

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté : Science de la nature et de vie
Département : Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série:

Intitulé :

Etude générale sur la Patuline

Présenté par : AKSAS Rayene

MEHOUCHI Amira

Le : 23/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : MERGOUD Lilia (MAA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examinatrice 1: ABDELAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examinatrice 2: ZERMANE Férial (MAA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Année universitaire

2021-2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّا أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

سورة البقرة: الآية 31

صَلِّ عَلَى اللَّهِ الْعَظِيمِ

Remerciements

En premier lieu et avant tout, nous remercions notre **ALLAH** le tout- puissant de nous avoir accordé santé, volonté et patience afin d'accomplir ce modeste travail.

Avant de démarrer ce travail qui présente la fin d'un parcours d'étude, il nous apparaît opportun de remercier chaleureusement toute l'équipe de professeurs de la Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie, Département de Microbiologie.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur : Mme **MERGOUD Lilia**, qui nous a guidé, encouragé, orienté et consacré des efforts énormes tout au long de la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent à Mlle **ABDELAZIZ Ouided**(maitre de conférences UMC1) et Mme **ZERMANE Férial** (maitre assistante UMC1) pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Dédicace

*A*vec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les mots employés, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère.

*A*u plus cher cadeau que Dieu m'a offert l'homme, à qui je dois la vie et ma réussite.

Tout le respect et chapeau à mon cher père Djoumoui.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse: mon adorable mère *Hayet.*

A mes chères sœurs *Wiam, Kawthar et Maysson,* pour leur soutien moral et leurs précieux conseils tout au long de mes études. *Que Dieu les protège et réalise tous leurs plus grands souhaits.*

A mes adorables frères *Ayoub, Anas et loyâi* ceux qui M'Ont protégés, soutenus tout le long de ma vie.

A tous les cousins, les voisins et mes amis : *Radia, Khalida, Dikra, Amira et Nihad,* Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.

*S*ans oublier mon binôme *Amira* pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce mémoire.

Rayene

Dédicace

Louange à ALLAH et paix et bénédiction sur Mohamed.

*Remerciez mon Dieu qui m'aidait et il m'a honorée de cette humble réalisation, je le présente à ceux qui se trouvaient à côté de moi sans ennui ou fatigue. A celui qui, si je lui ai donné ma vie, ne sera pas suffisant : ma mère, ma mère, puis ma mère **Fatima** que Dieu la protège pour nous.*

*A mes chères sœurs et mon soutien dans la vie **Hawa, Zaineb et Fairouz.***

*A mon cher fiancé **Hamza** pour m'avoir donné la force et l'espoir, j'apprécie votre patience avec moi.*

*A mes amis avec qui j'ai eu les meilleurs souvenirs à ceux qui marchaient ensemble pour paver la voie au succès **Khouloud, Kenza et Chaima.***

*A celui qui m'a aidé à la préparation de ce mémoire, mon binôme **Rayene.** Merci pour votre patience.*

Enfin, je le dédie à tous ceux qui me connaissent moi de près ou de loin.

Amira

Liste des symboles et abréviations

% : Pourcent.

°C : Degré Celsius.

µm : micromètre (10^{-6} m).

µl : microlitre (10^{-6} l).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AFB1 : Aflatoxine B1.

AFG1 : Aflatoxine G1.

AFG2 : Aflatoxine G2.

AOAC : Association of Analytical Communities.

A_w : Activité de l'eau.

C₁₈ : Colonne de 18 carbones.

CCM : Chromatographie à couche mince.

CIRC : Centre international de recherché sur le cancer.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

CYA : Milieu de culture Czapek Yeast Agar.

DON : Déoxynivalénol.

ECD : Détecteurs capteurs d'électrons.

EPS : Extraction phase solide.

et al : Et autre auteurs.

FD : Détecteurs à fluorescences.

FID : Détecteurs à ionisations de flamme.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

Ig E : Immunoglobuline E.

M2 : Milieu aux extraits de malt et de levures.

MBTH : Méthyle de benzothiazolinone hydrazine.

MEA : Milieu de culture Gélose à l'extrait de malt.

MS : Spectrométrie de masse.

NIV : Nivalénol.

NRRL : Agricultural Research Service Culture Collection.

O₂ : Oxygène.

OTA : Ochratoxine A.

PAT : Patuline.

pH : Potentiel d'hydrogène.

rpm : Le tour de rotation par minute.

T2 et HT2:Mycotoxine de la famille des Trichothécènes.

TIA : Les toxi-infections alimentaires

UV : Le rayonnement ultraviolet.

v/v : Un volume de méthanol par du volume de l'eau.

ZEA : Zéaralénone.

Table des matières

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre 1 : Altération des fruits et des légumes par les moisissures

1. Définition 3

2. Types d'altérations..... 3

2.1 Altération supérieure3

2.2 Altération interne.....4

3. Généralités sur les moisissures 4

3.1 Définitions4

3.2 Classification des moisissures.....5

3.2.1 Principaux groupes de Phycomycètes5

3.2.2 Les Ascomycètes.....5

3.2.3 Les Basidiomycètes.....6

3.2.4 Les Deutéromycètes6

4. Intérêts industriels des moisissures 6

4.1 Intérêt alimentaire6

4.2 Intérêt pharmaceutique7

4.3	Intérêt agricole	7
5.	les effets des moisissures sur la santé humaine	8
5.1	Les intoxications alimentaires.....	8
5.2	Les infections pulmonaires	8
5.3	Les effets immuno-allergiques.....	9
5.4	Les effets infectieux.....	9
5.5	Les effets toxiques et cancérigènes	10

Chapitre 2 : Les mycotoxines et la Patuline

1.	Généralités sur les mycotoxines.....	12
1.2	Les classes des mycotoxines	13
1.2.1	les Aflatoxines.....	13
1.2.2	les Trichothécènes	14
1.2.3	La Zéaralénone.....	15
1.2.4	L'Ochratoxines A.....	15
1.2.5	Patuline	16
1.3	Les facteurs influençant la présence des mycotoxines	16
1.3.1	Les facteurs physiques.....	16
A.	La Température.....	16
B.	L'activité de l'eau A_w	16
C.	Présence d'oxygènes dans le milieu.....	17
1.3.2	Facteurs chimiques	17
D.	Le pH.....	17
E.	La nature de substrat.....	17

2. Patuline	17
2.1 Définition	17
2.2 Caractérisations et identifications des moisissures productrices de Patuline	18
2.2.1 <i>Penicillium expansum</i>	18
2.2.2 <i>Aspergillus clavatus</i>	18
2.2.3 <i>Byssochlamys nivea</i>	19
2.3 Structure chimique de Patuline	22
2.3.1 Propriétés physico-chimiques de la patuline	22
2.4 Toxicité de la Patuline	23
2.4.1 Toxicité aiguë	23
2.4.2 Toxicité chronique	23
a) Génotoxicité	23
b) Pouvoir cancérogène et cytotoxique	23
c) Immunotoxicité	23
2.5 Procédés de prévention et de réduction des mycotoxines dans les produits alimentaires.....	24
2.5.1 La lutte avant la récolte	24
2.5.2 La lutte au moment de la récolte	24
2.5.3 La lutte après la récolte.....	25

Chapitre 3 : Extraction, purification et détection de la Patuline

1. Extraction et purification de Patuline	28
2. Détection et dosage de l'agent pathogène	29
2.1 Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)	30

2.2	Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	30
2.3	Chromatographie à couche mince (CCM)	31
3.	Quelques travaux sur l'extraction et la production de patuline	32
3.1	Extraction et détection de la patuline dans la pomme par <i>Penicillium expansum</i>	32
3.1.1	Matériel et Méthodes.....	32
3.1.2	Résultats.....	33
3.2	La production de patuline par <i>Byssochlamys nivea</i>	34
3.2.1	Matériel et Méthodes.....	34
3.2.2	Résultats.....	35
3.3	Discussion	36
	Conclusion	38
	Références bibliographiques	

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la toxicité des mycotoxines responsables de l'altération des fruits et des légumes, spécifiquement la patuline, et proposer des stratégies de contrôle et de prévention pour assurer la sécurité humaine et animale.

Pour cela, la première partie de ce travail a porté un aperçu général sur les moisissures contaminant les fruits et les légumes, leurs intérêts industriels dans différents secteurs et leurs effets toxiques sur la santé humaine. La deuxième partie vise à exposer les principales mycotoxines présentes dans les fruits et légumes ainsi que les différentes souches fongiques productrices de la patuline. Cette substance demeure un grand problème dans l'altération de ces aliments en provoquant la diminution de rendement quantitatif et qualitatif de la culture des fruits et des légumes et par conséquent sur la santé humaine. Pour cette raison, la troisième partie était consacrée pour l'analyse de cette toxine et les moyens de sa détection.

Mots clés : mycotoxines, Patuline, détection, extraction et purification.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة سمية السموم الفطرية المسؤولة عن تلف الفواكه والخضروات ، وتحديدًا الباتولين ، واقتراح استراتيجيات التحكم والوقاية لضمان سلامة الإنسان والحيوان.

لهذا ركز الجزء الأول من هذا العمل على إعطاء لمحة عامة عن القوالب التي تلوث الفواكه والخضروات ، ومصالحها الصناعية في مختلف القطاعات وتأثيراتها السامة على صحة الإنسان. يهدف الجزء الثاني إلى تحديد السموم الفطرية الرئيسية الموجودة في الفواكه والخضروات وكذلك السلالات الفطرية المختلفة التي تنتج الباتولين. على الرغم من دور هذه السموم الفطرية في التكنولوجيا الحيوية ، إلا أنها تظل مشكلة كبيرة في تغيير هذه الأطعمة مما يؤدي إلى انخفاض العائد الكمي والنوعي لزراعة الفاكهة والخضروات وبالتالي على صحة الإنسان. لهذا السبب خصص الجزء الثالث لتحليل هذا السم وطرق كشفه.

الكلمات المفتاحية : السموم الفطرية ، الباتولين ، الكشف ، الاستخلاص التنقيطية.

Abstract

The objective of this work is to study the toxicity of mycotoxins responsible for the alteration of fruits and vegetables specifically patulin and propose control and prevention strategies to ensure human and animal safety.

For this purpose, the first part of this work has provided a general overview of the molds contaminating fruits and vegetables, their industrial interests in different sectors and their toxic effects on human health. The second part aims to define the main mycotoxins present in fruits and vegetables as well as the different fungal strains producing Patulin. In spite of the role of this mycotoxin in biotechnologies, it remains a big problem in the alteration of these foods which causes the decrease of quantitative and qualitative yield of the culture of fruits and vegetables and consequently on human health. For this reason, the third part was devoted to the analysis of this toxin and the means of its detection.

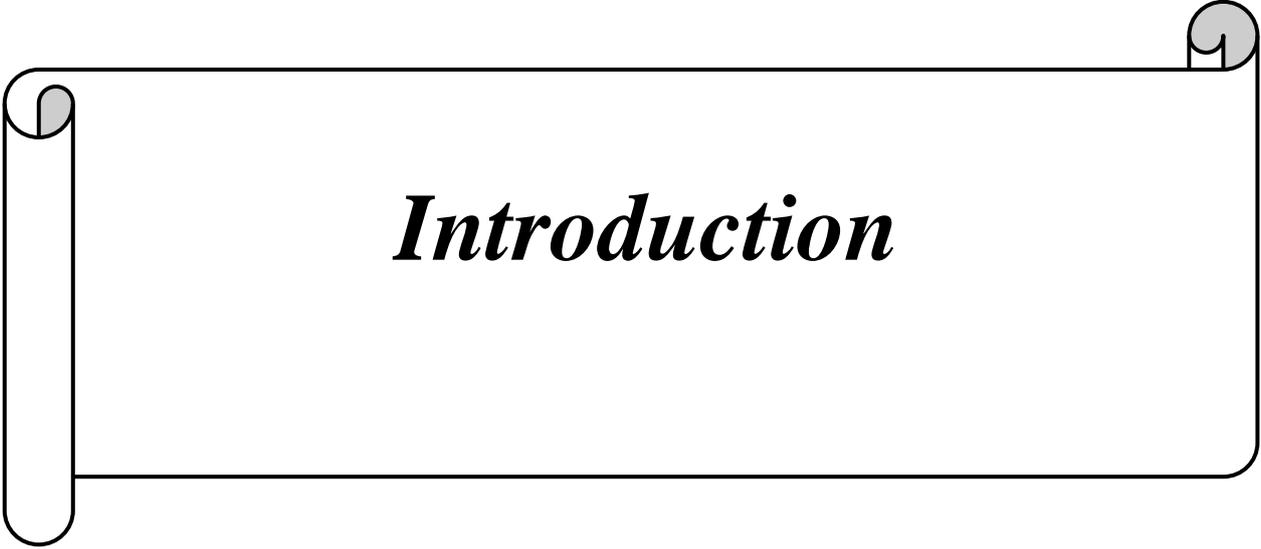
Key words: mycotoxins, Patulin, detection, extraction, purification.

Liste des figures

Figure 1 : <i>Penicillium expansum</i> sur l'orange	4
Figure 2 : Cellule de pomme contaminée par <i>Penicillium expansum</i>	4
Figure 3 : <i>Penicillium camemberti</i> dans du fromage	7
Figure 4 : Structure chimique de l'Aflatoxine B1 (AFB1).....	14
Figure 5 : Les Trichothécènes T2.....	14
Figure 6 : la structure chimique de ZEA.....	15
Figure 7: Structure chimique de l'Ochratoxines A.....	15
Figure 8 : Aspect macroscopique de <i>Penicillium expansum</i>	20
Figure 9 : Aspect microscopique de <i>Penicillium expansum</i>	20
Figure 10 : <i>Aspergillus clavatus</i>	21
Figure 11 : Aspect microscopique d' <i>Aspergillus clavatus</i>	21
Figure 12 : Les colonies de <i>Byssochlamys nivea</i>	21
Figure 13 : <i>Byssochlamys nivea</i>	21
Figure 14 : Structure moléculaire de la Patuline.....	22
Figure 15 : La chromatographie en phase liquide à haute performance.....	30
Figure 16 : Schéma descriptif d'une chromatographie en phase gazeuse.	31
Figure 17: La chromatographie sur couche mince	32
Figure 18 : Histogramme représente les teneurs en Patuline exprimées en µg/g dans la variété de Marié Ménard et Frequin Rouge de pommes infectée par la souche de <i>P. expansum</i> 3569538.....	33
Figure 19 : Chromatogramme HPLC de la Patuline standart.....	34
Figure 20 : Courbe graphique exprime les différentes teneurs de la production de Patuline par la souche NRRL 32565 et NRRL 35592 de <i>Byssochlamys nivea</i>	35

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales moisissures productrices des mycotoxines retrouvées dans l'alimentation humaine et animale	13
Tableau 2 : la taxonomie de <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> et <i>Byssochlamys nivea</i>	19
Tableau 3 : Les principaux caractères morphologiques de <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> et <i>Byssochlamys nivea</i>	21
Tableau 4 : Les teneurs maximales de Patuline dans différentes denrées alimentaires	30



Introduction

Au cours de ces dernières années, la recherche en nutrition humaine n'a provoqué qu'un régime équilibré, riche de fruit et légume pour garantir une bonne santé. Les fruits et les légumes sont mondialement consommés car elles se produisent des antioxydants qui peuvent également à prévenir des maladies cardiovasculaires et en éliminant les risques de diabète (**Carughi et al.,2016**).

Malgré leurs avantages et leur teneur en énergie, ces aliments peuvent être contaminés par des microorganismes particulièrement des moisissures pendant la croissance (**Meng et Doyle 2002**). Ces dernières se développent sur la surface des denrées alimentaires lors de la culture ou bien de pré- récolte et la post-récolte sinon lors de stockage.

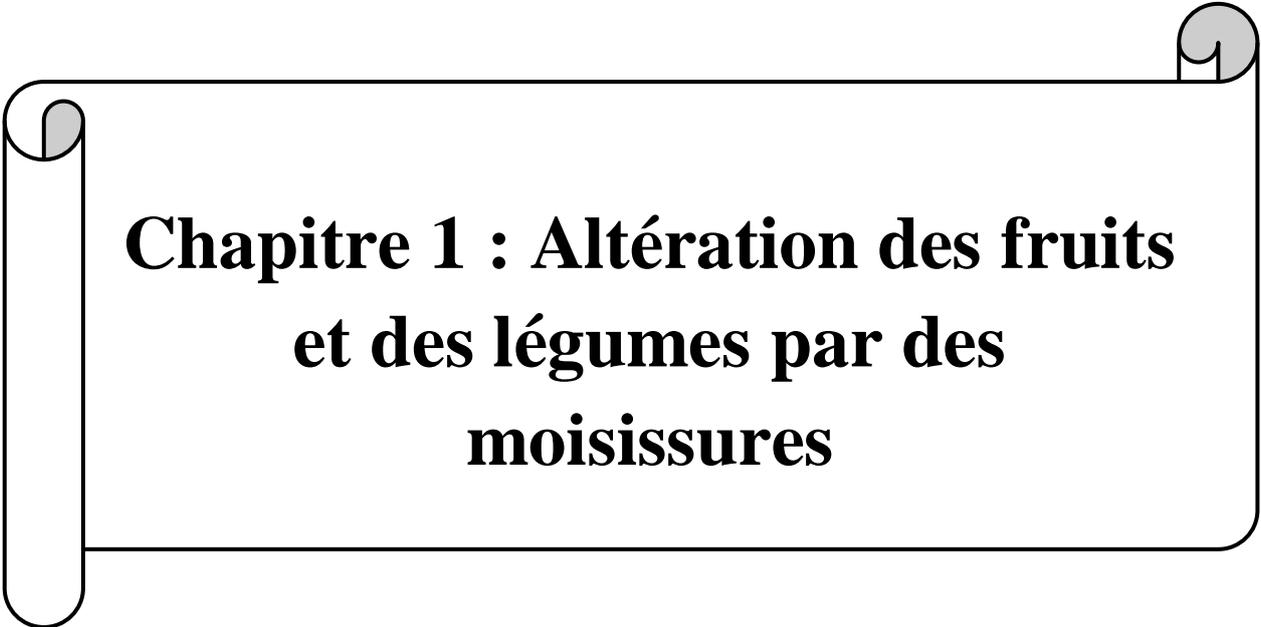
Les moisissures sont des agents d'altérations très importants dans des conditions favorables telles que la température, la teneur en humidité et la présence d'oxygène (**Salomaoet al.,2009**), et qui produisent des substances portent les noms des mycotoxines responsables d'intoxication grave chez l'homme et l'animal. Les maladies causées par l'exposition aux mycotoxines sont appelées **mycotoxicoses**. Cependant, les mycotoxicoses restent souvent méconnues des professionnels de la santé, sauf lorsqu'un grand nombre de personnes sont impliquées (**Zain, 2011**). Les premières épidémies de mycotoxicoses ont été décrites durant l'Antiquité et s'apparentaient à l'ergotisme, plus tard nommé « Feu de Saint Antoine » ou « Mal des Ardents » (**Gauthier, 2016**).

À l'heure actuelle, la Patuline est considérée comme une toxine des fruits à l'échelle mondiale, et de nombreux pays surveillent les résidus de Patuline dans les aliments. Par conséquent, il est très important de développer une méthode de détection des traces de Patuline dans les aliments. Cependant, la Patuline est une mycotoxine essentiellement produite par plus de 10 espèces de champignons, tels que *Penicillium*, *Aspergillus* et *Byssochlamys* (**Zhao et al., 2019**).

Afin d'assurer la santé des consommateurs, chaque pays doit adopter une législation spécifique pour les principales mycotoxines.

L'objectif de notre travail est :

- Donner une idée générale sur les mycotoxines sécrétées par des champignons responsable de l'altération des fruits et des légumes.
- Etudier les genres et les espèces fongiques productrices de la Patuline.
- Exposer les méthodes de détection et d'extraction de cette molécule.



**Chapitre 1 : Altération des fruits
et des légumes par des
moisissures**

1. Définition

D'après **Dauda et Zarafi (2019)**, les fruits et légumes sont des produits vivants qui accumulent durant leur croissance des réserves qui assurent la continuité du métabolisme après la récolte. Ils vont donc évoluer de façon naturelle au cours du stockage principalement par perte hydrique, mais ils peuvent également être victimes de maladies physiologiques ou microbiologiques (**Pitt et Hocking, 2009**).

La détérioration fongique des fruits et des légumes entraîne des pertes annuelles importantes dans les ventes mondiales. La corruption des moisissures peut également être un problème de sécurité alimentaire en raison de la production de mycotoxines par ces moisissures. Pour éviter l'altération par les moisissures, il est important que les microbiotes impliqués soient correctement isolés et correctement identifiés. Les principaux groupes de champignons liés aux conditions météorologiques sont xérophiles, résistants à la chaleur, de conservation, anaérobies et psychrophiles. Les mycotoxines et les filaments d'altération, principalement : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Byssochlamys* sont naturellement présents dans l'air ambiant, le sol et les plantes et sont considérés comme les contaminants alimentaires les plus importants (**Pitt et Hocking, 2009**).

L'altération de ces produits due aux moisissures se traduit par des goûts désagréables, la contamination par les mycotoxines, la décoloration et la pourriture. L'altération peut se produire sur le terrain ou lors du stockage. L'activité de l'eau de l'aliment détermine les types de moisissures qui altèrent l'aliment (**Twaruzek et al., 2021**).

2. Types d'altérations

2.1 Altération supérieure

La peau des fruits et légumes forme une barrière pour empêcher les moisissures d'altération de pénétrer, prolongeant efficacement la durée de conservation de ces aliments après la récolte. Cependant, cette protection naturelle peut être brisée, permettant aux germes d'altération d'entrer en contact avec les tissus internes. D'autre part, leur revêtement extérieur contient de nombreux micro-organismes issus de la flore du sol et de l'eau, ainsi que des polluants atmosphériques (**Laville, 1994**).

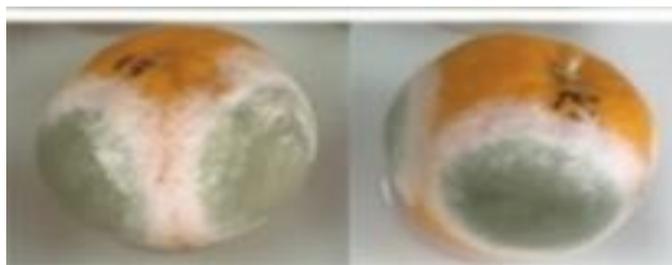


Figure 1 : *Penicillium digitatum* sur l'orange (Ramón Carbonell et Torres, 2021).

2.2 Altération interne

Les tissus internes des végétaux et des fruits renferment normalement peu de microorganismes.

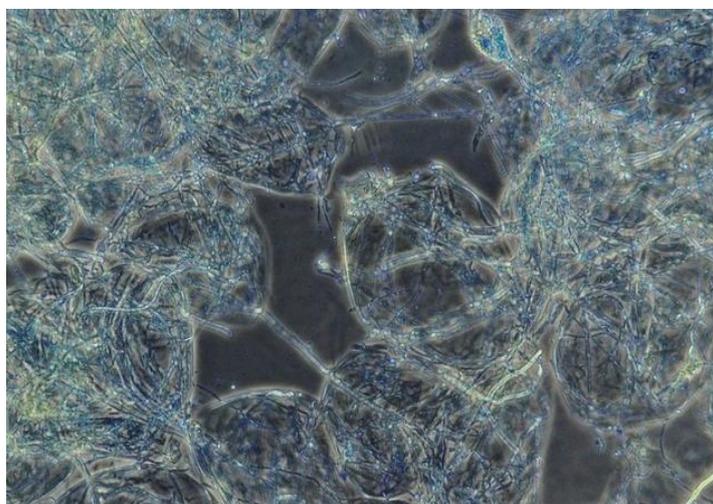


Figure 2 : Cellule de pomme contaminée par *Penicillium expansum* ¹

3. Généralités sur les moisissures

3.1 Définitions

Les moisissures sont des champignons microscopiques qui forment une flore filamenteuse et s'agglutinent des milliers d'espèces. Ils sont composés de nombreux filaments fins et enchevêtrés (Kirk *et al.*, 2001), ils sont saprophytes, c'est-à-dire qu'elles se font au détriment de la matière organique se décomposent en y implantant leur mycélium, puis libèrent les filaments qu'ils portent, unité de transmission (Gauthier, 2016).

Par ailleurs, ils sont des organismes eucaryotes pluricellulaires qui étaient traditionnellement classés dans le règne végétal, c'est l'ensemble des champignons microscopique présentant une végétation notable et qui ont de l'importance dans l'industrie humaine. Elles peuvent être nuisibles, car elles sont agents d'altération d'aliment et aussi utiles, car intervenant dans la production d'aliments, d'antibiotiques, d'enzymes et dans diverses fermentations. Par ailleurs, l'humidité favorise généralement la croissance de la plupart des moisissures, bien qu'il existe des espèces des moisissures adaptées à la sécheresse (**Leyral et Vierling, 2007**).

3.2 Classification des moisissures

Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (**Davet, 1996**). Il ya quatre classes des moisissures :

- Les Phycomycètes.
- Les Ascomycètes.
- Les Basidiomycètes.
- Les Deutéromycètes

3.2.1 Principaux groupes de Phycomycètes

Les Phycomycètes comprennent deux sous-classes :

A- Les Oomycètes : caractérisés par la production d'oospores au cours de la reproduction sexuée et de zoospores (spores flagellées) en reproduction asexuée.

B- Les Zygomycètes : produisant des zygospores. Leur reproduction est assurée par des conidiospores ou des sporangiospores, ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée. Les mucorales représentent le groupe principal parmi les zygomycètes au sein desquels ils s'identifient par la production de sporangiospores. Ce groupe comprend les cinq genres très usuels en microbiologie des aliments : *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus* et *Thamnidium* (**Leyral et Vierling, 2007**).

3.2.2 Les Ascomycètes

La plus importante, au sein du règne Fungi. Ce sont des champignons à mycéliums qui produisent des ascospores endogènes, cette classe comprend de nombreuses moisissures et parasites végétaux. Seul l'ordre des héli ascomycètes intéresse la microbiologie alimentaire.

Il rassemble, en effet, les champignons ayant un thalle levuriforme *Penicillium expansum* (Guiraud, 2012).

3.2.3 Les Basidiomycètes

Les basidiomycètes sont des moisissures parasites caractérisées par la présence de "boucles" au stade de cloisons, qui produisent par bourgeonnement des spores sexuées appelées basidiospores (Salimi, 2011).

3.2.4 Les Deutéromycètes

Les Deutéromycètes ou champignons imparfaits, sont des champignons filamenteux à thalle septé et mycélium cloisonné se reproduisant par le mode asexué, cette classe composée par une vaste gamme de contaminants des végétaux et des produits alimentaires. Les Deuteromycotina sont divisés en trois classes : **Les Blastomycètes, les Hyphomycètes et les Coelomycètes** (Dendouga, 2006).

4. Intérêts industriels des moisissures

Les moisissures sont des micro-organismes largement connus pour leurs diverses caractéristiques biochimiques. Ces champignons peuvent envahir efficacement une grande variété de substrats dans des conditions opérationnelles et produire de nombreux bioproduits d'intérêt, tels que des enzymes, des acides organiques, des composés aromatiques et des colorants (Londoño-Hernández et al., 2017). Les champignons filamenteux sont actuellement utilisés dans différents secteurs du monde entier. Ils constituent une source de matières primaires pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et pour l'agriculture, etc. (Egbuta et al., 2016).

4.1 Intérêt alimentaires

Ces microorganismes sont également importants en tant que producteurs de denrées alimentaires, certaines espèces de *Penicillium* sont actives pour l'affinage de quelques types de fromage comme camembert et cheddar. Elles sont fréquentes sur les céréales, les pains et les gâteaux comme ils peuvent jouer un rôle dans l'amélioration des qualités organoleptiques de certains produits alimentaires (Dauda et Zarafi, 2019).

Notamment, l'*Aspergillus* est un bon exemple pour la production des acides organiques tels que l'acide oxalique, l'acide citrique et l'acide fumarique qui fabriquent par la fermentation

des activités biochimiques des moisissures à l'échelle commerciale en Europe et en Amérique (Solomon et al., 2019).



Figure 3 : *Penicillium camemberti* dans du fromage²

4.2 Intérêt pharmaceutique

Le rôle des champignons filamenteux dans la production des substances antibiotiques a été établi pour la première fois par Six Alexander Fleming en 1929. Le *Penicillium* est un genre très répandu dans le domaine médical et pharmaceutique (Solomon et al., 2019). L'antibiotique le plus célèbre, la pénicilline qui a été utilisée pour guérir d'innombrables infections bactériennes (Laater et al., 2008).

Tandis que les champignons du genre *Aspergillus* produisent différents métabolites qui montrent des effets inhibiteurs sur les voies métaboliques, un exemple de ces composants est les statines qui comprennent la lovastatine pour réduire le taux de cholestérol sanguin chez les personnes qui présentent un taux de cholestérol plus élevé (Egbuta, et al., 2016).

4.3 Intérêt agricole

L'utilisation de champignons filamenteux dans le secteur agricole est potentiellement utile pour améliorer la santé et la croissance des plantes, l'absorption de l'eau, la disponibilité des nutriments, la tolérance au stress et le biocontrôle (Thakur, 2020).

Les moisissures sont des agents de biorestauration qui vont dégrader le contenu du sol et réduire leur toxicité. Notamment, les espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de dégrader le benzopyrène dans le sol tandis que les espèces de *fusarium* peuvent également bio remédier aux sols riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques (Egbuta, et al., 2016).

5. les effets des moisissures sur la santé humaine

Les moisissures sont des organismes ubiquistes qui apparaissent naturellement et que l'on trouve autant à l'intérieur qu'à l'extérieur. Ces milieux contiennent des conditions propices à la croissance des moisissures, notamment la présence d'oxygène, des sources nutritifs à base de Carbone, des températures et l'humidité (**Palaty et Shum, 2012**).

Pendant leur cycle de reproduction, les moisissures fabriquent des milliers de très petites particules appelées spores. En cas le contact avec l'air, les moisissures relâchent leurs spores dans l'air. L'inhalation des spores de moisissures peut engendrer des maladies ou des effets néfastes provoquant des problèmes graves pour la santé humaine (**Azémar, 2000**). Voici les effets les plus fréquentes des moisissures :

5.1 Les intoxications alimentaires

Dans tous les pays du monde et indépendamment de leurs niveaux économiques, les toxi-infections alimentaires (TIA) demeurent un problème majeur de santé publique. Les intoxications alimentaires sont des infections causées par l'ingestion d'aliments contaminés par certains agents infectieux (*Aspergillus et Penicillium*) ou par leurs toxines sécrétées et préformées dans l'aliment. Les principaux symptômes observés indépendamment de l'agent causal sont des nausées, des vomissements, des diarrhées et les maux de tête et des douleurs abdominaux. Mais aussi peuvent être la cause de mortalité chez des sujets fragiles (**Zaidi et al., 2021**).

5.2 Les infections pulmonaires

C'est une infection opportuniste qui se développe quand il existe un terrain favorable, particulièrement une immunodépression notamment la neutropénie provoquée par des champignons imparfaits filamenteux appartenant au genre *Aspergillus*. La contamination se fait par les voies aériennes le plus souvent, puis l'infection se propage au sang et atteint les organes profonds (**Brauner, 2006**).

Les infections fongiques pulmonaires se présentent le plus souvent sous forme de pneumopathies graves, qui peuvent toucher le sujet immunocompétent mais surtout les patients ayant des facteurs de risque d'infections fongiques, augmentant ainsi le taux de mortalité et de morbidité (**Ben Salah et al., 2021**).

5.3 Les effets immuno-allergiques

Les manifestations allergiques et immunologiques sont les plus fréquemment mentionnées, les allergènes fongiques peuvent déclencher l'asthme allergique, rhinite allergique, sinusite allergique et dermatite (Méric, 2011).

La réponse allergique (ou d'hypersensibilité) survient lorsqu'il y a production d'anticorps spécifiques (IgE) dirigées contre des allergènes environnementaux ou autres. Les réactions allergiques provoquées par l'inhalation de spores fongiques constituent un problème de santé reconnu par les cliniciens depuis des décennies. Il a été montré que jusqu'à 10 % de la population réagirait positivement aux tests d'extraits de moisissures (Verhoeff et Burge, 1997), tandis que cette proportion pourrait atteindre 20,9 % à 27,4 % chez les personnes souffrant d'asthme (Boulet et al., 1997). L'allergie aux moisissures est cependant difficile à diagnostiquer, notamment à cause de l'absence d'extraits d'allergènes standardisés (Vermeulen et al., 2011).

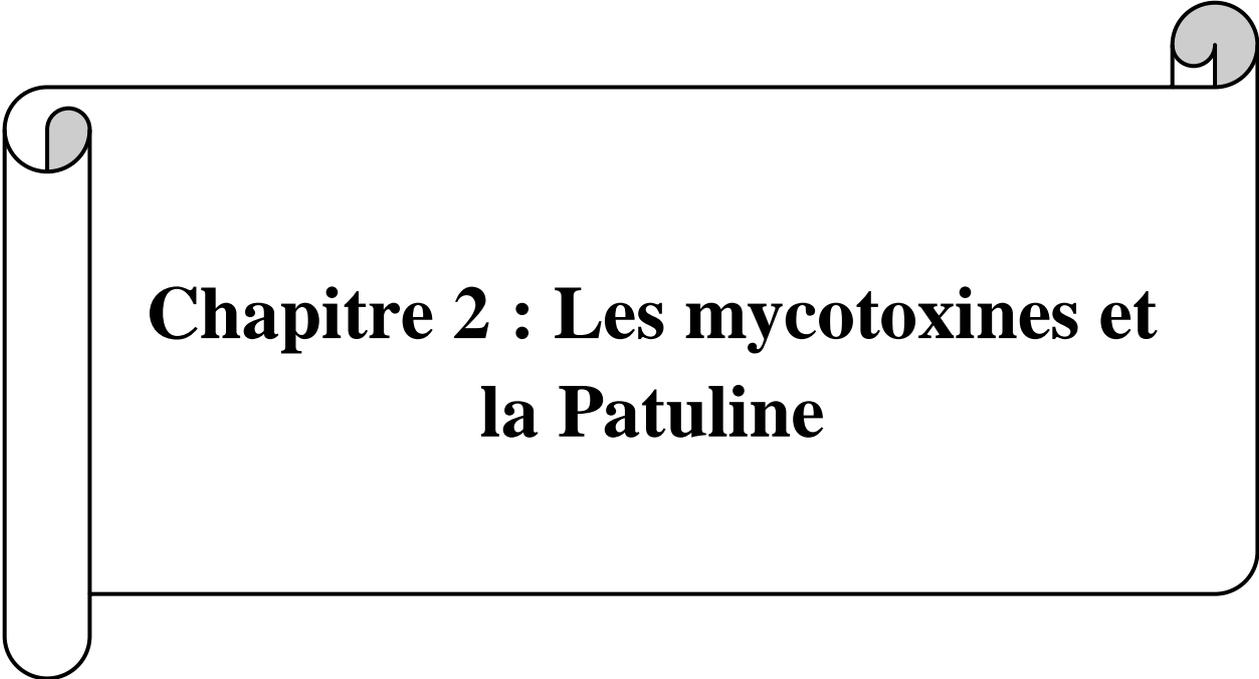
5.4 Les effets infectieux

Selon les travaux de Halewyn et ses collaborateurs en 2003, peu de moisissures, sur les matériaux de construction ou dans les systèmes de ventilation, peuvent être à l'origine d'infection.

Cependant, les infections relativement bien connues sont *l'aspergillose invasive* ou *aspergillus nosocomial* qui provoquent des conséquences très graves voire même fatale pour les personnes immunodéprimées. Cette maladie due principalement à *Aspergillus* de quelques espèces voisines (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*,.....). Actuellement, les *Aspergillus* invasifs représentent la première cause de mortalité d'origine infectieuse dans les services d'hématologies (Gangneux et al., 2008).

5.5 Les effets toxiques et cancérologènes

La majorité des effets toxiques causés par inhalation des moisissures qui peuvent persister sur les denrées alimentaires bien après la disparition de la moisissure et résistent à de très fortes températures lors de la cuisson. Deux groupes de champignons toxigènes peuvent être distingués. Le premier type est constitué de champignons produisant les mycotoxines sur les plantes sénescents ou stressées (*Alternaria*, *Fusarium*). Il est alors question de toxines de champs. L'autre groupe comprend ceux qui produisent les toxines après récolte (*Aspergillus* et *Penicillium*). On les qualifie de toxine de stockage (**Oswald et Parent-Massin, 2020**).



Chapitre 2 : Les mycotoxines et la Patuline

1. Généralités sur les mycotoxines

La présence des mycotoxines dans les aliments a été mise en évidence pour la première fois en 1960, lors de la maladie X du dindon. Une mortalité très élevée observée dans un élevage de dindes en Grande-Bretagne. Le terme mycotoxine trouve son origine dans les racines grecques « mycose », signifiant du champignon et « toxicum » qui va destiner poison (**Oswald et Forget, 2018**).

Les mycotoxines sont des substances secondaires, c'est -à-dire qu'ils ne sont pas indispensables au fonctionnement des champignons, résultant par la dégradation des métabolites primaires rassemblant les sucres, les lipides, les acides aminés et les acides organiques (**Leslibraires, 1999**).

Ces toxines sont présentes à faible concentration pas plus de 500g/mol, d'induire des effets toxiques pour les reins, le système nerveux ou encore le foie, tandis que sont supposés cancérogènes ou mutagènes. Par conséquent, la toxicité ne provient pas forcément de la mycotoxine elle-même, mais peut être due à l'un de ses métabolites issus de la dégradation (**Gauthier, 2016**).

La croissance des champignons n'est pas nécessairement associée à la formation de mycotoxines et, en raison de la stabilité des mycotoxines ; celles-ci peuvent être présentes dans les aliments lorsque les champignons ne sont plus présents. En outre, un champignon peut produire différentes mycotoxines, et une mycotoxine peut être produite par plusieurs champignons différents. La potentielle mycotoxine dépend des espèces et des souches de champignons, de la composition de la matrice et des facteurs environnementaux tels que la température et l'humidité (**Fernández-Cruz et al., 2010**).

Il s'agit des molécules peu solubles dans l'eau, particulièrement résistantes à la chaleur ainsi que sont très stables dans l'acidité (**Anfossi et al., 2016**). La production des mycotoxines est influencée par plusieurs genres des moisissures, parmi eux : *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Byssochlamys*. Quelques exemples de genres de moisissures et leurs mycotoxines dans différentes denrées alimentaires sont présentés dans le tableau n°1.

Tableau 1 : Principales moisissures productrices des mycotoxines retrouvées dans l'alimentation humaine et animale (AFIS, 2018).

Champignons	Mycotoxine	Matières primaires
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxine Ochratoxines A Patuline	Arachides, coton, riz, haricots, lait, tissus animaux, ensilage.
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes Zéaralénone Fumonisines	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine, noix.
<i>Penicillium</i>	Patuline Ochratoxines A Citrinine	Fruits, jus de fruits, blé, riz, fromage, noix, ensilage.
<i>Byssochlamys</i>	Patuline	Fruits et jus de fruits, ensilage.

1.2 Les classes des mycotoxines

1.2.1 les Aflatoxines

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330), très peu solubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques (AFFSA, 2009).

Elles sont produites par des moisissures du genre *Aspergillus* notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Les plus courantes dans la chaîne alimentaire sont l'aflatoxine B1 ainsi que l'aflatoxine B2 (AFB2), l'aflatoxine G1 (AFG1) et l'aflatoxine G2 (AFG2) (Firmin, 2011).

Selon la société de l'ARAA, 2019, les aflatoxines contaminent différents produits agricoles, comme les céréales, les oléagineux (les arachides), les épices, les noix et aussi le lait. Cette contamination intervient lors de la production ou encore pendant la manipulation ou lors de stockages. Elles seraient la cause des nombreux cas de cancer, de malnutrition et du retard de croissance chez les enfants, ce qui affecte la disponibilité des produits alimentaires pour la population et par ricochet la sécurité alimentaire.

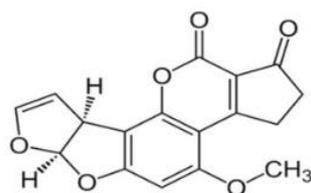


Figure 4 : Structure chimique de l'Aflatoxine B1 (AFB1) (Diakite et al., 2017).

1.2.2 les Trichothécènes

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par de nombreux *Fusarium* dont les principaux sont *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*. Ces mycotoxines sont classées en 4 groupes A, B, C, D. Dans l'alimentation, les plus fréquemment retrouvées sont le nivalénol (NIV), le déoxynivalénol (DON), les toxines T2 et HT2 (Heit, 2015).

La déoxynivalénol est la mycotoxine la plus abondante des trichothécènes du groupe B. Cette toxine appelée aussi vomie toxine qui provoque des effets tératogènes, neurotoxiques, embryotoxiques et immunosuppressives (Lahouar, 2016).

Elles se retrouvent dans les produits bruts comme les grains mais peuvent aussi se retrouver dans les produits transformés comme la farine, la semoule et les céréales. Les trichothécènes sont également phytotoxiques. Ils causent des nécroses ainsi qu'une perturbation de la germination des graines. Le DON est considéré comme un facteur de virulence permettant l'extension de la maladie d'un épillet à l'autre durant l'infection de la plante (Andujar, 2011).



Figure 5 : Les Trichothécènes T2³

1.2.3 La Zéaralénone

La ZEA est une mycotoxine œstrogénique non stéroïdienne, issue du métabolisme secondaire de nombreuses espèces de champignons tels que : *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* et *Gibberella zaeae*. Ces champignons colonisent les cultures céréalières plein champ et produisent leurs toxines principalement avant la récolte et après la récolte, lors de mauvaises conditions de manipulation, séchage et stockage des céréales (Koraichi, 2012).

La ZEA induit des effets œstrogéniques sur les mammifères et perturbe la conception, l'ovulation, l'implantation et la viabilité de fœtus. Outre son activité œstrogénique, la ZEA possède une activité anabolisante (Bravin, 2008).

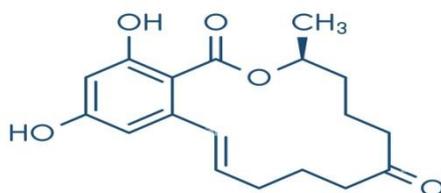


Figure 6 : la structure chimique de ZEA ⁴

1.2.4 L'Ochratoxines A

L'ochratoxine est une acide organique ayant une masse molaire de 403,8 g/mol, qui est soluble dans les solvants organiques polaires (alcools, cétones, chloroformes) mais faiblement soluble dans l'eau et insoluble dans les éthers de pétrole (El Khoury, 2007). L'OTA produite par *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus niger*. Ce dernier produit l'ochratoxine à une température optimale entre 20 et 25°C. Cette mycotoxine résulte de la condensation d'un résidu phénylalanine et d'un dérivé isocoumarinique (Boudih, 2011).

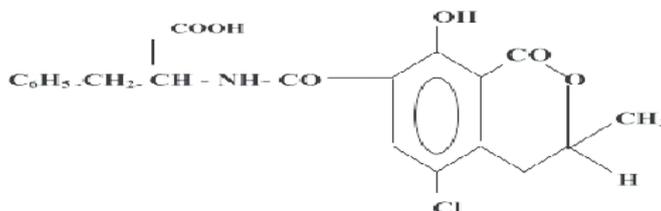


Figure 7 : Structure chimique de l'Ochratoxines A ⁵

1.2.5 Patuline

Les champignons qui métabolisent ce toxique sont très nombreux : *Penicillium expansum*, *Aspergillus clavatus* et *Byssochlamys nivea* qui ne produit pas que l'acide byssochlamique. Par ailleurs, la Patuline comme les aflatoxines et d'autres mycotoxines, a été indiquée par un contaminant toxique et cancérigène (**Dupaigne, 1978**).

En effets, elle est capable de se développer à des différentes températures entre 0 et 30°C. La patuline se trouve dans les fruits et les végétaux et elle est détectée aussi dans les céréales. Elle provoque également des dommages oxydatifs et affecte le système hormonal et immunitaire chez l'homme (**Houissa, 2020**).

1.3 Les facteurs influençant la présence des mycotoxines

La production des mycotoxines est conditionnée par divers facteurs d'ordre physique et chimiques:

1.3.1 Les facteurs physiques

A. La Température

La température est un facteur physique prépondérant qui joue un rôle sur la croissance des moisissures. La plupart des champignons filamenteux sont mésophiles avec une croissance optimale variant de 25°C à 35°C (**El Khoury, 2007**).

La température optimale de la toxinogénèse est légèrement inférieure à la température de croissance comme par exemple *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* autour de 30°C (**Royer et Tap, 2004**).

B. Activité de l'eau (A_w)

Les microorganismes ont besoin d'utiliser l'eau disponible dans les aliments pour assurer la croissance en particulier sur la germination des spores et la croissance des mycéliums. Les champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement xérophiles et capables de se développer à des teneurs de 0,7 qui vont contaminer les aliments pauvres en eau comme les céréales au stockage et les fruits secs (**Lahouar, 2016**).

Au contraire, le genre de *Fusarium* est considéré comme des moisissures de champ puisqu'il se développe dans une humidité importante supérieure à 0,9%. Ce principe n'est pas fixe et

c'est pour cela *Fusarium* produisent les mycotoxines dans des conditions durant le stockage (Ahmadou, 2019).

C. Présence d'oxygène dans le milieu

Les moisissures sont des microorganismes aérobies stricts. Elles ont besoin d'oxygène pour leur développement. Par conséquent, la croissance des moisissures est peu affectée de la teneur en oxygène plus faible que celle de l'atmosphère (Makhlouf, 2019).

1.3.2 Facteurs chimiques

D. Le pH

Le pH influence le développement de plusieurs espèces de moisissures, car la croissance mycélienne et la germination des conidies sont restreintes à une certaine gamme pour chaque espèce. Cette gamme de pH peut être large ou restreinte en fonction des espèces, par exemple *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* peuvent croître sur des milieux dont le pH respectivement entre 4 et 10 et entre 4 et 7 (Dossa et al., 2019).

E. La nature de substrat

La composition qualitative et quantitative du substrat peut influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines. En effet, un taux élevé de sucres et de lipides est favorable à la toxino-génèse. Les céréales et les oléagineux, plus riches en sucres et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines. La production des aflatoxines par *Aspergillus flavus* est favorisée par certains sucres comme le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose.

Le fer, le zinc et le cuivre ont été testés sur la production d'aflatoxines et d'Ochratoxine grâce à leur rôle de catalyseurs dans la peroxydation des lipides (Ciuma et al., 2022).

2. Patuline

2.1 Définition

La Patuline (PAT) a été découverte par Waksman et Horning en 1943, dans le filtrat de culture d'*Aspergillus clavatus*. Puis isolée pour la première fois à partir de colonies de *Penicillium griseofulvum* aussi nommé *P. patulum* (Birkinshaw et al., 1943).

La PAT est un métabolite secondaire élaborée par de nombreuses espèces : *Penicillium expansum*, *P. granulatum*, *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *Byssochlamys*

nivea et de *B. fulva*.... Elle a plusieurs dénominations : Clavacine, Claviformine, Clavitrine, Expansine, Pénicidine et mycoïne C3 (AFFSA, 2009).

En 1956, le professeur **Brian** et ses associés ont identifié pour la première fois des produits alimentaires naturellement contaminés par la Patuline en utilisant des méthodes antimicrobiennes. La Patuline n'était pas détectable sans analyse. Le jus qui le contient n'a pas de goût ni modification d'aspect (Deshpande, 2002).

Ses propriétés antibiotiques contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives font conduire à l'utilisation initiale de la Patuline en médecine humaine et vétérinaire. Le sien est maintenant suspendu en raison de sa neurotoxicose.

2.2 Caractérisation et identification des moisissures productrices de Patuline

La production des mycotoxines est limitée par certains champignons filamenteux et au sein d'une même espèce. En ce qui concerne la patuline, cette dernière est élaborée comme un métabolite secondaire par un large micromycète appartenant particulièrement aux :*Penicillium expansum*, *Aspergillus clavatus* et (Borkowska et Escoula, 1977).

2.2.1 *Penicillium expansum*

Penicillium expansum est une espèce répandue cosmopolite, pouvant se retrouver dans le sol et l'air. En outre, ce champignon capable d'infecter les fruits à pépins tels que la pomme et la poire, bien que les fruits à noyau comme cerises, prunes, et les légumineuses par exemple les arachides et fèves (Tannous, 2015).

La température optimale pour le développement de *Penicillium expansum* est 25°C et maximum près de 35°C parce qu'il est champignon psychrophile. En outre, l'activité minimale pour la germination était 0,82-0,83%. Par contre, pour la production de patuline, la température environ 25°C et le pH optimum de 5 à 7 (Ostry et al., 2004).

2.2.2 *Aspergillus clavatus*

Ce champignon filamenteux est particulièrement développé sur l'orge pendant le maltage où la température est élevée environ 42°C, cette espèce se trouve dans les céréales, le blé, la farine, et le pain (Hocking, 2006).

Aspergillus clavatus est responsable des lésions d'hyperkératose chez les porcs. Par ailleurs, cette moisissure était connue comme productrice d'un antibiotique : la clavacine ou bien clavatine (Jacquet et al.,1963).

2.2.3 *Byssochlamys nivea*

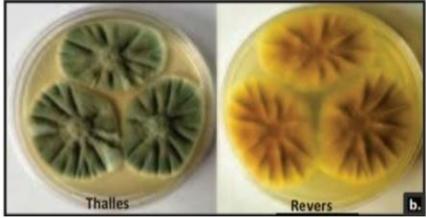
Byssochlamys nivea ou appelé *Paecilomyces niveus* est une espèce thermophile qui se développe dans une température optimale de 35°C. Ce champignon est résistant à des conditions anaérobies (Percebois et al., 1975).

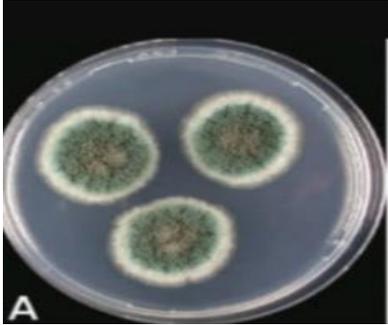
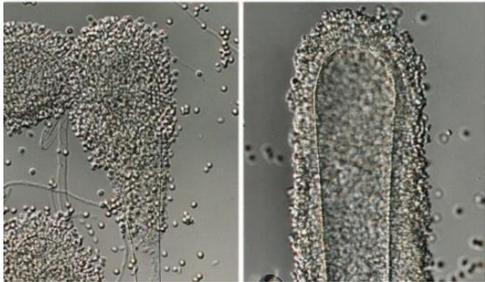
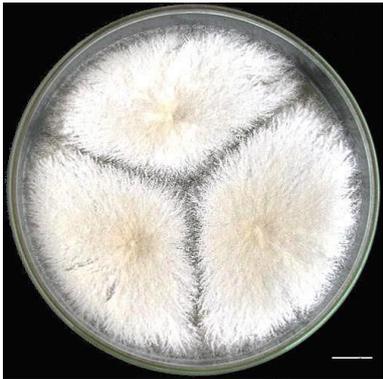
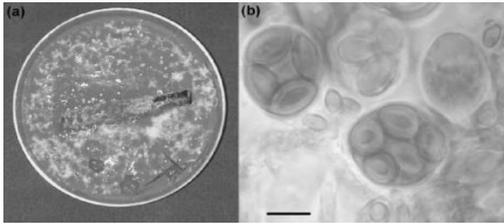
Cette espèce de *Byssochlamys* est responsable de l'altération et de la dégradation des fruits et des ensilages et peut également être considérée comme la principale source de contamination de pomme, d'ananas, d'orange et de tomate (Puel et al., 2005).

Tableau 2 : la taxonomie de *Penicillium expansum*, *Aspergillus clavatus* et *Byssochlamys nivea*

Espèce classification	<i>Penicillium expansum</i> (Rosario et al., 2020)	<i>Aspergillus clavatus</i> (Naturelle, 2019)	<i>Byssochlamys nivea</i> (INPN, 1971)
Règne	Fungi	Fungi	Fungi
Division	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Sous- division	Pezizomycotina	Pezizomycotina	Pezizomycotina
Classe	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes
Sous- classe	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetidae
Ordre	Eurotiales	Eurotiales	Eurotiales
Famille	Trichomocomaceae	Trichomocomaceae	Trichomocomaceae
Genre	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Byssochlamys</i>
Espec	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Byssochlamys nivea</i>

Tableau 3 : Les principaux caractères morphologiques de *Penicillium expansum*, *Aspergillus clavatus* et *Byssochlamys nivea* ⁶

Espèce	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
<i>Penicillium expansum</i>	<p>-Sur le milieu CYA :</p> <p>Thalle de 30-40 mm de diamètre, plissés avec mycélium blanc ou vert foncé.</p> <p>-Sur milieu MEA :</p> <p>Le diamètre de thalle est 20-40 mm à texture lisse, quelques isolats veloutés de couleurs gris, vert ou orange.</p>  <p>Figure 8 : Aspect macroscopique de <i>Penicillium expansum</i> (Tannous, 2015).</p> <p>b) Thales et revers de la culture sur milieu CYA, pendant 7 jours à 25° C.</p>	<p>-Les conidiophores sont portés par des hyphes isolées ou en groupe à paroi lisse.</p> <p>-Les conidies sont ellipsoïdes, vert terne ou brun orangé à cannelle.</p>  <p>Figure 9 : Aspect microscopique de <i>Penicillium expansum</i>.</p> <p>a) <i>Penicillium expansum</i> avec une longueur de 10 μm⁷</p>

<p><i>Aspergillus clavatus</i></p>	<p>Les colonies grises à verdâtres avec des revers incolores à brun de 1,5 à 3 mm de longueur sur le milieu M2.</p>  <p>Figure 10 : <i>Aspergillus clavatus</i>. A) Les colonies après 7 jours à 25°C sur le milieu CYA (Mokobi, 2021).</p>	<p>-Têtes conidiennes sont bleu vert à vert-olive. -Les conidiophores à paroi lisses, fines et incolores qui se terminent par une vésicule renflée.</p>  <p>Figure 11 : Aspect microscopique d'<i>Aspergillus clavatus</i>⁸</p>
<p><i>Byssochlamys nivea</i></p>	<p>Sur le milieu M2, les colonies sont de couleur blanche-crème avec un mycélium ras et granuleux en surface de la culture.</p>  <p>Figure 12 : Les colonies de <i>Byssochlamys nivea</i>⁹</p>	<p>-Des ascospores elliptiques ou globuleuses, lisses. -Des conidies en chaine persistantes elliptiques, lisse formé à partir de phialide à col allongé, raides. -Des aleurioconidies solitaires, sphériques.</p>  <p>Figure 13 : <i>Byssochlamys nivea</i> (Hoff et al., 2004).</p> <p>a) Culture sur un milieu riche en nutriment, b) Asque contenant des ascospores.</p>

2.3 Structure chimique de Patuline

La patuline est un contaminant franchement toxique, sa structure chimique a été proposée par Raistrick, 1943 (figure 3), la PAT est une lactone hétéro cyclique insaturée de poids moléculaire 154,1 g/mol (Catana *et al.*, 2010), et de formule empirique $C_7H_6O_4$ répondant à la structure, sa dénomination complète est : 4,6-dihydro-4-hydroxy-2H-furo [3,2-c] pyranne-2-one.

Sa biosynthèse est formée par la condensation de trois molécules de malonyl-CoA et d'une molécule d'acétyl-CoA (acteur majeur du cycle de Krebs) (Tannous, 2015).

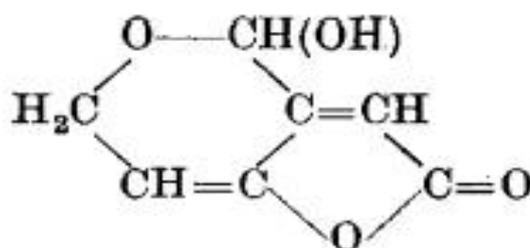


Figure 14 : Structure moléculaire de la Patuline (Stachel, 1963).

2.3.1 Propriétés physico-chimiques de la Patuline

La patuline forme des cristaux incolores avec des sections transversales rhombiques ou prismatiques, présente un point de fusion 111°C , c'est une substance neutre (Trucksess et Tang, 1999), soluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques tels que éthanol, méthanol, acétone, acétate d'éthyle, éther et chloroforme. Par contre, totalement insolubles dans les solvants organiques non polaires tels que le benzène ou l'éther de pétrole (Ciegler, 1977).

Car il est soluble dans l'eau, la PAT a la capacité de se propager des parties pourries du fruit aux parties apparemment saines (Bandoh *et al.*, 2009). Il est stable en milieu acide quelle que soit la température, en revanche, il devient inactif en milieu alcalin (Brackett et Marth, 1979).

La Patuline s'est avérée très instable et est progressivement détruite en présence du dioxyde de soufre pendant le stockage (Tabatabaie *et al.*, 2010), protéines contenant du soufre tel que le glutathion, la cystéine et les acides thioglycolique, acides organiques principalement ascorbiques (Drusch *et al.*, 2007). Cette forte dégradation est due à la forte réactivité du groupement lactone de la Patuline.

2.4 Toxicité de la Patuline

2.4.1 Toxicité aiguë

A surtout été étudiée chez le rat, C'est par sa neurotoxicose que l'intoxication aiguë à la Patuline se distingue. Les signes d'une atteinte nerveuse sont peu spécifiques : convulsions, hyperesthésie, tremblements, agitation et paraplégie (AFSSA, 2009 ; Brochard, 2009).

Une perturbation des sécrétions des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes a aussi été rapportée. Certains composés tels que la cystéine liée à la patuline peuvent éliminer ses effets toxiques (Ciegler *et al.*, 1976).

2.4.2 Toxicité chronique

Concernant la toxicité chronique, les études chez les animaux ont permis de mettre en évidence une perte pondérale, des œdèmes pulmonaires associés à une dyspnée, des perturbations rénales et gastro-intestinales. En plus de ses propriétés neurotoxiques (Schebb *et al.*, 2009), nous distinguons d'autres propriétés toxiques :

a) Génotoxicité

La Patuline est suspectée d'être génotoxique, à sa forte réactivité vis-à-vis des nucléophiles cellulaires. Elle réagit rapidement avec le groupe sulfhydryle dont la vitesse de réaction est lente avec la fonction amine et rapide avec protéines et glutathion, jusqu'à trois molécules de glutathion peuvent être combinées avec des molécules de Patuline (Gauthier, 2016).

b) Pouvoir cancérigène et cytotoxique

La Patuline est aussi cancérigène, mutagène, et cytotoxique. Ces propriétés sont attribuées au caractère clastogène de la Patuline, c'est-à-dire sa capacité à provoquer des ruptures dans les brins d'ADN et induire des micronoyaux contenant des fragments non centrés (AFSSA, 2009). En revanche, sa cancérigénicité n'est pas établie, elle a été classée dans le groupe 3 du CIRC (Gauthier, 2016).

c) Immunotoxicité

De nombreuses études *in vitro* montrent que la Patuline inhibe de multiples fonctions des macrophages par la diminution de l'ATP. Ainsi, Sorenson et ses collaborateurs (1986) ont observés que la synthèse des protéines était inhibée dans des macrophages alvéolaires de rat exposés *in vitro* et que la fonction membranaire était aussi empêchée par la Patuline. Dans les mêmes cellules de souris, il a été confirmé que la toxine diminuait significativement la

formation de radicaux oxygénés (O_2^-), la fusion phagosome-lysosome et l'activité des lysosomes (Brochard, 2009).

2.5 Procédés de prévention et de réduction des mycotoxines dans les produits alimentaires

Il est important de noter que les moisissures produisant les mycotoxines peuvent se développer sur diverses cultures et denrées alimentaires et peuvent y pénétrer profondément: elles ne poussent pas qu'en la surface. Selon l'OMS (2018), Le système biologique contre les mycotoxines doit se concevoir à trois niveaux de la production :

2.5.1 La lutte avant la récolte

Dans les climats chauds et humides, de nombreuses règles doivent être suivies pour maintenir la fertilité du sol et donc aider à éviter la prolifération des spores et la production ultérieure des mycotoxines. Voici quelques techniques actuellement utilisées selon Quellien (2002) :

- Assurer à la récolte sur pied de bonnes conditions écologiques (irrigation suffisante, apport de minéraux...) et éviter les conditions écologiques favorables à l'infection fongique.
- Éviter les résidus de plants intoxiqués afin d'empêcher le risque de contamination à la récolte suivante ou aux autres plants.
- Utiliser des traitements chimiques pour prévenir l'apparition de moisissures.
- Utilisation des fongistatiques inhibant la croissance des moisissures et empêchant la toxinogénèse.

2.5.2 La lutte au moment de la récolte

Pendant cette période, deux facteurs sont à contrôler : le lavage et le séchage. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agricultures, 1979. Les méthodes sont nombreuses et variées selon le type de produit :

- Récolter à pleine maturité.
- Éviter les dégâts mécaniques aux produits durant la récolte.
- Sécher immédiatement la récolte, en tenant compte du fait que le séchage au soleil en présence d'une forte humidité est susceptible d'entraîner l'infestation de la récolte par des moisissures.

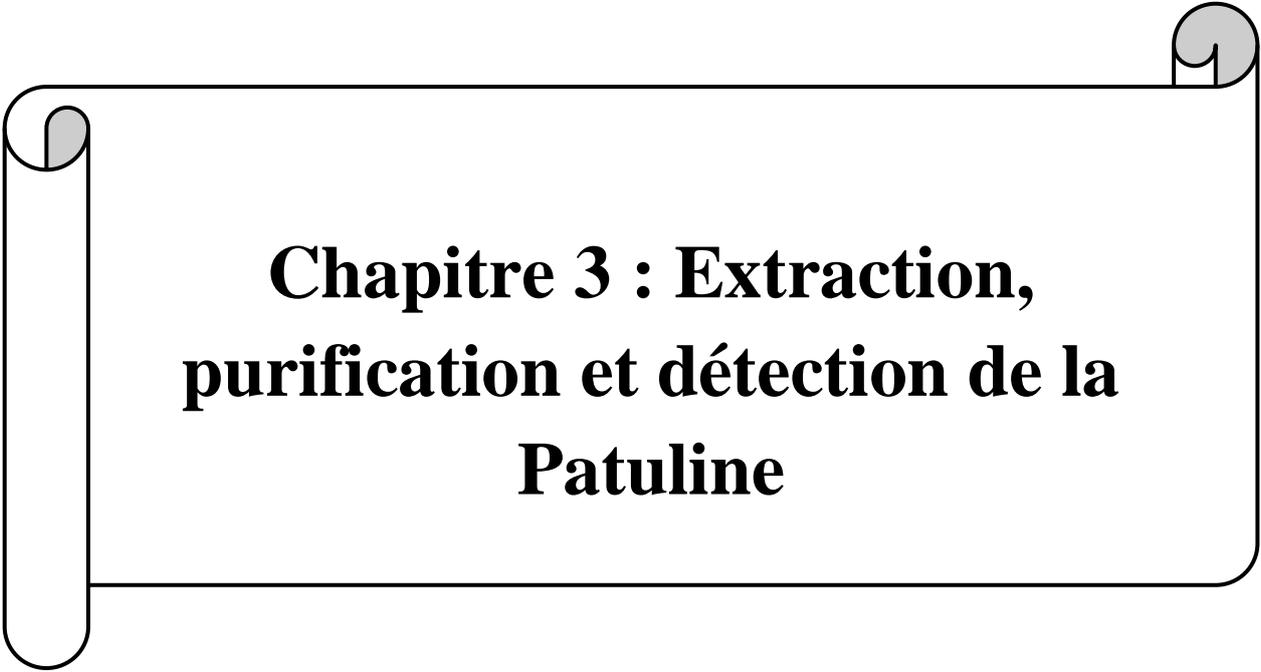
- Éviter que la récolte ne se ré humidifie pendant ou après le séchage, en assurant une protection appropriée contre la pluie pendant le séchage au soleil et en évitant la forte humidité que provoque l'utilisation de bâches sur laquelle la vapeur d'eau se condense lorsque la température baisse pendant la nuit.

2.5.3 La lutte après la récolte

D'après le **Journal Officiel de l'Union Européenne, 2006**, les procédures appliquées au cours de la période d'entreposage sont très importantes pour éviter l'exposition des consommateurs aux mycotoxines ; ces procédés doivent être simples à mettre en œuvre et peu coûteux :

- Pour les denrées ensachées, s'assurer que les sacs sont propres et secs et les empiler sur des palettes ou intercaler une couche imperméable à l'eau entre les sacs et le sol.
- Aérer si possible les céréales en faisant circuler de l'air dans la zone d'entreposage pour maintenir une température appropriée et uniforme dans toute cette zone.
- Contrôler régulièrement la teneur en eau et la température dans les céréales stockées durant l'entreposage. Une mauvaise odeur peut signifier que les grains sont en train de se réchauffer, notamment si le lieu d'entreposage est clos.
- Mesurer la température des céréales entreposées à des intervalles déterminés pendant l'entreposage. Une hausse de température peut indiquer un développement microbien et/ou une infestation par les insectes.
- Séparer les parties apparemment infectées des céréales et envoyer des échantillons pour analyse. Ensuite, abaisser la température des céréales restantes et aérer.
- Éviter d'utiliser des céréales contaminées pour la production d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale.
- Utiliser de bonnes méthodes d'entretien afin de réduire au minimum la présence d'insectes et la formation de moisissures dans les entrepôts. On utilisera notamment des insecticides et des fongicides appropriés et agréés ou d'autres méthodes adaptées.
- L'utilisation d'un agent de conservation approprié et agréé (par exemple des acides organiques tels que l'acide propionique) peut se révéler bénéfique pour les céréales destinées à l'alimentation animale. L'acide propionique et ses sels sont fongistatiques et sont parfois utilisés pour conserver les grains récoltés humides en évitant qu'ils ne s'échauffent ou moisissent avant leur traitement ultérieur.

- Ces produits doivent être appliqués rapidement au moyen d'un équipement adéquat de manière à obtenir une répartition uniforme dans la totalité du lot à traité tout en garantissant la sécurité de l'opérateur.
- Si les grains sont traités après une période d'entreposage humide, la présence de l'agent de conservation ne constitue pas une garantie de non-contamination des grains.



**Chapitre 3 : Extraction,
purification et détection de la
Patuline**

1. Extraction et purification de Patuline

La Patuline se recherche dans nombreux aliments tels que les fruits, les jus de fruits ou les légumes ; les teneurs maximales admissibles de Patuline sont illustrées dans le tableau 3 (Capinov, 2022). Ce qui en matière d'analyse correspond à une multitude des matrices complexes.

Le protocole d'analyse de la Patuline est composé des étapes préliminaires à partir de préparation de l'échantillon : Broyage, centrifugation, extraction en milieu organique et extraction liquide-liquide pour obtenir l'extrait sec de la Patuline. Sachant que les parois cellulaires des fruits sont un mélange complexe de cellulose, d'hémicellulose, de pectine et de protéines, des molécules de taille inférieure à 0,5 μm , la PAT peut être retenue dans le réseau pectine (Funes et Resnik, 2009). Une procédure de dépectinisation est essentielle dans certains cas pour détruire le filet de pectine et améliorer la récupération de Patuline existant dans les matrices solides ou semi-solides (Boonzaaijer et al., 2005; Spadaro et al., 2007)

D'autre part, une extraction phase solide (EPS) qui est introduite comme une méthode polyvalente pour supplanter les étapes conventionnelles d'extraction liquide-liquide, elle est basée sur deux étapes : la première étape est effectuée sur la colonne C_{18} , suivie d'une deuxième purification sur colonne de silice (Boonzaaijer et al., 2005).

L'analyse de Patuline étant une analyse de traces, il est de plus en plus recommandé de procéder à une étape de concentration de l'extrait pour utiliser dans les analyses de détection et dosage.

Tableau 4 : Les teneurs maximales de Patuline dans différentes denrées alimentaires selon Capinov (2022).

	Teneur maximale en Patuline ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou ppb)
Jus de fruits et boissons spiritueuses.	50
Produits à base de morceaux de pommes (compotes, purées de pommes).	25
Produits pour les enfants en bas âge et les nourrissons (jus de pommes, compotes de pommes).	10

2. Détection et dosage de l'agent pathogène

Afin d'obtenir l'extrait de la Patuline, on le dissout dans 300 μl de mélange méthanol-eau (80/20 ; v/v). Pour le dosage de cette mycotoxine l'une des méthodes suivantes HPLC, CPG ou CCM est utilisée :

2.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les couplages à des détecteurs ultraviolets (UV), à fluorescence (FD) sont aujourd'hui des techniques de référence les plus utilisées. Il permet d'atteindre des seuils de détection très bas (environ 10ng/kg) grâce au couplage à la méthode fluorimétrique. Cette technique a été adoptée comme méthode officielle par l'AOAC, dans lesquelles l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) à travers une colonne chromatographique remplie d'une phase stationnaire de petite taille de particules. L'augmentation de la pression dans le système est due au débit élevé de l'éluant (Driehuis *et al.*, 2008 ; Monbaliu *et al.*, 2010 ; Tannous, 2015).

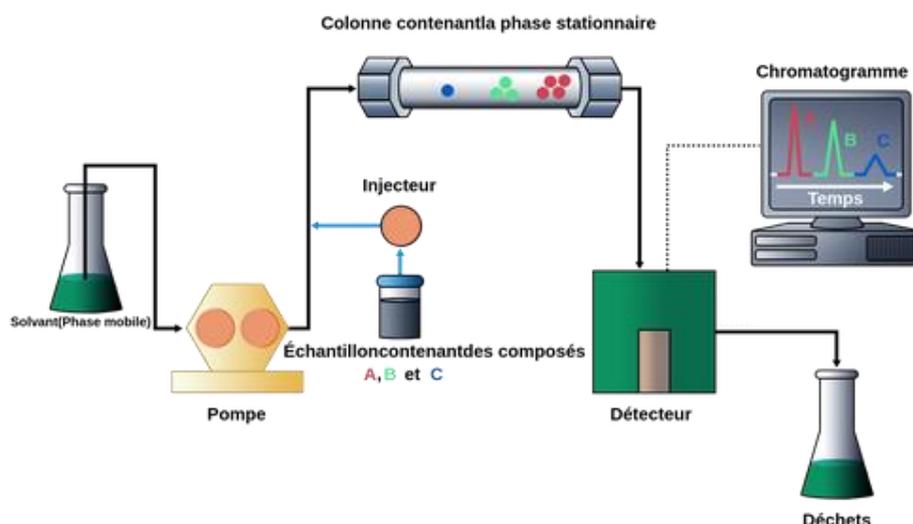


Figure 15 : La chromatographie en phase liquide à haute performance ¹⁰.

2.2 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

couplée aux détecteurs à ionisation de flamme (FID), détecteur de capture d'électrons (ECD) et spectrométrie de masse (MS) en utilisant de la Patuline sillée (Moukas *et al.*, 2008), la PAT non dérivée a été déterminée dans les jus de pomme et de fruits par cette méthode (CG-MS) en mode ionisation chimique négative (Roach *et al.*, 2000) même si la méthode CG-MS soit très sensible, elle nécessite souvent une dérivation de la Patuline avant son analyse.

Le mélange à étudier est vaporisé à l'entrée de la colonne contenant la phase stationnaire (liquide ou solide). Il est ensuite transporté à travers de la colonne à l'aide d'un gaz vecteur (phase mobile). Les différents composés du mélange vont se séparer et quitter la colonne un par un selon leur affinité avec la phase stationnaire (Jackson *et al.*, 1996).

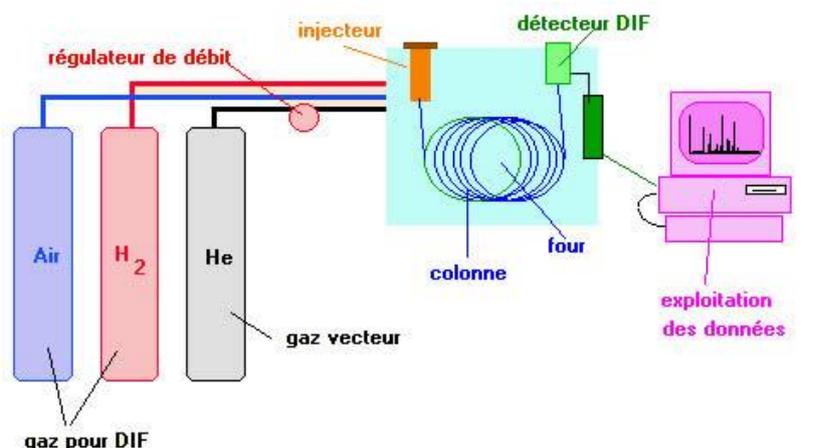


Figure 16 : Schéma descriptif d'une chromatographie en phase gazeuse ¹¹.

2.3 Chromatographie à couche mince (CCM)

La méthode officielle de l'AOAC pour l'analyse de la Patuline par CCM a été validée selon les études réalisées par **Scott** et leurs collaborateurs en **1974**. Il est constitué d'une phase stationnaire comprenant une fine couche de matériel absorbant (gel de silice) immergée dans un liquide (phase mobile) composé d'un solvant qui sépare les molécules dans la colonne de chromatographie.

La détection se fait par pulvérisation 3-Méthyle-2-benzothiazolinone hydrazine (MBTH). La technique est à nouveau utilisée pour partie d'autres études visant à quantifier la PAT alimentaire (**Martins et al., 2002; Welke et al., 2009**). Cette technique est peu coûteuse, facile à manipuler et permet un criblage rapide de plusieurs échantillons. Cependant, elle est peu sensible et donne des résultats moins précis que l'HPLC et CPG (**Houissa, 2020**).

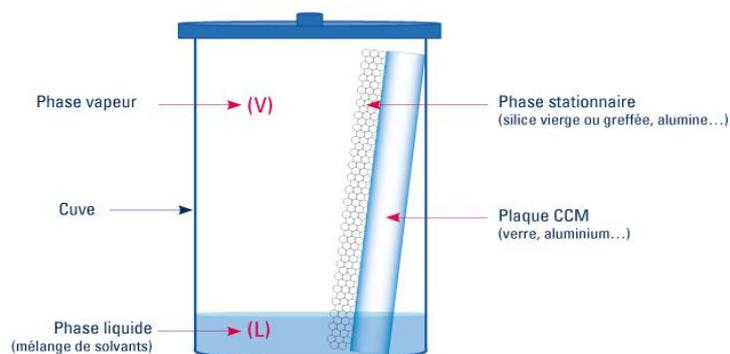


Figure 17 : La chromatographie sur couche mince ¹².

3. Quelques travaux sur l'extraction et la production de patuline

3.1 Extraction et détection de la patuline dans la pomme par *Penicillium expansum*

L'étude a été mise au point par **Tannous**, en **2015**, dans un objectif de confirmer l'implication de la Patuline dans le processus d'infection des pommes par deux souches de *Penicillium expansum*. Il agit à titre de facteur de virulence plutôt que de facteur de pathogénicité.

3.1.1 Matériel et Méthodes

La souche fongique utilisée dans le cadre de cette analyse est la souche NRRL 35695 (Agricultural Research Service Culture Collection) de *Penicillium expansum*.

Les échantillons sont des pommes de table (au couteau) de deux variétés ; Marie Ménéard et Frequin Rouge.

La Patuline est extraite à partir des broyeurs de pommes entières, infectée par *P. expansum* et incubée avec 150 µl de pectinase et 10 ml d'eau. Après incubation, le surnageant est prélevé par une centrifugation (5 min à 4500 rpm). Il a ensuite été mis en macération dans 50 ml d'acétate d'éthyle pendant une journée. Lors de la phase suivante, la phase organique est récupérée et concentrée sous vide en utilisant un rotavapor. L'extrait sec a été pris en 300 µl d'un mélange méthanol-eau (80/20 ; v/v) pour réaliser les analyses en HPLC.

3.1.2 Résultats

Analyse de la production de Patuline dans les pommes

Les analyses de la production de la Patuline dans les deux variétés des pommiers ont fourni les résultats suivants ;

Les pommes infectées par la souche sauvage de *P. expansum* NRRL 35695 ont présenté des teneurs plus ou moins importantes de la patuline, ainsi qu'une disproportion entre les variétés des pommes. Par ailleurs, la variété de Frequin Rouge a été la plus favorable à la production de la Patuline par cette souche, du douzième aux quatorzièmes jours d'incubation où la quantité de la Patuline a été estimée à 12 μ g/g. Au cours de la douzième période d'incubation, la quantité de la Patuline est graduellement réduite au fil du temps jusqu'à 1 μ g/ g en raison du vieillissement de la souche de *Penicillium* et de l'impossibilité de produire des quantités suffisantes de la Patuline.

Par contre, la variété de la pomme à couteau Marie Ménéard était significativement moins propice à la production de Patuline par *P. expansum* avec des teneurs de Patuline qui étaient de l'ordre 7 μ g/g de pomme après deux semaines d'incubation dans un milieu PDA non renouvelable et ensuite diminué au cours des derniers jours d'incubation.

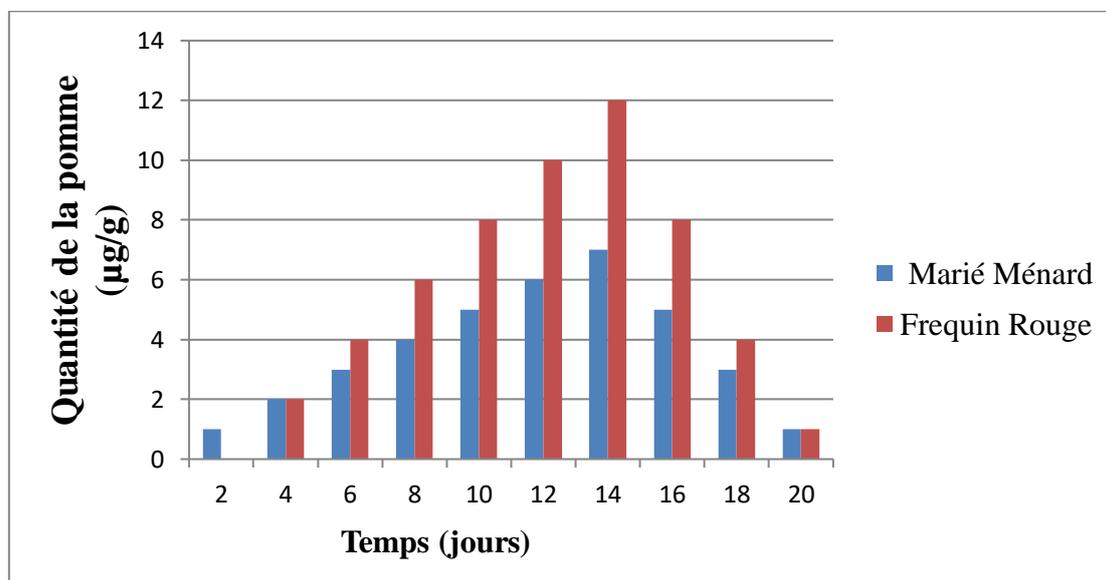


Figure 18 : Histogramme représente les teneurs en Patuline exprimées en μ g/g dans la variété de Marié Ménéard et Frequin Rouge de pommes infectée par la souche de *P. expansum* 35695¹³

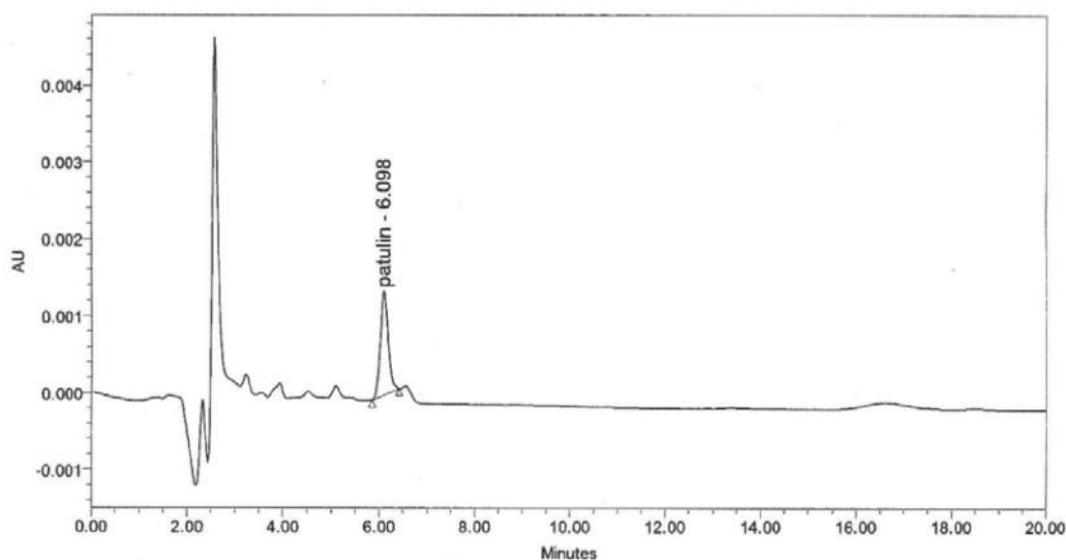


Figure 19 : Chromatogramme HPLC de la Patuline standart (Tannous, 2015).

3.2 La production de patuline par *Byssochlamys nivea*

Ce travail est réalisé par **Dombrink-Kurtzman** et **Engberg, 2006**. Pour un but d'extraction et de détection de la Patuline par deux souches de *Byssochlamys nivea* (NRRL 32565 et NRRL 35592), contaminant le jus de fruits qui sert comme un excellent substrat pour la croissance de *B. nivea*, suivie par la production de la mycotoxine Patuline.

3.2.1 Matériels et Méthodes

Les souches impliquées dans ce travail sont les suivantes :

NRRL 32565 et NRRL 35592 de *Byssochlamys nivea*. Les isolats utilisés dans l'étude provenant du jus de fruits sont conservés dans NRRL.

Le protocole repose sur l'extraction d'échantillons filtrés au moyen de colonnes d'extraction en phase solide (SPE) avec un collecteur sous vide. Avant l'usage, les colonnes étaient remplies de l'H₂O. Après cela, les échantillons sont chargés dans les colonnes SPE, qui ont été rincés avec bicarbonate de sodium à 1% puis avec l'acide acétique et séchées avant être éluées avec l'acétate d'éthyle à 10%. Les flacons ont été évaporés à sec sous l'azote à température ambiante. La solution de la patuline est diluée dans 25 ml de l'acétate d'éthyle et conservée à 20°C pour les analyses HPLC.

3.2.2 Résultats

Les quantités minimales de la Patuline ont été détectées à 5 jusqu'à 14 jours après l'incubation. Tandis que, la production maximale de la Patuline produit à 10 jours d'incubation.

Le niveau le plus élevé de la Patuline est marqué dans la souche NRRL 32565 de *Byssochlamys nivea* où il a atteint 350 µg/ml du cinquième aux dixièmes jours d'incubation. Ensuite, cette quantité de la Patuline est diminuée rapidement qui peut être absente dans le quatorzième jour.

Par contre, la production maximale de la Patuline chez la souche NRRL 35592 est détectée pendant 5 jours après l'incubation qui a été estimée à 200 µg/ml, après quoi elle a disparu dans le dernier jour d'incubation car cette espèce est dégradée la Patuline en tant substrat pour sa croissance.

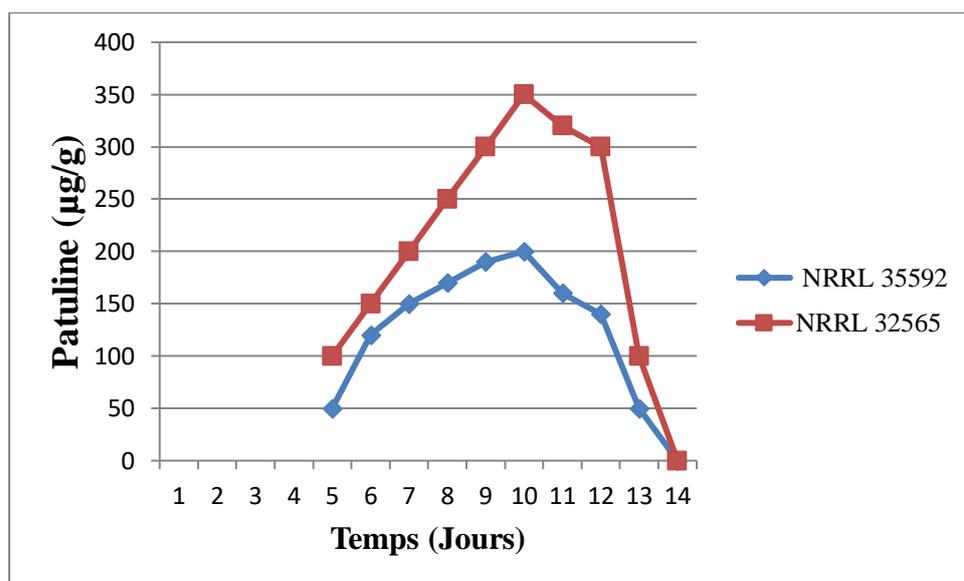


Figure 20 : Courbe graphique exprime les différents teneurs de la production de Patuline par la souche NRRL 32565 et NRRL 35592 de *Byssochlamys nivea* ¹⁴

3.3 Discussion

Les résultats de ces travaux indiquent des concentrations de Patuline très différentes selon les matières contaminées par la souche de *P. expansum* NRRL 35695 et les deux souches de *Byssochlamys nivea* (NRRL 32565 et NRRL 35592).

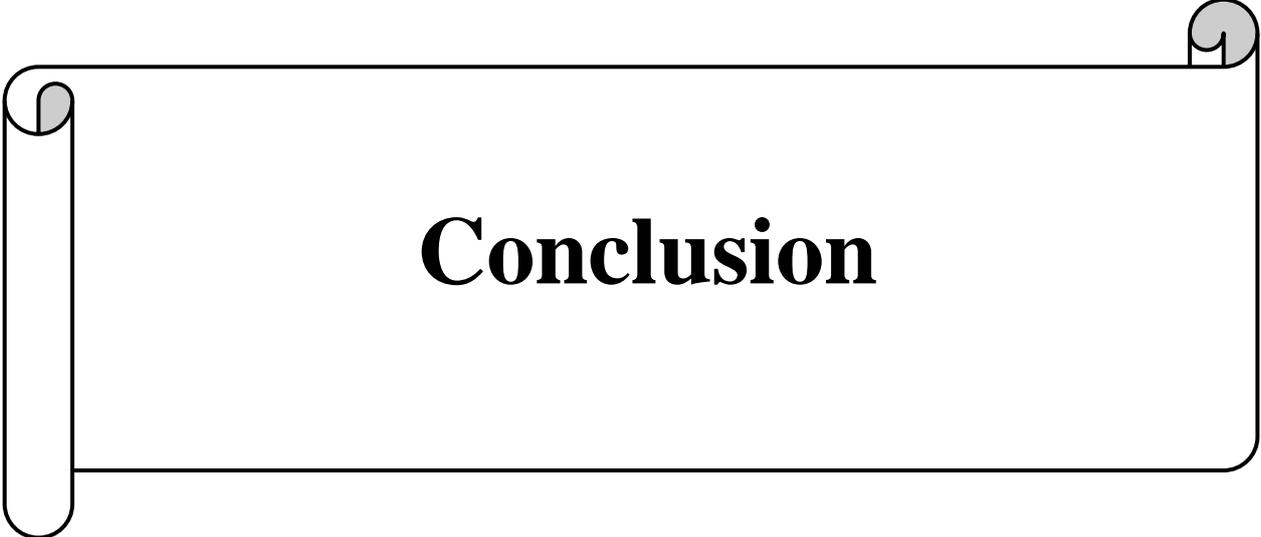
La comparaison entre les deux espèces montre que les souches NRRL 32565 et NRRL 35592 de *Byssochlamys nivea* présentent des taux de Patuline plus élevés (350 et 200 µg/g respectivement) pendant la première période d'incubation, avec un déclin de la production de Patuline jusqu'à son absence au bout de 10 jours d'incubation dans un bouillon PDA renouvelé par des acides aminés (arginine et lysine).

En contrepartie de l'analyse, la variété de Marié Ménard et Frequin Rouge de la pomme sur lesquelles le champignon a produit les quantités de Patuline plus faible environ 7 et 12µg/g de la pomme respectivement après deux semaines d'incubation sur le milieu PDA.

Cette constatation d'une différence d'accumulation de Patuline parmi les variétés de pommiers n'est pas une nouveauté. Cependant, plusieurs auteurs ont remarqué dans leur étude une accumulation de Patuline plus importante chez les pommes de Frequin Rouge que chez les pommes de Marié Ménard.

Ces résultats révèlent que les souches de *B. nivea* peuvent être des agents plus importants responsables de la présence de Patuline par l'altération des produits fruitiers car elles produisent des ascospores résistant à la chaleur capable de se développer à un pH faible de seulement 2.

Le protocole d'extraction, de purification et de détection de la Patuline utilisé dans ces pratiques est semblable chez les deux espèces de *Byssochlamys nivea* et *Penicillium expansum*, mais la quantité de la production de Patuline n'est pas la même. On constate que la méthode fournissant les valeurs importantes de la Patuline est la méthode de **Dombrink-Kurtzman** et **Engberg**, parce qu'il s'agit d'un processus efficace et répandu qui nous apporte de nombreux avantages dans les différents domaines d'utilisation de la Patuline dans le secteur médical, pharmaceutique et industriel.



Conclusion

A tous les stades de la production agroalimentaires depuis les champs jusqu'à l'assiette des consommateurs, les moisissures sont susceptibles de se développer et produire des toxines dans des conditions favorables notamment l'humidité et la température. La contamination des fruits et des légumes peut avoir lieu avant ou dans le stockage par des moisissures qui diffusent dans la masse de l'aliment.

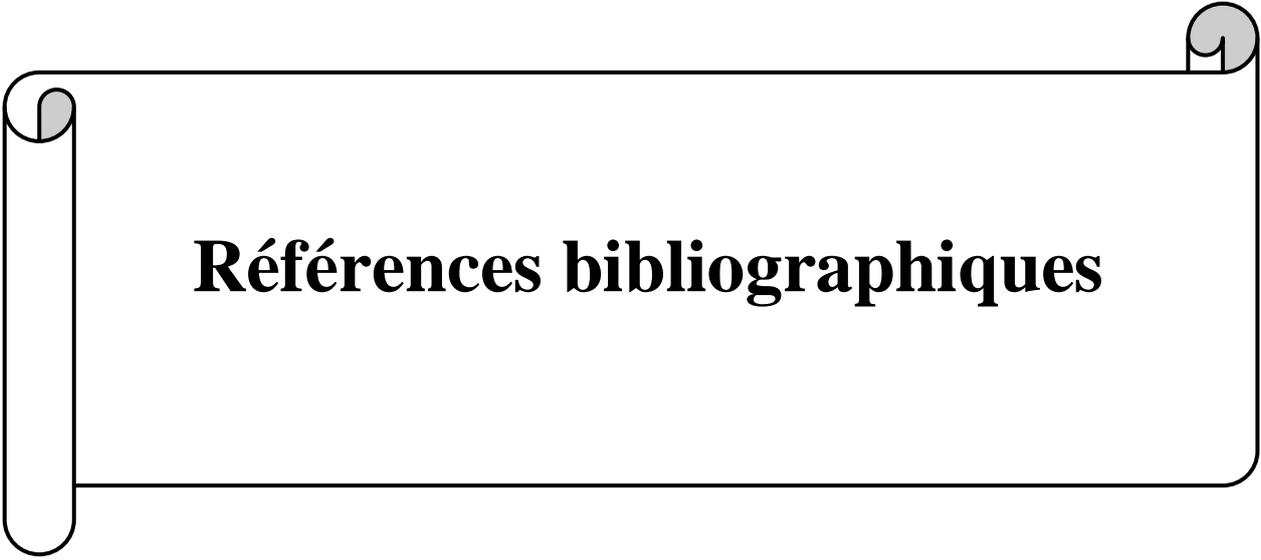
Malgré que les mycotoxines sont toxiques. La patuline est entraînée son introduction en thérapeutique vétérinaire et humaine. Elle fut utilisée avec succès dans la brucellose bovine et contre les agents des rhumes et bronchites, mais sa neurotoxicité l'a fait abandonner chez l'homme (AFFSA, 2009).

Par conséquent, on a proposé des règles pour empêcher la production des mycotoxines afin de garantir que les fruits et les légumes sont sans danger. Pour cela, il faut conseiller au consommateur :

- Nettoyer les fruits et légumes à l'eau de Javel pour éviter la détérioration par des moisissures et jeter celles qui semblent moisies, décolorées ou flétries.
- Acheter les marques réputées, propre et fraîche dans la mesure du possible, qui ont grandi dans des conditions défavorables et qui n'ont pas été transportées au cours d'une longue période.
- Assurer que les aliments sont stockés convenablement et qu'ils ne sont pas entreposés pendant des périodes prolongées avant leur consommation.
- Suivre un régime alimentaire équilibré, riche en légumes et fruits frais pour rester en bonne santé et exempt des maladies.

A l'avenir, des études intensives sur les divers usages de la Patuline, notamment dans les domaines médical et pharmaceutique, seront nécessaires avec la possibilité d'importer tous les prétextes et les matériels pour dépister les positifs de cette mycotoxine, car il est considéré comme un antibiotique dans la lutte biologique contre les maladies chroniques et dangereuses ; Ainsi que pour maintenir la qualité organoleptique des fruits et légumes contre corruption.

Finalement, un programme de surveillance des mycotoxines est devenu une priorité nationale en matière de protection de la consommation humaine et animale et étrangère généralement inconscients des effets néfastes provoqués à long terme causés par ces substances.



Références bibliographiques

- **Ahmadou, A. (2019).** Réduction de la mycotoxicité dans l'agriculture malienne à partir de l'utilisation de biochar obtenu des sous- produits de la filière cajou. Thèse de doctorat : Sciences des Aliments et Nutrition. Ecole doctorale GAIA, 172 p.
- **AFIS. Association Française pour l'Information Scientifique. (2018).** Les mycotoxines : les sources de contaminations [en ligne]. (Page consultée le : 07/05/2022). Disponible sur : (<https://www.afis.org/Les-mycotoxines>).
- **AFSSA. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (2009).** Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes humaine et animale [en ligne] (page consultée le 05/04/2022). (<https://www.an.tses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>).
- **Andujar, P. (2011).** Mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse du mésothéliome. *Agents physiques*, 5 (15), 4-6.
- **Anfossi, L., Giovannoli, C et Baggiani, C. (2016).** Mycotoxins detection. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology*, 37, 120-126.
- **ARAA.** Agence Régionale pour l'Agriculture et Alimentation. (2019).
- **Azémar, B. (2000).** Étude du rôle de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme : mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de doctorat : Science Agronomique. Université de Toulouse, 265 p.
- **Bandoh, S., Takeuchi, M., Ohsawa, K., Higashihara, K., Kawamoto, Y et Goto, T. (2009).** Patulin distribution in decayed apple and its reduction. *International Biodeterioration et Biodegradation*, 63 (4), 379-382.
- **Ben Salah, A., Bouhaha, F., Belgacem, S., Azzez, A., Lazzem, M. (2021).** Epidémiologie des infections pulmonaires fongiques au CHU Fattouma Bourguiba de Monastir. Congrès National de la Société Tunisienne de Pathologie Infectieuse, 1.
- **Birkinshaw, J.h., Bracken, A et Raistrick, H. (1943).** Studies in the biochemistry of micro-organism : 72. Gentisyl alcohol (2 : 5-dihydroxybenzyl alcohol) a metabolic product of *Penicillium patulum*. *Biochem Journal*, 37(6), 1943. 726.
- **Boonzaaijer, G., Bobeldijk, I et Van Osenbruggen, W. A. (2005).** Analysis of patulin in Dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*, 16(7), 587.
- **Borkowska, B et Escoula, L. (1977).** Production de la Patuline en milieu liquide par des moisissures appartenant aux genres : *Aspergillus* et *Penicillium*. *Annales des recherches vétérinaires*, 8 (2), 129-13

- **Boudih, S. (2011).** Identification des moisissures et leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Thèse de doctorat : Science de la Vie et de la Santé. Paris : Université Paris EST, 186 p.
- **Boulet, L. P., Turcotte, H., Laprise, C., Lavertu, C., Bédard, P. (1997).** Comparative Degree and Type of Sensitization to Common Indoor and Outdoor Allergens in Subjects with Allergic Rhinitis and/or Asthma. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 27 (1), 52.
- **Brackett, R.E et Math, E.H. (1979).** Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patuline from buffer solution and apple juice. *Journal of food protection*, 42 (11), 864-8666.
- **Brauner, M. (2006).** Infections pulmonaires aiguës graves. *Journal de Radiologie*, 87 (10), 1227.
- **Bravin, F. (2008).** Étude du métabolisme et du transport de composés exogènes grâce à l'enrichissement isotopique uniforme au ¹³C. Thèse de doctorat: Science de l'ingénieur. Paris : Ecole Centrale des Arts, 282 p.
- **Brochard, G et Bacle, C. (2009).** Mycotoxines en milieu de travail. I. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. *Document pour le médecin du travail*, 129, 130-136.
- **Capinov. (2022).** Les mycotoxines [En ligne]. (page consultée le : 07/06/2022). Disponible sur : (<https://www.capinov.fr/>).
- **Carughi, A., Feeney, M., Kris-Etherton, P., Fulgoni, P., Kendall, C. (2016).** Pairing nuts and dried fruit for cardiometabolic health. *Nutrition Journal*, 15, 23.
- **Catana, M., Catana, L., Lonescu, v. (2010).** Evaluation of patulin contamination of apple juice, using high performance liquid chromatography. *Chem Bull "Politehnica Univ"*, 55, 186-188.
- **Ciegler, A., Beckwith, A et Jackson, L. (1976).** Teratogenicity of patulin adducts formed with cysteine. *Apple and Environmental Microbiol*, 31(5), 664-667.
- **Ciegler, A., Vesonder, R. F et Jackson, L. K. (1977).** Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Applied and environmental microbiology*, 33(4), 1004-1006.

- **Ciuma, C., Mulamba, T., Otono, B., Beaudouin, N., Nkate, M., Mukendi, J., Chantal, M et Hussaini, A. (2022).** Les Mycotoxines dans les Aliments Consomment à Kinshasa, République Démocratique du Congo (RDC). 2410-4299.
- **Dauda, w et Zarafi, A. (2019).** Exploring the importance of fungi in agricultural biotechnology. International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicin, 7(1), 6-7.
- **Davet, P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Paris : 396 p.
- **Dendouge, W. (2006).** Isolement et identification des moisissures productrices de protéase à partir de milieu externe. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Thèse de doctorat : Science de la vie et de la nature. Université de Constantine 1.
- **Diakit, A., Goulibi, M., Kouassi, D., et Aboua, J. (2017).** Détermination de la contamination par l'aflatoxine B1 de la pâte d'arachide consommée par la population en côte d'Ivoire : intérêt de la chromatographie sur couche mince. International journal of biological and chemical science, 11(4), 1646-1654.
- **Dombrink-Kurtzman, M et Engberg, A. (2006).** *Byssochlamys nivea* with patulin-producing capability has an isoeoxydon dehydrogenase gene (idh) with sequence homology to *Penicillium expansum* and *P. griseofulvum*. Mycological Research, 110(9), 1111-1118.
- **Dossa, J., Togbe, E., Pernaci, M., Agbosou, E et Ahohuendo, B. (2019).** Effet des facteurs de l'environnement sur les *Fusarium* pathogènes des plantes cultivées. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 13 (1), 493-502.
- **Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. et Giffel, M. C. (2008).** Occurrence of Mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. Journal of dairy science, 91(11), 4261-4271.
- **Drusch, S., Kopka, S et Kaeding, J. (2007).** "Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid." Food Chemistry, 100(1), 192-197.
- **Dupaigne, P. (1978).** Les mycotoxines et les fruits. Fruits, 33(2), 7-8.
- **Egbuta, M., Mwanza, M et Babalola, O. (2016).** A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. Advances in Microbiology, 6 (14), 1140-58.

- **El Khoury, A. (2007).** Champignons mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : occurrence et origine. Thèse de doctorat : Science de la Vie. Beyrouth : Ecole Doctorale Science et la Santé, 213 p.
- **Fernández-Cruz, M., Mansila, M et Tadeo, J. (2010).** Mycotoxins in fruits and their processed products : Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), 113-122.
- **Firmin, S. (2011).** Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Thèse de doctorat: Nutrition et science des aliments. Université Blaise Pascal, 193 p.
- **Funes, G. J et Resnik, S. L. (2009).** Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control*, 20(3), 277-280.
- **Gangneux, J., Camus, C et Philippe, B. (2008).** Épidémiologie et facteurs de risque de l'aspergillose invasive du sujet non neutropénique. *Rêve des Maladies Respiratoires*, 25 (2), 139-53.
- **Gauthier, A. (2016).** Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de mémoire : Pharmacie. Paris : Université de Bordeaux, 132 p.
- **Guiraud, J. (2012).** Microbiologie alimentaire : Industries agroalimentaires. Dunod : 696 p.
- **Halewyn, M., Leclerc, J., King, N., Bélanger, M et Legris, M. (2003).** Moisissures en milieu intérieure et risque pour la santé. Institut National de la Santé Public, 4-8.
- **Heit, S. (2015).** Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF [en ligne]. Thèse de doctorat : pharmaceutiques. Université de Lorraine. (Page consultée le : 22/04/2022). Disponible sur : (<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01731674/document>).
- **Hocking, A.D. (2006).** Food Spoilage Microorganisms : 17 - *Aspergillus* and related teleomorphs. Blackburn. 451-487. - (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition).
- **Hoff, J. A., Klopfenstein. N.P., McDonald. J. I., Tonn. J. R., Kim. M. S. (2004).** Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology*, 34(4), 255-271.
- **Houissa, H. (2020).** Les mycotoxines du mil : occurrence et flore fongique. Thèse de doctorat : Sciences Biologiques. Tunisie : Ecole doctorale GAIA, 259 p.

- **INPN. Inventaire National du Patrimoine Naturel. (1971).** *Byssochlamys nivea* Westling, 1909 [En ligne]. (page consultée le 20/04/2022). Disponible sur : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/45919/tab/taxo).
- **Jackson, L.S., Hlywla, J.J., Senthil, K.R. (1996).** Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B2 in an aqueous system. *J, Agric. Food Chem*, 44, 1984-1987.
- **Jacquet, J., Boutibonnes, Ph et Cicile, J.P. (1963).** Observations sur la toxicité d'*Aspergillus clavatus* pour les animaux. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 116 (4), 199-208.
- **Journal Officiel de l'Union Européenne. (2006).** la prévention et la réduction des toxines du *Fusarium* dans les céréales et produits céréaliers [en ligne]. (Page consultée le 15/05/2022). Disponible sur: https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fpshealth_theme_file/recommandation_2006_583_commission_17_08_2006_fr.pdf).
- **Kirk, P., Cannon, P., David, J et Stalpers, J. (2001).** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi: 9th Edition. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi [en ligne], (9), (Page consulter le 05/04/2022). Disponible sur : <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013144931>).
- **Koraichi, F. (2012).** Etude in vivo/In vitro de l'effet de la Zéaralénone sur l'expression de transporteurs ABC majeurs lors d'une exposition gestationnelle ou néonatale. Thèse de doctorat: Science de la santé. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1, 433 p.
- **Laater, M., Kenioua, O., Kissoum, M et Akroum, S. (2008).** *Penicillium* producteurs d'antibiotiques. Thèse de doctorat : Biologie Moléculaire et Cellulaire. Jijel : Faculté de la Science et la Vie, 59 p.
- **Lahouar, A. (2016).** Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysologiques. Thèse de doctorat : Science biologiques et Biotechnologie. Tunisie : Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, 225 p.
- **Laville, E. (1994).** La protection des fruits tropicaux après récolte [en ligne]. (Page consultée le 13/04/2022). Disponible sur : <https://www.quae.com/produit/89/9782759214655/la-protection-des-fruits-tropicaux-apres-recolte>).

- **Leslibraires, F. (1999).** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion des risques. Section de l'Alimentation et de la Nutrition. 320 p.
- **Leyral, G et Vierling, E., (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments hygiène. 272 p.
- **Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Héctor. A., Ruiz, J., Ascacio-Valdés, M., Aguilar-Gonzalez, M. (2017).** *Rhizopus Oryzae* – Ancient Microbial Resource with Importance in Modern Food Industry. International Journal of Food Microbiology, 257, 110-27.
- **Luciano-Rosario, D., Keller, N et Jurick II, W. (2020).** *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. Molecular Plant Pathology, 21 (11), 1391-1404.
- **Makhlouf, J. (2019).** Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique. Thèse de doctorat : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Université de Toulouse INP, 142 p.
- **Martins, M. L., Gimeno, A., Martins, H. M et Bernardo, F. (2002).** Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. Food additives et contaminants, 19(6), 568-574.
- **Meng, J et Doyle, M.P. (2002).** Introduction. Microbiological food safety. Microbes and infection, 4 (4), 395-397.
- **Méric, L. (2011).** Qualité de l'air dans les espaces de conservation : impact des moisissures sur la santé. Musées, Patrimoine et Culture Scientifiques et Techniques, 55-61.
- **Mokobi, F. (2021).** *Aspergillus fumigatus*- An Overview [En ligne]. (page consultée le 13/04/2022). Disponible sur : (<https://microbenotes.com/aspergillus-fumigatus/>).
- **Monbaliu, S., Zhang, D., Van Peteghem, C et Saeger, S. (2010).** Multimycotoxin UPLC– MS/MS for tea, herbal infusions and the derived drinkable products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(24), 12664-12671.
- **Moukas, A., Panagiotopoulou, V et Markaki, P. (2008).** Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. Food Chemistry, 109 (4), 860-867.
- **Naturelle, M. (2019).** *Byssochlamys nivea* Westling, 1909 [En ligne]. (page consultée le : 11/04/2022). Disponible sur : (https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/45919).

- **Organisation des Nations Unies Pour l’Alimentation et l’Agricultures. (1979).** Pratiques recommandées pour la prévention des mycotoxines dans les produits alimentaires et fourragers [en ligne]. (Page consultée le : 03/05/2022). Disponible sur : (https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/28953/RPPM_FR.pdf?sequence=3&isAllowed=y).
- **OMS. Organisation Mondiale de la Santé. (2018).** Les mycotoxines.
- **Ostry, V., Skarkova, J et Ruprich, J. (2004).** Occurrence of *Penicillium expansum* and patulin in apples as raw materials for processing of foods — case study. *Mycotoxin Research*, 20 (1), 24-28.
- **Oswald, I et Forget, F. (2018).** Les intoxications alimentaires [en ligne]. Les mycotoxines (consultée le 5/04/2022). Disponible sur : (<https://www.afis.org/Les-mycotoxines>).
- **Oswald, I et Parent-Massin, D. (2020).** Mycotoxines : incidences sur la sécurité sanitaires des aliments. *Paysans societe*, 382 (4), 44-50.
- **Palaty, C et Shum, M. (2012).** Effet de l’exposition aux moisissures ou à l’humidité en milieu intérieur sur la santé. Rapport complet. Vancouver, BC Centre de collaboration nationale en santé environnementale, 8.
- **Percebois, G., Basile, A et Schwertz, A. (1975).** Existence commune, sur les fraises, d'ascospores de *Byssochlamys nivea* pouvant produire de la patuline. *Mycopathologia*, 57 (2), 109-111.
- **Pitt, J et Hocking, A. (2009).** Introduction. In *Fungi and Food Spoilage*, 1-2.
- **Puel, O., Tadriss, S., Galtier, P., Oswald, I et Delaforge, M. (2005).** *Byssochlamys nivea* as a Source of Mycophenolic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1), 550-553.
- **Quellien, J. (2002).** Les mycotoxines. France : Institut National de la Recherche Agronomique. 15 p.
- **Ramón-Carbonell, M et Torres, S. Penicillium digitatum sur l’orange. (2021).** [photo]. Unveiling the Role Displayed by *Penicillium digitatum* PdMut3 Transcription Factor in Pathogen–Fruit Interaction. *Journal of Fungi*, 7 (10), 828.
- **Roach, J. A., Yurawecz, M. P., Kramer, J. K., Mossoba, M. M., Eulitz, K et Ku, Y. (2000).** Gas chromatography—High resolution selected-ion mass spectrometric identification of trace 21: 0 and 20: 2 fatty acids eluting with conjugated linoleic acid isomers. *Lipids*, 35 (7), 797-802.

- **Royer, G et Tap, J. (2004).** Les mycotoxines [en ligne]. (Page consultée le 04/05/2022). Disponible sur : http://julientap.free.fr/travail_fichiers/les_mycotoxines.pdf.
- **Salimi, O, (2011).** Impact sanitaire des moisissures de l'environnement domestique dans la wilaya de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer. Thèse de doctorat : Pharmaceutique. Faculté de Médecine et de Pharmaceutique de Rabat. 255 p.
- **Salomao, B., Aragão, J., Churey, J., Padilla-Zakour, J.A et Worobo, R.W. (2009).** Influence of storage temperature and apple variety on patulin production by *Penicillium expansum*. Journal of Food Protection, 72 (5), 1030-1036.
- **Schebb, N. H., Faber, H., Maul, R., Heus, F., Kool, J. (2009).** Analysis of glutathione adducts of patulin by means of liquid chromatography (HPLC) with biochemical detection (BCD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Analytical and bioanalytical chemistry, 394 (5), 1361-1373.
- **Scott, R. P. W., Scott, C. G., Munroe, M et Hessjr, J. (1974).** Interface for on-line liquid chromatography—mass spectroscopy analysis. Journal of Chromatography A, 99, 395-405.
- **Solomon, L., Tomii, V et Dick, A. (2019).** Importance of Fungi in the Petroleum, Agro-Allied, Agriculture and Pharmaceutical Industries, 12, 8-15.
- **Sorenson, W. G., Gerberick, G. F., Lewis, D. M et Castranova, V. (1986).** Toxicity of Mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro. Environmental Health Perspectives, 66, 45-53.
- **Spadaro, D., Ciavorella, A., Frati, S., Garibaldi, A et Gullino, M. L. (2007).** Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. Food Control, 18(9), 1098-1102.
- **Stachel, H. D. (1963).** Übery-Alkyliden-tetronsäuren, I. Archiv Der Pharmazie, 296(7), 479-487.
- **Tabatabaie, F., Mortazavi, S. A., Tabatabaee, F et Ebadi, A. G. (2010).** Reduction of patulin in apple juice after treatment with SO₂ and heat. Indian J Sci Technol, 3, 596-720.
- **Tannous, J. (2015).** Patuline mycotoxine de *Penicillium expansum*, principale pathogène post-récolte des pommes : nouvelle données sur sa biosynthèse et développement d'approches préventive. Thèse de doctorat : Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition. Université de Toulouse, 208 p.

- **Thakur, M. (2020).** Fungi as a Biological Tool for Sustainable Agriculture. In *Agriculturally. Important Fungi for Sustainable Agriculture*, 1, 25-73.
- **Deshpande, S. (2002).** Handbook of Food Toxicology [en ligne]. (Page consulter le : 03/05/2022). Disponible sur :(<https://www.routledge.com/Handbook-of-Food-Toxicology/Deshpande/p/book/9780824707606>).
- **Trucksess, M. W et Tang, Y. (1999).** Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *Journal of AOAC International*, 82 (5), 1109-1113.
- **Twarużek, M., Soszczyńska, E et Kwiatkowska, J. (2021).** Molds in Food Spoilage : In *Encyclopedia of Mycology*. Oxford :édité par Óscar Zaragoza et Arturo Casadevall, 208-214 p.
- **Verhoeff, A et Burge, H. (1997).** Health Risk Assessment of Fungi in Home Environments. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 78 (6), 544-56.
- **Vermeulen, F., Nolard, N., Fonteyne, P et Masy, N. (2011).** L'allergie aux moisissures. *Medi-Sphere*, 376, 20-22.
- **Waksmann, S.A et Horning, E.S. (1943).** Distribution of antagonist fungi in nature and their antibiotic action. *Mycologia*, 47-65.
- **Welke, J. E., Hoeltz, M., Dottori, H. A et Noll, I. B. (2009).** Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector. *Food Additives and Contaminants*, 26 (5), 754-758.
- **Zaidi, Z., Boubguira, K et Meradi, L. (2021).** Les Intoxications alimentaires d'origine bactérienne. Thèse de doctorat : Science de la vie et de la nature. Université Oum El Bouaghi, 288 p.
- **Zain, M. (2011).** Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15 (2), 129-144.
- **Zhao, M., Shao, H., He, Y et Li, H. (2019).** The determination of patulin from food samples by using dual-dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography*, 11(25), 121-714.

Sites web

1. (<https://forum.mikroskopia.com/topic/11835-penicillium-expansum/>). Consultée le 13 Avril 2022.
2. (https://www.researchgate.net/figure/Camembert-cheese-Source-https-wwwsciencedirectcom_fig1_342286512). Consultée le 31 Mars 2022.
3. (<http://www.freepng.fr/png-wx1i5e/>). Consultée le 25 Avril 2022.
4. (<https://www.alamyimages.fr/la-zearalenone-zen-molecule-de-mycotoxines-produites-par-certaines-especes-de-fusarium-et-la-fusariose-formule-topologique-image151210233.html>). Consultée le 3 May 2022.
5. (https://www.researchgate.net/figure/Structure-de-lOchratoxine-A-Ringot-et-al-2006_fig1_305280691). Consultée le 10 May 2022.
6. (<http://coproweb.free.fr/mycoweb/indexmyc.htm>). Consultée le 15 May 2022.
7. (<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/penicillium-expansum>). Consultée le : 26 May 2022.
8. (<https://microbenotes.com/aspergillus-clavatus/>). Consultée le 13 May 2022.
9. (<https://alchetron.com/Byssochlamys>). Consultée le : 20 May 2022.
10. (<https://theory.labster.com/hplc-principles-fr/>). Consultée le 15 May 2022.
11. (https://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato_gaz1.html). Consultée le 25 May 2022.
12. (https://blog_fr.interchim.com/guide-chromatographie-couche-mince-ccm/). Consultée le 29 May 2022.
13. (https://oatao.univ-toulouse.fr/15722/1/Tannous_1.pdf). Consultée le 1 Juin 2022.
14. (<https://pubag.nal.usda.gov/download/2461/pdf>). Consultée le 4 Juin 2022.

Année Universitaire : 2021-2022

Présenté par : AKSAS Rayene

MEHAOUCHI Amira

Thème : Etude générale sur la Patuline

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la toxicité des mycotoxines responsables de l'altération des fruits et des légumes spécifiquement la patuline et proposer des stratégies de contrôle et de prévention pour assurer la sécurité humaine et animale.

Pour cela la première partie de ce travail a porté un aperçu général sur les moisissures contaminant les fruits et légumes, leurs intérêts industriels dans différents secteurs et leurs effets toxiques sur la santé humaine. La deuxième partie vise à définir les principales mycotoxines présentes dans les fruits et légumes ainsi que les différentes souches fongiques productrices de la Patuline. Malgré le rôle de cette mycotoxine dans les biotechnologies, elle demeure un grand problème dans l'altération de ces aliments qui provoque la diminution de rendement quantitatif et qualitatif de la culture des fruits et des légumes et par conséquent sur la santé humaine. Pour cette raison, la troisième partie était consacrée pour l'analyse de cette toxine et les moyens de sa détection.

Mots clés : mycotoxines, Patuline, détection, extraction et purification.

Encadreur : MERGOUUD Lilia (MAA - Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examinatrice 1: ABDELAZIZ Ouided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine1)

Examinatrice 2 : ZERMANE Férial (MAA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

