

RECHERCHE DES POPULATIONS D'ASPERGILLUS SECTION FLAVI AFLATOXINOGENES DANS LES AMANDES COMMERCIALISÉES DANS TROIS RÉGIONS ALGÉRIENNES

A. Matmoura^{1,2,*}, K. Bouti³, N. Bouras^{3,4}, Z. Houmani¹

¹ Laboratoire de Recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algérie.

² Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algérie.

³ Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie.

⁴ Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie.

Email of corresponding author: amina190280@gmail.com

Received: 10 October 2018

Accepted: 20 December 2018

Abstract

The objective of this research was to isolate and identify the aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* populations in samples of almonds commercialized in three regions of northern Algeria. Four varieties of almonds: local almonds (shelled and unshelled), and shelled almonds imported from the United States (blanched and non-blanched) were drawn from popular markets in three regions of Algeria: Blida, Medea and Tipaza. Fungal analysis results showed that the dominant fungal genera are *Aspergillus* (52.7%) and *Penicillium* (47.3%). The main isolated species which belong to *Flavi* and *Nigri* sections of the *Aspergillus* genus, were the most dominant ones with 56.1% and 43.4% respectively of the total of *Aspergillus*. The screening of 61 fungal isolates of the *Aspergillus* section *Flavi* was determined on Coconut Agar Medium (CAM). The production was then confirmed by thin layer chromatography (TLC). The results obtained from CAM and TLC showed a rate of 11.5% and 39.3% (24 isolates) respectively. The study of morphological features and chemotype of the aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* populations isolates indicates that this section is dominated by the typical species *A. flavus* (91.7%).

Keywords: aflatoxins, local and imported almonds, *Aspergillus* section *Flavi*, Algeria.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'isoler et identifier les populations d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes dans les amandes commercialisées dans trois régions du nord algérien. Quatre variétés d'amandes locales (décortiquées et non décortiquées) et amandes décortiquées importées des États-Unis (blanchies et non blanchies) ont été collectées au niveau des marchés de 3 villes d'Algérie: Blida, Médéa et Tipaza. Les résultats d'analyse fongique ont montré que les principaux genres fongiques dominants isolés sont *Aspergillus* (52,7%) et *Penicillium* (47,3%). Les principales espèces dominantes isolées appartiennent aux sections *Flavi* (56,1%) et *Nigri* (43,4%) du genre *Aspergillus*. Les résultats obtenus de pouvoir producteur d'aflatoxines sur milieu CAM (Coconut Agar Medium) et par CCM (Chromatographie sur Couche Mince) de 61 souches fongiques ont révélé un taux de 11,5% et 39,3% (24 isolats) respectivement. L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des caractères morphologiques et chimiotypiques des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes indique que cette section est dominée par l'espèce *A. flavus* typique (91,7%).

Mots clés: aflatoxines, amandes locales et importées, *Aspergillus* section *Flavi*, Algérie.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* [1]. La contamination inévitable des produits alimentaires par les mycotoxines constitue une cause importante de maladies d'origine alimentaire et un problème actuellement évoqué qui porte sincèrement sur la qualité et la sécurité sanitaire des aliments [2]. Les espèces impliquées dans la production d'aflatoxines (AFs) appartiennent essentiellement à *Aspergillus* section *Flavi*. D'après Steyn [3], les AFs sont sécrétées par des souches d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*. Les travaux de recherches entrepris en Algérie sur les mycotoxines ont porté sur la contamination de la filière blé par les AFs et l'ochratoxine A [4,5]. D'autres travaux ont montré la présence de l'AFB1 dans les arachides de bouche [6] et dans les épices [7].

L'Algérie est un pays méditerranéen, caractérisé par un climat chaud et humide favorisant la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. L'objectif de ce travail est d'analyser et d'identifier la flore fongique contaminant les différentes variétés des amandes commercialisées en Algérie. Cet isolement est focalisé sur la caractérisation morphologique des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*, et sur la détermination de leur pouvoir producteur d'Aflatoxines.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Échantillons d'amandes

Les denrées alimentaires ayant fait l'objet d'analyse fongique et aflatoxinogène sont :

- Amandes décortiquées (sans la coque) importées des États-Unis,
- Amandes décortiquées (sans la coque) blanchies importées des États-Unis,
- Amandes décortiquées (sans la coque) locales,
- Amandes non décortiquées (avec la coque) locales.

Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés ainsi pour l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques que pour la production des aflatoxines (AFs) sont les suivants:

- Milieu CYA (Czapek Yeast Agar) [8] est utilisé pour l'identification et la production des sclérotés; composé de: saccharose (30 g), extrait de levure (5 g), Czapek concentré (10 g), K_2HPO_4 (1 g), agar agar (15 g) et eau distillée (1 L); pH final $5,6 \pm 0,2$.
- Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (Davis et al., 1987) est utilisé pour la production d'AFs, composé de: noix de coco déchiquetée (100 g), β -cyclodextrine (3 g), agar agar (15 g) et eau distillée (1 L); pH final $7,0 \pm 0,2$.

Souches de références

Les études du pouvoir producteur d'AFs des isolats a nécessité l'utilisation des 2 souches de références: *Aspergillus flavus* NRRL 3251^T et *A. parasiticus* CBS 100926^T.

Identification morphologique des isolats fongiques

L'identification des principaux genres et espèces fongiques se tient par l'observation des caractères macro-morphologiques et micro-morphologiques.

L'étude des caractères morphologiques des moisissures isolées est effectuée sur milieu gélosé CYA [8]. L'identification macroscopique et microscopique a été réalisée à l'aide du schéma taxonomique en utilisant la méthode décrite dans la littérature [9,10].

Étude du pouvoir producteur d'aflatoxines

Le screening des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs est réalisé par détection de la fluorescence à 365 nm sur milieu de culture à base de noix de coco CAM (Coconut Agar Medium) selon la technique décrite dans la littérature [11,12]. La production d'AFs est ensuite confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM) [13].

Les souches fongiques sont ensemencées par le point central (une souche par boîte) sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco décheté (CAM), favorable à la production d'AFs [12] additionné de 0,3% de β -cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. La β -cyclodextrine et ses dérivés méthylés ont été utilisés par de nombreux auteurs [12,14] pour la détection des souches aflatoxinogènes. En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les isolats producteurs d'aflatoxines B et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visibles sous la lumière U.V. (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour.

Détection et confirmation de la production d'AFs par CCM

En vue d'une confirmation de la production des AFs par la chromatographie sur CCM, les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au chloroforme (ou le méthanol) selon la méthode décrite par Calvo et al. (2004). Six carottes (rondelles) de 10 mm de diamètre de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de Pétri (60 mm de diamètre). Les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml, l'extraction des AFs est réalisée par l'addition de 1 ml de méthanol, toute en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une micro-seringue puis injecté dans un autre tube Eppendorf. Le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et à une température de + 4 °C pour une analyse ultérieure. Les extraits précédemment obtenus, sont analysés par la chromatographie sur CCM. La méthode utilisée pour la détection des AFs par CCM est celle décrite par l'A.O.A.C [15].

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Reconnaissance les principaux genres

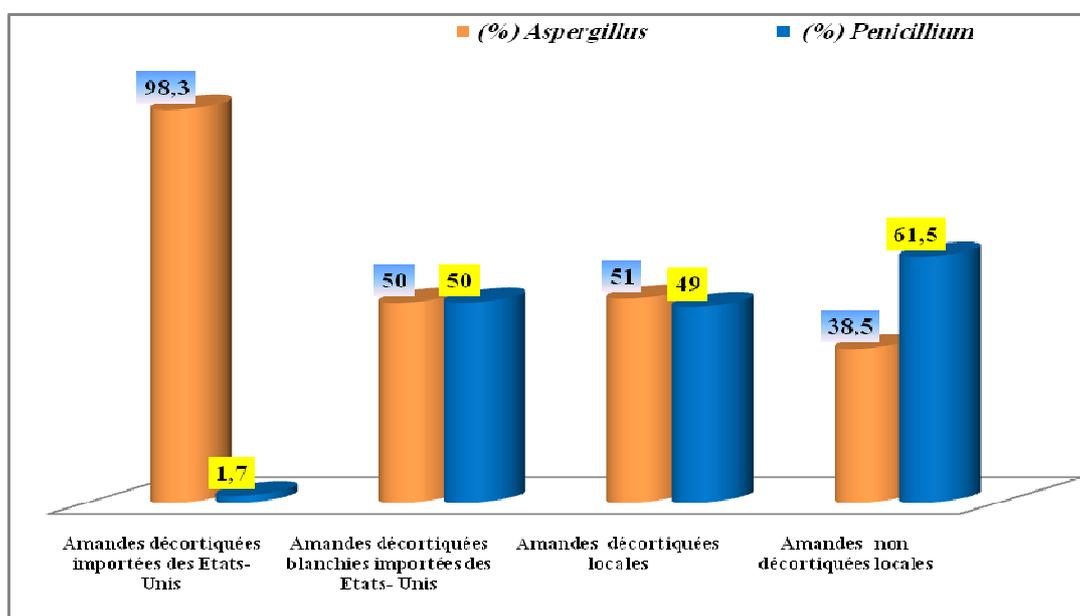
Les résultats de l'analyse fongique des échantillons d'amandes analysées obtenus montrent que les genres dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ces deux genres fongiques représentent respectivement 52,7 et 47,3% de la flore fongique totale. Les résultats relatifs illustrés dans la Figure 1 et dans le Tableau 1 témoignent la dominance du genre *Aspergillus* dans les amandes décortiquées importées des États-Unis (98,3%). Le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé chez la variété d'amandes non décortiquées locales (61,5%) pour celui d'*Aspergillus* (38,5%). En revanche, les taux d'*Aspergillus* et de *Penicillium* chez la variété d'amandes décortiquées blanchies importées des États-Unis et chez la variété d'amandes décortiquées locales sont égaux (50% et 50%), et (51% et 49%), respectivement.

Tableau 01 : Fréquences d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Aspergillus* section *Flavi* et *Aspergillus* section *Nigri* dans les différents échantillons d'amandes analysées.

Variétés d'amandes	Code d'échantillon	<i>Penicillium</i> (cfu/g)	<i>Aspergillus</i> (cfu/g)	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (cfu/g)*	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (cfu/g)*
Amandes décortiquées importées des États-Unis	A	$0,5 \times 10^4$	$14,5 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$	14×10^4
	B	10^4	43×10^4	$0,5 \times 10^4$	$42,5 \times 10^4$
	C	$0,5 \times 10^4$	$54,5 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$	54×10^4
Amandes décortiquées Blanchies importées des États-Unis	D	00	$0,9 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
	E	$0,6 \times 10^4$	$0,2 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$
	F	$0,7 \times 10^4$	$0,2 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$
Amandes Décortiquées locales	G	00	$186,5 \times 10^4$	151×10^4	$35,5 \times 10^4$
	H	84×10^4	2×10^4	00	00
	I	110×10^4	$13,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	6×10^4
Amandes non décortiquées locales	J	30×10^4	$14,5 \times 10^4$	6×10^4	$8,5 \times 10^4$
	K	$61,5 \times 10^4$	75×10^4	61×10^4	14×10^4
	L	105×10^4	$33,5 \times 10^4$	$19,5 \times 10^4$	14×10^4
Totale		$393,3 \times 10^4$	$438,8 \times 10^4$	$246,3 \times 10^4$	$190,5 \times 10^4$

* par rapport au total d'*Aspergillus*.

Les échantillons A, E, H et K ont été collectés au marché de la ville de Blida; les échantillons B, D, G et J ont été collectés au marché de la ville de Médéa; les échantillons C, F, I et L ont été collectés au marché de la ville de Tipaza.

**Figure 01** : Fréquence du genre *Aspergillus* et *Penicillium* dans les différentes variétés d'amandes analysées.**Distribution des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri***

Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *Aspergillus* section *Flavi* et *Aspergillus* section *Nigri*, sont les plus dominantes dans la majorité des échantillons analysés (Tableau 1).

La plus forte incidence d'*Aspergillus* section *Flavi* est enregistrée dans les amandes décortiquées, et non décortiquées locales avec des taux de 78,5% et 70,3% respectivement du total d'*Aspergillus*. Dans les amandes décortiquées importées des États-Unis cette section représente 23%. Un taux relativement faible est enregistré dans les amandes décortiquées importées des États-Unis (1,4%). Cependant, les isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* ont été isolés à des teneurs très élevées dans les amandes décortiquées importées des États-Unis (89,6%) et dans les amandes décortiquées blanchies importées des États-Unis (77%). Chez la variété d'amandes décortiquées et non décortiquées locales sa fréquence est de 20,5% et de 29,7% respectivement (Figure 2).

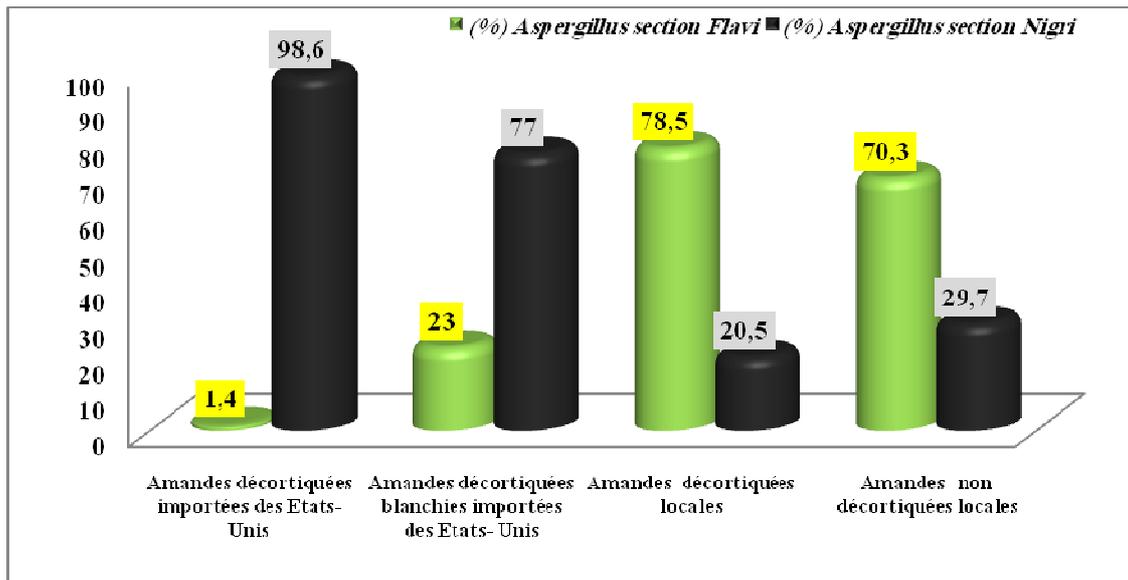


Figure 02 : Fréquence d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* dans les différentes variétés d'amandes analysées par rapport au total d'*Aspergillus*.

Étude du pouvoir producteur d'AFs par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

Au cours de cette étude, 61 souches d'*Aspergillus* section *Flavi* isolées des échantillons ont fait l'objet d'une étude du pouvoir producteur d'AFs. Les résultats ont révélé un taux de production de 11,5 et 39,3%, respectivement sur milieu CAM et sur CCM. Dix-sept (17) isolats faiblement producteurs paraissent des faux négatifs sur CAM; ce qui démontre que la chromatographie sur CCM est plus performante que la détection par méthode de screening simple sur milieu CAM.

Souches aflatoxinogènes isolées d'amandes

L'estimation de la quantité d'AF par CCM dans les extraits des 24 isolats a montré des quantités d'AFB1 très variables. Ainsi, les isolats aflatoxinogènes peuvent être divisés en fonction de l'intensité de la fluorescence en trois catégories: 70,8% des isolats sont faiblement producteurs, les isolats moyennement producteurs représentent 8,3% et les isolats fortement producteurs représentent 20,8%. Les résultats consignés dans le Tableau 2 montrent que les amandes non décortiquées locales sont les plus contaminées par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs (37,5%) suivies par les amandes décortiquées importées des États-Unis.

Les amandes décortiquées blanchies importées des États-Unis (25%). Les amandes décortiquées locales sont moins contaminées par les isolats aflatoxinogènes (12,5%).

Tableau 02 : Répartition des 24 isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction de l'intensité de fluorescence sur CCM.

Variétés d'amandes	Nombres totaux d'isolats testés	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Intensité			(% Isolats aflatoxinogènes)
			+++	++	+	
Amandes décortiquées importées des États-Unis	10	6	3	1	2	25
Amandes décortiquées blanchies importées des États-Unis	11	6	1	0	5	25
Amandes décortiquées locales	15	3	0	0	3	12,5
Amandes non décortiquées locales	25	9	1	1	7	37,5
Totale	61	24	5	2	17	100%
		39,3%	20,8%	8,3%	70,8%	

Fluorescence intense (+++), fluorescence moyenne (++), fluorescence faible (+).

Caractérisation des *Aspergillus* section *Flavi*

Au cours de cette étude, 61 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* ont fait l'objet d'une identification. La caractérisation des espèces de cette section repose sur une taxonomie polyphasique à savoir l'étude des caractères morphologiques, la production de certains métabolites et la production de sclérotés. Dans le cadre de ce travail nous n'avons pas pu faire l'analyse de tous ces métabolites et nous nous sommes limités aux productions d'AFs et des sclérotés, en plus des caractères morphologiques. Ceci ne nous permet évidemment pas de faire une délimitation très précise de nos isolats.

Distribution des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi*

Parmi 61 isolats, on trouve 53 isolats présentaient les caractères du groupe d'*Aspergillus flavus*. Ce groupe est formé de 50 isolats (82%) ne produisent pas de sclérotés, un isolat (1,6%) produit les sclérotés de type « S » (< 400 µm), et 2 isolats (3,4%) produisent les sclérotés de type « L » (> 400 µm). 7 isolats (11,5%) présentaient des conidies rugueuses et un mycélium d'aspect poudreux et de couleur verte olive tirant sur le brun (vert kaki) caractéristique d'*A. tamarii*. Un isolat sur les 61 (1,6%) ayant la couleur vert foncée, produisant l'AFB1 et l'AFG1 est rattaché à *Aspergillus parasiticus*. Les principaux résultats sont présentés dans la Figure 3.

Distribution des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes

Sur la base du profil d'AFs et les sclérotés produits, en plus des caractères morphologiques, les isolats aflatoxinogènes appartenant à la section *Flavi* ont été subdivisés en sept (07) groupes, selon la dernière classification proposée [16]. Le groupe I est constitué d'isolats produisant l'AFB, l'acide cyclopiazonique (CPA) mais pas l'AFG et de sclérotés. Le groupe II produit l'AF de type B, le CPA et de sclérotés de type « L » mais pas l'AFG. Le groupe III inclue les isolats produisant l'AFB et les sclérotés de type « L » mais pas l'AFG, et de CPA.

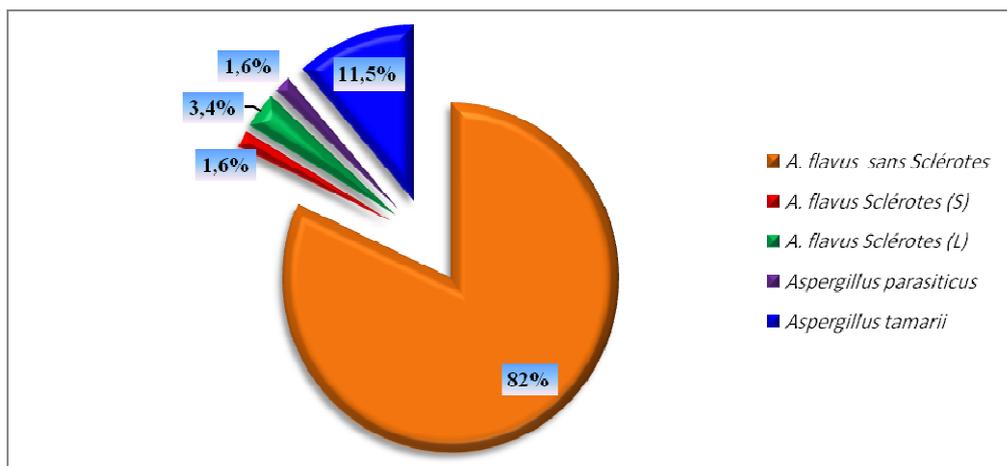


Figure 03 : Les différents types d'isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*.

Le groupe IV produit uniquement l'AFB. Les isolats du groupe I, II, III, et IV appartiendraient vraisemblablement à *A. flavus* typique. Le groupe V représente les isolats ayant la capacité de produire l'AFB, le CPA et les sclérotos de type « S »; ces isolats pourraient appartenir au groupe atypique d'*A. flavus*. Le groupe VI inclue les isolats produisant les AFs de type B et G, le CPA, et les sclérotos de type « S »; ces isolats sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus*. Le groupe VII produit les deux types d'AFs: B et G, mais pas de CPA et de sclérotos; ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*. Cette dernière, morphologiquement est très proche d'*A. flavus* et elle est fréquente dans le sol et parasite les insectes [17,18]. Parmi les 24 isolats aflatoxinogènes, 22 isolats (91,7%) sont rattachés à *A. flavus* typique, produisent l'AFB, mais pas l'AFG et de sclérotos. Ces isolats peuvent appartenir au groupe I (producteurs de CPA) ou au groupe IV (non producteurs de CPA). Un seul isolat (4,2%) appartient au groupe V s'il produit de CPA. le groupe VII représente 4,2% des isolats aflatoxinogènes testés. La caractérisation des 24 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes en fonction de la production d'AFB, AFG, de CPA et de sclérotos sont récapitulés dans le Tableau 3. Il est à noter que Le type II d'*A. flavus* correspond soit à *A. minisclerotigenes* soit à *A. parvisclerotigenus*, selon la dernière classification proposée [16].

Tableau 03 : Répartition des 24 isolats producteurs d'AFs d'*Aspergillus* section *Flavi* en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB, d'AFG et de sclérotos.

Groupe	AFB	AFG	CPA	L	S	Nombre d'isolats	Pourcentage (%) ^a
I	+	-	Non testée	-	-	22	91,7
II	+	-		-	-	-	-
III	+	-		-	-	-	-
IV ^b	+	-		-	-	*	*
V	+	-		-	+	1	4,2
VI	+	+		-	+	-	-
VII	+	+		-	-	1	4,2
Total (%)	91,7	4,2		-	4,2	24	100%

^a Pourcentage par rapport à 24 isolats testés. AFB: aflatoxine B1; AFG: aflatoxine G1; -: absence;

^b: les isolats du groupe IV sont regroupés avec les isolats du groupe I.

DISCUSSION

L'inventaire réalisé et le calcul de la fréquence de l'abondance de chaque agent fongique, révèlent que la mycoflore est dominée par les genres *Aspergillus* et *Penicillium* pour la totalité des échantillons d'amandes analysées. Ces deux genres fongiques représentent 52,7 et 47,3%, des résultats similaires ont été trouvés [19]. Généralement, les espèces du genre *Penicillium* se développent à des températures basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées [20]. En revanche, le genre *Aspergillus* est rencontré beaucoup plus dans les pays caractérisés par un climat chaud comme l'Algérie. Les amandes décortiquées importées des États-Unis sont beaucoup plus contaminées par le genre *Aspergillus* (98,3%) que *Penicillium*. Par contre, le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé chez la variété d'amandes non décortiquées locales (61,5%). La prévalence de *Penicillium* dans les amandes n'a pas été signalée dans la bibliographie. Elle peut toutefois s'expliquer par une forte installation de ce genre fongique aux dépens des autres moisissures lors de l'épluchage et le stockage. La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud est très connue [8]. *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation [21] et il est par conséquent très répandu dans la nature et tout particulièrement dans les régions à climat chaud [8, 22].

Cette étude a démontré la prédominance d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* avec des taux de 56,1 et 43,4% du nombre total d'*Aspergillus*, respectivement. La plupart des échantillons d'amandes sont contaminés par les espèces de la section *Flavi*. Toutefois leurs fréquences est moins importante dans les amandes importées. Dans les amandes décortiquées et non décortiquées locales nous retrouvons pratiquement autant de *Flavi* (78,5% et 70,3%) que des *Nigri*. Nos résultats ont également montré une très forte contamination d'amandes décortiquées importées (98,6%) et d'amandes décortiquées blanchies importées des États-Unis (77%) par *Aspergillus* section *Nigri*.

Les différences observées entre nos résultats avec ceux rapportés par certains auteurs peuvent être attribuées au fait que la mycoflore n'a pas été analysée de la même manière. Dans notre cas, nous n'avons pas pris les résultats de l'analyse des grains désinfectés. Donc, la flore fongique comprend la mycoflore endogène et superficielle. Par contre, dans la bibliographie on parle souvent des graines préalablement désinfectées. Cependant, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie et qui signalent la dominance d'*A. flavus* dans les arachides et les fruits secs [23]. *Aspergillus flavus* est très répandu dans les climats chauds et occupe des niches écologiques très diverses [24]. Cette espèce vit dans le sol à l'état saprophyte mais est capable de provoquer le pourrissement des grains [25].

Nos résultats montrent que sur 61 isolats seulement 24 isolats sont producteurs d'AFs, 5 isolats sont fortement producteurs, 2 isolats sont moyennement producteurs et 17 isolats sont faiblement producteurs. En ce qui concerne la contamination des amandes par les isolats aflatoxinogènes, les résultats ont révélé des concentrations assez importantes des isolats producteurs d'AFs dans les amandes non décortiquées locales (37,5%).

Dans l'analyse de la mycoflore, malgré la présence de toute une gamme d'agents fongiques dans tous les échantillons examinés, on a remarqué que l'échantillon I (amandes décortiquées locales provenant de Tipaza) est indemne d'isolats aflatoxinogènes, et dans l'échantillon G (amandes décortiquées locales provenant de Médéa) (81%) isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* étudiés, (8,4%) seulement d'entre eux produit les AFs, malgré il est fortement contaminés par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* mais il est moins contaminés par les isolats aflatoxinogènes. Ces données sont en accord avec les conclusions d'observations rapportées par de nombreux auteurs [26,27] qui ont montré que la présence d'agent fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par la présence d'un champignon bien spécifique (et même une souche spécifique). Ainsi les conditions permettant la toxino-génèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique [28]. Les échantillons prélevés sur des amandes endommagées (par exemple éraflées, entières ou brisées, non classées, blanchies) ont affiché la présence de la plus forte teneur en AFs. Riba et al. (2013) dans une enquête sur les *Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes et les AFs contaminant de noix échantillonnées en Algérie ont montré que parmi les 420 souches, 220 (52,4%) étaient aflatoxigènes. L'incidence des souches aflatoxigènes était de 44% pour les amandes décortiquées. Bottalico et Logrieco [29] ont également rapporté de faibles quantités d'AFs dans les amandes décortiquées en Italie. Par ailleurs, Jiménez et Mateo [30] soulignent une fréquence élevée de 76% d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* dans les amandes en Espagne.

D'après Schade et al. [31] sur 74 échantillons d'amandes de Californie non triés et non décortiquées, 10 (14%) ont été contaminés par les AFs avec des niveaux très bas (en dessous de 20 parties par milliard [ppb]) à 90% des échantillons contaminés. Schatzki [32] a rapporté que 80% des 1547 échantillons d'amandes avec différents types de traitement ont été contaminés, mais à des niveaux très bas. Plus récemment, Lutfullah et Hussain [33] rapportent que 3 sur 10 des échantillons d'amande recueillies auprès des marchés de détail au Pakistan ont été contaminés par des AFs.

Dans une étude menée par Riba et al. [6], AFB1 seulement a été détectée dans les amandes, avec de faible concentration. Bottalico et Logrieco [29] ont également rapporté de faibles quantités d'AFs dans les amandes décortiquées en Italie. Par ailleurs, Jiménez et Mateo [30] ont trouvé un seul échantillon d'amandes de l'Espagne contaminé par l'AFB1 (95 ng/kg) et l'AFB2 (15 ng/kg). Ainsi, l'incidence des AFs dans les amandes varie beaucoup avec la catégorie de produit fini.

Sur la base des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques, nous avons identifié 61 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*, 53 isolats présentaient les caractères du groupe d'*Aspergillus flavus* typique, 7 isolats *A. tamaritii* et un isolat rattaché à *A. parasiticus*. Bayman et al. [34] rapportent l'identification de 93% *A. flavus* et 7% *A. tamaritii* dans les amandes californiennes recueillies sur le terrain et achetées en magasin. Dans les amandes achetées en magasin à partir de l'Arabie Saoudite, *A. flavus* constituait 98% de la population *Flavi*, le reste est *A. tamaritii* [35]. La présence d'*Aspergillus flavus*, avec des taux élevés a retenu particulièrement notre attention. *Aspergillus flavus* est l'espèce la plus commune, se produisant dans la plupart des denrées dans les pays tropicaux [36].

Sur 24 isolats aflatoxinogènes, 22 isolats (91,7%) produisent l'AFB, mais pas l'AFG et de sclérotés. Cette catégorie d'isolats appartiendrait vraisemblablement à *A. flavus* typique (groupe I producteurs de CPA) ou (groupe IV non producteurs de CPA) [37].

Un isolat (4,2%) appartient au groupe V (groupe d'*A. flavus* atypique), s'il produit de CPA, et un seul isolat de groupe VII (4,2%). Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*.

Dans une étude sur les *Aspergillus* section *Flavi* des sols de culture de maïs en Iran, Razzaghi-Abyaneh et al. [38] soulignent, comme nous, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les AFs, le CPA, et les sclérotés (groupe I). Giorni et al. [39] trouvent que 70% des souches d'*A. flavus* isolées du maïs d'Italie sont aflatoxinogènes et la moitié produit également le CPA. Selon Rodrigues et al. [40] dans une étude sur l'approche polyphasique des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes et non aflatoxinogènes isolées à partir des amandes portugaises, tous les isolats *A. parasiticus* ont montré une production d'AFs, ils ont tous produit AFB et AFG, et aucune production de CPA n'a été détecté; et la majorité (77%) était non aflatoxinogènes, alors que 2 isolats (15%) étaient producteurs de CPA et d'AFB, et un isolat (8%) a produit les 3 groupes de mycotoxines (CPA, AFB, et AFG).

Baquião et al. [41] ont trouvé que 92,7% (167/180) isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* étudiés 68% (123/180) d'entre eux produisent les AFs, et 47,7% (86/180) de CPA. Parmi les 136 souches de *A. flavus*, 122 (89,7%) étaient producteurs de mycotoxines, 36 (26,5%) produisent seulement les AFs, 43 (31,6%) produisent que le CPA, 43 (31,6%) produisent les AFs et le CPA, et 14 (10,3%) ne produisent pas les mycotoxines. CPA a été produit par 75% (43/57) d'isolats d'*A. flavus* non aflatoxinogènes. Tous les isolats *A. nomius* et *A. parasiticus* produisent AFB et AFG.

Nos résultats montrent que parmi les 61 isolats, 2 isolats (3,4%) d'entre eux ne produisent pas d'AFs, produisent des sclérotés de type « L », et un isolat (1,6%) produit des sclérotés de type « S ». Cet isolat est fortement producteur d'AFB1 révélée sur CCM. Le type « S », signalé pour la première fois par Hesseltine et al. [42] est rarement rencontré [43,44]. Des résultats ont montré que 54 isolats (30%) des 180 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* produisent des sclérotés après incubation sur l'agar agar, les sclérotés étaient tous de type « L », et aucun isolat d'*A. parasiticus* produit les sclérotés (Baquião et al., 2013). D'après Hua Sui-Sheng [45], tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le morphotype « L », le plus fréquent, comprend des producteurs et des non producteurs. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie.

CONCLUSION

Les aliments contaminés par les moisissures toxigènes représentent un risque accru pour le consommateur suite à la production de substances toxiques (mycotoxines). Les aflatoxines retiennent le plus d'attention à l'échelle mondiale en raison de leurs effets néfastes pour l'homme et pour l'animal. En Algérie, le manque de contrôles sanitaires, le mauvais conditionnement des aliments ainsi que l'absence d'une réglementation stricte augmentent le risque de contamination par ces mycotoxines.

Partant des premières constatations de ce travail, il est clair que la qualité des amandes dépend essentiellement de l'état sanitaire de récolte et du stockage. Une carence dans la conduite d'une bonne stratégie de stockage pose le problème de la formation des aflatoxines pouvant engendrer donc une dépréciation de la valeur nutritionnelle et commerciale des produits finis, avec un risque majeur pour la santé des consommateurs, l'homme et/ou l'animal.

RÉFÉRENCES

- [1]. A.F.S.S.A (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2006 - Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, 181p.
- [2]. O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé), 2002 - Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante–sixième réunion du Comité mixte FAO/OMS d’experts des additifs alimentaires, Série de rapports techniques de l’OMS no 906, Organisation mondiale de la santé, (OMS), Genève, Suisse.
- [3]. P.S. Steyn, 1998 - The biosynthesis of mycotoxins. Rev. Med. Vet, 149, 469-478.
- [4]. A. Riba, S. Mokrane, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou, 2008 - Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat, Int. J. Food Microbiol, 122, 85-92.
- [5]. A. Riba, N. Bouras, S. Mokrane, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou, 2010 - *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. Food Chem Toxicol, 48, 2772-2777.
- [6]. A. Riba, A. Matmoura, S. Mokrane, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou, 2013 - Investigations on aflatoxigenic fungi and aflatoxins contamination in some nuts sampled in Algeria. Afr. J. Microbiol. Res,7, 4974-4980.
- [7]. N. Azzoune, S. Mokrane, A. Riba, N. Bouras, C. Verheecke C., Sabaou N., and Mathieu F., 2015 - Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. Qual. Assur. Saf. Crops, 8, 137-144.
- [8]. J.I. Pitt, , and A.D. Hocking, , 1997 - Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professionnal, London.
- [9]. O. Filtenborg, J.C. Frisvad, U. Thrane, 1996 - Moulds in food spoilage, Int. J. Food Microbiol., 33, 85-102.
- [10]. C. Tabuc, 2007 - Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse et Université de Bucarest.
- [11]. N.D. Davis, S.K. Iyer and U.L. Diener, 1987 - Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. Appl. Environ. Microbiol, 53, 1593-1595.
- [12]. C.A. Fente, J.J. Ordaz, B.I. Vazquez, C.M. Franco and A. Cepeda, 2001 - New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin–producing *Aspergillus* strains. Appl. Environ. Microbiol, 67, 58-62.
- [13]. A.M. Calvo, J. Bok, W. Brooks, and N.P. Keller, 2004. - veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol, 70, 4733-4739.
- [14]. T.R. Rojas, C.A.F. Sampayo, B.I. Vazquez, C.M. Franco and A. Cepeda, 2005 - Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrine. Food Control, 16, 445-450.
- [15]. A.O.A.C, 2000 - Association of Official Analytical Chemists, 17th edn, 2000 Chapter 49, subchapter 1 Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.
- [16]. M.B. Pildain, J.C. Frisvad, G. Vaamonde, D. Cabral, J. Varga, R.A. Samson, 2008 -Two novel aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. Int. J. Sys. Evol. Microbiol, 58, 725-735.

- [17]. C.P. Kurtzman, B.W. Horn and C.W. Hesseltine, 1987 - *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147-158.
- [18]. S.W. Peterson, 2000- In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163-178.
- [19]. N. Magan and D. Aldred, 2005 - Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Addit. Contam*, S1, 10-16.
- [20]. J.P.F. D’Mello and A.M.C. Macdonald, 1998 - Fungal toxins as disease elicitors, ed. *Environmental toxicology: current developments*, pp. 253-289. Amsterdam, the Netherlands, Gordon and Breach Science Publishers.
- [21]. H. Gourama, and L.B. Bullerman, 1995 - *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, aflatoxigenic fungi of concern in foods and feed – a review. *J. Food Protect*, 58, 1395-1404.
- [22]. P.G. Mantle, 2002 - Risk assessment and the importance of ochratoxins. *Int. Biodeter. Biodegrad*, 50, 143-146.
- [23]. J.I. Pitt, A.D. Hocking, K. Bhudhasamai, B.F. Miscamble, K.A. Wheeler, and Ek P. Tanboon, 1993 - The normal mycobiota of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *Int. J. Food Microbiol*, 20, 211-226.
- [24]. D.M. Wilson, W. Mubatanhema and Z. Jurjevic, 2002 - Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Advances Experim. Med. Biol*, 504, 3-17.
- [25]. B.W. Horn and J.W. Dorner, 1998 - Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut growing regions of the United States. *Mycologia*, 90, 767-776.
- [26]. F. Chapeland-Leclerc, N. Papon, T. Noël, and J. Villard, 2005 - Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Rev. Fran. Labor*, 373, 61-6.
- [27]. A. Pfohl-Leszkowicz, 1999 - Ecotoxicogénèse. in: *Les mycotoxines dans l’alimentation, évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 17–35.
- [28]. A. Pfohl-Leszkowicz, 2001 - Définition et origines des mycotoxines in: *Les mycotoxines dans l’alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14.
- [29]. A. Bottalico, and A. Logrieco, 2001 - Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. In: Logrieco A (ed) *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feeds in Europe*, European Commission, COST Action 835, EUR19695: 69-104.
- [30]. M. Jiménez, and R. Mateo, 2001 - Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in agricultural commodities in Spain. In: Logrieco A (ed) *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feeds in Europe*, European Commission, COST Action 835, EUR 19695, 173-190.
- [31]. J.E. Schade, K. McGreevey, A.D.Jr. King, B. Mackey, and G. Fuller, 1975 - Incidence of aflatoxin in California almonds. *Appl. Microbiol.* 29, 48-53.
- [32]. T.F. Schatzki, 1996 - Distribution of aflatoxin in almonds. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3595-3597.
- [33]. G. Lutfullah, A. Hussain, 2011 - Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*, 22, 426-429.

- [34]. P. Bayman, J.L. Baker, and N.E. Mahoney, 2002 - *Aspergillus* on tree nuts: Incidence and associations. *Mycopathologia* 155, 161-169.
- [35]. K.M. Abdel-Gawad and A.A. Zohri, 1993 -Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 124, 55-64.
- [36]. R.J. Molyneux, N. Mahoney, J.H. Kim and B.C. Campbell, 2007 - Mycotoxins in edible tree nuts. *Int. J. Food Microbiol*, 119, 72-78.
- [37]. R.A. Samson, J.A. Houbraken, A.F.A. Kuijpers, M.J. Frank and J.C. Frisvad, 2004 - New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol*, 50, 45-61.
- [38]. M. Razzaghi-Abyaneh, M. Shams-Ghahfarokhi, A. Allameh, A. Kazeroon-Shiri, S. Ranjbar-Bahadori, H. Mirzahoseini and M.B. Rezaee, 2006 - A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161, 183-192.
- [39]. P. Giorni, N. Magan, A. Pietri, T. Bertuzzi, and P. Battilani, 2007 - Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol*, 113, 330-338.
- [40]. P. Rodrigues, A. Venâncio, Z. Kozakiewicz and N. Lima, 2009 - A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int. J. Food Microbiol* 129, 187-193.
- [41]. A. Baquião, M. Oliveira, T. Reis, P. Zorzete, D. Atayde, B. Correa, 2013 - Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chem*, 139, 1127-1132
- [42]. C.W. Hesseltine, O.L. Shotwell, M. Smith, J.J. Ellis, E. Vandegrift and G. Shannon, 1970 - Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. Pages 202-210 In: *Toxic Micro-organisms*. M. Herzberg, ed. U. S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.
- [43]. G. Vaamonde, A. Patriarca, V. Fernandez Pinto, R. Comerio and C. Degrossi, 2003 - Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 79-84.
- [44]. G. Barros, A. Torres and S. Sofia Chulze, 2005 - *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *J. Sci. Food Agric*, 85, 2349-2353.
- [45]. T. Hua Sui-Sheng, 2002 - Biocontrol of *Aspergillus flavus* by saprophytic Yeast, progress from laboratory bioassay to field trial. *Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonis In: and 16th Aflatox Elimination Workshops*. October 13-15, 2003 Savannah, Georgia USA.