour des margines grecques et par GONCALVES *et al* (2011) pour des margines portugaises 7,7g/l. Cette valeur est supérieure par rapport à celle des margines marocaines rapporté par EL HAJOUJI *et al* (2008) qui est de 0,79g/l.

Cette variation de la teneur en polyphénols dépend de plusieurs facteurs qui sont : Les conditions climatiques et géographiques (ZIOGAS *et al*, 2010), l'état physiologiques et l'âge de la plante (DE LEONARDIS *et al*, 2008), la température des olives avant et durant le broyage influence sur la solubilisation des polyphénols (CAPONIO et CATALANO, 2001), la variété de l'olivier, les conditions de culture et le degré de maturation des olives (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA, 1992 ; ZIOGAS *et al*, 2010).

#### **4.1.9. Teneur en Sucres totaux**

La teneur moyenne en sucres totaux présentent dans les MM étudiées est de l'ordre de  $[14,65 \pm 1,05]$  g/l, cette teneur est équivalente à 16,74 g/100g de poudre de margine. Cette valeur se situe dans l'intervalle de (10 à 80) g/l cité par PROCIDA et CECCON, (2006). Elle est inférieure à celle rapportée par DANILAKIS *et al*. (2011) pour des margines issues d'une huilerie localisée à Patras (Grèce) qui est de l'ordre de  $[41,65 \pm 0,07]$  g/l et par LEULMI (2011) pour des margines issues d'une huilerie située dans la région de Jijel (Algérie) qui est de 39,91g/l.

Cette valeur dépasse légèrement l'intervalle cité par ZBAKH et EL ABBASSI (2012) qui est de (1,3 à 8,79) g/l, ce qui prouve la richesse des margines étudiées en sucres totaux. Cette teneur élevée en sucres totaux peut être expliqué par l'absence d'une fermentation pendant le stockage (HAMDI, 1991).

#### **4.1.10. Teneur en protéines**

La fraction protéique des margines est représentée essentiellement par les acides aminés libres. Les plus abondants sont la proline, la glycine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

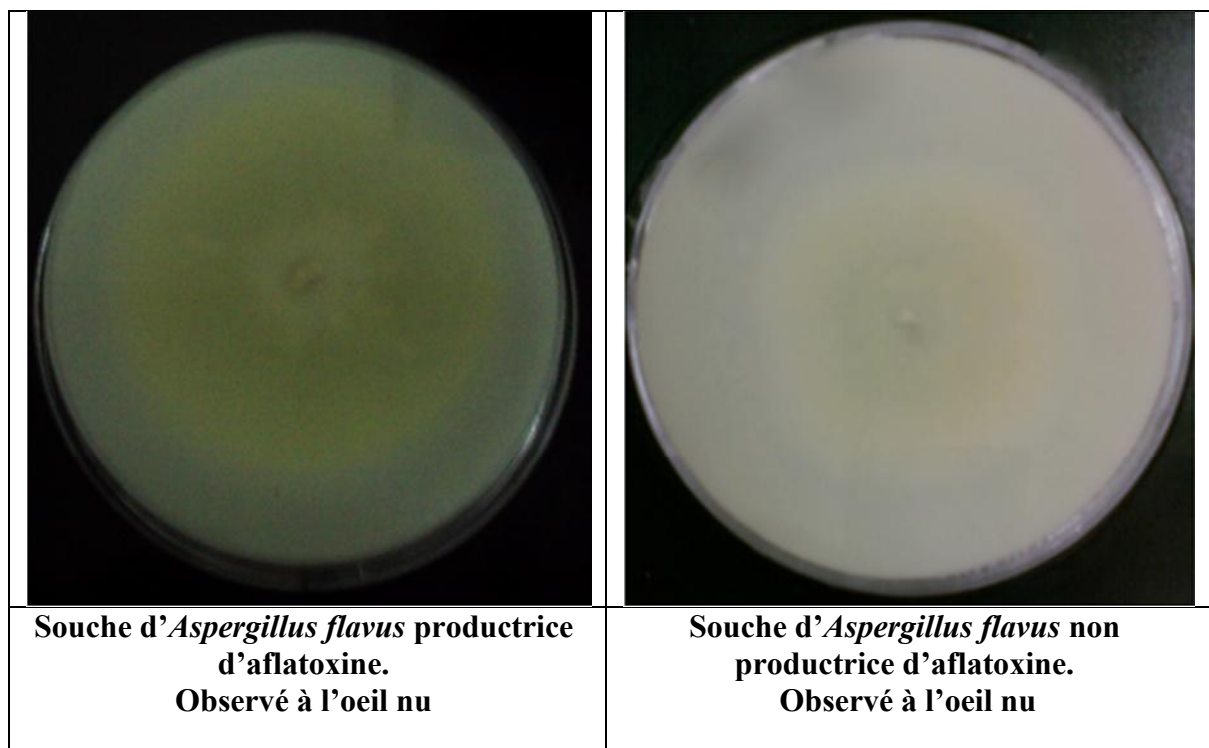
Les résultats obtenus qui sont de l'ordre de  $[2,31 \pm 0,06]$  g/l et sont équivalents à 2,8 g/100g de poudre de margines. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par ASFI *et al*. (2012) pour des margines issues d'une ville au sud de la Grèce (Kalamata) qui sont de l'ordre de  $[2,67 \pm 0,75]$  g/l, et supérieur de ceux trouvés par LOPES *et al* (2008) pour des margines portugaises qui sont 0,516g/l.

## 4.2. Résultats et discussion de l'étude microbiologique *in vitro* et *in situ*

### 4.2.1. Résultats du test *in vitro*

#### 4.2.1.1. Résultats du criblage de la production d'aflatoxines sur milieu CAM de la souche testée

Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de noix de coco, donnent une fluorescence visible sous UV (366nm) surtout sur le revers du mycélium. En effet, après 72 heures d'incubation à 28°C, la souche test productrice d'aflatoxine B développe autour du mycélium une fluorescence bleue, visible sous lumière UV à 366nm et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour. Après 7 jours d'incubation ? les résultats obtenus sont consignés dans les figures 6 et 7



**Figure 6 : Revers jaune orangé (observé à l'oeil nu). Culture d'*Aspergillus flavus* après 7 jours d'incubation sur milieu CAM à 28 °C.**

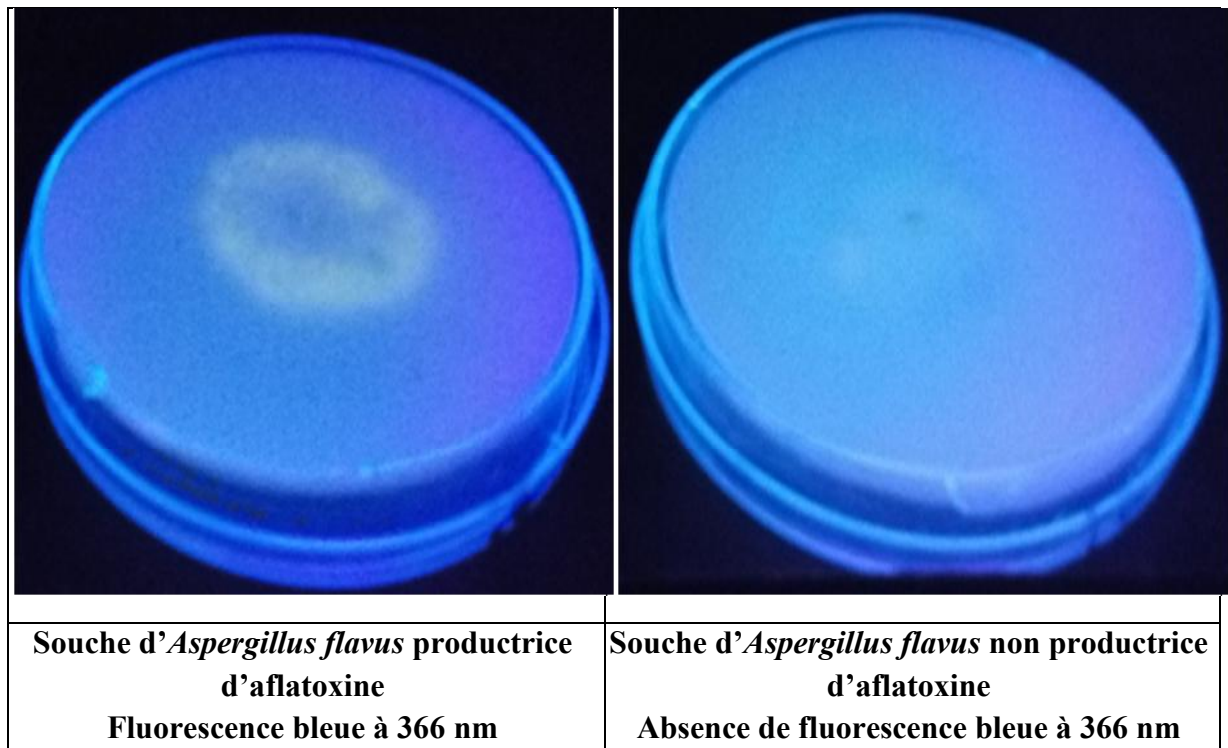


Figure 7: Mise en évidence sous lumière UV à 366nm de la production des aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.

#### 4.2.1.2. Résultats de la détermination de la CMI, biomasse et nature de l'activité de la poudre et de l'extrait phénolique des margines

Une diminution correspondant à la croissance du mycélium fongique en présence des concentrations croissantes de poudre et de l'extrait phénolique des margines (EP) a été observée dans la présente étude (figure 8 et figure 9).

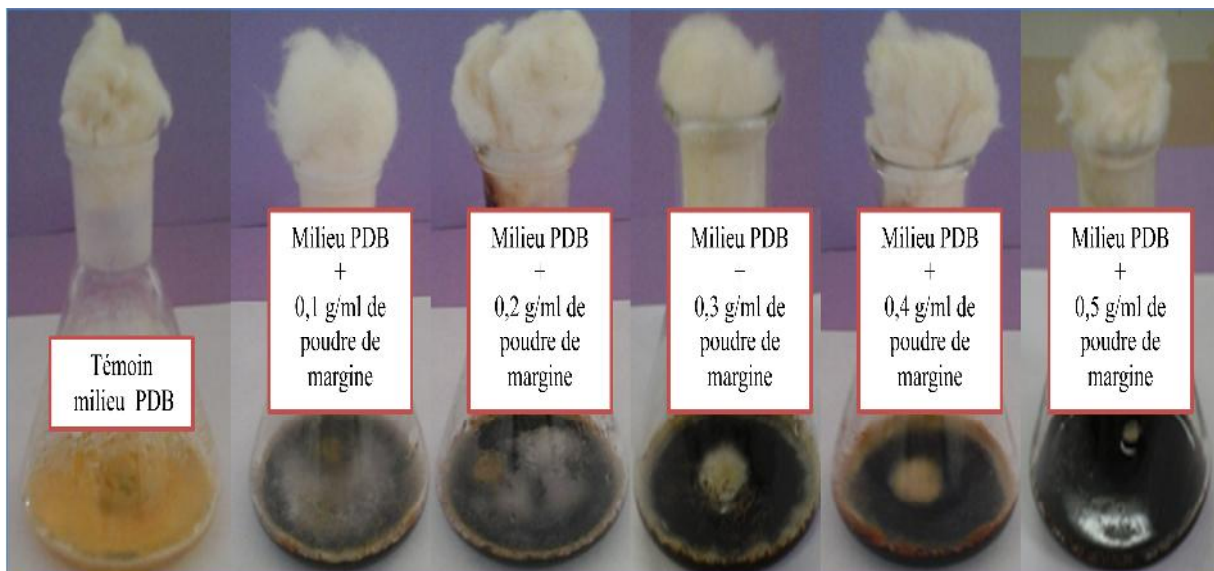
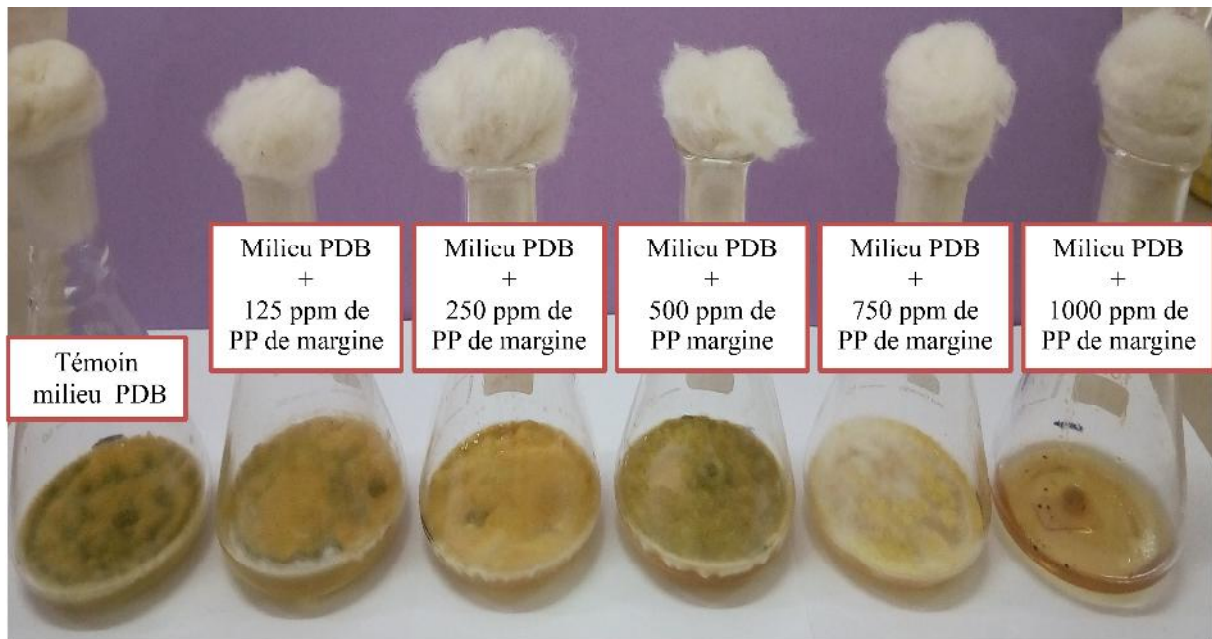
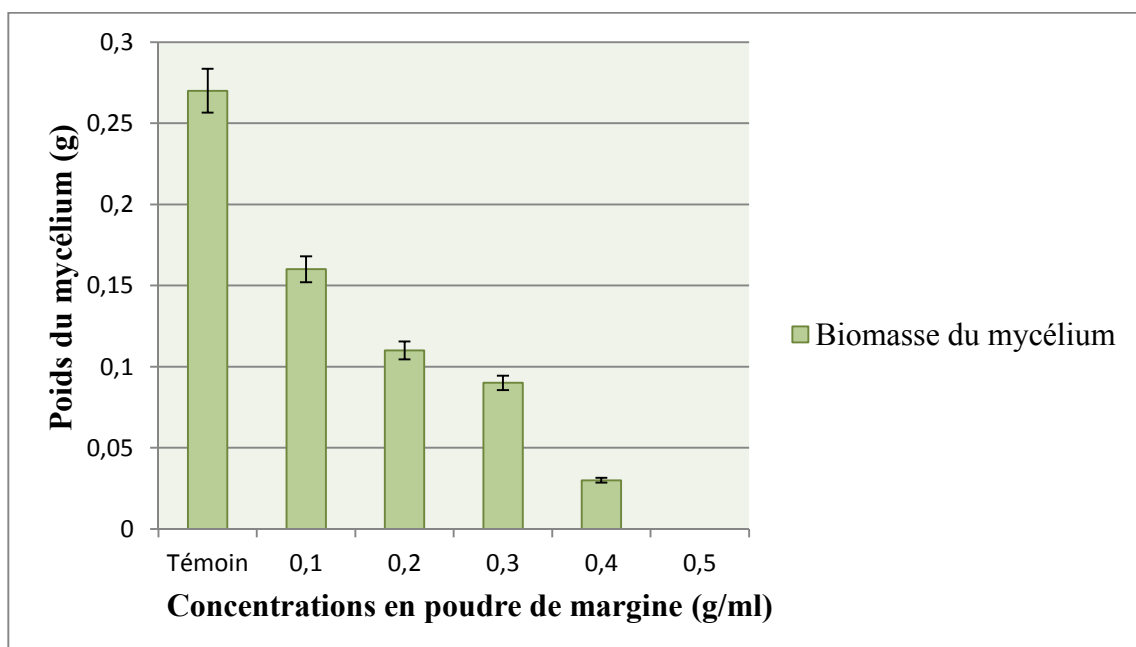


Figure 8: Inhibition de la croissance d'*A. flavus* par la poudre de margine après 7 jours d'incubation à 28°C sur milieu PDB

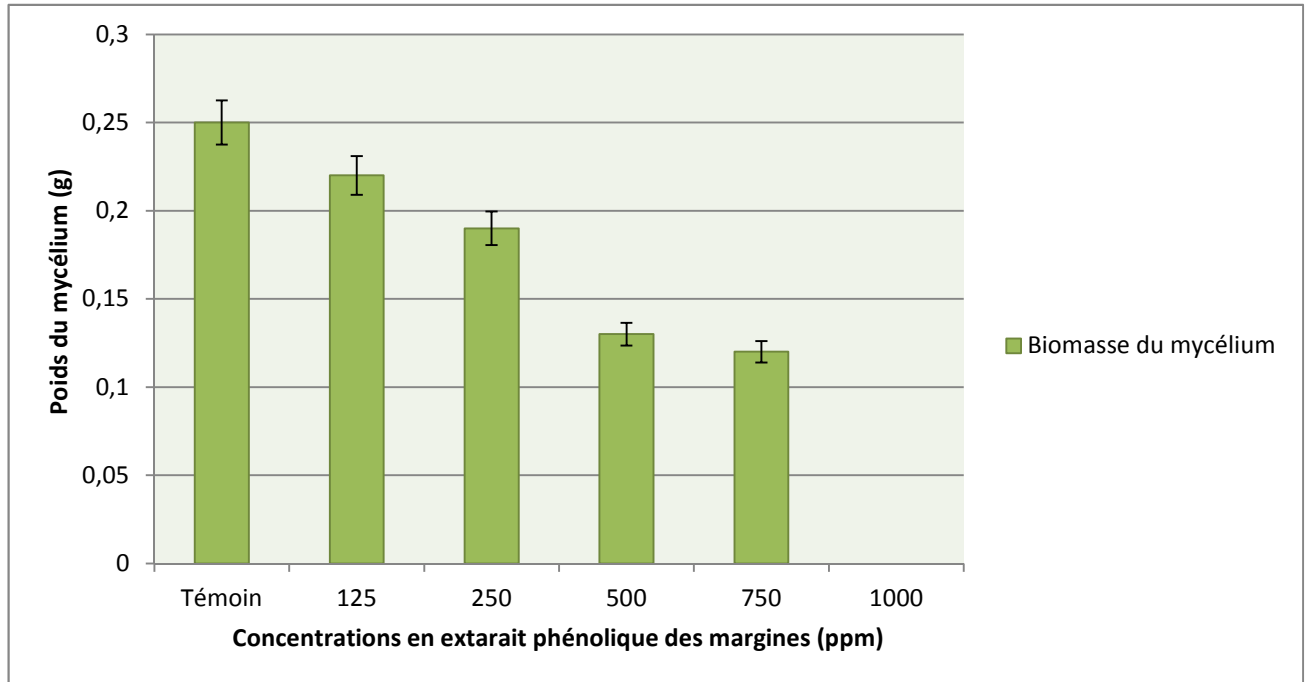


**Figure 9: Inhibition de la croissance d'*A. flavus* par l'extrait phénolique des margines après 7 jours d'incubation à 28°C su milieu PDB**

L'inhibition complète de la croissance mycélienne a été établit à partir de la biomasse du mycélium. Cette inhibition totale correspond à la concentration minimale inhibitrice qui est de 0,5g/ml pour la poudre (tableau XI en annexe 3 et figure10) et de 1000 ppm pour l'EP des margines (tableau XII en annexe 3 et figure 11). L'étude statistique a démontré, que cette diminution du poids du mycélium est très hautement significative ( $P < 0,001$ ).



**Figure 10: Histogramme de la biomasse du mycélium en présence de la poudre des margines**



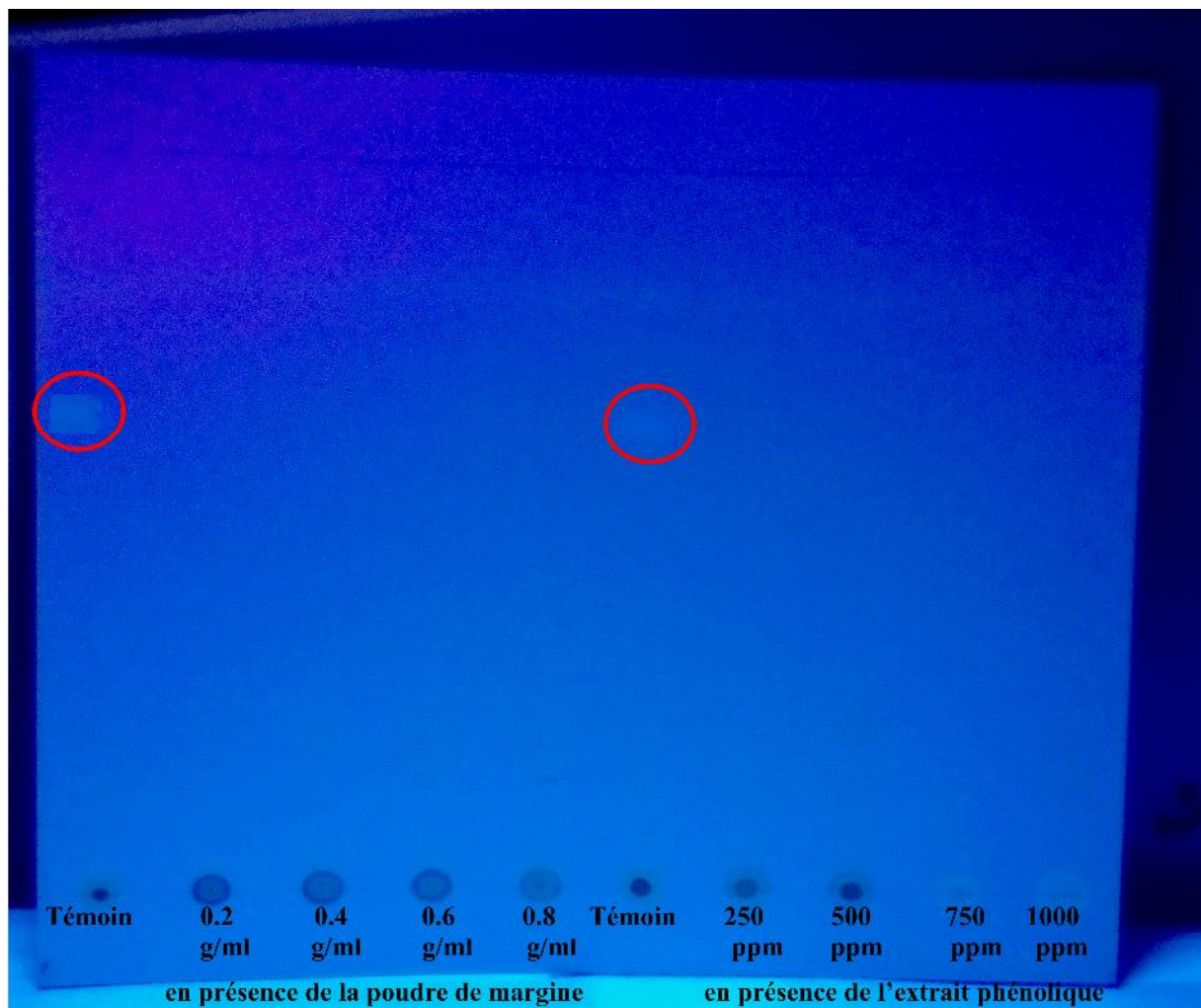
**Figure 11: Histogramme de la biomasse du mycélium en présence de l'extrait phénolique des margines**

La poudre et l'EP des margines ont exercé une activité fongistatique. Cette activité puissante est en relation avec l'interaction des différents composés chimiques et microbiologique des margines, pour ce qui est de l'extrait phénolique, l'activité est due aux différents constituants actifs ( les acides phénoliques, flavonoides)

Jusqu'à l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antifongique de la poudre de margine, alors que pour les EP de margines des études ont été réalisées sur l'activité antibactérienne et antifongique (SENANI et MATI-MOULTI, 2012 ; ESMAIL *et al*, 2015). Beaucoup d'études ont été faites sur l'activité antifongique des huiles essentielles (H.E) jusqu'à aujourd'hui (LI *et al*, 2016). Selon SRIVASTAVA *et al* (2008), l'étude a montré une inhibition totale de la croissance du mycélium d'*Aspergillus flavus* sur milieu SMKY à des concentrations de 1000 ppm (mg/l) avec l'huile essentiel *Cinnamomum camphora* et *Alpiinia galanga*, ce résultat est équivalent à celui de notre études avec les EP des margines. Une autre étude réalisée par TATSADJIEU *et al* (2008) a montré une inhibition incomplète de la croissance mycélienne sur milieu SMKY à des concentrations de 1000 ppm avec les huiles essentielles suivantes *Plectranthus glandulosus* et *Ocimum gratissimum*. Le poids sec du mycélium à des concentrations de 1000 ppm en présence des deux H.E est de  $[0,502 \pm 0,0]$  g pour *Ocimum gratissimum* et de  $[0,503 \pm 1,14]$  g pour *Plectranthus glandulosus*, alors qu'il est de  $[0,00 \pm 0,00]$  g dans notre étude.

#### 4.2.1.3. Résultats du test antiaflatoxinogène

Parallèlement au premier test réalisé sur milieu PDB, un autre test complémentaire a été effectué sur milieu SMKY afin de mesurer les potentialités antifongiques que possèdent la poudre et l'EP sur la production des aflatoxines par cette *A. flavus*, connue par ces immenses potentialités à produire des mycotoxines dont les plus toxiques sont les aflatoxines B1 (LI *et al*, 2016). La CCM n'a révélé aucune production d'aflatoxines pour toutes les concentrations testées aussi bien pour la poudre et l'EP des margines par rapport au témoin (figure 12), Ce résultat est dû, soit à l'inhibition totale de la production d'aflatoxines par les concentrations utilisées, soit à la très faible quantité d'aflatoxines produites non détectés par CCM.



**Figure 12: Photographie du chromatogramme obtenu sur les extraits d'aflatoxines de la souche test *A. flavus* (révélation à l'UV à 366nm)**

Les spots obtenus au niveau du témoin sur le chromatogramme de la figure 12 confirment la présence de production d'aflatoxines par rapport aux concentrations testées.

L'inhibition de la production d'aflatoxine ne peut être attribuée à une insuffisance de croissance, en effet, la baisse de la production de l'aflatoxine B1 n'est pas en relation avec la croissance du mycélium (TATSADJIEU *et al*, 2008).

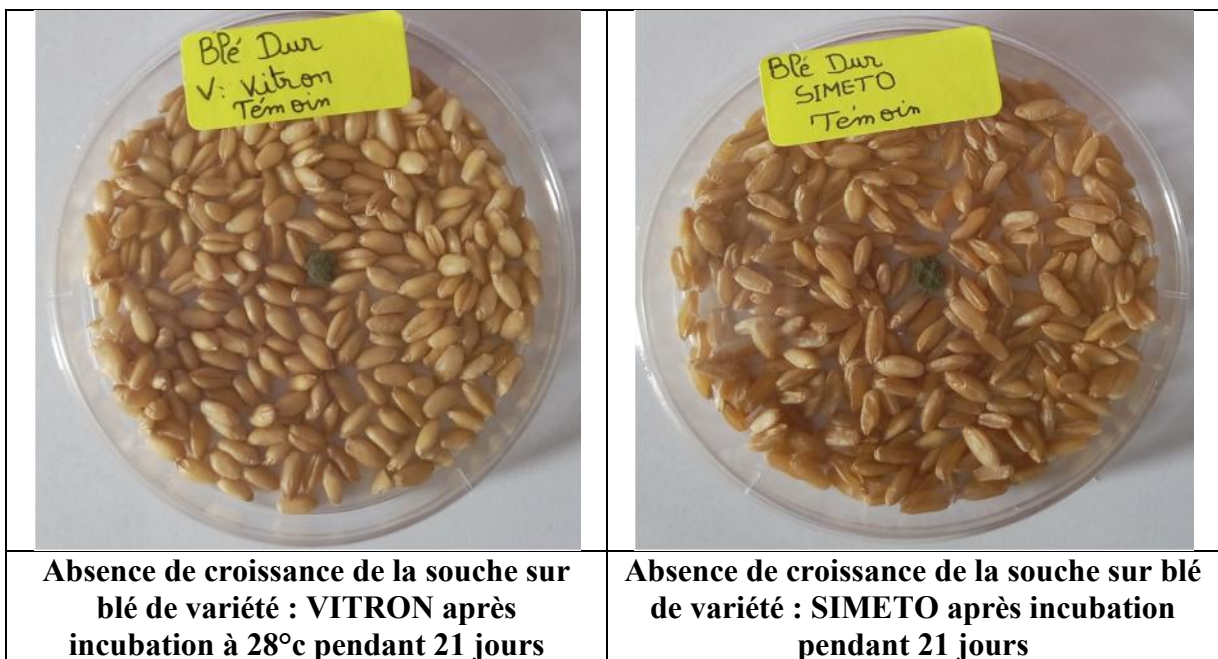
Selon SARIVASTAVA *et al* (2008), la croissance du mycélium de  $[0,28 \pm 0,01]$  g à une concentration de 750 ppm a permis d'enregistrer une absence de production d'aflatoxine. Ce résultat est équivalent à celui de notre étude où nous avons enregistré un poids du mycélium de  $[0,12 \pm 0,00]$  g et une absence de production d'aflatoxine B1.

Selon l'étude menée par MOHAMMEDI *et al* (2010), les résultats enregistrés expliquent une relation proportionnelle entre les biomasses et la production des aflatoxines, qui est dose-dépendante avec l'HE de *Thymus Fontanesii* récoltées dans la région nord ouest de l'Algérie.

#### 4.2.2. Résultat du test *in situ*

##### 4.2.2.1. Choix de la matrice alimentaire

Les résultats de la contamination de deux matrices alimentaires (blé et maïs) sont illustrés dans la figure 13 et la figure 14.



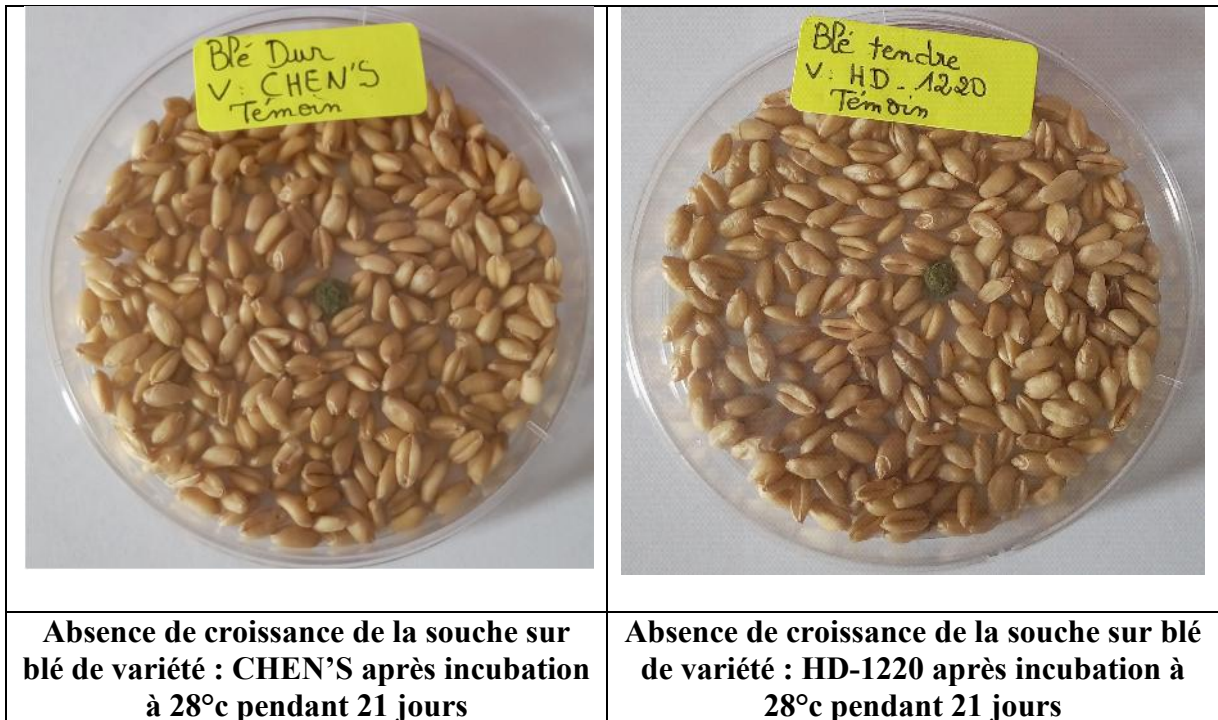


Figure 13: Absence de croissance de la souche *Aspergillus flavus* sur les différentes variétés de blé après incubation à 28°C pendant 21 jours



Figure 14: Croissance de la souche *Aspergillus flavus* après incubation à 28°C pendant 3 jours

L'étude préliminaire a démontré que le blé est difficile à être contaminé par *Aspergillus flavus* après une incubation de 21 jours à 28°C, par rapport au maïs où une croissance mycélienne a été observée au bout de 3 jours jusqu'à envahissement total de la boîte au bout de 7 jours.

La prédominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant les céréales est mise en évidence dans les études réalisées par RIBA *et al* (2008), GACEM *et al* (2011), en Algérie, et par TAHANI *et al* (2008) au Maroc. Par ailleurs, TABUC (2007) et SREENIVASA *et al* (2011) confirment que le genre *Aspergillus* est le contaminant majeur du maïs et une grande prévalence de l'*Aspergillus flavus* avec un pourcentage de 53,52%.

Les espèces du genre *Aspergillus* sont connues comme des moisissures de stockage (MORENO *et al*, 2009, MAKUN *et al*, 2007); selon RIBA *et al* (2008), le manque de ventilation couplé à une température élevée, favorise la croissance de ces espèces xérotolérantes.

L'absence de croissance d'*Aspergillus flavus* au niveau du blé peut être associée à une résistance des variétés vis à vis de la souche.

#### **4.2.2.2. Humidité**

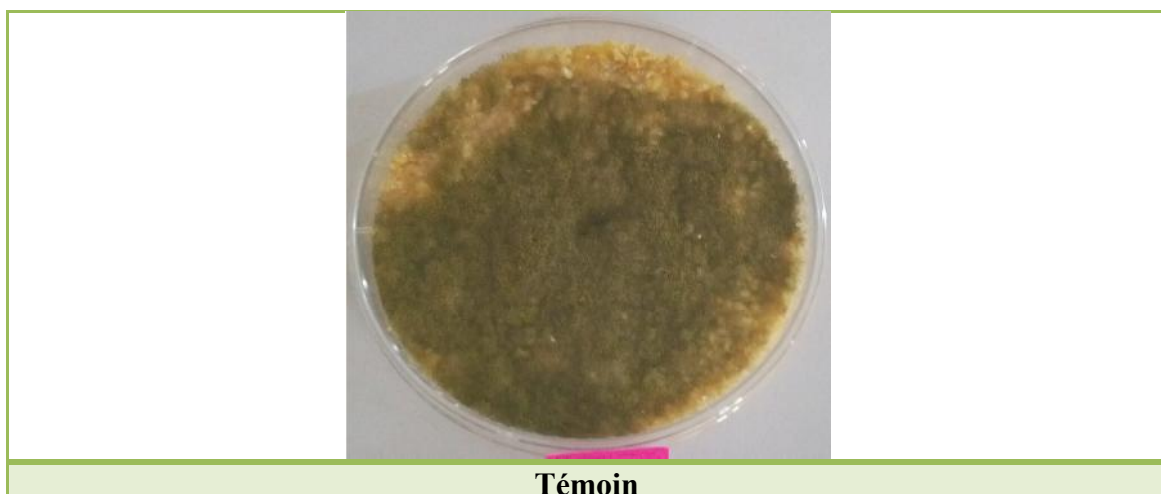
D'après les résultats obtenus par l'humidimètre à infrarouge, la valeur moyenne obtenue est de 11,50 %  $\pm$  0,97. SULTANA *et al*, (2015) a rapporté que l'humidité initiale du maïs est de 11.10%, ce résultat est approximatif à celui trouvé dans notre étude.

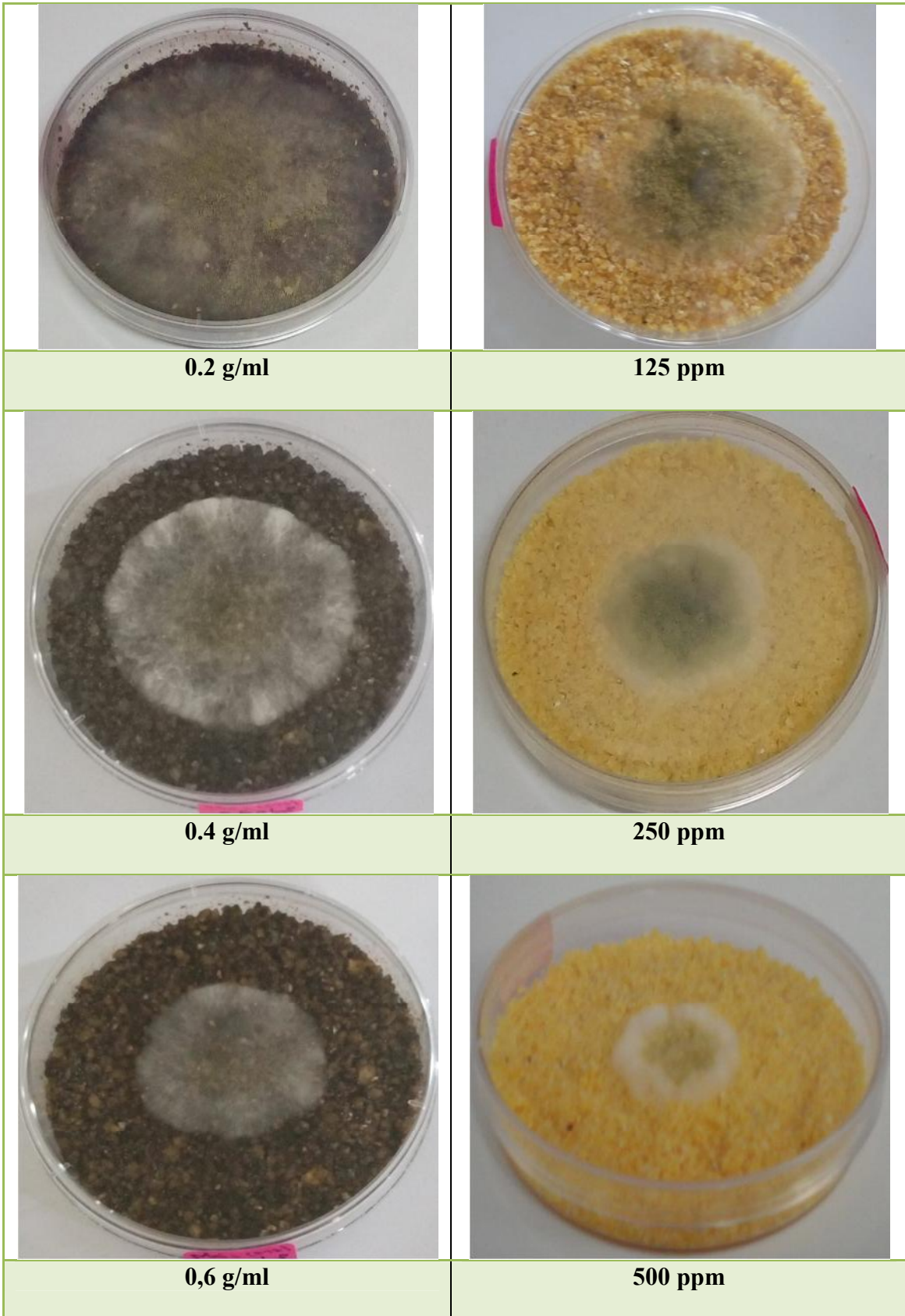
#### **4.2.2.3. Résultats de l'effet antifongique et anti-aflatoxinogène de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur le maïs contaminé par *Aspergillus flavus***

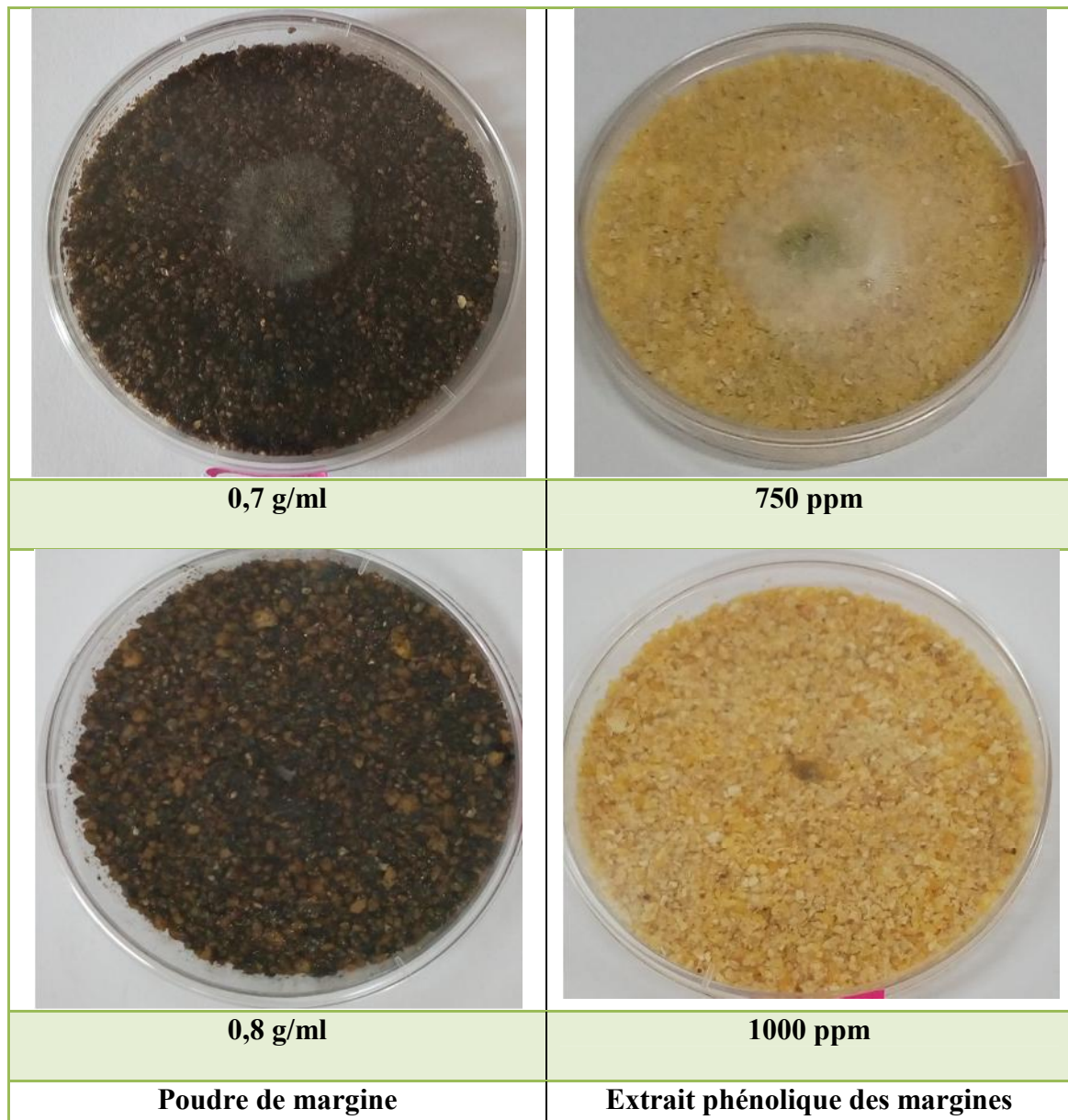
##### **4.2.2.3.1. Test antifongique**

Au vu des résultats obtenus sur le milieu SMKY et PDB, le maïs a été réservé pour le test de contact direct.

La figure 15 consigne les résultats obtenus sur l'effet de la poudre et l'EP des margines sur la croissance d'*Aspergillus flavus in situ* après une incubation de 7 jours.







**Figure 15: Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la croissance d'*Aspergillus flavus in situ* après une incubation de 7 jours.**

La figure 15 montre une inhibition de la sporulation à partir de 0,4 g/ml pour la poudre et 500 ppm pour l'EP des margines.

Les résultats obtenus *in situ* montrent bien une diminution logique du diamètre de croissance d'*Aspergillus flavus* avec la poudre (figure 16) et l'extrait phénolique des margines (figure 17). Cette diminution indique une activité antifongique positive. L'activité antifongique enregistrée est apparue nulle à une concentration de 0,8 g/ml pour la poudre de margine et à une concentration de 1000 ppm pour l'EP.

L'analyse de variance ANOVA a démontré que les concentrations 0,2 g/ml de la poudre et 125 ppm de l'EP des margines n'ont pas d'effet inhibiteur sur la croissance d'*Aspergillus*

*flavus* ( $P_{value}>0.05$ ), alors que les autres concentrations ont un bon effet inhibiteur ( $P_{value}<0,001$ )

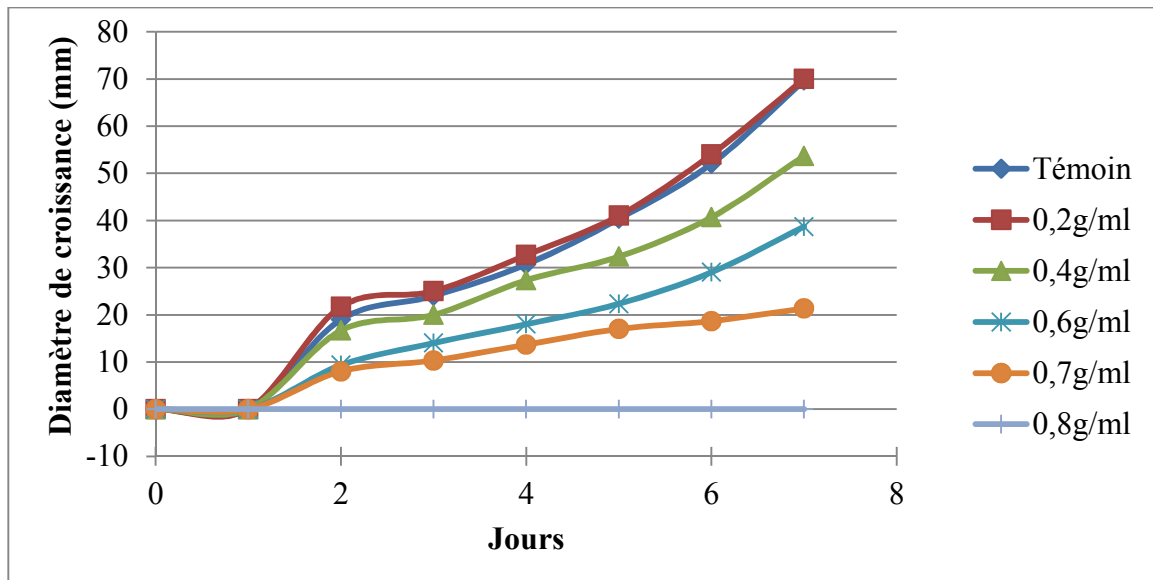


Figure 16: Effet de la poudre de margine sur la croissance de la souche *A. flavus in situ* après 7 jours d'incubation à  $28 \pm 02^\circ\text{C}$ .

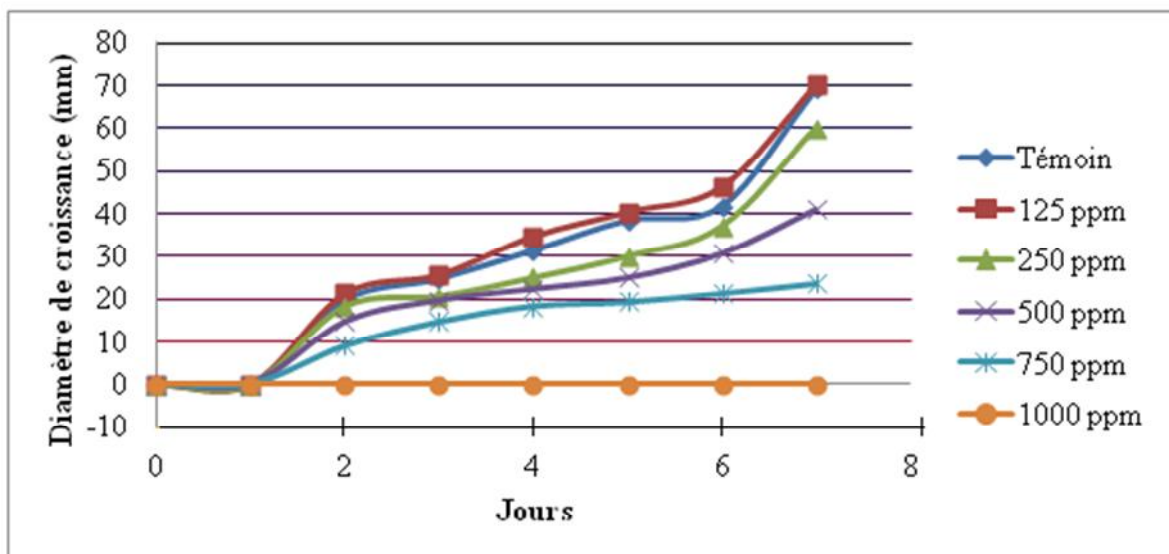


Figure 17: Effet de l'extrait phénolique des margines sur la croissance de la souche *A. flavus in situ* après 7 jours d'incubation à  $28 \pm 02^\circ\text{C}$ .

En effet les pourcentages d'inhibition étudiés de la poudre et de l'EP des margines avec *A. flavus* sont plus importants après 7 jours d'incubation. Ces données sont consignées dans les tableaux XIII et XIV

**Tableau XIII: Pourcentages (%) d'inhibition de la poudre de margines sur la souche *A.flavus* après 7 jours d'incubation**

Concentrations (g/ml) Poudre de margine	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin	/
0,2	<b>00 ± 00</b>
0,4	<b>22,9 ± 3,21</b>
0,6	<b>44,5 ± 3,05</b>
0,7	<b>69,4 ± 3,21</b>
0,8	<b>100 ± 00</b>

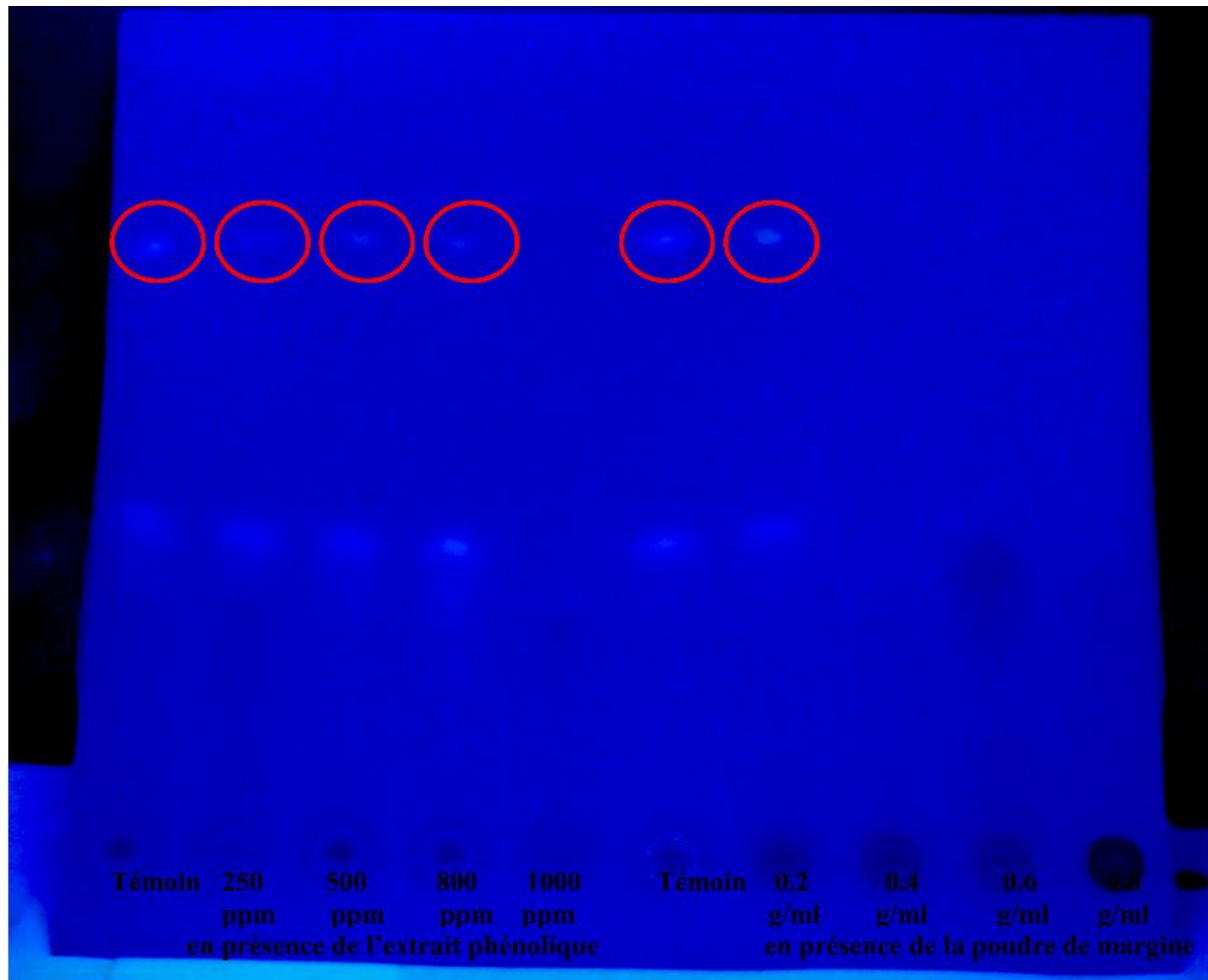
**Tableau XIV: Pourcentages (%) d'inhibition de l'extraits phénolique des margines sur la souche *A.flavus* après 7 jours d'incubation**

Concentrations (ppm) Extrait phénolique des margines	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin	/
125	<b>00 ± 00</b>
250	<b>13,9 ± 5</b>
500	<b>41,2 ± 3,60</b>
750	<b>66 ± 2,52</b>
1000	<b>100 ± 00</b>

D'après les résultats obtenus avec la poudre et l'EP des margines, le pourcentage d'inhibition a atteint au bout du septième jour une valeur de 100% pour une concentration de 0,8 g/ml en présence de la poudre de margine et aussi pour une concentration de 1000 ppm pour l'EP des margines. Des résultats similaires ont été rapportés par BLUMA *et al* (2008), un pourcentage d'inhibition de 100% est obtenu à une concentration de 1000 ppm en présence de 5 huiles essentielles : *Pimpinella anisum L*, *Peumus boldus*, *Hedeoma multiflora*, *Syzygium aromaticum L* et *Lippia turbinata*.

#### 4.2.2.4. Test antiaflatoxinogénique

La chromatographie sur couche mince de la poudre de margine a permis de séparer plusieurs spots, apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV à une longueur d'onde de 366 nm. Les spots correspondants à l'aflatoxine B donnent une fluorescence bleue (figure 18).



**Figure 18: Photographie de chromatogramme obtenue sur les extraits d'aflatoxines de la souche test *A. flavus* (révélation à l'UV)**

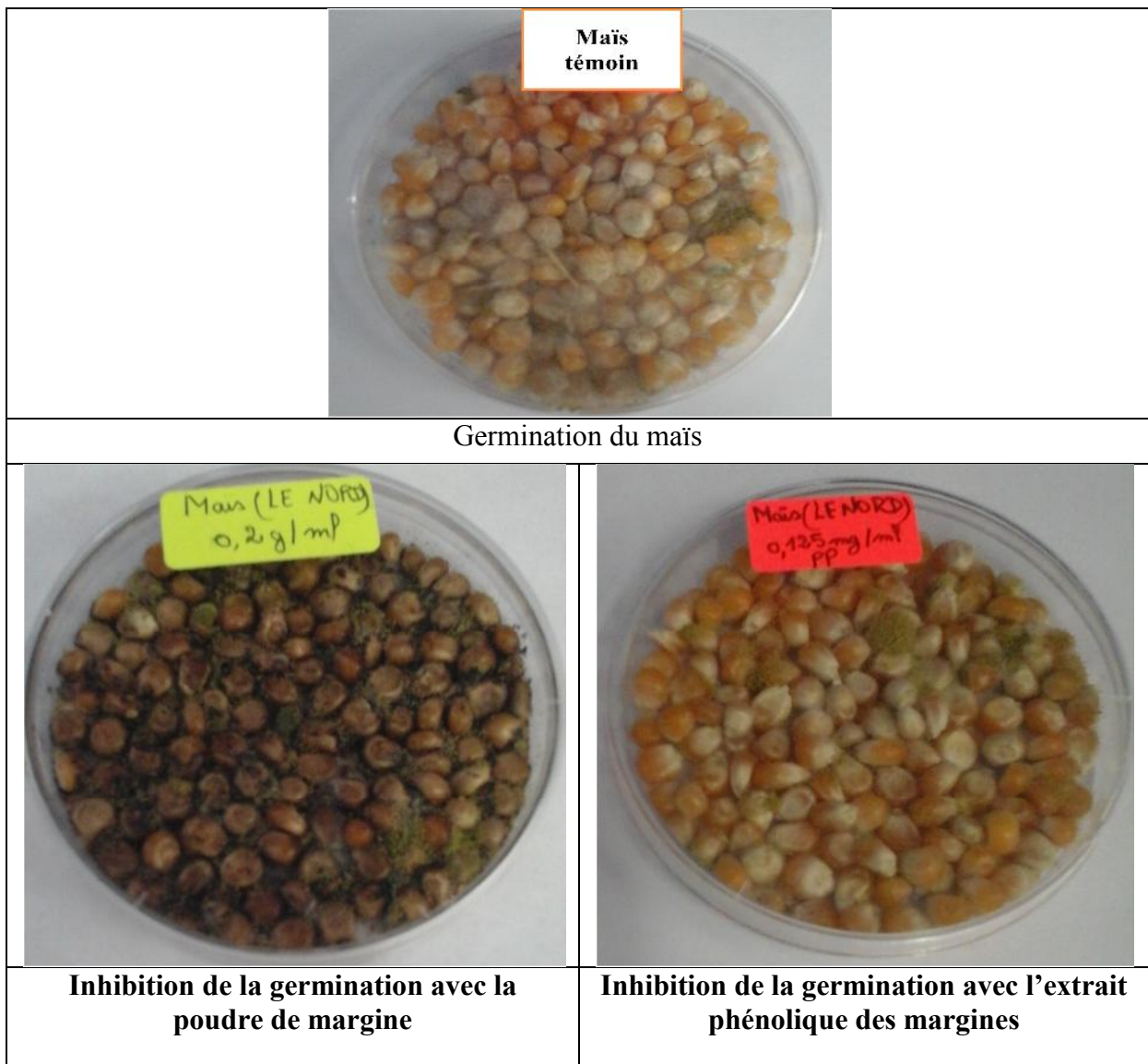
Sur le chromatogramme de la figure nous avons observé l'effet de la poudre et l'EP des margines sur la production d'aflatoxines. En effet, l'apparition d'un spot à la concentration de 0,2 g/ml pour la poudre de margine et une diminution progressive des tailles des taches pour les concentrations de 250, 500, 800 ppm pour l'EP des margines jusqu'à une disparition pour les concentrations 0,4 g/ml, 0,6 g/ml, 0,8 g/ml pour la poudre de margine et la concentration de 1000 ppm pour l'EP.

Selon l'étude réalisée par BLUMA et ETCHEVERRY (2008), cinq types d'huiles essentielles ont été testées afin d'inhiber la production d'aflatoxine *in situ*. L'huile essentielle

de *Pinpinella anisum* L. (Anis) n'a pas d'effet inhibiteur sur la production d'aflatoxine, *Hedeoma multiflora* Benth (Mountain thyme) et *Syzygium aromaticum* L. (Clove) ont un effet inhibiteur à 1000µg/g, *Lippia turbinata* (Poleo) et *Pëumus boldus* Mol (Boldus) ont un effet inhibiteur 2000 µg/g. L'effet inhibiteur de la production d'aflatoxine a été obtenu à de faible dose par rapport à celle tester dans notre étude.

#### 4.2.2.5. Autres résultats

La poudre et l'EP des margines ont un effet inhibiteur sur la germination du maïs (figure 19)



**Figure 19: Effet de la poudre et de l'extrait phénolique des margines sur la germination du maïs après humidification et ajout de concentration**

La germination du maïs est une phase physiologique qui correspond à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule. Le

processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée. Cette germination a un effet négatif sur la durée de conservation ainsi que sur la valeur nutritionnelle (BEWLEY, 1997).

La poudre ainsi que l'extrait phénolique des margines ont exercé un effet inhibiteur de la germination des graines à de faible concentration, 0.2 g/ml pour la poudre et à 125 ppm pour l'EP des margines. Le même fait a été rapporté par MEKKI *et al* (2008).

# *Conclusion*

## CONCLUSION

Dans le but de la recherche de nouvelles molécules capables de réduire ou d'inhiber la croissance fongique et la production d'aflatoxines et également dans le but de valoriser des sous produits des industries oléicoles qui posent des problèmes de pollution comme les margines nous avons tenté d'étudier les effets antifongiques de la poudre et les extraits phénoliques des margines.

L'objectif de ce travail est d'une part, la caractérisation de quelques paramètres physicochimiques des margines issues d'une huilerie utilisant le système de centrifugation à trois phases et d'autre part, l'étude de l'effet antifongique de la poudre et des extraits phénoliques de margines vis-à-vis d'*Aspergillus flavus*.

La caractérisation physicochimique des margines a démontré leurs richesse en eau et en matière organique et minérales. La teneur en eau est de  $92 \pm 0,05\%$  et la teneur en matière sèche est de  $82,7 \pm 0,83\text{g/l}$ , avec une forte teneur en composés phénoliques qui est de  $5,58 \pm 0,5 \text{ g/l}$  et aussi en sucres totaux qui est de  $13,84 \pm 0,98 \text{ g/l}$ . la forte acidité et conductivité des margines aussi ont été démontré et sont de l'ordre de  $4,88 \pm 0,09$  et de  $12,2 \pm 0,13 \text{ mS/cm}$  respectivement.

Les résultats issus de l'étude microbiologique ont montré que la poudre et les EP des margines exercent une importante activité antifongique vis-à-vis d' *A. flavus*. En effet de faibles doses ont conduits à l'inhibition de la croissance et même à l'absence de sporulation. Ces résultats sont prometteurs et suggèrent la possibilité d'utiliser la poudre et les extraits phénoliques comme moyens de lutte biologique. En effet en tant qu'additifs alimentaires naturels préservateurs, la poudre et les EP des margines promettent un large champ d'utilisation. Etant donné que l'aflatoxine B1 pose un problème sanitaire sérieux par leur capacité à contaminer une large gamme de céréale notamment le maïs. L'emploi de ces molécules naturelles constitue une alternative qui permet aux industriels du secteur agroalimentaire de s'affranchir de l'étiquetage systématique relatif aux ingrédients synthétiques (antioxydants et antifongiques synthétiques...) qui suscitent la suspicion du consommateur parfois à sa juste valeur.

Ces résultats obtenus *in vitro* et *in situ* ne constituent qu'une première étape préliminaire. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront confirmer les performances mises en évidence. Il serait donc intéressant de mener dans l'avenir :

- penser à la décoloration des margines lors de son application sur matrice alimentaire ;
- approfondir l'étude par la réalisation d'une HPLC pour la quantification des aflatoxines ;
- des études détaillées sur les fractions de la poudre et des extraits phénoliques des margines démontrant une activité antifongiques et anti-aflatoxinogène *in vitro* et *in situ*. En vue d'identifier les composés responsables de cette activité par des techniques plus performantes chromatographiques ou électrophorétiques.

# *Références bibliographiques*

- ABBAS H.K., WILKINSON J.R., ZABLOTOWICZ R.M., ACCINELLI C., ABEL C.A., BRUNS H.A. et WEAVER M.A. (2009).** Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2–3), 142–153.
- ACHAK M., OUAZZANI N., YAACOUBI A. et MANDI L. (2008).** Caractérisation de margines issues d'une huilerie moderne et essais de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *J. Water. Sci*, 21 (1), 53-67.
- AGUILERA M., QUESADA M.T., GUERRA DEL AGUILA V., MORILLO J.A., RIVADENEYRA M.A., RAMOS-CORMENZANA A. et MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008).** Characterization of *paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth and detoxification of olive mill wastewaters. *Biores. Technol*, 99, 5640-5644.
- AISSAM H., ERRACHIDI F., MERZOUKI M., BENLEMLIH M. (2002)** Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé*, 7, 23-30.
- AISSAM H. 2003.** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidi mohamed ben abdellah. Fes. 156p.
- ANONYME 1. (1993).** 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*. **IARC (International Agency for Research on Cancer)** ). Lyon, France, 56, 359-362.
- ANONYME 2. (2013).** Conductivité théorie et pratique. Radiometer analytical SAS, France.
- ANONYME 3. (2008).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. 5<sup>ème</sup> édition. Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. Algérie. **OMS**. 1-106p.
- AMARAL C., LUCAS M.S., COUTINHO J., CRESPI A.L., ANJOS M.R. et PAIS C. (2008).** Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresour. Technol*, 99, 7215-7223.
- ASFI M., OUZOUNIDOU G., PANAJIOTIDIS S., THERIOS I. et MOUSTAKAS M. (2012).** Toxicity effects of olive mill wastewater on growth, photosynthesis and pollen morphology of spinach plants. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 80, 69-75.
- ASTORECA A.L., DALCERO A.M., FERNANDEZ PINTO V. et VAAMONDE G. (2011).** A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 146, 38–43
- ATAS M., YARDIMCI Y. et TEMIZEL A. (2012).** A new approach to aflatoxin detection in chili pepper by machine vision. *Computers and Electronics in Agriculture*, 87, 129–141

**ATWAL R. (2003).** In vitro Antimicrobial Activity Assessment of zymox otic solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 1 (3), 240-252.

**BADEA M., TAUS N., POTROVITA M. et MOARCAS M.(2009).** Toxicological studies of mycotoxins using enzymatic and histochemical methods. *Water Air Soil Pollution*, 9, 261–269.

**BAIRD R.E., TRIGIANO R.N. et WINDHAM G. (2006).** Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. *Mycopathologia*, 161, 93–9.

**BATTILANI P., TOSCANO P., VAN DER FELS-KLERX H. J., MORETTI A., CAMARDO LEGGIERI M., BRERA C., RORTAIS A., GOUMPERIS T. et ROBINSON T. (2016).** Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 24328

**BEJAOUI H. (2005).** Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. Thèse de doctorat d'université en Génie des procédés et de l'environnement. Toulouse: Institut National Polytechnique. France. 228p.

**BEN YAHIA ,2003** Analyse des problèmes de l'industrie d'olive et solution récemment développée, *SESEC II*.

**BEWLEY, J.D. (1997).** Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055-1066

**BEYER M., KLIX M.B., KLINK H. et VERREET J.A. (2006).** Quantifying the effects of previous crop, tillage, cultivar and triazole fungicides on the deoxynivalenol content of wheat grain - a review. *Journal for Plant Diseases and Plant Protection*, 113, 241-6.

**BITLER C.M, VIALE T.M, BASSAM DAMAJ B.et CREA R. (2005).** Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti inflammatory activity. *J.Nutr*, 135, 1475-1479.

**BLIKA K.P.S., STAMATELATOU K., KORNAROS M. et LYBERATOS G. (2009).** Anaerobic digestion of olive millwastewater. *Glob.Nest.J*, 11(3), 364-372.

**BLUMA R., AMAIDEN M.R. et ETCHEVERRY M. (2008).** Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B<sub>1</sub> accumulation by *Aspergillus section Flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 114–125

**BLUMA R.V. et ETCHEVERRY M.G. (2008).** Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol*, 25, 324–334.

**BLOUT W.P. (1961).** Turkey “X” disease. *Turkeys*, 9, 52-58.

**BHATNAGAR-MATHUR P., SUNKARA S., BHATNAGAR-PANWAR M., WALIYAR F. et SHARMA K.K. (2015).** Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119–132.

**BRADFORD M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.biochem*, 72, 248-254.

**BROCHARD G. & LE BACLE C. (2009).** Mycotoxines en milieu de travail: Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. *Dossier médico-technique*, INRS. TC128 N° 119, 299-323.

**BURT S.A. (2004a).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International journal of food microbiology*, 94 (3), 16 – 167.

**CAIRNS V., HOPE R. et MAGAN N. (2003).** Environmental factors and competing mycoflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Aspects of Applied Biology*, 68, 81-90.

**CALVO A.M., BOK J., BROOK W et KELLER N.P. (2004).** *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4733-4739.

**CANADAS D. (2006).** Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition subchronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués?. Thèse de doctorat d'université en Génie des procédés environnement. Toulouse. Institut National Polytechnique. France.232.

**CASA R., D'ANNIBALE A., PIERUC CETTI F., STAZI S.R., GIOVANNOZZI SERMANI G., LO CASCIO B. (2003)** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8), 959-66.

**CASTEGNARO M. (1999).** Risques Cancérogènes - Les Aflatoxine. Dans "Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque" de conseil supérieur d'hygiène publique de France. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 199-247.

**CAPASSO R., DE MARTINO A., ARIENZO M. (2002)** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *J Agric Food Chem.*, 50(10), 2846-55.

**CARY J.W. et CALVO A.M. (2008).** Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Toxin Reviews*, 27, 347-70.

**CHAMPEIL A., DORE T. et FOURBET J.F. (2004a).** *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166, 1389-415.

**CICCO N., LANORTE M.T., PARAGGIO M., VIGGIANO M. et LATTANZIO V. (2009).** A reproducible, rapide and inexpensive folin-ciocalteu micro-méthod in determining phénolics of plant methanol extraxts. *Micro chem.j.* 91, 107-110.

**COLE R.J et COX R.H. (1981).** Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York.

**COLE R.J. et SCHWEIKERT M.A. (2003).** Handbook of secondary fungal metabolites. *Academic Press (Elsevier Science)*, USA, Volume I, 547- 569.

**COTTY P.J. (1997).** Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona soils. *Plant Diseases*, 81, 911–916.

**CHINAPHUTI AMARA., AUKKASARAKUL SUPARA. (2008).** Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production using herbal extracts. *Journal of Biotechnology*, 136S, S751–S759.

**CURTIS M., JOLLY A., BUDRY B., RICHARD T., AWUAHB., SIMON C., FIALOR B., JOHNATHAN T. et WILLIAMS C. (2009).** Examining the structure of awareness and perceptions of groundnut aflatoxin among Ghanaian health and agricultural professionals and its influence on their actions. *The Journal of Socio-Economics*, 38, 280–287.

**DA CRUZ CABRAL L., PINTO V.F. et PATRIARCA A. (2013).** Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1–14.

**DANELLAKIS D., NTAIKOU I., KORNAROS M. et DAILIANIS S. (2011).** Olive oil mill wastewatter toxicity in the marine envirenment : Alterations of stress indices in tissues of mussel mytilus galloprovincialis. *Aqua.Toxicol*, 101, 358-366.

**DAOHONG Z., PEIWU L., QI Z., WEN Z., YANLING H., XIAOXIA D. et JUN J. (2009).** Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure. *Analytica Chimica Acta*, 636, 63–69.

**DAVIES N D., IYER S K. et DIENERU L. (1987).** Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1593–1595.

**DE LA CASA J.A., LORITE M., JIMENEZ J. ET CASTRO E. (2009).** Valorisation of wastewatter from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production. *J.Hazard. Mat*, 169, 271-278.

**DELGADO-VIRGEN F. et GUZMAN-DE-PEÑA D.(2009).** Mechanism of sterigmatocystin Biosynthesis Regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Braz.J.Microbiol.* 40 (4), 1517-1590.

**DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A. et SACCHI R. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food.Chem*, 104, 858-867.

**DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. et MICHAUD P. (2013).** Olive mill wastes : Biochemical characterizations and valorization strategies. *Proc.Biochem*, 48, 1532-1552.

**DI-GIOVACCHINO L., MASCOLO A., SEGHITTI L. (1988)** Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. *La Rivista delle Sotanze Grasse*. 65.

**DORNER J.W., COLE R.J. et DIENER U.L. (1984).** The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*, 87, 13–15.

**DOWD P.F. (1998).** Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, 19, 307-350.

**DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J., REBERS P. et SMITH F. (1956).** Colometric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chem*, 28, 350-356.

**DUTTON M.F., EHRLICH K. et BENNETT J.W. (1985).** Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1392–1398.

**EDITE BEZERRA DA ROCHA M., DA CHAGAS OLIVEIRA FREIRE F., ERLAN FEITOSA MAIA F., IZABEL FLORINDO GUEDES M. et RONDINA D. (2014).** Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159-165.

**EDWARDS S.G. (2003).** *Fusarium* mycotoxins in UK wheat. *Aspects of Applied Biology*, 68, 35-42.

**EDWARDS S.G., (2004).** Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153 : 29-35.

**EL KHOURY A. (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et Origine. Thèse de Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse. École doctorale Transferts, Dynamique des Fluides, Énergétiques et Procédés. Spécialité en Génie des procédés et de l'environnement.

**EL ABBASSI A., KHAYET M. et HAFIDI A. (2011).** Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Water.Res*, 45,4522-4530.

**EL HAJJOUJI H., AIT BADDI G., YAACOUBI A., HAMDY H., WINTERTON P., REVEL J.C. et HAFIDI M. (2008).** Optimization of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour.Technol*, 99, 5505-5510.

**EL-SHANAWANY A.A., EMAN MOSTAFA M. et BARAKAT A. (2005).** Fungal populations and mycotoxins on silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic Aspergilli toxin. *Mycopathologia*, 159, 281-289.

**ESMAIL A., ABED H., FIRDAOUS M., CHAHBOUN N., MENNANE Z., BERNY H. et OUHSSINE M (2014).** Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc (Ouazzane, Fès Boulman et Béni Mellal). *J. Mater. Environ. Sci.* 5(1), 121-126.

**ESMAIL A., CHAHBOUN N., MENNANE Z., AMIYARE R., ABED H., BARRAHI M., QEBIBO A., OUHSSINE M. et BERNY H (2015).** Etude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *J. Mater. Environ. Sci.* 63, 869-876.

**ESRA S.A., SEDAT. et LALE E. (2001).** Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water.Res.*, 35(9), 2336-2340.

**FADIL K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A., BORJA R. (2003)** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration & biodegradation*, 51, 37-41.

**FAYE M. (2010).** Nouveau procédé de fractionnement de la graine de neem (azadirachta indica A. jussii) sénégalais : production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau. Thèse de doctorat en Science des Agroressources. Faculté des Sciences de la Matière. Université Toulouse.

**FEDORAK P.M. ET HRUDEY S.E. (1984).** The effects of phenol and some alkyl phenolics on bath anaerobic methanogenesis. *Water. Res.*, 18, 361-7.

**FENTE C.A., ORDAZ J.J., VAZQUEZ B.I., FRANCO C.M. et CEPEDA A. (2001).** New additive for cultural media for rapid identification of aflatoxin-producing Aspergillus strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4858-4862.

**FERNANDEZ DIAZ M.J. (1983)** Olives. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 5, 379-397.

**FERNANDEZ A., BELO R., JOSERAMOS J., M CARMEN S. et TEOFILO S. (1997).** Aflatoxins and their Metabolites in the Tissues, Faeces and Urine from Lambs Feeding on an Aflatoxin-Contaminated Diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 161-168.

**FIESTAS ROS DE URSINOS, J.A., BORJA R. (1992)** Use and traetement of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 2, 101-106.

**FIORENTINO. (2003)** Environnemental effects caused by olive mill wast water ,2003, *journal of agricultural Food Chen*, 1005-1009 .

- FRANZOLIN M.R., GAMBALE W., CUERO R.G. et CORREA B. (1999).** Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. *Journal of Stored Products Research*, 35, 215-224.
- GACEM M. A., OULD EL HADJ K. A. et GACEMI B. (2011).** Étude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien inter-professionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Algerian journal of arid environment*, 1(2), 67-76.
- GARCIA D., RAMOS A.J., SANCHIS V. et MARIN S. (2012).** Effect of *Equisetum arvense* and *stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *International journal of food microbiology*, 153, 21-27.
- GEISER D.M., DORNER J.W., HORN B.W. et TAYLOR J.W. (2000).** The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 169–179.
- GEORGIADOU M., DIMOU A. et YANNIOTIS S. (2012).** Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, 26, 580-586.
- GERALDINE P., SARASWATHI M., LEEMA G. et THOMAS P.A. (2008).** Aflatoxin B1 production in Tissues in Experimental Invasive Aspergillosis Due to *Aspergillus flavus* .13<sup>th</sup> *International Congress on Infectious Diseases Abstracts, Poster Presentations*.
- GOLINSKI P., KOSTECKI M., LASOCKA I., WISNIEWSKA H., CHELKOWSKI J., KACZMAREK Z. (1996).** Moniliformin accumulation and other effects of *Fusarium avenaceum*(Fr.) Sacc. on kernels of winter wheat cultivars. *Journal of Phytopathology*, 144, 495-499.
- HAMDI M., GARCIA J.L. (1991)** Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for fermented olive mill wastewaters. *Biores. Technol*, 38, 23-29.
- HAMDI M., GARCIA J.L., ELLOUZ R. (1992)** Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess. Eng.*, 8, 79.
- HAMDI M., ELLOUZ P. (1993)**Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environ. Technol.*, 14, 183-188.
- HAMDI M. (1996).** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process.Biochem*, 31, 105-111.
- HARRIS B. et STAPLES C.R. (1992).**The Problems of Mycotoxins in Dairy Cattle Rations.DS31 University of Florida. IFAS. Extension.
- HASKARD C., BINNION C., AHOKAS J. (2000).** Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemistry and Biology Interaction*, 128, 39-49.

**HERMAN J.L. (1999).** Analyse des risques liés aux mycotoxines effectuée par le comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires. In : Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUC sur les mycotoxines, Tunis, Tunisie. *Food and Agricultural Organization of the United Nation*, Rome, 8 p.

**HESELTEINE C.W. (1976).** Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds; in: <Mycotoxins and other fungal related food problems> edited by Rodricks, J.V., *Advances in Chemistry Series No. 149.*, American Chemical Society, Washington DC, USA

**HUONG B.T.M., TUYEN L.D., THANH DO T., MADSEN H., BRIMER L. et DALSGAARD A. (2016).** Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. *Food Control*, 70, 191-200.

**HESELTEINE C.W., SHOTWELL O.L., ELLIS J.J., et STUBBLEFIELD R.D. (1966).** Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriol Rev.*, 30(4), 795–805.

**HORN B.W., DORNER J.W., GREENE R.L., BLANKENSHIP P.D., COLE R.J. (1994).** Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathol*, 125, 179–191.

**HUA SUI SHENG T. (2002).** Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial; in: «Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin and 16th Aflatoxin Elimination Workshops», Savannah, Georgia USA.

**HUYBRECHTS B., TANGNI E.K., DEBONGNIE P., GEYS J. et CALLEBAUT A. (2013).** Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles: une revue. *Cahiers Agricultures*, 22, 202-215.

**ISIK K., CHUN J., HAH Y.C. et GOODFELLOW M. (1999).** *Nocardia Salmocida*: a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 49, 833-837.

**JAIL A., BOUKHOUBZA F., NEJMEDDINE A., SAYADI S., HASSANI L. (2010).** Co-treatment of olive-mill and urban wastewaters by experimental stabilization ponds. *J. of Hazardous Mater.*, 176 : 893–900.

**JEGUIRIMA M., CHOUCHE A., REGUILLON F.A., TROUVEA G. et LE BUZIT G. (2012).** A new valorization strategy of olive mill wastewater : Impregnation on sawdust and combustion. *Resour. Conser. Recy.*, 59, 4-8.

**JINAP S., DE RIJK T.C., ARZANDEH S., KLEIJNEN H.C.H, ZOMER P., VAN DER WEG G. et MOL J.G.J. (2012).** Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods. *Food Control*, 26, 42-48.

**KABAK B., DOBSON A.D.W. et VAR I. (2006).** Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619.

**KAMENI A., IMELE H. et MBANYA N.J. (2002).** An alternative heat treatment for milk pasteurization in Cameroon. *International Journal of Dairy Technology*, Volume 55, Issue 1, pages 40–43.

**KAPELLAKIS I.E., TSAGARAKIS K.P. et CROWTHER J.C. (2008).** Olive oil history, production and by-product management. *Environ.Sci.Biotechnol*, 7, 1-26.

**KLICH M., MENDOZA C., MULLANEY E., KELLER N. et BENNETT J. W. (2001).** A New sterigmatocystin-producing *Emericella* Variant from Agricultural Desert Soils. *System. Appl. Microbiol*, 24, 131–138.

**KOSEGARTEN C.E., RAMIREZ-CORONA N., MANI-LOPEZ E., PALOU E. et LOPEZ-MALO A. (2016).** Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time to detection models. *International Journal of Food Microbiology*, xxx, xxx–xxx

**KRSKA R. et JOSEPHS R. (2001).** The state of the art in the analysis of oestrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369, 469-76.

**KUMAR V., BASU M.S. et RAJENDRAN T.P. (2008).** Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891-905.

**LACEY J. (1986).** Factors affecting mycotoxin production; in: «Mycotoxins and phycotoxins» edited by Steyn P. S. and Vleggaar R., 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.

**LAFKA T.A., LAZOU A.E., SINANOGLU VJ. ET LAZOS E.S. (2011).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food.Chem*, 125, 92-98.

**LANGSETH W., HOIE R. et GULLORD M. (1995).** The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science*, 45, 63-67.

**LEBLANC M-C. et SAINT-HILAIRE M. (2002).** Doit-on s'inquiéter du pouvoir cancérigène des mycotoxines chez l'humain ? Projet d'intégration en microbiologie BIO600. Université de Sherbrooke : Sherbrooke, 67 p.

**LECLERC F.C., PAPON N., NOEL T. et VILLARD J.(2005).** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires*, 373, 61-66.

**LEFRANCOIS J. (2007).** Dynamiques et origines des matières en suspension sur de petits bassins versants agricoles sur schiste. Thèse de doctorat en Sciences de la terre. Faulté des Sciences de la Matière. Université de Rennes 1, France.

LEMING L., JUN Z., PING W., YUESONG W. et JIPING C. (1998). Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. Review . *Journal of Chromatography A*, 815, 3–20.

LEULMI N. (2011). La valorisation nutritionnelle des margines et de leurs impacts sur la réduction de la méthanogènes ruminale chez l'ovin. Thèse de magister en biotechnologie microbienne. Faculté des sciences de la nature et la vie. Université Mentouri, Constantine, Algérie.

LEVIS-MENZI R., GAVIOZZI A., RIFFALDI R. ET FAIZI I. (1992). L'épandage aux champs des margines : Effet sur les propriétés du sol. *Oliv*, 40, 20-25.

LIANG Z., LI J., HE Y., GUAN S., WANG N., JI C. & NIU T. (2008). AFB1 Bio-Degradation by a New Strain - *Stenotrophomonas*. *Sp. Agricultural Sciences in China*, 7(12), 1433-1437.

LI JUAN-JUAN., SUO DE-CHENG & SU XIAO-OU. (2010). Binding Capacity for Aflatoxin B1 by Different Adsorbents. *Agricultural Sciences in China*, 9(3), 449-456.

LI Y., KONG W., LI M., LIU H. ZHAO X. et YANG S. (2016). *Litsea cubeba* essential oil as the potential natural fumigant: inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. *Industrial crops and products*, 80, 186-193.

LIPPS P.E. et DEEP I.W. (1991). Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*, 75, 828-833.

LOPEZ-MALO A., STELLA MARIS A. et ENRIQUE P. (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 119–128.

LOPES M., ARAUJO C., AGUEDO M., GOMES N., GONCALVES C., TEIXEIRA J.A. et BELO I. (2008). The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: Medium supplementation and surfactant presence effects. *J.Chem.Technol.Biotechnol*, 84, 533-537.

LUTWIN B., FIESTAS ROS DE URSINOS J.A., GEISSEN K., KACHOURI M., KLIMM E., DE LADORDE MONPEZAT G., XANTHOULIS D. (1996) Les expériences méditerranéennes dans le traitement et l'élimination des eaux résiduaires des huileries d'olives, *Editions (GTZ) GmbH, Eschborn*. République Fédérale d'Allemagne.

MAGAN N. et ALDRED D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131–139.

MAGOHA H., KIMANYA M., DE MEULENAER B., ROBERFROID D., LACHAT C., KOLSTEREN P. (2014) Association between aflatoxin M<sub>1</sub> exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. *World Mycotoxin J.* 7(3), 277–84.

- MAKUN H.A. GBODI T. A., AKANYA O. H., SALAKO E. A., OGBADU G. H. (2007).** Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza Sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6(2), 099-108.
- MASSADEH M.I. ET MODALLAL N. (2008).** Ethanol production from olive mill waste watter (OMW) pretreated with pleurotus sajor-caju. *Energy. Fuels*, 150 (22), 150-154.
- MARIN S., SANCHIS V., ARNAU F., RAMOS A.J. et MAGAN, N. (1998).** Environmental factors *in vitro* interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102, 831-837
- MARIN S., RAMOS A.J., CANO-SANCHO G. et SANCHIS V. (2013).** Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- MEKKI A., DHOUB A. et SAYADI S. (2007).** Polyphénols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastwaters. *J. Environ. Managem*, 84, 134-140.
- MEKKI A., DHOUB A., FEKI F. et SAYADI S. (2008).** Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 69, 488–495.
- MITCHELL D., PARRA R., ALDRED D. et MAGAN N. (2004).** Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 439–445.
- MILLAN B., LUCAS R., ROBLES A., GARCIA T., ALVAREZ DE CIENFUEGOS G. et GALVEZ A. (2000).** A study on the microbiota from olive mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and theirs biodegradative potential. *Microbiol. Res*, 155(3), 143-7.
- MOHAMMEDI Z, BACHIK S ET BELKAROUBE N. (2010).** Potentiel antifongique et anti aflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss and Reut. *Les technologies de laboratoire*, 5 (19), 10-15.
- MONBALIU S., VAN POUCKE C., VAN PETEGHEM C., VAN POUCKE K., HEUNGENS K. et DE SAEGER S. (2009).** Development of a multi-mycotoxin liquid Chromatography / tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. **RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY.** Rapid Commun. *Mass Spectrometry*, 23, 3–11.
- MORENO E., PEREZ J., RAMOS-CORMENZANA A., MARTINEZ J. (1987)** Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios*, 51, 169-174.

**MORENO E. C., GARCIA G. T., ONO M. A., VIZONI É., KAWAMURA O. et HIROOKA E.Y. (2009).** Co-occurrence of mycotoxins incornsamples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *FoodChemistry*, 116, 220–226.

**MOSS M.O. et FRANK J.M. (1985).** Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society*, 84, 585-590.

**MURPHY P.A., HENDRICH S., LANDGREN C. et BRYANT C.M. (2006).** Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, 71, R51-65.

**NABNEY J. et NESBITT B.F. (1965).** A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst*, 90, 155-160.

**NADOUR M., LAROCHE C., PIERRE G., DELATTRE C., MATI F. et MICHAUD P. (2015)** Structural Characterization and Biological Activities of Polysaccharides from Olive Mill Wastewater. *Appl Biochem Biotechnol*, 177, 431–445.

**NAFEES B. (2009).** Caracterisation des polycetones synthases intervenant dans la biosynthese d'ochratoxine A, d'acide penicillique, d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *Aspergillus westerdijkiae*. Thèse de doctorat d'université en Microbiologie et Biocatalyse Industrielles. Toulouse. Institut National Polytechnique. France. 255p.

**NEFZAOI. (1987).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier, Tunisie.

**NESSI A. et ETCHEVERRY .M. (2008).** Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *fungal ecology. Article in press*.

**NOUBIH A., ABDERRABBA M. et PROVISTE E. (2007).** Temperature and addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J.Chem.Thermody*, 39, 297-303.

**NUNZIA CICCÒ., MARIA T. LANORTE., MARGHERITA PARAGGIO., MARIASSUNTA VIGGIANO., VINCENZO LATTANZIO. (2009).** A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91, 107–110.

**OBIED H.K., ALLEN M.S., ET BEDGOOD D.R. (2007).** Bioscreening of australian olive mill waste extracts : biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food. Chem. Tox*, 45, 1238-1248.

**PANAGOUE E.Z., SKANDAMIS P.N. et NYCHAS J.E. (2003).** Modelling the combined effect of temperature, pH and  $a_w$  on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 146–156.

**PAPP E., H-OTTA K., ZARAY G. et EMIL MINCSOVICS E. (2002).** Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73, 39–46.

**PARADES C., CEGARRA J., RIOG A., SANCHEZ-MONEDERO M.A., BERNAL M.P., BRENES M. (1999).** Characterization of olive mill wastewater (alpechin) audits sludge for agricultural purpose. *Bioresour. Technol*, 67, 111-115.

**PARK D.L. et LIANG B.(1993).** Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends Food Sci. Technol.*,4, 334.

**PERAICA M., RADIC B., LUCIC A. et PAVLOVIC. M. (1999).**Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organisation*, 77, 754-766.

**PFOHL-LESZKOWICZ A. et CASTAGNERO M. (1999).** L'ochratoxine A, In: Les mycotoxines dans l'alimentation, Evaluation et gestion du risque, Tec & Doc, Lavoisier, Londres, Paris, New York, 249-277.

**PFOHL-LESZKOWICZ A. (2009).** Mycotoxins: a cancer risk factor. *African. Journal of Cancer*, 1, 42-55 .

**-PINTO R.T.P., LINTOMEN L., LUZ L.F.L. et WOLF-MACIEL M.R. (2005).** Strategies for recovering phenol from wastewater: Thermodynamic evaluation and environmental concerns. *Flu.Phase.Equil*, 228-229, 447-457.

**PITT J.I. et HOCKING, A.D. (1997).** Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.

**PITT J.I., BASILICO J.C., ABARCA M.L. et LOPEZ C. (2000).** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38, 41-6.

**PITT J.I. (2006).** Fungal ecology and the occurrence of mycotoxins; in: «Mycotoxins and Phycotoxins : advances in determination, toxicology, and exposure management» ed, Wageningen Academic Publishers, Njapau N, Trujillo S, van Egmond H, Park D, eds. Maryland, USA

**PITT J.I. ET HOCKING A. D. (2009).** Fungi and food spoilage. 3 rd ed. Springer. New York. 524p.

**PROCEDA G., CECCON L. (2006).** Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill wastewaters. *Anal.Chem.Acta*, 561, 103-106.

**RAMOS-CORMENZANA A. (1986)** Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: Inter. Symp.: On olive by-products valorization. *Sevilla-Spain*. 41-60.

**RANALLI A. (1991)** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37, 30-39.

- RAPER K. et FENNELL D.J. (1965).** The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- REBOUX G. (2006).** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46, 208–212
- REDDY K.R.N., REDDY. C.S., MURALIDHARAN .K. (2008).** Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Article in press.
- REDDY K.R.N., REDDY .C.S. et MURALIDHARAN. K. (2009a).** Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 53–57.
- REDDY K.R.N., REDDY. C.S., et MURALIDHARAN .K. (2009b).** Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*, 20, 173–178.
- REDDY K.R.N., SALLEH B., SAAD B., ABBAS H.K., ABEL C.A. et SHIER W.T. (2010).** An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29, 3-26.
- REJESEKF. (2003).** Analyse des eaux: aspects réglementaires et techniques. *Sci. Techn. Environ.* Bordeaux : CRDP d'aquitaine.
- RIBA A. (2008).** Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Faculté des sciences biologiques et agronomiques. UMMTO. 169p.
- RIGO K., VARGA J., TOTH B., TEREN J., MESTERHAZY A. et KOZAKIEWICZ Z. (2002).** Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences on the intergeneric transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Journal of General Applied Microbiology*, 48, 9–16.
- ROBERT H.A., BOSTON R.S., PAYNE G.A. (2008).** Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbial Biotechnol*, 78, 559-572
- RODIER J. (1996).** Analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux résiduares, Eaux de mes. 8<sup>ème</sup> Ed., Dunod, Paris.
- ROCHA VILELA GEORGIA., GUSTAVO STEFFEN DE ALMEIDA., MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE., MARIA HELOISA DUARTE MORAES., JOSE' OTA'VIO BRITO., MARIA FA'TIMA DAS G.F. DA SILVA., SEBASTIA~O CRUZ SILVA., SONIA MARIA DE STEFANO PIEDADE., MARIA ANTONIA CALORI-DOMINGUES. et EDUARDO MICOTTI DA GLORIA. (2009).** Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*. Article in press.

**ROIG A., CAYULA M.L. ET SANCHEZ-MONEDERO M.A. (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Was.Manag*, 26, 960-969.

**ROMINA V. BLUMA et MIRIAM G. ETCHEVERRY. (2008).** Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25, 324–334.

**SABBAH I., MARSOOK T. et BACHEER S. (2004).** The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process.Biochem*, 39, 1947-1951.

**SALVEMINI F. (1985).** Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercemente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze Grasse*, 112, 559-564.

**SAMSON R.A. et PITT JI. (2000).** Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam, the Netherlands, 510 pp.

**SAMSON R., LEGENDRE J.B., CHRISTEN R., FISCHER-LE SAUX M., ACHOUAK W. et GARDAN L. (2005).** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1415-1427.

**SAMSON R.A., HONG S.B. et FRISVAD J.C. (2006).** Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, 133–148.

**SAQER M. et HERZALLAH. (2009).** Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Analytical Methods.Food Chemistry*, 114, 1141–1146.

**SCHEIDEGGER K.A. et PAYNE G.A. (2003).** Unlocking the secrets behind secondary metabolism, A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, 22, 427–463.

**SCHMID J. & AMRHEIN N. (1995).** Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry*, 39 (4), 737-749.

**SENANI N. et MOULTI-MATI F. (2012).** Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété Chamlal (*Olea europea*) sur deux souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. *Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod*, 8(1), 44-48.

**SMITH J.E. et MOSS M.O. (1985).** Mycotoxins, formation, analysis and significance, John Wiley et Son, Chichester.

**SRIVASTAVA A. K., ARA A., BHARGAVA P., MISHRA Y., RAI S. P. ET RAIL. C. (2007).** A rapid and cost-effective method of genomic DNA isolation from cyanobacterial culture, mat and soil suitable for genomic fingerprinting and community analysis. *J Appl Phycol*, 19, 373–382.

**STARK A.A. (2001).** Mechanisms of action of aflatoxin B1 at the biochemical and molecular levels In *Microbial Food Contamination* (C.L. Wilson and S. Droby, eds), pp. 47–60. Boca Raton, FL: CRC Press.

**SREENIVASA M.Y., DASS R.S. et CHARIT RAJ A.P. (2011).** Mycological evaluation of maize grains produced in Karnataka (India) for the post harvest fungal contamination. *World Applied Sciences Journal*, 13 (4), 688-692

**SULTANA, B., NASEER R. et NIGAM P. (2015).** Utilization of agro-wastes to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus parasiticus*: A biotreatment of three cereals for safe long-term storage. *Bioresource Technology*, 15, 01219-5.

**SUNG-HYE C., CHANG-HEE L., MI-RAN J., YOUNG-WOOK S., SANG-MOK LEE, IN-SUN C., SO-HEE K., DAI-BYUNG K. (2008).** Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Analytical Methods. Food Chemistry*, 107, 1283–1288.

**TABUC CRISTINA. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, spécialité : pathologie, mycologie, génétique et nutrition Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest. 190 p.

**TATSADJIEU N.L., ETOA F-X., MBOFUNG C.M.F. AND NGASSOUM M.B. (2008).** Effect of *Plectranthus glandulosus* and *Ocimum gratissimum* on growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B production. *Tropicul*, 26, 78-83.

**TAHANI N., ELAMRANI A., SERGHINI-CAID H., OUZOULINE M., KHALID A. (2008).** Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 2(1), 81-91.

**TSIOULPAS A., DIMOU D., ICONOMOU D. and AGGELIS G.(2002).** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84: 251-257.

**VARGA J., RIGO K., TOTTH B., TEREN J. et KOZAKIEWICZ Z. (2003).** Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 29–36.

**VESELY D., VESELA D. et JELINEK R. (1983).** Comparative assessment of the aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 embryotoxicity in the chick embryo, *Toxicology Letters*, 15, 297-302.

**VINOD K., BASU M.S. et RAJENDRAN T.P. (2008).** Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891–905.

**WICKLOW D.T. et SHOTWELL O.L. (1983).** Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and selerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1–5.

**WILD C.P., HUDSON G.J., SABBIONI G., CHAPOT B., HALL A.J., WOGAN G.N., WHITTLE H., MONTESANO R. et GROOPMAN J.D. (1992).** Dietary intake of aflatoxins and the level of aflatoxin in peripheral blood in the Gambia, West Africa, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1, 229-234.

**XU X.M., PARRY D.W., NICHOLSON P., THOMSETT M.A., SIMPSON D. et EDWARDS S.G. (2008).** Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 21-34.

**YALCUK A., BALDAN PAKDIL N. and YAPRAK TURAN S. (2010).** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands . *Desalination*, 262: 209-214.

**YIANNIKOURIS A. et JOUANY J.P. (2002a).** Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Resource*, 51, 81–99.

**YIANNIKOURIS A. et JOUANY J.P. (2002b).** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA ,Productions Animales*, 15 (1), 3-16.

**ZBAKH H. ET EL ABBASI A. (2012).** Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages.*J.Funct.Foods*, 4, 53-65.

# *Annexes*

## Annexe 1

### 1. La préparation de la solution de carbonate de sodium à 20% (NUNZIA CICCO et al, 2009):

La solution de carbonate de sodium est préparée en dissolvant à 70 ou 80° C au bain marie 20g de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre dans 100ml d'eau distillée. après avoir laissé refroidir pendant une nuit (à +4), une cristallisation de la solution sursaturée est provoqué en ajoutant un cristal de carbonate de sodium 10 fois hydraté ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), après cristallisation, la solution est filtrée sur laine de verre.

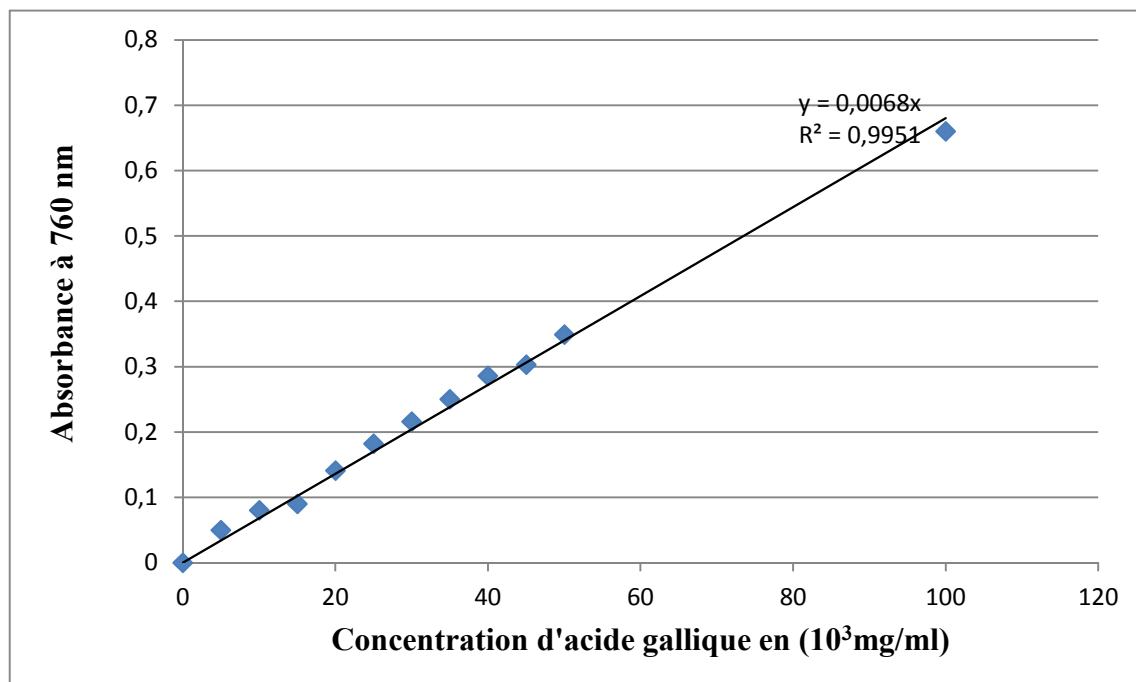
### 2. Dosage des composés phénoliques :

#### \* Courbe d'étalonnage :

A partir de la solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0 -0,1] mg/ml d'acide gallique.

La concentration de la solution mère est de 0,1 mg/ml.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est donnée dans la figure suivante :



**Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration d'acide gallique et des densités optiques à 760 nm.**

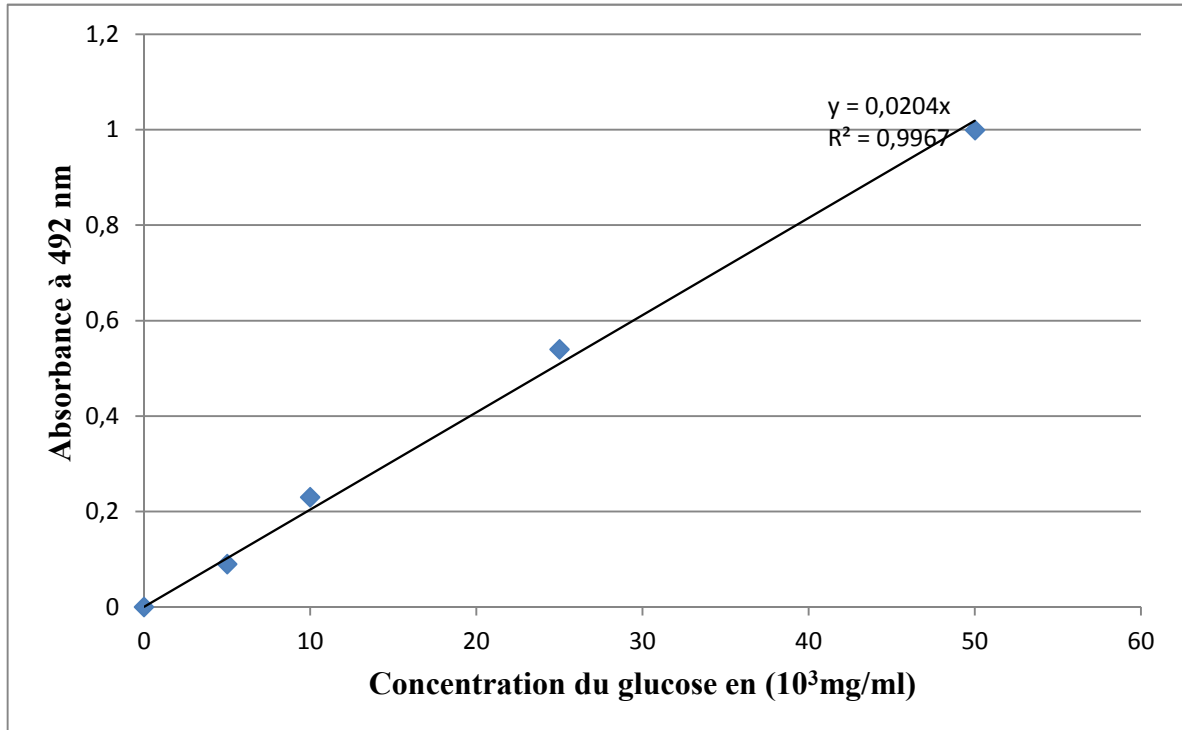
## 1. Détermination de la teneur des margines en Sucres Totaux :

### \* Courbe d'étalonnage :

La concentration de la solution mère de glucose est de 0,05 mg/ml.

A partir de cette solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0 –50] µg/ml de glucose.

La courbe d'étalonnage du glucose est donnée dans la figure suivante :



**Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration du glucose et des densités optiques à 492 nm.**

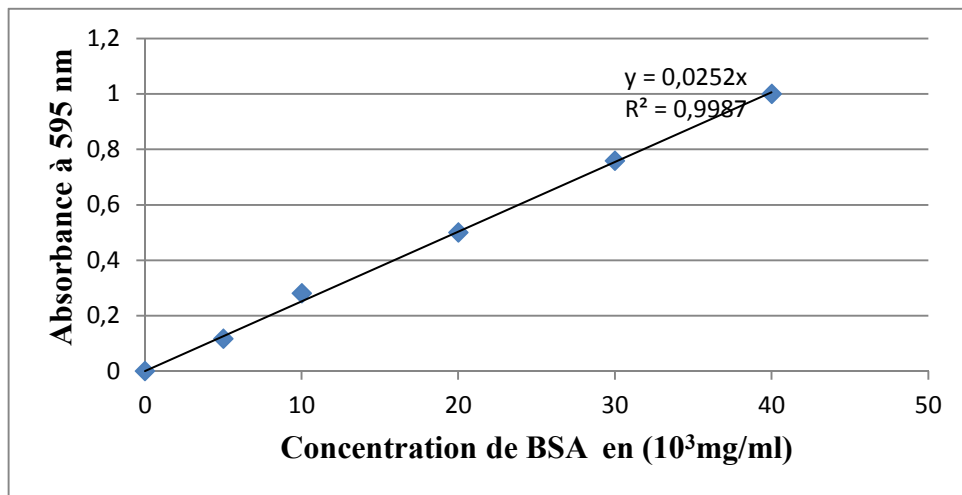
## 2. Détermination de la teneur des margines en protéines :

### \* Courbe d'étalonnage :

La concentration de la solution mère de BSA est de 0,04 mg/ml.

A partir de cette solution mère, nous préparons une gamme d'étalonnage allant de [0-40]  $\mu\text{g/ml}$  de BSA.

La courbe d'étalonnage de la BSA est donnée dans la figure suivante :



**Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration de BSA et des densités optiques à 595 nm.**

## Annexe 2

### La Composition des milieux de cultures utilisés :

#### 1. Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

Pomme de terre.....	200g
Agar.....	15g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
pH final= 5,6 ± 0,2	

Ramollir la pulpe de pomme de terre dans 300ml d'eau en chauffant. Ajouter ensuite le glucose et l'agar. Porter à ébullition pour solubiliser l'agar puis filtrer sur gaze et compléter à un litre avec de l'eau distillée.

#### 2. Milieu CAM : Coconut Agar Medium : milieu à base de coco gélosé

Noix de coco déchiquetée.....	100g
Eau distillée.....	300ml.
Tissu en mousseline	
Agar .....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Préparation : 100g de noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 05 min avec 300 ml puis porté à ébullition, le mélange est filtré à l'aide du tissu en mousseline. Le pH final ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N (cette étape on peut ne pas l'effectuer) Le filtrat est additionné de 20 g d'agar puis complété à 1000ml par l'eau distillée.

#### 3. Potato Dextrose Broth (PDB) :

Pomme de terre.....	200 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Laver la pomme de terre ; couper en cubes dans 300 ml d'eau distillée; Porter à ébullition pendant 30 – 45 min. Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le glucose. Compléter le volume à 1000 ml.

#### 4. Semi synthetic liquid medium (SMKY)

Saccharose.....	200 g
Sulfate de magnésium.....	0,5 g
Nitrate de potassium.....	3 g
Extrait de levure.....	7 g

Les ingrédients sont mélangés à 1000 ml d'eau distillée.

**NB : tous les milieux sont stérilisés par autoclave durant 20min à 120°C.**

### Annexe 3

**Tableau XI: L'efficacité de la poudre de margine sur la biomasse du mycélium (g) de la souche toxigénique d'*A. flavus* dans le milieu PDB**

Concentration Poudre de margine g/ml	Biomasse du mycélium (g)
Témoin	0,27 ± 0,05
0,1	0,16 ± 0,03
0,2	0,11 ± 0,02
0,3	0,09 ± 0,01
0,4	0,03 ± 0,01
0,5	0,00 ± 0,00

**Tableau XII: L'efficacité de l'extrait phénolique des margines sur la biomasse du mycélium (g) de la souche toxigénique d'*A. flavus* dans le milieu PDB**

Concentration Extrait phénolique mg/ml (ppm)	Biomasse du mycélium (g)
Témoin	0,25 ± 0,05
125	0,22 ± 0,01
250	0,19 ± 0,01
500	0,13 ± 0,00
750	0,12 ± 0,00
1 000	0,00 ± 0,00