

N° d'ORDRE :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE  
"HOUARI BOUMEDIENE"  
FACULTE DE CHIMIE



**MEMOIRE**

Présenté pour l'obtention du diplôme de **MAGISTER**  
EN : **CHIMIE**

Spécialité : **METHODES INSTRUMENTALES DE CARACTERISATION**

Par : **BENAYAD Tahar**

**IDENTIFICATION DES ESPECES DE MOISSURES OCHRATOXINOGENES  
DANS LE JUS DE RAISIN ET ANALYSES DE L'OCHRATOXINE A (OTA) PAR  
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE AVEC DETECTION  
FLUORIMETRIQUE.**

Soutenu le 21 Juillet 2008, devant le Jury composé de:

Mr. GUERMOUCHE M.Hassan	(Professeur FC - USTHB)	Président
Mr. AKRETCHÉ Djamel Eddine	(Professeur FC - USTHB)	Directeur de thèse
Mr. TOUABET Abdelkrim	(Professeur FC - USTHB)	Examineur
Mr. SEBIH Said	(Professeur FC - USTHB)	Examineur
Mr. BOUDAH Soulimane	(Professeur FC - USTHB)	Examineur
Mr. KACI Yahia	(Maître de Conférences FSB - USTHB)	Examineur

## *Dédicaces*

Je dédie ce travail à la mémoire de mon défunt père, que Dieu le Tout-Puissant accorde Sa Sainte Miséricorde. Repose en Paix très cher Père

A ma mère

A mes frères et sœurs  
A mes nièces et mes neveux

A ma famille

## AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé effectué au sein du Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (U.S.T.H.B.) et au Laboratoire Central de Police Scientifique (SDPST-DGSN) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Djamel - Eddine AKRETCHE.

Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour ses conseils très précieux et ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée.

Je remercie la Direction Générale de la Sûreté Nationale pour le soutien financier dans le cadre d'une coopération interministérielle.

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude à M. Ferragh Ali, Sous Directeur de la Police Scientifique et Tehnique.

J'adresse mes remerciements à Messieurs les Professeurs Said SEBIH, Soulimane BOUDAH, Hassan GUERMOUCHE et M. Yahia KACI Maître de Conférences qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Monsieur Abdenour ALIANE, Maître de recherches pour son aide précieuse, ses encouragements et son soutien durant toute la période de ce travail.

Je ne saurais oublier tous les cadres du Département de Sécurité Alimentaire du Laboratoire Central de Police Scientifique pour leur aide et particulièrement Mme Sadadou, Mme Zerrouki, M.Ghermoul et M. Bouayad.

Je tiens à remercier Mme Mazrou pour son aide dans le domaine de la filtration membranaire et pour ses encouragements.

Ma reconnaissance s'adresse également à Mme Ghezlane pour ses conseils qu'elle m'a prodiguée au cours de l'évolution de ce mémoire.

Je souhaiterais également remercier tous les membres du Laboratoire Central de Police Scientifique pour leurs aides et leurs encouragements : en particulier MM. Zekri, Nana, Bouchekal et Mme Denni.

Il m'est particulièrement agréable d'adresser un remerciement très chaleureux au Professeur Guermouche pour ses conseils et son aide concernant les analyses effectuées au sein de son Laboratoire, en Chromatographie Liquide à Haute Performance en mode de fluorescence.

## **Abréviations**

**a<sub>w</sub>** : Activité de l'eau

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**LC /MS** : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

**Da** : Daltons

$\lambda$  : Longueur d'onde

**MEB** : Microscopie Electronique à Balayage

**MF** : Microfiltration

**NF** : Nanofiltration

**ng** : Nanogrammes

**OTA** : Ochratoxine A

**OI** : Osmose Inverse

**PBS**: Tampon Phosphate Buffer Sulfate

**PHE**: Phenylalanine

**RPM** : Rotation Par Minute

**Seuil de coupure** : Seuil de rétention

**TSE** : Trptone Sel Eau

**UF** : Ultrafiltration

**ul**: Microlitres

**UV**: Ultraviolet

# Sommaire

AVANT-PROPOS

Abréviations

## I-Introduction

..... 1

II-Les mycotoxines.....5

III-Les micro-organismes responsables de la production de mycotoxines  
et les conditions de leur développement dans les matrices alimentaires..... 10

III.1.Les mycètes.....10

III.2.Facteurs ayant une influence sur la croissance et la toxinogénèse  
des espèces d'*Aspergillus*..... 11

III.2.1.Influence de l'humidité..... 14

III.2.2.Influence de la température..... 14

III.2.3.Effet du potentiel redox (pH) sur le pouvoir toxigène des  
moisissures..... 15

III.2.4.Impact de la nature du substrat et le temps d'incubation sur la croissance et la production de  
l'Ochratoxine A chez *Aspergillus*..... 15

III.2.5.Autres facteurs..... 15

IV-Ecotoxicogénèse.....17

IV.1.*Aspergillus* contaminants et producteurs d'OTA  
dans la filière raisin..... 18

IV.1.1.Caracteristiques morphologiques et classification des *Aspergillus*..... 19

V- Ochratoxine A.....20

V.1. Les propriétés toxicologiques de l'Ochratoxine A.....20

V.2.Les techniques de détection de l'Ochratoxine A dans  
les denrées alimentaires..... 21

V.2.1.Etape d'extraction..... 22

V.2.2.Etape d'élution..... 23

V.2.3.Limites et réglementation..... 25

VI-Les différents procédés de filtration membranaire..... 26

VI.1.Définition de la membrane..... 26

VI.2.Classification des membranes..... 26

VI.2.1.Classification selon le mécanisme de séparation..... 26

VI.2.2. Classification selon la morphologie.....	27
VI.2.3. Classification selon la géométrie de préparation des membranes.....	27
VI.2.4. Classification selon la nature chimique.....	28
VI.3. Applications des membranes.....	28
VI.3.1. Microfiltration.....	28
VI.3.2. Ultrafiltration.....	29
VI.3.3. Nanofiltration.....	29
VI.3.4. Osmose Inverse.....	29
<b>VII-Matériels et méthodes</b> .....	31
<b>VII.1. Matériels</b> .....	31
VII.1.1. Echantillon de raisin soumis à l'analyse.....	31
VIII.1.2. Liste des Kits utilisés.....	31
VII.1.3. Liste des produits utilisés.....	31
VII.1.4. Appareils utilisés.....	32
VII.1.5. Milieux de cultures .....	32
<b>VII.2. Méthodes</b> .....	35
VII.2.1. Analyse mycologique.....	35
VII.2.1.1. Préparation des dilutions de jus de raisin.....	35
VII.2.1.2. Technique d'isolement des mycètes.....	35
VII.2.1.3. Purification des espèces du genre <i>Aspergillus</i> par la culture monospore.....	35
VII.2.1.4. Identification des espèces du genre <i>Aspergillus</i> .....	36
VII.2.1.4.1. La microscopie photonique.....	37
VII.2.1.4.1.1. Principe.....	37
VII.2.1.4.1.2. Mode opératoire.....	38
VII.2.1.4.2. La Microscopie Electronique à Balayage.....	38
VII.2.1.4.2.1. Principe.....	38
VII.2.1.4.2.2. Mode opératoire.....	40
VII.2.1.5. Conservation des espèces du genre <i>Aspergillus</i> identifiées.....	40

<b>VIII- Extraction et dosage de l'Ochratoxine A</b> .....	41
<b>VIII.1. Préparation de l'échantillon</b> .....	41
<b>VIII.2. Adsorption et élution de l'Ochratoxine A par colonne d'immunoaffinité</b> .....	41
<b>VIII.3. Analyse de l'échantillon de jus de raisin par Chromatographie Liquide à Haute Performance</b> .....	42
<b>IX- Procédé de filtration</b> .....	42
<b>IX.1. Protocole expérimental</b> .....	43
<b>X- Résultats et discussion</b> .....	45
<b>X.1. Isolement et dénombrement de la mycoflore totale</b> .....	45
<b>X.2. Identification de l'espèce aspergillaire</b> .....	45
<b>X.3. Purification des <i>Aspergillus spp</i> par culture monospore</b> .....	46
<b>X.3.1. Calcul de la concentration cellulaire</b> .....	46
<b>X.4. Etude des caractères morphocultureux du genre <i>Aspergillus</i></b> .....	46
<b>X.4.1. Examen macroscopique</b> .....	46
<b>X.4.2. Examen microscopique</b> .....	48
<b>X.4.2.1. Au microscope photonique</b> .....	48
<b>X.4.2.2. Au microscope électronique à balayage</b> .....	51
<b>XI- La filtration membranaire</b> .....	52
<b>XII- Analyse chromatographique</b> .....	54
<b>Conclusion</b> .....	59
<b>Références bibliographiques</b> .....	60
<b>Annexe</b> .....	64

## I - Introduction

La connaissance des mycotoxicoses aiguës humaines est très ancienne. Ainsi, à titre d'exemple, l'ergotisme qui est la plus ancienne mycotoxicose historiquement reconnue à particulièrement sévi du Moyen-Age jusqu'au XVIII ème siècle, en Europe occidentale et centrale. Connue sous le nom de «feu sacré» ou «feu de St Antoine», cette endémie a décimé les populations humaines. Les symptômes caractéristiques de cette mycotoxicose sont des sensations alternées de chaud ou froid, de diarrhée et des vomissements.

L'agent étiologique de cette mycotoxicose est constitué par un ensemble d'alcaloïdes produits par des *Claviceps*, en particulier *C. purpurea*. Ces alcaloïdes sont accumulés dans des petites excroissances (ergots) formées sur les épis de céréales (seigle, orge, avoine) en réaction à leur colonisation par les *Claviceps*, cela se produisant généralement lors d'été très chaud suivant des printemps pluvieux. Les derniers cas de mycotoxicose ont été signalés en Russie (1926), en Irlande (1929) et en France (1953). On peut s'interroger sur le risque de ré-émergence de cette mycotoxicose suite à la diminution de l'emploi de fongicides et autres pesticides en agriculture biologique.

De nombreux autres cas de mycotoxines ont été signalés durant tout le siècle dernier, ainsi on peut citer : Les diverses observations d'intoxication de jeunes enfants ayant consommé du pain moisi, la relation existante entre les vertiges et les maux de tête et l'absorption du pain infecté par le *Fusarium*, constatés chez les individus. Cependant l'intérêt accordé aux mycotoxines ne s'est accru qu'à partir de l'année 1960 ou des intoxications massives dans les élevages en Grande Bretagne par *Aspergillus flavus* furent constatées.

Un grand nombre d'espèces de moisissures appartenant aux trois genres très communs *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, présents dans l'air, le sol, sur les cultures sont capables de synthétiser et excréter des mycotoxines.

Le caractère hautement toxigène des moisissures associées au fait que ces micro-organismes fongiques se développent sur de nombreuses denrées alimentaires à travers le monde, ce qui pose donc un problème d'hygiène alimentaire et de santé publique. Ce problème est d'autant plus préoccupant que dans certains pays comme ceux de l'Afrique centrale où le régime alimentaire se limite à la consommation des aliments qui sont fréquemment contaminés par les moisissures, du fait que cette zone géographique connaît des conditions climatiques favorables au développement de ce type de micro-organismes.

L'étude des mycotoxines est donc liée à l'apparition de ces maladies «mycotoxicose». Ces mycotoxines peuvent être présentées dans des substrats très variés tels que les céréales, les fruits et leur jus, les fruits séchés. L'intoxication se fait par ingestion des denrées alimentaires contaminées.

Une intoxication aiguë est la conséquence d'une ingestion massive de la toxine, elle peut aboutir à la mort après diverses manifestations pathologiques telles que les nausées, les léthargies.

L'intoxication chronique, en revanche, se produit à long terme et se traduit par des infiltrations graisseuses et elle est à l'origine de cancer (**Esteban, 2005**). Un grand nombre d'espèces de moisissures appartenant principalement aux trois genres très communs *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* sont capables, en se développant sur les différentes matrices alimentaires (céréales, raisins, arachides, cafés) de synthétiser et excréter des mycotoxines.

A ce jour, on dénombre au moins 350 espèces de moisissures capables de produire environ 300 mycotoxines. La contamination des denrées alimentaires peut survenir avant, pendant et après la récolte, et notamment au moment du stockage. La palette des effets toxiques des mycotoxines est très étendue : effet cancérigène, mutagènes, tératogènes, immunodépresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotiques. Les organes et tissus-cibles sont très divers : foie, rein, peau, système immunitaire, système nerveux, les glandes endocriniennes, ou des lésions irréversibles peuvent être produites (**Creppy et al., 1991 ; D'Mello et McDonald, 1997; Scudamore et Livesey, 1998**).

Les mycotoxines constituent un problème mondial en économie alimentaire et en santé publique. La FAO (Food and Agricultural Organization) a estimé qu'environ 25 % des récoltes de céréales dans le monde sont probablement affectées par les mycotoxines (**Yiannikouris et Jouany, 2002**). L'éradication du problème des mycotoxines est probablement impossible, car il reviendrait à éliminer des quantités importantes de produits agricoles des circuits de transformation et de distribution, mettant ainsi en danger la suffisance alimentaire. Si certains moyens de prévention et de décontamination contribuent à l'amélioration de la qualité sanitaire des denrées alimentaires, la réglementation et la surveillance doivent également être accentuées. Pour cette raison, des règlements techniques ont été promulgués au niveau international.

Au niveau international, des directives et des réglementations ont été édictées afin de limiter la mise sur le marché de denrées alimentaires contaminées par leurs mycotoxines. Sur le plan mondial, on tente d'harmoniser les législations des différents Etats-membres sur ces toxines à travers l'édification du Codex Alimentarius.

Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi comme substrat d'étude les raisins produits à la périphérie d'Alger, région présentant un climat chaud avec des conditions optimales de développement des moisissures toxigènes (**Pitt, 2000; Varga et Kozakiewicz, 2006**). Ce travail est composé de deux parties. La première consiste à la mise en évidence des moisissures toxigènes spécifiques aux raisins en optimisant les paramètres de culture de cette flore fongique suivie de la purification et de l'analyse qualitative et quantitative de l'Ochratoxine A par CLHP. La deuxième partie est consacrée à l'élimination des spores fongiques par un procédé de décontamination membranaire, permettant ainsi de se débarrasser de ces contaminants sans dénaturation du produit.

## **II - Les mycotoxines**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* qui peuvent contaminer les matières premières et les denrées alimentaires. Ce sont des petites molécules de faibles poids moléculaires (inférieurs à 1000 daltons), peu solubles dans l'eau et difficilement métabolisées par les organismes vivants. De par leur structure chimique (figure 1), elles sont très stables à la chaleur et à l'acidité.

Cette stabilité rend leur élimination et, en conséquence, la décontamination des denrées alimentaires, très problématique. Même après disparition des moisissures, les mycotoxines éventuellement produites peuvent rester sur les matrices alimentaires et être transférées tout le long de la chaîne alimentaire dans les produits dérivés. Les mycotoxines les plus couramment rencontrées et faisant l'objet d'une surveillance régulière sont les Aflatoxines, l'Ochratoxine A, la patuline, les trichothécènes (DON-déoxynivalénol, Zéaralénone....) et les fumonisines. (**Zöllner et Mayer-Helm, 2006**).

En termes de toxicologie alimentaire, il existe six familles de mycotoxines :

Les Aflatoxines : Elles sont réduites aux pays tropicaux et sub-tropicaux.

Les Ochratoxines : Ce sont des mycotoxines principalement néphrotiques issues du stockage.

Les Fumonisines : Ce sont des toxines produites un peu partout dans le monde, et se retrouvent principalement sur le maïs.

La Zéaralénone : C'est une mycotoxine retrouvée principalement sur les céréales.

Les Trichothécènes : Ce sont des mycotoxines des céréales.

La Patuline : C'est une mycotoxine retrouvée généralement dans la pomme.

Les mycotoxines sont des molécules très toxiques pour l'être humain comme pour l'animal. La palette des effets toxiques des mycotoxines est très étendue : effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotiques. Les organes et tissus-cibles sont très divers : foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines où des lésions organiques irréversibles peuvent être produites. (**Tableau 1**)

<b>Organes Mycotoxines</b>	<b>Foie</b>	<b>Reins</b>	<b>Système Nerveux</b>	<b>Glandes Endocrines</b>	<b>Peau</b>	<b>Système immunitaire</b>
<b>Aflatoxines</b>	*	*	*	*		
<b>Ochratoxines</b>	*	*	*			*
<b>Trichothécènes</b>			*		*	*
<b>Trémorgènes</b>			*			
<b>Acide cyclopiazonique</b>	*	*	*			
<b>Zéaralénone</b>		*		*		

**Tableau 1 : Organes cibles des différentes mycotoxines**

Bien que la démonstration en soit complexe, on suppose l'existence d'un effet synergique des mycotoxines d'autant plus que les denrées alimentaires sont souvent contaminées par plusieurs mycotoxines.

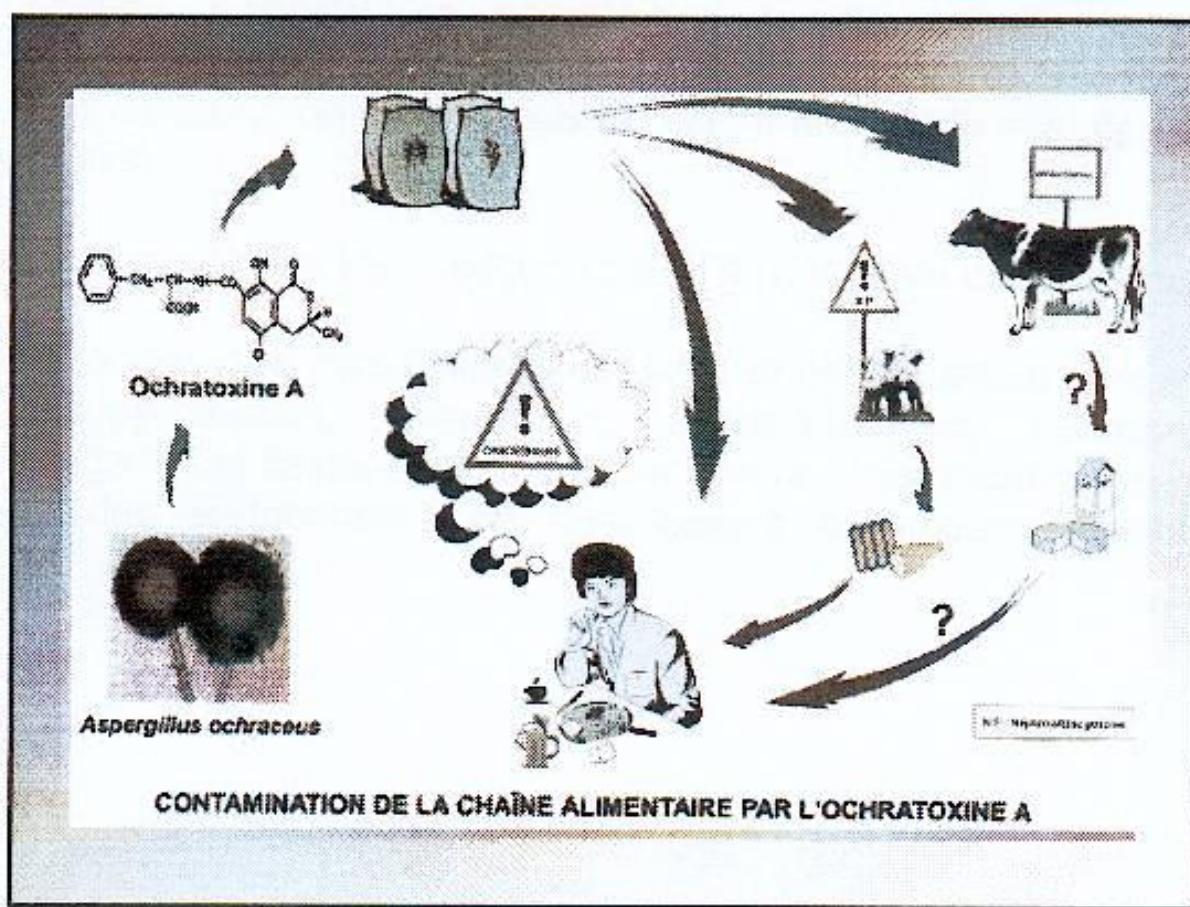
Les mycotoxines peuvent être responsables d'épisodes d'intoxication aiguë d'évolution éventuellement mortelle (mycotoxicose). Chez l'Homme, ce type d'intoxication aiguë reste exceptionnel. Le danger des mycotoxicoses est en général plus pernicieux et résulte d'une exposition chronique à de très faibles quantités sur une période de temps assez longue. Une telle toxicité chronique peut entraîner l'apparition de lésions nécrosantes et/ou dégénératives ou alors l'apparition de tumeurs cancéreuses de divers organes. (**A.Pfohl-Leszkowicz, 1999**).

Concernant le risque de toxicité chronique, le Centre International de Recherche sur le Cancer (**I.A.R.C.**) de l'Organisation Mondiale de la Santé (**O.M.S.**) a évalué à plusieurs reprises la cancérogénicité des mycotoxines. Comme d'autres agents cancérigènes, le CICR a classé les mycotoxines en plusieurs groupes :

- Aflatoxines B et G dans le groupe 1, car il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de ces molécules chez l'Homme et chez l'animal ;
- Aflatoxine M<sub>1</sub>, Ochratoxine A, toxines de *Fusarium moniliforme*, griséofulvine,
- Stérigmatocystine, dans le groupe 2, car il existe des preuves presque suffisantes de cancérogénicité chez l'Homme et/ou des preuves suffisantes chez l'animal ;
- Citrinine, patuline, toxine T-2, Zéaralénone dans le groupe 3 car, en regard des données existantes, il n'est pas possible de se prononcer sur la cancérogénécité de ces molécules chez l'Homme.

L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'Homme s'effectue soit par des denrées consommées directement (arachides, raisins, amandes...) soit indirectement par des produits dérivés (par exemple farine de céréales, jus de raisin) à partir desquels sont élaborés des aliments finis. Mais les mycotoxines peuvent également se transmettre par des produits d'origine animale (laits et produits laitiers, abats.....) si l'animal a consommé une nourriture contaminée par des mycotoxines.

L'exemple du transfert de l'Ochratoxine A dans les produits d'origine végétale et animale est le suivant (**Figure 1**) : l'Ochratoxine A est sécrétée par des moisissures du genre *Aspergillus*. L'Ochratoxine A entre dans la chaîne alimentaire de l'Homme soit par consommation directe de produits contaminés, soit par consommation de produits provenant d'animaux nourris avec des aliments contaminés. On peut en effet trouver de l'Ochratoxine A dans les abats ou dans les préparations charcutières et éventuellement dans d'autres produits d'origine animale (le lait) et végétale (céréales, raisins).



**Figure 1** : Contamination de la chaîne alimentaire par l'Ochratoxine A

Compte tenu de leur toxicité et de leur présence dans les aliments (Steyn, 1995 ; Pitt et al., 2000), les mycotoxines constituent un problème de santé publique (Yiannikouris et Jouany, 2000)

On dénombre aujourd'hui 200 mycotoxines différentes présentant une grande diversité de structures chimiques. La figure 2 contient des exemples de quelques-unes de ces structures. (Zöllner et Mayer-Helm, 2006)

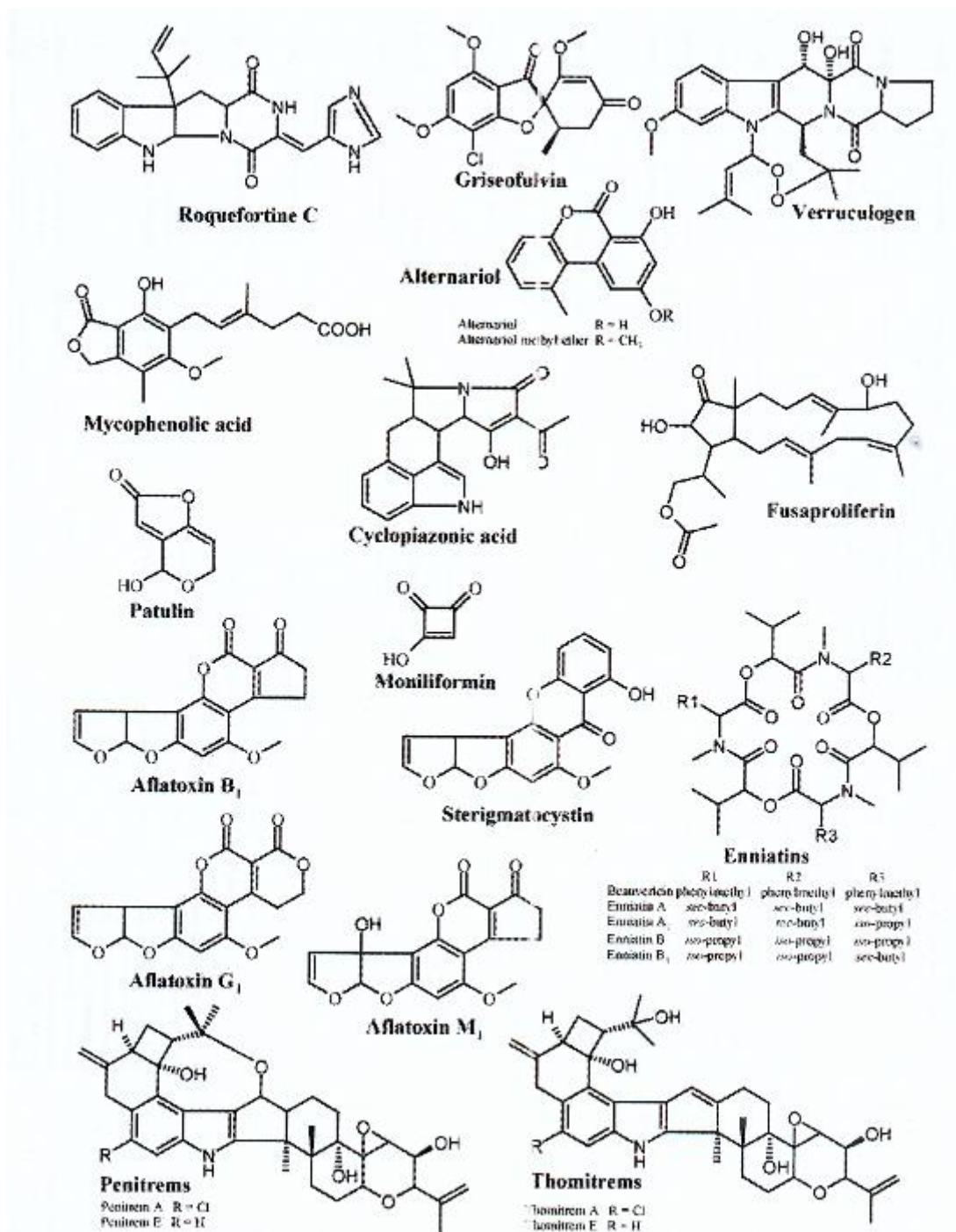


Figure 2 : Structure des différentes mycotoxines

Les mycotoxines produisent divers effets biologiques chez les animaux tels que les effets cancérigènes, tératogènes, hallucinogènes, émétiques et oestrogènes. L'homme et les animaux peuvent être exposés aux mycotoxines par l'ingestion de produits alimentaires contaminés par les toxines, par inhalation ou par contact cutané.

La présence des mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine peut être le résultat :

- de la contamination directe par des champignons et cultures, de matières premières, de produits manufacturés ou de produits finis.
- de la contamination de produits animaux provoquée par la contamination de l'aliment consommé par l'animal.

### **III - Les micro-organismes responsables de la production de mycotoxines et les conditions de leur développement dans les matrices alimentaires**

#### **III.1. Les mycètes**

Les moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles. Ils sont multicellulaires mais la notion de cellule est assez floue car leur structure est généralement cénocytique. Ce sont des champignons filamenteux appartenant à la classe des Ascomycètes dont les colonies se présentent sous forme duveteuse, et un thalle mycélien, formé de tubes plus ou moins ramifiés et cloisonnés (hyphes). Ces organismes possèdent deux types de reproduction : reproduction végétative toujours présente et reproduction sexuée qui n'existe que pour certaines espèces.

Les moisissures ont une répartition mondiale, ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost et les denrées alimentaires. Ils sont présents dans l'environnement, notamment dans les plantes, les fruits, la poussière et l'air (**Yiannikouris et Jouany, 2002**).

Il existe un grand nombre de mycomycètes pouvant sécréter des mycotoxines, parmi lesquels on peut citer : Le groupe des *Aspergillus* et le groupe des *Penicillium*. Le potentiel toxigène est quantitativement variable d'un groupe à un autre et d'une souche à une autre d'une même espèce, (**Lacey, 1986**) en cultivant les différentes souches d'un même groupe comparativement sur un même substrat et dans les mêmes conditions, la production de toxines diffère suivant les souches.

Cette variabilité de la toxinogénèse est due particulièrement à la nature de la souche, plus spécifiquement à ses caractères morphologiques et génétiques, aux conditions de croissance et de développement de celle ci (**Cast, 2003**).

Les *Aspergillus* et les *Penicillium* sont des moisissures très répandues dans les produits végétaux, agents de dégradation surtout des fruits et légumes (Pitt et al ; 2004). Ils sont d'autant plus indésirables que certaines espèces ont un pouvoir toxigène. D'autres espèces sont des agents technologiques précieux soit par leur métabolisme fermentaire (aérobie) par exemple la production d'acide citrique ou d'acide gluconique par *Aspergillus niger*, soit par leurs activités enzymatiques surtout protéolytiques et lipolytiques, par exemple en fromagerie pour l'affinage par *Penicillium roqueforti* et *Penicillium camemberti*, soit pour leur activité protectrice par exemple sur les salaisons sèches par *Penicillium nalgiovense* (**Guiraud, 2003**).

Les *Aspergillus* sont poudreux ou duveteux de couleur variable : blanc, vert, brun à noir. Ils se caractérisent par la formation d'organes de reproduction asexuée : les têtes aspergillaires. Le conidiophore de longueur variable se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule. A partir de celle-ci se forment des phialides soit directement, soit par l'intermédiaire de métules. Les phialides forment des conidies unicellulaires, basipétales disposées en chaînettes. Quelques espèces produisent des cléistothèces.

D'autres moisissures sont utilisées pour la production d'enzymes (**Berdy, 1995; Strohl, 1997**) et de métabolites dont les antibiotiques (Pénicilline, griséofulvine, etc), (**Carlile et Watkinson, 1997 ; Kiffer et Morlet, 1997 ; Perry et al., 2004**) ainsi que pour des bioconversions (stéroïdes).

Les moisissures toxigènes peuvent envahir les produits agricoles pendant la croissance des végétaux ou la moisson. La contamination est due aux fragments de conidies ou de mycélium présent dans l'environnement. La présence de grand nombre de spores ou de fragments de conidies et de mycélium dans des produits qui ne sont pas visiblement moisissus peut être le signe d'une contamination générale de l'environnement, d'une part, ou du traitement de matières premières moisissus, d'autre part. La croissance des champignons n'a lieu que dans des conditions favorables. Les champignons ont besoin de divers nutriments pour leurs besoins énergétiques. Ne pouvant pas synthétiser les glucides, le substrat doit apporter ces composés. La plupart des denrées alimentaires contiennent les nutriments nécessaires au développement des moisissures et peuvent donc servir de substrat.

Un grand nombre de métabolites se forment pendant la décomposition des glucides. Ils comprennent ceux qui sont toxiques pour l'homme et les animaux (les mycotoxines) et ceux qui sont toxiques pour les micro-organismes (les antibiotiques). Les champignons qui produisent habituellement des mycotoxines sont au nombre de 150. Le **tableau 2** donne quelques exemples de certaines moisissures et de leurs mycotoxines. (**FAO : Alimentation et nutrition, 1992**)

<b>Espèces de champignons</b>	<b>Toxines</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocystine
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxines
<i>Fusarium roseum</i>	Zéaralénone
<i>Fusarium tri chothécènes</i>	Trichothécécènes

**Tableau 2 : Les moisissures toxigènes et leurs toxines**

Ce sont des champignons phytopathogènes et cosmopolites, largement retrouvés dans le sol et les végétaux en décomposition, responsable de la pourriture des pommes et des poires. Rarement pathogène chez l'homme il peut attaquer certains insectes (vers à soie). Il peut provoquer de rares onychomycoses. Leur diagnostic se repose sur :

- La présence de filaments hyalins cloisonnés, ramifiés, de diamètre constant à l'examen direct ;
- La culture : apparition rapide de colonies d'aspect granuleux et de couleur ocre caractéristique sur milieu de Sabouraud chloramphénicol ou sur milieu de Czapek.

L'examen microscopique permet une identification précise par les caractéristiques de la tête aspergillaire. La croissance de ce groupe de moisissures est rapide sur milieu de Sabouraud avec ou sans Actidione, PDA ou sur milieu de Czapek.

La colonie est granuleuse et de couleur jaune ocre caractéristique. Le revers est brun jaunâtre. Le conidiophore est long (1500  $\mu\text{m}$ ), échinulé et de couleur jaune à brun. La vésicule terminale est globuleuse. La tête aspergillaire est bisériée le plus souvent et de forme radiaire. Les phialospores sont globuleuses, lisses ou discrètement rugueuses et de 2,5 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre. La production de sclérotes est assez fréquente dans les vieilles cultures. Ils sont incolores au début, puis deviennent violacés à pourpres.

### **III.2. Facteurs ayant une influence sur la croissance et la toxinogénèse des espèces d'*Aspergillus***

Outre la présence de nutriments, les facteurs les plus importants pour la croissance et la production de mycotoxines sont l'oxygène, la température, l'activité de l'eau, la nature et l'état du substrat.

### **III.2.1. Influence de l'humidité**

Il est certain que le facteur le plus important qui régit la croissance de l'*Aspergillus* est l'humidité, ou plus précisément l'humidité relative à l'équilibre (H.R.E). Ces micro-organismes ont besoin d'un niveau optimal d'H.R.E (supérieur à 80 %) au-dessous duquel ils ne peuvent se développer. La valeur d'HRE dépend de la température ambiante et du substrat sur lequel se développe la flore fongique. La connaissance de cette valeur d'humidité pour chaque type de substrat est importante, car en ramenant par séchage les denrées alimentaires à des valeurs d'humidité légèrement inférieures aux taux minimums déterminés, on évitera ainsi tout risque de développement fongique.

Au lieu du taux d'humidité, la disponibilité en eau ( $A_w$ ) d'une substance est utilisée pour exprimer, les besoins du champignon. L' $A_w$  est définie comme étant le rapport de la tension de vapeur du produit et celle de l'eau pure. Ce paramètre tient compte de l'équilibre de l'eau disponible entre le substrat et l'air ambiant, à une température donnée. Plus l' $A_w$  est faible, moins il y'aura d'eau disponible pour la croissance des mycomycètes. Pour les *Aspergillus*, la croissance optimale se situe entre 0,72 et 0,9.

### **III.2.2. Influence de la température**

La température joue également un rôle prépondérant sur la croissance et la toxinogénèse des espèces *Aspergillus*, cette température optimale se situe entre 25 et 30°C suivant la nature du substrat sur lequel se développe les moisissures. Si la flore fongique se développe dans un domaine de température assez large, les spores sécrétées par les mycomycètes résistent à ces conditions de températures beaucoup plus rigoureuses et ceci pendant des temps très longs, ce qui explique le cas de la recontamination de certaines denrées alimentaires ayant subi un traitement thermique.

### **III.2.3.Effet du potentiel redox (pH) sur le pouvoir toxigène des moisissures**

Parmi les facteurs qui peuvent également influencer sur le développement et la toxinogénèse des espèces d'*Aspergillus*. On peut citer le pH du milieu où la croissance est optimale entre 5 et 6. Le pH a un effet critique sur le développement des moisissures et la toxinogénèse. Le pH optimal pour la croissance des champignons se situe entre 2 et 9, à des températures comprises entre 15 °C et 30 °C (Esteban et al., 2005).

La composition de l'atmosphère a également une incidence puisqu'une réduction de la teneur en oxygène entraîne une diminution de la croissance des souches d'*Aspergillus*. Dans le cas de l'Ochratoxine A, plusieurs essais ont été réalisés montrant l'effet des facteurs environnementaux et leurs interactions sur la croissance fongique et la production de l'OTA (Esteban, 2005 ; Pardo et al., 2004 ).

### **III.2.4.Impact de la nature du substrat et du temps d'incubation sur la croissance et la production de l'ochratoxine A chez *Aspergillus***

Les besoins nutritionnels de croissance d'*Aspergillus* se limitent aux sources de carbone, d'azote et de sels, ce qui explique que des mycètes puissent se développer sur de très nombreux substrats tels que les produits agricoles, les produits céréaliers, les fruits frais et secs. La nature du substrat influe sur l'expression du pouvoir toxigène des mycomycètes. Des études récentes ont montré que la croissance et la synthèse de l'OTA chez certains *Aspergillus* dépend de l'interaction combinée de la température, du substrat et du temps d'incubation (Chapeland et al., 2005 ; Reboux, 2006)

### **III.2.5.Autres facteurs**

Les facteurs qui affectent la formation de mycotoxines incluent aussi le temps de stockage des denrées alimentaires, la présence d'oxygène et de dioxyde de carbone, la dispersion des spores, la prédominance d'espèces toxigènes et les interactions microbiennes. La présence d'autres micro-organismes, de bactéries ou autres champignons modifient la croissance des moisissures productrices de mycotoxines, ceci est en fait dû à une modification du pH qui, par exemple, lorsqu'il baisse peut inhiber la croissance de certaines espèces d'*Aspergillus* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

De plus l'utilisation des fongicides (Moss et Franck, 1985), et la culture biologique peuvent influencer la production des mycotoxines.

Le **tableau 3** présente l'influence de certains facteurs environnementaux sur la croissance des moisissures toxigènes et la production de certaines toxines.

Espèce ou toxine	pH mini	pH maxi	t° mini (°C)	t° maxi (°C)	a <sub>w</sub> mini
<i>Aspergillus flavus</i>	2	11	10	43	0,80
Aflatoxine	2,5	10	13	37	0,82
<i>A. parasiticus</i>	2	11	12	42	0,80
Aflatoxine	2	8	12	40	0,86
<i>A. ochraceus</i>	2,2	13	8	37	0,77
Ochratoxine	2,2	12	12	37	0,83
Acide pénicillique	2,2	12	10	31	0,81
<i>A. versicolor</i>	3,1	10	9	40	0,76
<i>Penicillium</i>					
<i>citreonigrum</i>	2,2	10	5	37	0,80
Citréoviridine	2,5	10	10	37	0,80
<i>P. citrinum</i>	2,2	9,7	5	40	0,80
Citrinine			15	37	
<i>P. crustosum</i>	2,2	10	2	30	0,90
Penitrem A			17	30	0,92
<i>P. griseofulvum</i>	2,4	9,5	0	35	0,82
Patuline	2,4	9,5	4	33	0,93
<i>P. islandicum</i>	2,1	9,2	10	38	0,83
<i>P. verrucosum</i>	2,1	10	0	31	0,81
<i>Fusarium</i>					
<i>sporotrichoides</i>	2,5	10,6	-2	35	0,88
<i>F. equiseti</i>	3,3	10,4	2	37	0,92
<i>F. graminearum</i>	2,4	10,2	2	45	0,90
<i>F. moniliforme</i>	2,5	10,6	22	28	0,87

**Tableau 3** : Influence des conditions du milieu sur la croissance des moisissures toxigènes et la production de certaines toxines (Guiraud, 2003)

#### **IV-Ecotoxicogénèse**

La connaissance des facteurs qui interviennent dans le développement des moisissures est essentielle pour la compréhension des mécanismes biochimiques de synthèse des mycotoxines (**Yiannikouris et Jouany, 2002**). De ce fait, leur classification peut se faire selon leur voie de biosynthèse en trois groupes (**Steyn, 1980**) qui sont :

- Les composés dérivés des acides aminés : L'alcaloïde de l'ergot, l'acide cyclopiazonique, les sporidesmines, les orgènes, etc.
- Les composés dérivés des terpènes : La toxine T<sub>2</sub>, déoxynivalénol, fusarénone, trémorgènes, etc.
- Les composés dérivés des polycétoacides (polyacétates) : Les ochratoxines, les aflatoxines les fumonisines, la patuline les sterigmatocystines, etc.

Il convient de noter que toutes les souches des mycomycètes (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*) ne sont pas toxinogènes, ainsi sur l'ensemble des souches de moisissures, seul une centaine s'est révélée toxigène. La contamination des produits d'alimentation humaine et animale par les mycotoxines dépend en grande partie des conditions écologiques qui sont propices à la croissance des moisissures et à la production des toxines.

Il a été démontré que l'ochratoxine A est une néphrotoxine puissante chez toutes les espèces animales soumises aux épreuves de toxicité (**Krogh, 1977**). La patuline est un indicateur de procédés de fabrication défectueuse (utilisation de matières premières moisies) plutôt qu'une menace sérieuse pour la santé humaine et animale, ainsi que l'ont révélé des études sur la toxicité aiguë et chronique. La stérigmatocystine est une substance cancérigène qui se développe occasionnellement dans les céréales et dans la croûte des fromages à pâte dure.

Parmi les trichothécènes, la toxine T-2 et le déoxynivalénol produisent un large éventail d'effets toxiques chez les animaux en expérimentation tels que les vomissements, et les hémorragies graves, de plus ces composés sont extrêmement tératogènes et ils perturbent le système immunitaire.

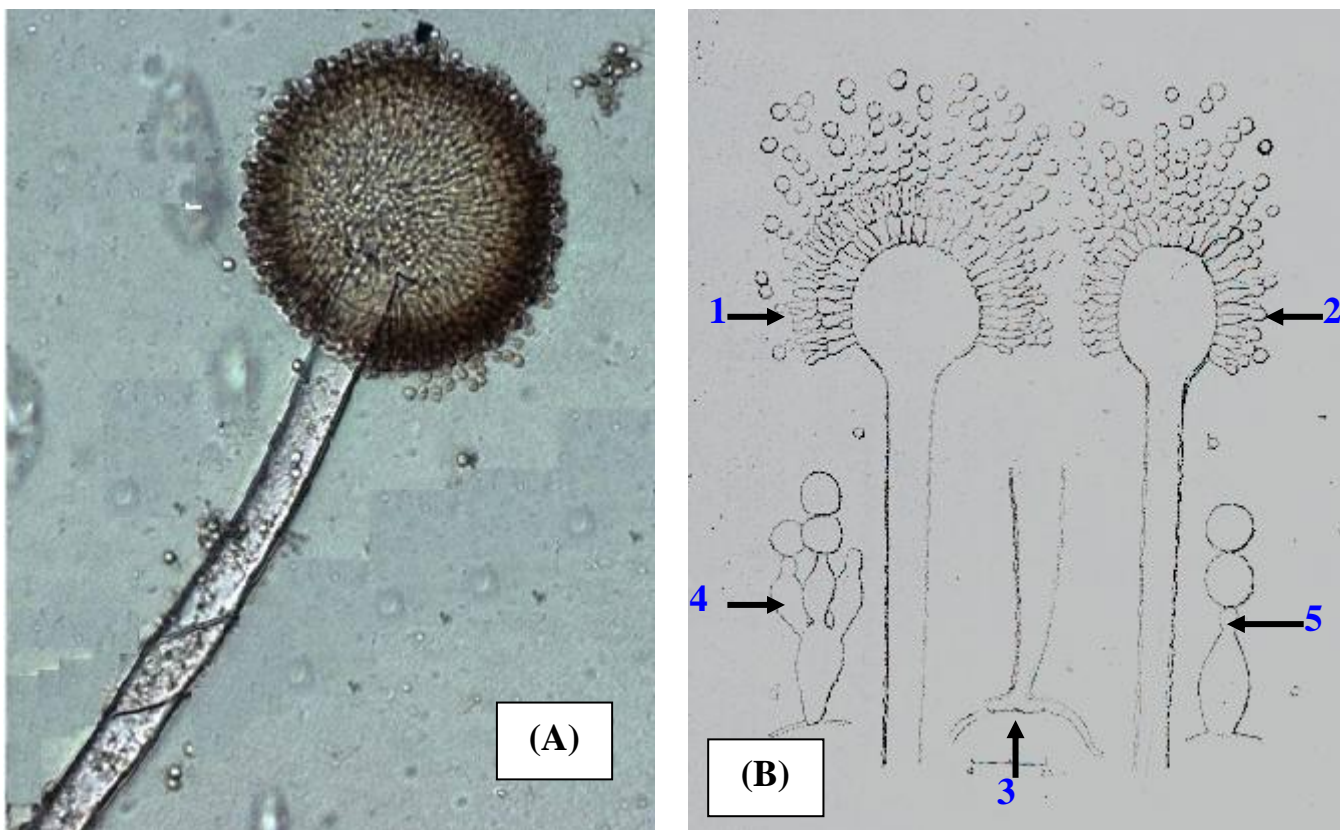
Outre les dangers que font peser sur la santé les mycotoxines, il faut mentionner l'impact négatif sur l'économie des pays en développement, car les technologies applicables pendant la récolte et qui empêcheraient la croissance des moisissures et la production des mycotoxines sont insuffisantes.

#### **IV.1. Aspergillus contaminants et producteurs d'OTA dans la filière raisin**

Les *Aspergillus* (*A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. niger*) sont des contaminants majeurs de certaines denrées alimentaires se développant dans des endroits qui simulent un climat tropical. Parmi les espèces de ce groupe, *A. carbonarius* présente le potentiel ochratoxigénique le plus élevé. *A. ochraceus* peut produire plusieurs métabolites secondaires dont les mycotoxines telles que les ochratoxines A, l'acide pénicillinique, *A. ochraceus* est considéré comme la principale espèce productrice d'OTA dans les climats chauds, de plus *A. niger* peut produire de l'OTA mais à une concentration plus faible par rapport aux *A. carbonarius* et *A. ochraceus*.

#### IV.1.1. Caractéristiques morphologique et classification des *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, de type moisissures, appartenant à la classe des Ascomycètes, dont les colonies se présentent sous forme duveteuse. Le thalle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule. Ils sont constitués d'un pied coiffé d'une tête conidienne sur laquelle sont insérées les phialides, soit directement (phialides unisériées), soit par l'intermédiaire de métules (phialides bisériées) ; à partir de ces phialides naissent les spores (**Figure 3**).

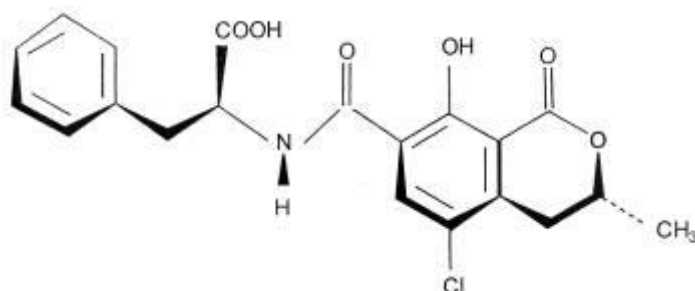


- 1** : Tête sporifère à phialides bisériées
- 2** : Tête sporifère à une seule rangée de phialides
- 3** : Base de conidiophore
- 4** : Détail de phialides bisériées
- 5** : Détail de phialide isolée

**Figure 3** : Observation microscopique d'*Aspergillus* Gx 40 (A) et schéma d'organisation microscopique de l'appareil sporifère d'*Aspergillus* (B)

## V-Ochratoxine A

L'ochratoxine A est produite par des espèces de deux genres de champignons, *Aspergillus* et *Penicillium* qui poussent naturellement dans les denrées alimentaires. Dans le raisin, les agents producteurs d'OTA les plus importants sont *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger*. Parmi les ochratoxines décrites dans la littérature, seule l'ochratoxine A et dans une moindre mesure l'ochratoxine B présentent un risque de toxicité. Elle est synthétisée par la voie des polycétoacides et appartient au groupe des ochratoxines de formule brute  $C_{20}H_{18}ClNO_6$ , de poids moléculaire 403,8. Cette toxine, dont la structure est présentée **figure 4**, est un métabolite secondaire élaboré par diverses moisissures. Il s'agit du 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroiso-coumarine lié à la L-phénylalanine.



**Figure 4 : Structure générale de l'Ochratoxine A**

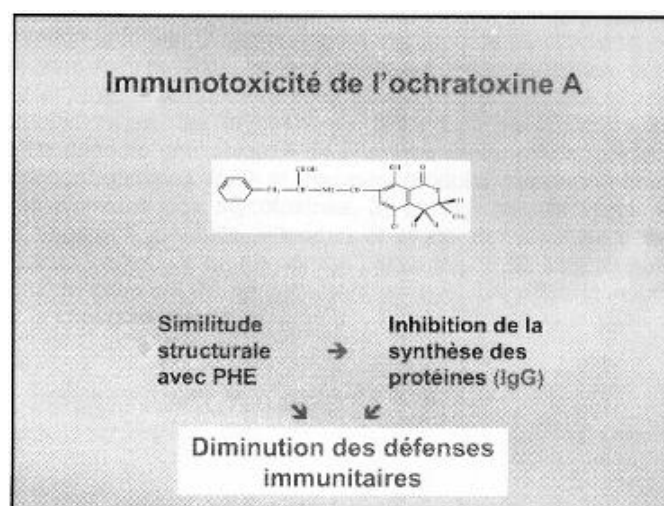
On la retrouve essentiellement dans les céréales, le riz, le soja. On note sa présence également dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain et les pâtes. On la retrouve aussi dans le vin et les jus de raisin (Zimerli et Dick, 1996 ; Hohler et al., 1997). Les concentrations en OTA retrouvées dans les aliments varient de quelques ng/Kg jusqu'à plusieurs dizaines de mg/Kg (Krogh, 1987 ; Kuiper-Goodman et Scott, 1989)

### V.1. Les propriétés toxicologiques de l'Ochratoxine A

L'ochratoxine A est une mycotoxine ayant des propriétés cancérigènes, néphrotoxiques, tératogènes, immunotoxiques et éventuellement neurotoxiques. Elle a également été associée à la néphropathie chez les humains. L'ochratoxine A peut avoir une longue durée de demi-vie chez les humains. Elle résiste aux traitements culinaires ordinaires. (Hussein, 2001).

L'Ochratoxine A a été classée dans le groupe 2B «cancérogène possible» pour l'homme selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (I.A.R.C.) L'immunotoxicité de l'OTA a été démontré in vitro, sur culture de cellules y compris d'origine humaine ou chez l'animal de laboratoire. Un des mécanismes d'immunotoxicité peut être illustré sur la **figure 5** de la manière suivante :

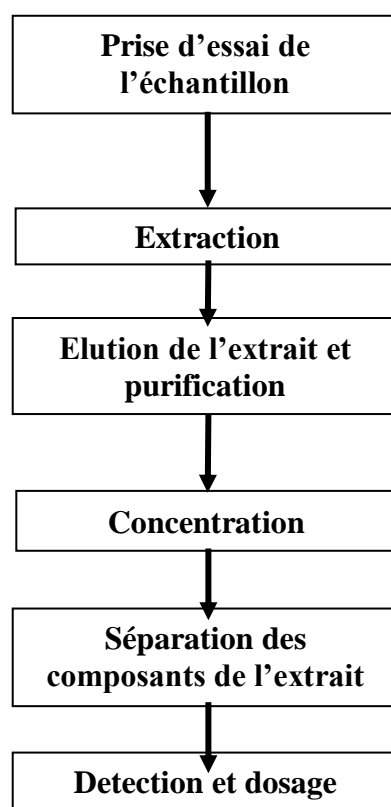
L'OTA renferme un résidu phénylalanine la rendant compétitive avec la phénylalanine libre vis à vis de l'ARN-transférase pour la synthèse de protéines et, en particulier des immunoglobulines de classe G (Ig G). L'action immunodépressive de l'OTA pourrait contribuer à l'instauration du processus tumoral chez l'homme (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**)



**Figure 5 : Immunotoxicité de l'OTA**

## **V.2. Les techniques de détection de l'ochratoxine A dans les denrées alimentaires**

Des méthodes analytiques ont été établies pour la détection et le dosage des mycotoxines. Les méthodes biologiques peuvent se révéler utiles pour la recherche des mycotoxines connues ou inconnues. Cependant si l'on connaît la mycotoxine recherchée, il est préférable de recourir aux techniques d'épreuve chimique car elles sont plus spécifiques et possèdent un seuil de détection plus bas. En règle générale, toutes les méthodes d'analyse utilisées pour la détection et le dosage des mycotoxines comportent les étapes fondamentales indiquées sur la **figure 6**.



**Figure 6 : Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines**

### **V.2.1. Etape d'extraction**

La première étape de l'analyse chimique comporte l'extraction afin de séparer les composants intéressants de l'ensemble des constituants de la matrice. En règle générale les mycotoxines sont extraites avec des solvants organiques comme le chloroforme, l'acétonitrile, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol. Le choix du solvant est dicté par les propriétés chimiques de la toxine à extraire autant que par les propriétés du support.

### **V.2.2. Etape d'élution** (purification et concentration)

Les réactions d'interférences avec les composantes de la matrice à analyser nécessite l'utilisation d'autres techniques de confirmation afin d'éviter les résultats des faux positifs ou la détermination des concentrations en OTA imprécises ou surestimées. En général et indépendamment de la technique appliquée de détection, il est nécessaire de procéder à une extraction et une purification des échantillons par l'utilisation des colonnes SPE ou d'immunoaffinités (**L.Monaci et al., 2004**).

Les concentrations faibles en OTA présentent des inconvénients lors de l'analyse, et ce à cause des liaisons de l'OTA avec les protéines et l'ADN affectant négativement le processus de son extraction et de sa purification dans les différentes matrices alimentaires (**H. Valenta, 1998**). L'immunopurification de l'ochratoxine A avant le dosage en HPLC, permet sa concentration avant analyse : l'échantillon de raisin broyé finement est agité en présence du TSE. Après centrifugation, l'extrait est dilué avec du Tampon PBS (Tampon PBS : Solution tampon de Na/K, NaCl, glucose et eau distillée), puis chromatographié sur colonne d'immunoaffinité. Après un double lavage à l'eau de la colonne, l'ochratoxine est éluée par le méthanol selon les prescriptions des fournisseurs des colonnes. L'aliquote de l'éluat peut être analysée par le système HPLC approprié à la quantification fluorimétrique de l'ochratoxine A.

Des enquêtes sur la fréquence et les niveaux de présence de l'ochratoxine A dans des échantillons de denrées alimentaires et de sang humain indiquent que les denrées alimentaires sont souvent contaminées.

Le principal apport en ochratoxine A dans le cadre de l'ingestion alimentaire provient des céréales et des produits à base de céréales. La seconde source est constituée par les raisins et le vin, en particulier les vins rouges des zones viticoles méditerranéennes. Il a été constaté que les raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs) présentaient un degré de contamination élevé. Les raisins secs constituent une importante source alimentaire d'ochratoxine A pour les personnes qui en consomment en grandes quantités, notamment les enfants.

Seulement peu d'études sur l'analyse des OTA par la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/MS) ont été rapportées dans la littérature en appliquant l'ionisation (**E. Rajakyla et al., 1987**) et l'injection directe de l'échantillon (**D. Abramson, 1987**). Néanmoins des études se sont focalisées sur les propriétés de spectrométrie de masse de l'OTA, telles que l'efficacité de la fragmentation et la source d'ionisation.

L'analyse des ochratoxines dans des matrices spécifiques par LC/MS sur les plans qualitatif et quantitatif, est exclusivement concentrée sur les OTA, du fait qu'elle présente la toxicité la plus élevée des ochratoxines dans les milieux biologiques et dans les aliments. En raison de sa toxicité élevée, l'analyse de l'OTA doit être effectuée dans une gamme de concentration la plus basse contenue dans les différentes matrices alimentaires pour estimer le risque de toxicité de la prise d'essai de l'OTA.

La LC/MS est un excellent outil pour élucider *in vivo* la structure des métabolites et des OTA dans les aliments et les tissus biologiques, permettant une meilleure compréhension du mode d'action des OTA dans les processus de la mutagenèse et de la carcinogénèse chez les animaux et les humains (**K.H. Ominski et al., 1996 ; A. Mally et al., 2005**).

D'autres ochratoxines, comme OTA et OTC produisent des métabolites telles que L'Ochratoxine  $\alpha$  4 hydrox OTA, 10 hydroxy OTA glutathione, 3'monophosphate desoxyguanidine et d'hydrate de carbone conjugué à l'OTA, permettant l'étude de leur métabolismes et de leur mode d'action, en s'appuyant sur l'analyse structurale de ces métabolites par LC/MS (H.Zepnik et al., 2003 ; H.Xiao et al., 1996 ; V.faucet et al., 2004).

### V.2.3.Limites et réglementation

Les risques que comporte pour l'homme ou les animaux l'ingestion de produits alimentaires contaminés par des mycotoxines ont conduit de nombreux pays à instaurer des mesures afin de contrôler la contamination des produits d'alimentation humaine ou animale.

Compte tenu de la toxicité des mycotoxines et de leur présence dans les aliments, elles constituent un problème de santé publique. Aussi les pouvoirs publics à l'échelle internationale ont édicté des réglementations afin de limiter la mise sur le marché de denrées alimentaires contaminées par les mycotoxines à travers l'édification du Codex Alimentarius.

Actuellement des recommandations régissant les teneurs maximales en Ochratoxine A dans les aliments destinés à la consommation humaine (**Tableau 4**), selon la Directive Européenne 05/123 du 26 juillet 1998.

Aliments	Limite maximale de résidus d'Ochratoxine A en ug/Kg
Céréales et dérivés	3 -5
Raisins secs	10
Raisins	2
Aliments infantiles à base de céréales	0,5

**Tableau 4 : Les valeurs limites des concentrations en Ochratoxines A dans l'alimentation humaine**

Depuis le 26 janvier 2005 (règlement CE N°123/2005), la Commission a fixé une teneur maximale d'ochratoxine A dans les vins pour la commercialisation à 2 µg/l.

## **VI-Les différents procédés de filtration membranaire**

### **VI.1.Définition de la membrane**

Une membrane peut être définie comme étant une couche mince de matière, permettant l'arrêt ou le passage sélectif de substances dissoutes ou non, sous l'action d'une force motrice de transfert. Les critères de séparation des particules, des molécules et/ou des ions sont (**Audinos et Isoard, 1986**) :

- La dimension et la forme ;
- La nature chimique ;
- L'état physique ;
- La charge électrique, etc.

### **VI.2.Classification des membranes**

#### **VI.2.1.Classification selon le mécanisme de séparation**

Les mécanismes de séparation dans les membranes sont complexes et encore partiellement compris. Les processus qui jouent un rôle dans la séparation membranaire sont : le tamisage, la friction sur les parois des pores des membranes, la diffusion dans le matériau membranaire ou dans les pores des membranes, les forces de surface répulsives ou attractives, notamment la répulsion électrostatique. La classification la plus répandue des membranes d'après le mécanisme de séparation est la suivante :

\*Les membranes poreuses (MF, UF, UF), ou les effets de tamisage et de friction jouent des rôles important mais où les forces de surface peuvent aussi jouer un rôle important comme en NF ; les pores peuvent être subdivisés en plusieurs catégories :

- Plus grands que 50nm (MF, UF) ;
- 2 à 50 nm (UF) ;
- Plus petits que 2 nm (NF).

\*Les membranes non poreuses (perméation de gaz, pervaporation, osmose inverse (OI); ces membranes peuvent être considérées comme des milieux denses où la diffusion des espèces a lieu dans les volumes libres situés entre les chaînes moléculaires du matériel de la membrane ;

\*Les membranes échangeuses d'ions. Ces types de membranes considérées comme un type spécial de membranes non poreuses, consistant dans des gels denses ayant une charge fixe positive (échangeuses des anions) ou négative (échangeuses des cations).

### **VI.2.2. Classification selon la morphologie**

Les membranes peuvent être classées en fonction de leur structure :

- Membranes à structure symétrique : Ces membranes denses ou poreuses ont la même structure sur toute leur épaisseur (structure isotrope) ;
- Membranes à structure asymétrique : La structure de la membrane varie d'une couche à une autre (membranes anisotropes)

La plupart des membranes commerciales de MF, UF et de NF sont des membranes à structure asymétrique car ce type de structure permettent d'avoir des perméabilités plus élevées.

### **VI.2.3. Classification selon la géométrie de préparation des membranes**

Les membranes peuvent être classées fonction de la forme sous laquelle elles sont fabriquées :

- Membranes planes ;
- Membranes cylindriques (tubulaires ayant un diamètre interne supérieur à 3 mm ; creuses dont le diamètre est inférieur à 3 mm).

#### **VI.2.4. Classification selon la nature chimique**

Les membranes sont fabriquées à partir des polymères organiques et de matières inorganiques. Bien qu'il existe des membranes mixtes faites de polymères et de matériaux inorganiques, la plupart des membranes disponibles dans le commerce sont faites à partir de polymères. Les principaux polymères utilisés pour la fabrication de membranes sont :

Les dérivés de cellulose : Ce sont des polymères hydrophiles avec un faible pouvoir d'adsorption ;

- Les polyamides dont les propriétés chimiques sont supérieures à celles des dérivés de la cellulose ;
- Les polysulfones et les polyethersulfones qui ont un pouvoir d'adsorption élevé avec une meilleure stabilité chimique et thermique ;

Les membranes inorganiques sont faites à base de céramique (oxydes d'aluminium, de zirconium ou de titane). Ces membranes ont une stabilité chimique, et thermique supérieure aux membranes polymériques.

#### **VI.3. Applications des membranes**

Actuellement, quatre procédés membranaires sont utilisés pour produire de l'eau potable : MF, UF, NF et OI. Ces procédés utilisent tous comme force motrice de transport à travers la membrane un gradient de pression. Les membranes de MF, de UF, de NF et d'OI diffèrent par leur structure poreuse est donc par la taille des particules et des molécules qui peuvent être retenues.

##### **VI.3.1. Microfiltration (MF)**

La MF est le plus ancien de tous les procédés membranaires utilisé et commercialisé pour la première fois par Sartorius Werke GmbH en Allemagne en 1929. L'utilisation d'un tel procédé a été nécessaire pour assurer une eau potable sûre du point de vue bactériologique dans les villes allemandes bombardées durant la deuxième guerre mondiale (**Belfort et al., 1994**). Les membranes de MF sont capables de retenir des particules plus grandes que 0.1µm. Ces membranes permettent aussi de retenir les bactéries et les moisissures. La MF peut aussi servir de prétraitement pour la NF et l'OI.

### **VI.3.2.Utrafiltration (UF)**

La taille des pores des membranes d'UF est moins élevée que celles des membranes de MF et plus élevée que celles des membranes de NF quoiqu'il y ait des chevauchements entre les domaines de l'UF et ceux de la MF et de la NF. Les seuils des membranes des UF se situent entre 1000 et 100.000 Da. La pression d'opération en UF reste assez basse (50-500 kPa) et les flux de perméation sont moins élevés qu'en MF (**Anselme et Jacobs, 1996**). Les membranes d'UF permettent d'enlever les colloïdes, les particules et les macromolécules. Etant donné la taille des pores des membranes d'UF, qui se situe entre quelques nm et des centaines de nm, certaines membranes d'UF (dans le domaine qui est le plus proche de la NF) sont capables d'enlever aussi les virus.

### **VI.3.3.Nanofiltration (NF)**

La NF est le deuxième procédé membranaire en importance (**Malleval et al., 1997**). En plus de permettre un enlèvement des particules et des macromolécules comme en UF, les membranes de NF sont fabriquées à partir des polymères et ont des seuils de coupure entre 300 et 1000 Da (**Hong et Elimech, 1997**).

### **VI.3.4.Osmose inverse(OI)**

C'est un procédé de filtration membranaire à pression élevée. Dans ce cas, le degré de rétention des solutés inorganiques et organiques est fonction de leur solubilité et de leur diffusivité dans la membrane. Le phénomène de rétention dépend beaucoup aussi de la charge nette sur la surface de la membrane. Les membranes d'OI sont celles qui ont les structures les plus denses de toutes les membranes utilisées actuellement avec des seuils de coupure plus bas que 300 Da.

Le **tableau 5** : Limites de séparation pour les différents procédés :

Types de procédés	<b>Microfiltration</b>	<b>Ultrafiltration</b>	<b>Nanofiltration</b>	<b>Osmose inverse</b>
Taille des particules	> 0,01µm > 500 000 Da	0,01µm à 0,1µm 100 – 500 000 Da	0,01µm à 0,001 µm 100 – 1000 Da	< 0,001 µm < 1000 Da
Types de particules	Particules suspendues, colloïdes, émulsions d'huile	Macromolécules, bactéries, cellules, virus, protéines	Composés organiques à faible poids moléculaire	Ions

**Tableau 5 : Les différents procédés de filtration membranaire**

## **VII-Matériels et méthodes**

### **VII.1.Matériels**

#### **VII.1.1.Echantillon de raisin soumis à l'analyse**

L'échantillon de raisin soumis à l'analyse a été prélevé en septembre de l'année 2007 dans la région de Douera appartenant à la variété Cinsault et à l'espèce *vitis venifira*. (**Figure 7**)



**Figure 7** : Echantillon de raisin de variété Cinsault

#### **VII.1.2.Liste des kits utilisés**

- Colonnes d'immuno-affinité OchraPrep r-Biopharm, St Didier Au Mont D'Or, France, contenant un gel de Sepharose sur lequel des anticorps monoclonaux spécifiques de l'Ochratoxine A sont liés de façon covalente.
- Témoin OTA, Sigma Aldrich

#### **VII.1.3.Liste des produits utilisés**

- Agar bactériologique (Institut Pasteur d'Algérie, I.P.A.)
- TSE (Tryptone Sel Eau)
- Extrait de levure (Institut Pasteur d'Algérie, I.P.A.)
- Sulfate ferreux (Panreac, Quinica, Espagne)
- Nitrate de sodium (Prolabo, Rhône - Poulenc, France)
- Sulfate de magnésium heptahydraté (Prolabo, VWR international)
- Chlorure de potassium (Merck, Germany)
- Phosphate de potassium (Merck, Germany)
- Dipotassium hydrogénophosphate (Merck, Germany)
- Sulfate de Zinc (Merck, Germany)
- Sulfate de cuivre (Merck, Germany)
- Glucose (Merck, Germany)
- Ammonium heptamohydrate tetrahydraté (Merck, Germany)
- Méthanol pour CLHP (Merck, Germany)

- Acetonitrile pour CLHP (Merck, Germany)
- Acide acétique pour CLHP (Merck, Germany)
- Tween 80 (Institut Pasteur d'Algérie, I.P.A.)
- Saccharose (Institut Pasteur d'Algérie, I.P.A.)
- Glycerol (Merck, Germany)
- PBS (Tampon Phosphate Buffer Sulfate)

#### **VII.1.4.Appareils utilisés**

- Microscope Electronique à Balayage M.E.B (F.E.I.)
- Chromatographe Liquide à Haute Performance (CLHP), avec une pompe Jasco PU-2080 Plus «intelligent HPLC pump», détecteur : Scanning Fluorescence detector Waters <sup>TM</sup> 474 avec le logiciel d'exploitation (Clarity Lite), Colonne C8 15x4,6x5.
- Dispositif de filtration membranaire
- Autoclave (VARIOKLAG GmbH, type 25T)
- Rotavapeur (Laborota 4002, digital, Heidolph, Germany)
- Bain-marie (TECHNE-OSI, TE-8D, England)
- Centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific, genre 1-6, Germany)
- Microcentrifugeuse (Héraeus )
- Appareil numérique CASIO, Exilm
- Etuve (Thermosi SR1000).
- Microscope (Leica, Leitz DM RB)
- pH-mètre (Eutech instruments 510)

#### **VII.1.5.Milieux de cultures**

##### **1) Milieu Czapek Yeast Extract Agar (CYA)**

La préparation du milieu CYA nécessite la préparation préalable des trois solutions A, C et Cu+Zn.

Composition pour 1 litre

Saccharose.....	30 g
Extrait de levure.....	5 g
Solution A.....	50 ml
Solution C.....	50 ml
Solution Cu+Zn.....	1 ml
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	qsp 1L
Autoclaver 15 min à 121°C	

Solution A (500 ml)

NaNO <sub>3</sub> .....	20 g
KCl.....	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O.....	5 g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Eau distillée.....	qsp 500 ml

Solution C (500 ml)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 10 g  
Eau distillée..... qsp 500 ml

Solution métallique Cu+Zn (100 ml)

ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O..... 1 g  
CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O..... 0,5 g  
Eau distillée..... qsp 100 ml

**2) Milieu Czapek Dox Agar (CZ)**

La composition de ce milieu est la même que CYA mais sans extrait de levure

**3) Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)** (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France)

La composition de ce milieu est la suivante :

Extrait de pomme de terre.....1L  
à partir de 200 g  
Glucose .....20 g  
Agar.....20g  
pH 5,6  
Autoclaver 15 min à 120°C

**4) Milieu Synthétique (SM)**

La préparation du milieu synthétique nécessite la préparation de deux solutions A et B dont la composition est la suivante :

**Solution A**

Composition pour 1 litre

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ..... 3 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....26 g  
KCl.....1 g  
Mg SO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O..... 1 g  
Solution minérale..... 10 mL  
Agar .....15 g

Le pH est ajusté à 6,5 avec 6 N HCl

**Solution B**

Glucose .....100 g/500 mL

Les deux solutions A et B sont stérilisées séparément à 121 °C pendant 20 min. La préparation du milieu définitif consiste à mélanger 75 mL de la solution A et 25 mL de la solution B dans des Erlenmeyers de 250 ml

**5) Milieu Oxytétracycline Agar Glucose (OGA)**

La composition de ce milieu est la suivante :

Extrait de levure .....5 g

Glucose .....20 g

Agar.....16g

pH 7

Autoclaver 20 min à 115°C

Ajouter avant emploi au milieu en surfusion 100 ml d'oxytétracycline à 1 mg/ml

## **VII.2.Méthodes**

### **VII.2.1.Analyse mycologique**

#### **VII.2.1.1.Préparation des dilutions de jus de raisin**

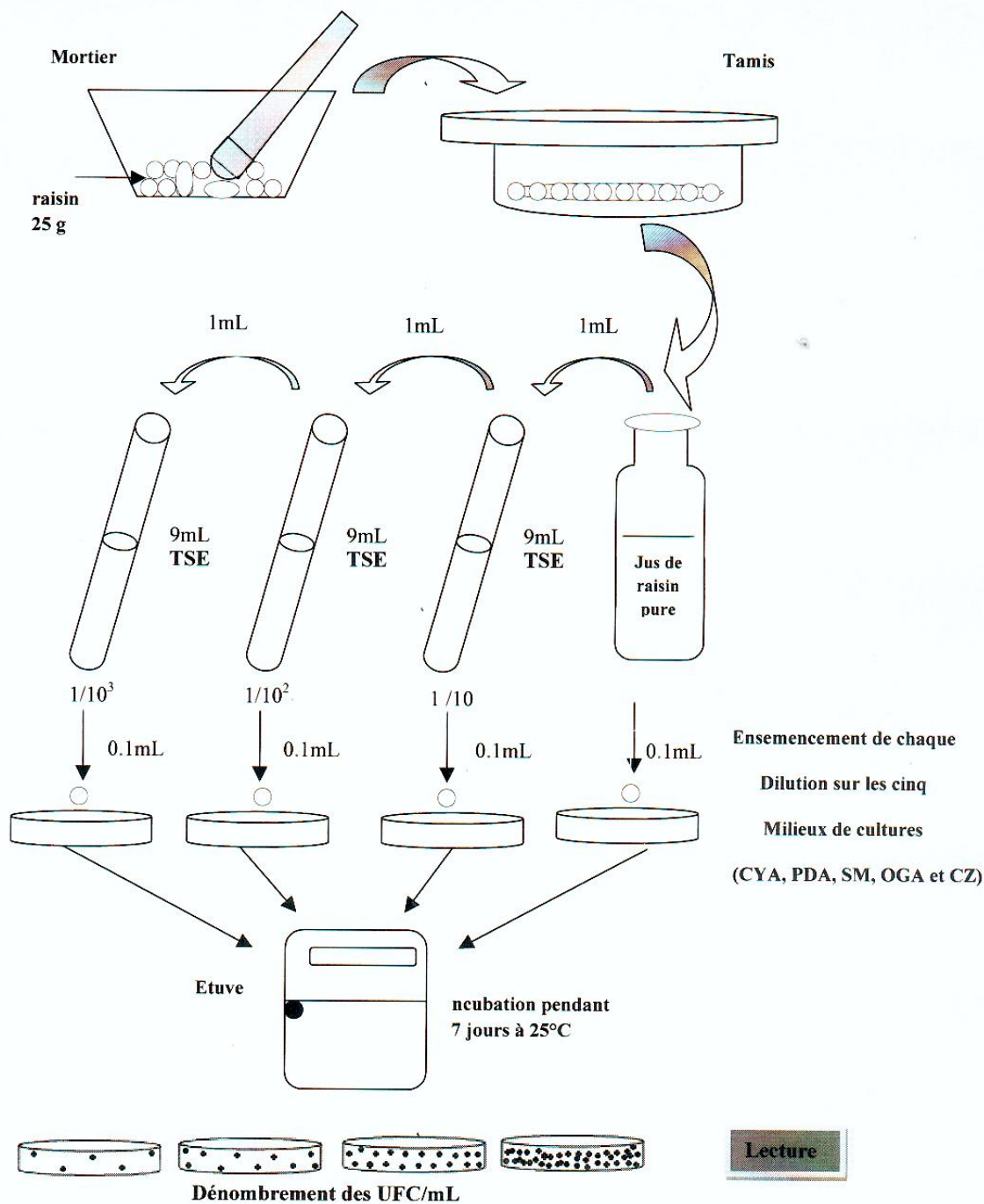
25 grammes de raisins sont broyés (solution mère), 01ml de cette solution est transférée dans 09 ml dans des solutions d'eau physiologique stérile pour l'obtention des dilutions décimales  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ .

#### **VII.2.1.2.Technique d'isolement des mycètes**

L'ensemencement de chaque dilution est réalisé en surface sur des boites contenant le milieu PDA à raison de 0,1 ml, puis incubé à 25 °C pendant 07 jours. La première lecture se fait à partir du 3<sup>ème</sup> jour afin d'éviter l'envahissement des mycètes.

L'isolement des différentes souches de mycètes est effectué par le prélèvement des explantats de culture de chaque souche à l'aide d'un emporte pièce (9mm), puis repiquée sur des boites contenant les milieux PDA et CYA. L'incubation se fait à 25 °C pendant 15 jours. (**Figure 8**)

Avant le dosage de l'Ochratoxine A à partir des grains de raisins, on procède à des étapes d'extraction puis de purification sur colonne d'immunoaffinité.



**Figure 8 : : Préparation des dilutions de jus de raisin et ensemencement**

### **VII.2.1.3. Purification des espèces du genre *Aspergillus* par la culture monospore**

La culture monospore permet d'obtenir une culture pure à partir d'une spore unique. (Djerbi, 1990). On prélève stérilement deux explantats de culture de mycètes que l'on introduit dans 10 mL d'eau distillée stérile. La suspension agitée manuellement pendant 10 min est filtrée à travers une gaze stérile pour séparer les fragments mycéliens des conidies.

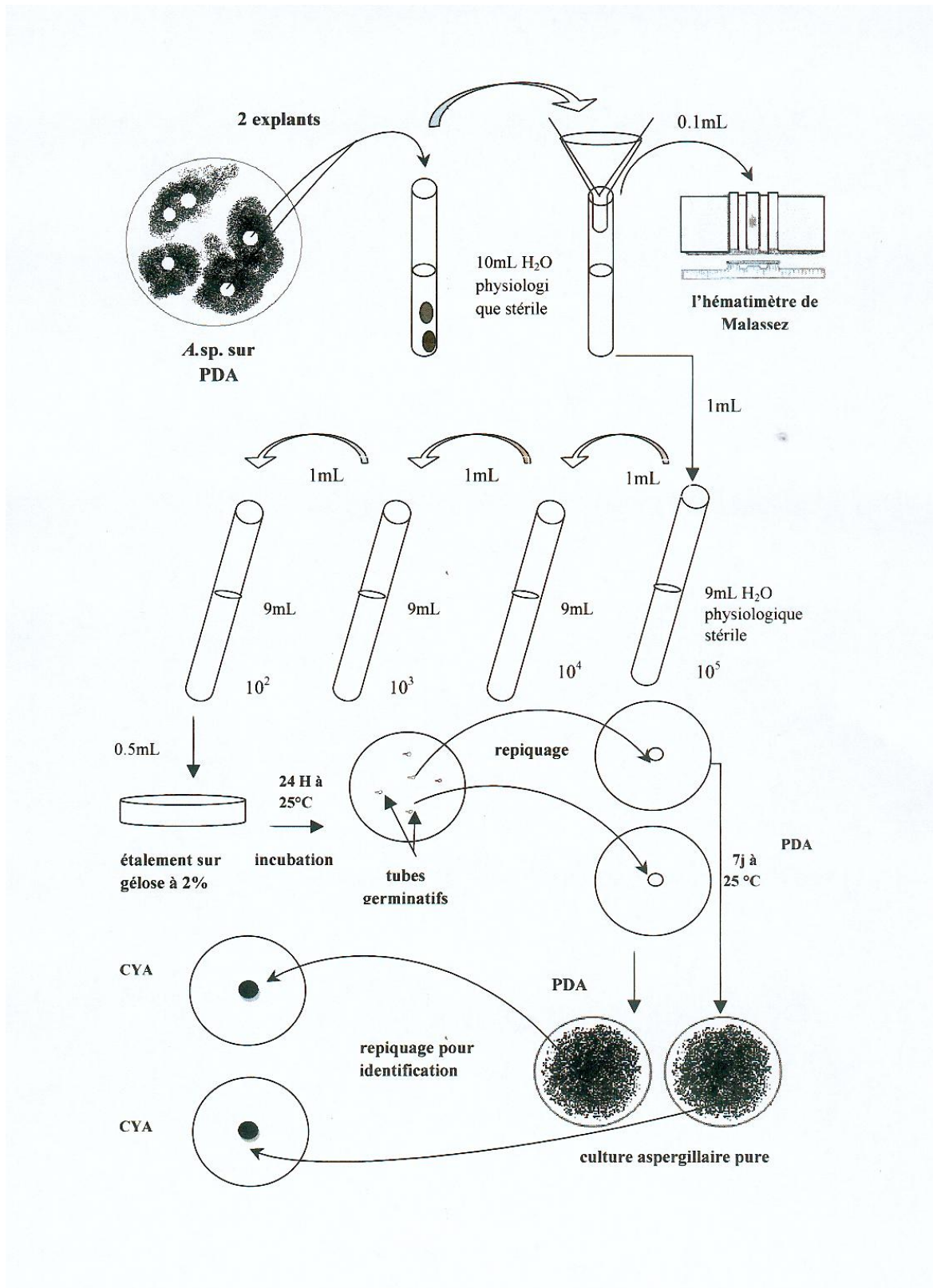
La numération des spores est réalisée sur cellule de Malassez après leur sédimentation sur le plan quadrillé central. On observe avec un faible grossissement, pour distinguer le quadrillage et les spores, puis on passe au grossissement plus fort en faisant une mise au point.

On compte le nombre de spores localisées sur les rectangles des deux diagonales et on fait la moyenne. Le chiffre trouvé correspond au nombre de conidies contenues dans un rectangle soit dans un volume de 0.01 mm<sup>3</sup>. Sachant que 0.01 mm<sup>3</sup> correspond à 10<sup>-5</sup> ml et que la concentration est estimée en nombre de spores /ml.

$$X = \frac{\text{nombre de spores dans un rectangle} \times \text{facteur de dilution}}{10^{-5}}$$

Ce nombre moyen **X** correspond à la concentration en spores dans l'échantillon.

Afin d'obtenir une culture monosporale (pureté de la souche), on étale aseptiquement 0,5 ml de la suspension fongique ajustée à une concentration de 10<sup>2</sup> spores/ml sur les boîtes coulées avec de l'eau gélosée à 2%, puis on effectue une incubation à 25 °C pendant 24 heures. Les spores ayant germé sont repiquées sur le milieu PDA coulé en boîtes. Après 7 jours d'incubation à 25°C, nos isolats sont ensemencés sur milieu CYA en vue de leur identification. (**Figure 9**)



**Figure 9** : Isolement et purification d'*Aspergillus* par la culture monospore

#### **VII.2.1.4. Identification des espèces du genre *Aspergillus***

Les espèces *carbonarius*, *ochraceus* et *niger* sont les agents contaminants les plus fréquents du raisin. L'identification de ces espèces est basée sur les caractères morphologiques des **têtes aspergillaires**. En pratique courante, les clés d'identification peuvent être suffisantes pour les reconnaître ; la couleur et l'aspect des colonies sont pris en compte. Sur culture jeune, elles sont blanches puis elles se colorent avec l'apparition des spores. Certaines espèces sont blanches, ocre, brunes, noires, vertes ou même jaunes.

Après prélèvement d'une colonie au scotch, nous observons successivement au microscope les différentes parties accompagnant les têtes aspergillaires :

Le **conidiophore** lisse ou échinulé, de taille variable, droit ou sinueux, brun ou incolore. Il peut parfois être septé.

La **vésicule** peut être très allongée, soit globuleuse, soit hémisphérique ou aplatie sur le sommet.

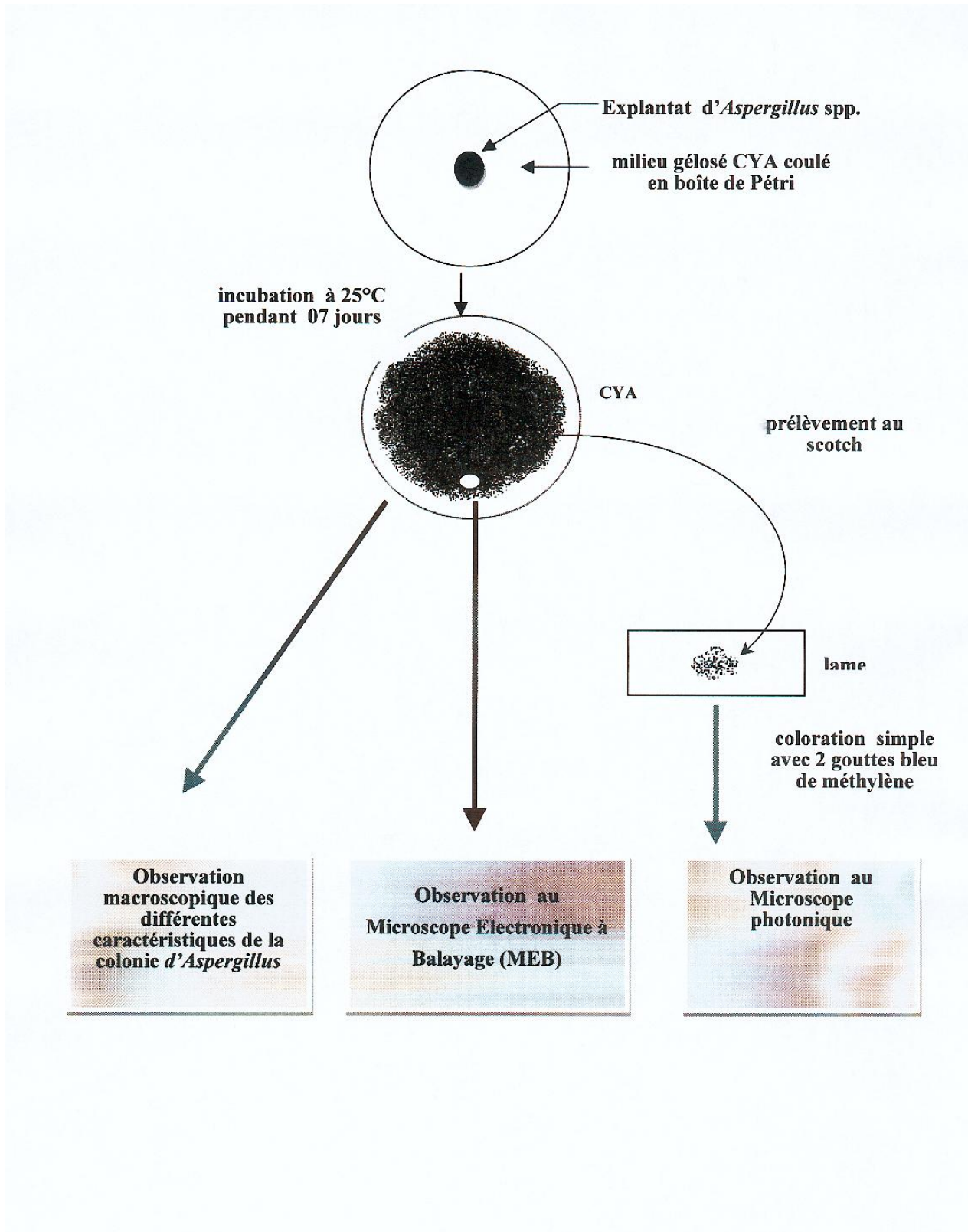
Les **phialides** formées directement sur la vésicule ou portées par des métules. L'ensemble est appelé stérigmates. Des fois chez la même souche, on peut observer les deux possibilités. Elles recouvrent toute la vésicule ou uniquement la partie apicale.

Les **conidies** sont lisses ou verruqueuses, rondes ou allongées.

La **tête aspergillaire** peut être soit en colonne longue ou courte, soit radiaire ou irrégulière.

Des **sclérotés**, amas de filaments denses colorés et très durs peuvent apparaître sur des cultures âgées.

Nos isolats sont observés sur le plan microscopique (Microscope Photonique et Microscope Electronique à Balayage) **Figure 10**.



**Figure 10** : Identification d'*Aspergillus niger*

#### **VII.2.1.4.1.La microscopie photonique**

##### **VII.2.1.4.1.1.Principe**

La microscopie photonique est basée sur l'utilisation de la lumière visible ( $4000 < \lambda < 8000$  nm) et sa réfraction au niveau de l'échantillon. La lumière incidente issue de la source est focalisée sur la préparation par un condenseur. La lumière transmise est ensuite focalisée par l'objectif et l'oculaire. La gamme d'objectifs nécessaire se compose de deux objectifs à sec de grossissement x10 et x 40 et d'un objectif à immersion de grossissement x100.

##### **VII.2.1.4.1.2.Mode opératoire**

Le mycète isolé de jus de raisin est mis en place sur la platine porte objet qui sera cadré par rapport à l'objectif sélectionné, en général un examen débute par une étude au grossissement le plus faible (X10).

#### **VII.2.1.4.2.La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

##### **VII.2.1.4.2.1.Principe**

La Microscopie Electronique à Balayage couplée à un micro-analyseur X est actuellement une méthode de choix qui est utilisée dans tous les Laboratoires de recherche permettant une recherche individuelle des particules en se basant sur leur composition et leur morphologie.

Le fonctionnement en Microscope Electronique à Balayage est basé sur la focalisation d'un faisceau d'électrons déplacé ligne par ligne de façon à balayer une surface carrée ou rectangulaire de l'échantillon à identifier. Tous les signaux captés sont issus de l'interaction des électrons du faisceau incident avec les atomes de l'échantillon, générant ainsi de nombreux phénomènes secondaires :

- Les électrons secondaires reconstruire le contraste de topographie ;
- Les électrons rétrodiffusés caractérisent le contraste chimique ;
- Les rayons X fournissent la composition chimique élémentaire.

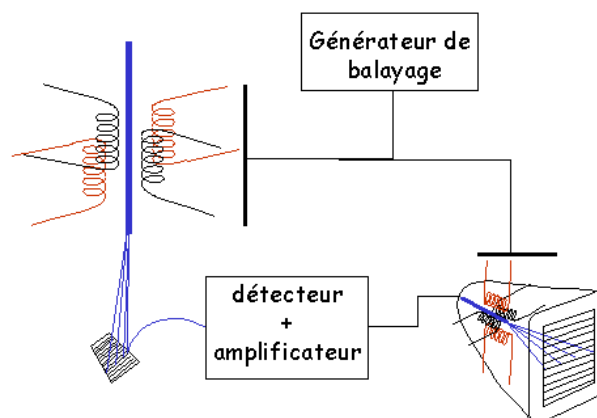
L'analyseur X couplé au Microscope Electronique à Balayage permet d'identifier tous les éléments chimiques du Carbone à l'Uranium grâce à leurs raies d'émission (K, L, M). Les caractéristiques techniques du Microscope Electronique à Balayage utilisé dans notre analyse sont de marque PHILIPS Quanta 400 de type XL 30 cp se résumant comme suit :

- Un détecteur d'électrons secondaires qui permet la visualisation de l'effet topographique des échantillons.
- Un détecteur ROBINSON d'électrons rétrodiffusés qui permet d'obtenir des images en contraste de numéro atomique (plus un élément est lourd, plus il apparaît brillant à l'écran).
- Deux écrans vidéo permettent de visualiser les différentes émissions électroniques caractéristiques de la topographie et de la composition chimique des différentes zones de l'échantillon étudié.
- Un analyseur X EDAX de type DX 4i.

Le logiciel GSR-XT comporte une procédure de calibration automatique avancée qui permet un réglage complet et un réajustement dynamique de la colonne du microscope, de la platine motorisée, du détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSD) ainsi qu'un système d'analyse de rayon X et ceci sans l'intervention d'un opérateur.

Le microscope électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images de surface de tous les matériaux solides, à des échelles allant de celle de la loupe (x10) à celle du microscope électronique en transmission (x500.000 ou plus). Ces images présentent une grande profondeur de champ et donnent des renseignements sur le relief. Le MEB conventionnel fonctionne dans un vide poussé en High vacuum ( $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  mbar).

Le principe du balayage consiste à explorer la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident. (**Figure 11**)



**Figure 11** : Schéma de principe de fonctionnement du MEB

#### **VII.2.1.4.2.2. Mode opératoire**

L'échantillon de moisissure prélevé sur la boîte de Pétri est déposé dans une capsule en acier inoxydable qui sera transféré sur un porte objet «Etage peltier» dans la chambre d'analyse qui garde l'échantillon à l'état frais. Des informations telles que la taille de l'échantillon, la surface de recherche, la disposition de l'échantillon, la taille minimale des particules recherchées ainsi que le pourcentage d'échantillons à analyser sont définies au préalable. En utilisant le balayage rapide du MEB, les champs vides peuvent être analysés en un temps réduit de soixante (60) minutes pour un champ de 10x10 mm.

Les conditions opératoires au cours de cette analyse sont les suivantes :

- -Tension d'excitation : 20 kv.
- -Microscope en mode High Vacuum à un vide très poussé.
- Spot ou le diamètre du faisceau incident : 6.0
- -Grossissement entre 1200 et 30000
- -Détecteur **L.F.D.** (**L**arge **F**ield **D**etector)
- -**H.F.W.** 249 um (**H**igh **F**ield **W**ork)
- -**W.D.** 29,6 mm (**W**ork **D**istance)

#### **VII.2.1.5. Conservation des espèces du genre *Aspergillus* identifiées**

Une suspension de spores ( $5 \cdot 10^6$ ) obtenue à partir d'une culture de mycètes sur milieu PDA, incubée à 25 °C pendant 15 jours, est ensemencée sur une boîte de pétri contenant le milieu CYA après 10 jours d'incubation à 25°C. 10 ml de la solution de Tween 80 stérile à 0,01% est déposée sur la boîte de Pétri. Les spores sont raclées à l'aide d'un râteau stérile. La suspension de spores obtenue est filtrée sur de la gaze puis dénombrée à l'aide de cellule de Malassez. Les spores sont conservées à - 20°C dans une solution de glycérol (50:50).

### **VIII-Extraction et dosage de l'Ochratoxine A**

#### **VIII.1.Préparation de l'échantillon**

Le protocole d'extraction prévoit le passage de 20 ml d'échantillon de raisin à travers la colonne d'immunoaffinité (Atoui, 2006). Pour cela on doit :

- Peser 125 g d'échantillon de raisin qui est broyé à l'aide d'un mixeur.
- Filtrer sur du papier filtre.
- Reprendre le filtrat et centrifuger une première fois 10 min à 4000 rpm à température ambiante.
- Une deuxième centrifugation est effectuée pendant 10 min à 4000 rpm pour éliminer les impuretés et récupérer 75 ml de surnageant.
- Ajuster le pH du jus de raisin à 7.8 par NaOH 2N.
- Diluer 10 ml du jus avec 10 ml de solution saline de phosphate tamponnée (tampon PBS) : cette solution est appelée solution échantillon.
- Adsorption et élution de l'ochratoxine A par colonne d'immuno-affinité

### **VIII.2. Adsorption et élution de l'Ochratoxine A par colonne d'immunoaffinité**

La concentration et la purification de l'OTA se font grâce à des colonnes d'immuno-affinité OCHRAPREP, selon le protocole ci après :

- Equilibrer la colonne d'immunoaffinité avec 2 ml de solution PBS.
- Faire passer dans la colonne la totalité de la solution à un débit approximatif de 1 goutte toutes les deux secondes.
- Rejeter l'effluent.
- Laver la colonne avec 5 ml de solution de lavage (2,5% de NaCl + 0,5% de Na HCO<sub>3</sub>)
- Eluer avec 2 ml de méthanol pur en pratiquant toujours un débit de 1 goutte toutes les 2 secondes : la solution éluante recueillie sera ensuite utilisée pour la quantification en CLHP.

### **VIII.3. Analyse de l'échantillon de jus de raisin par Chromatographie Liquide à haute Performance**

La Chromatographie Liquide à Haute Performance est une technique analytique basée sur la séparation des molécules selon leurs propriétés physiques telles que l'adsorption ou le partage.

C'est une méthode applicable à tous les types de chromatographies sur colonne avec un système d'élution approprié, en utilisant comme support des particules de l'ordre du micromètre.

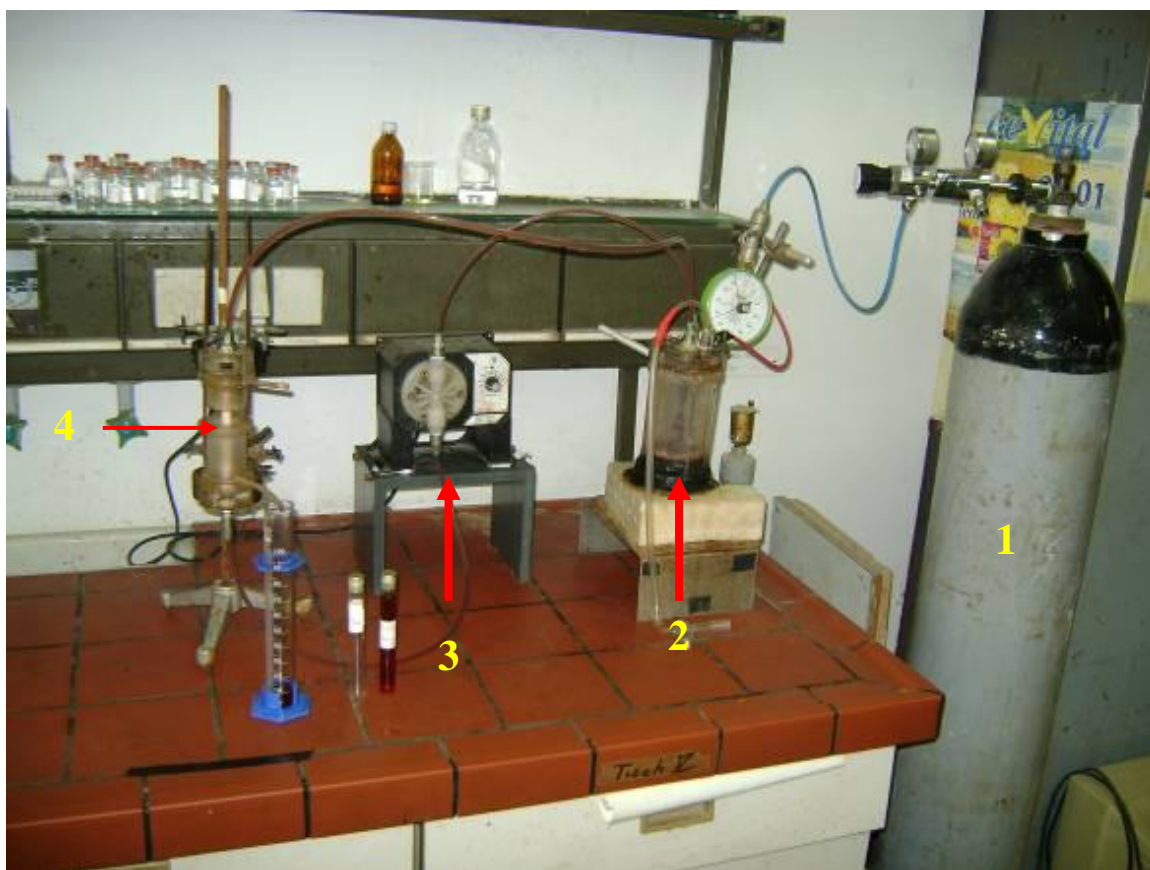
L'ochratoxine A est dosée par Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase inverse par fluorimétrie en isocratique (d'excitation = 333 nm;  $\lambda$  d'émission = 460 nm). La colonne analytique à phase inversée utilisée est de type C8 ODB (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m). La phase mobile est un mélange acétonitrile : eau : acide acétique 99/99/2 à un débit de 1 ml/min. Les injections sont effectuées manuellement avec une seringue de 100  $\mu$ l. Le volume d'injection est de 100  $\mu$ l. Afin d'évaluer la concentration en ochratoxine A dans l'échantillon de raisin, une courbe de calibration a été réalisée à partir d'une solution étalon mère d'ochratoxine A (ci joint en annexe la préparation des solutions étalons mère et filles d'ochratoxine A).

## IX-Procédé de filtration membranaire

Le système de filtration utilisé dans notre travail est une ultrafiltration en discontinu (en Batch), permettant la décontamination de la matrice alimentaire.

### IX.1. Protocole expérimental

L'échantillon de jus de raisin est recirculé à l'aide d'une pompe qui permet d'extraire l'air afin d'en diminuer et d'atteindre la valeur de la pression voulue. La recirculation se poursuit jusqu'à épuisement du réservoir contenant l'échantillon, le filtrat (perméat) est récupéré au fur et à mesure de sa sortie. **La figure 12** montre le montage de l'ultrafiltration.



**Figure 12: Dispositif d'ultrafiltration**

- 1 : Gaz inerte
- 2 : Bac d'alimentation contenant le jus de raisin
- 3 : Pompe péristaltique
- 4 : Membrane de filtration

Dans notre travail, nous avons utilisé une membrane de filtration dont les caractéristiques sont mentionnées dans le **tableau 6**.

Composition de la membrane	Porosité	Aire membranaire en cm <sup>2</sup>	Température en °C	PH
ZrO <sub>2</sub> sur support alumine	5 nm	36,68	Pas de limite *	0 – 14

\* : Pas de limite en température pour l'oxyde de Zirconium dans les filtrations des liquides.

**Tableau 6 : Caractéristiques de la membrane d'ultrafiltration**

## **X-Résultats et discussion**

### **X.1.Isolement et dénombrement de la mycoflore totale**

Les micro-organismes contaminant le raisin sont nombreux et variés. Jusqu'à présent seul l'analyse microbiologique par ensemencement de son jus sur les milieux de culture sélectifs, à savoir les milieux CYA, CZ, SM, PDA et OGA a permis leur détection et leur évaluation numérique. Pour cela, nous avons procédé à des tests microbiologiques selon la technique de suspension-dilution.

L'analyse sur les cinq milieux de la mycoflore totale révèle l'existence d'une population mycologique peu diversifiée ; elle est représentée par une forte population levurienne et par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*.

Concernant la solution mère, nous avons isolé sur le milieu PDA 200 UFC/mL d'*Aspergillus* spp. Sur milieu CYA la population aspergillaire est de 160 UFC/ml Sur les autres milieux, elle est comprise entre 4 et 10 UFC uniquement. Cependant les levures s'y trouvent en moyenne en nombre de  $32.10^2$  UFC/mL sur les cinq milieux de culture.

Cette charge levurienne pourrait s'expliquer par une fermentation des sucres dans le jus de raisin.

Dans nos conditions expérimentales, les résultats obtenus montrent que parmi les milieux de culture ensemencés, seuls les milieux de cultures **PDA et CYA** sont sélectifs pour un développement optimal des contaminants du raisin.

### **X.2.Identification de l'espèce aspergillaire**

Les résultats de la culture monospore des *Aspergillus* spp nous ont permis d'identifier une seule espèce présentant des colonies noires appartenant à la section des **Nigri**. Pour tous les isolats purifiés sur eau gélosée à 2%, puis repiqués sur milieu CYA, l'identification s'est basée sur les caractères macroscopiques et microscopiques décrits par **Pitt et al.(1997)**.

---

### **X.3.Purification des *Aspergillus* spp par culture monospore**

#### **X.3.1.Calcul de la concentration cellulaire**

Le dénombrement des spores sur cellule de Malassez est de l'ordre de  $5.10^6$  spores/mL, nous a conduit à effectuer quatre dilutions successives au 1/10, afin d'atteindre une densité de  $10^2$  spores/ml

### **X.4.Etude des caractères morphocultureux du genre *Aspergillus***

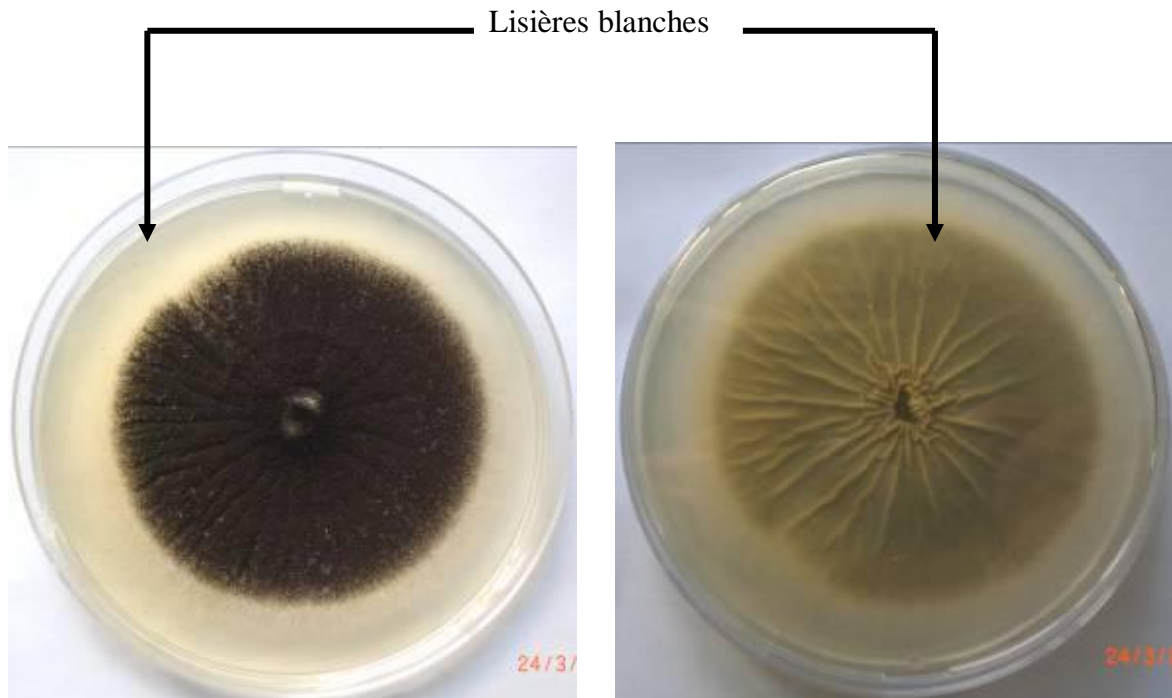
L'identification des *Aspergillus* se fait par l'analyse des critères morphologiques après observation macroscopique et microscopique.

#### **X.4.1.Examen macroscopique**

En culture sur le milieu CYA, les colonies en début de croissance sont blanches et après 48 h, elles deviennent noires charbonneuses, le revers restant incolore.

Au bout de 5 jours, l'analyse des boîtes montre que les colonies sont aériennes, plates, granuleuses avec lisière blanche, de consistance duveteuse avec couleur toujours noire au recto (**Figure 13 A**), et jaune au verso (**Figure 13 B**), le diamètre est de 72 mm.

Eventuellement avec une loupe, il est aisé de distinguer assez facilement les têtes aspergillaires portées par les conidiophores. On note également la présence de rayons fins et longs au verso des boîtes.



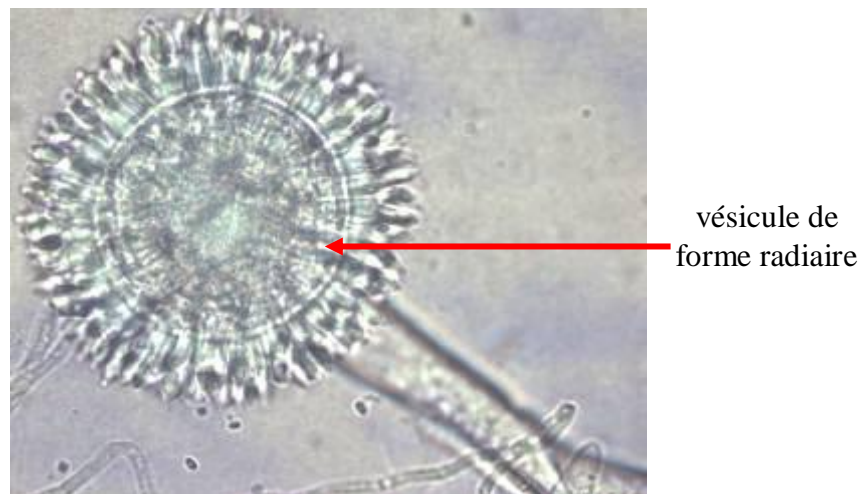
**Figure 13 A** : Observation macroscopique de face d'un *Aspergillus niger*

**Figure 13B** : Observation macroscopique à l'envers de la boîte d'un *Aspergillus niger*

## X.4.2.Examen microscopique

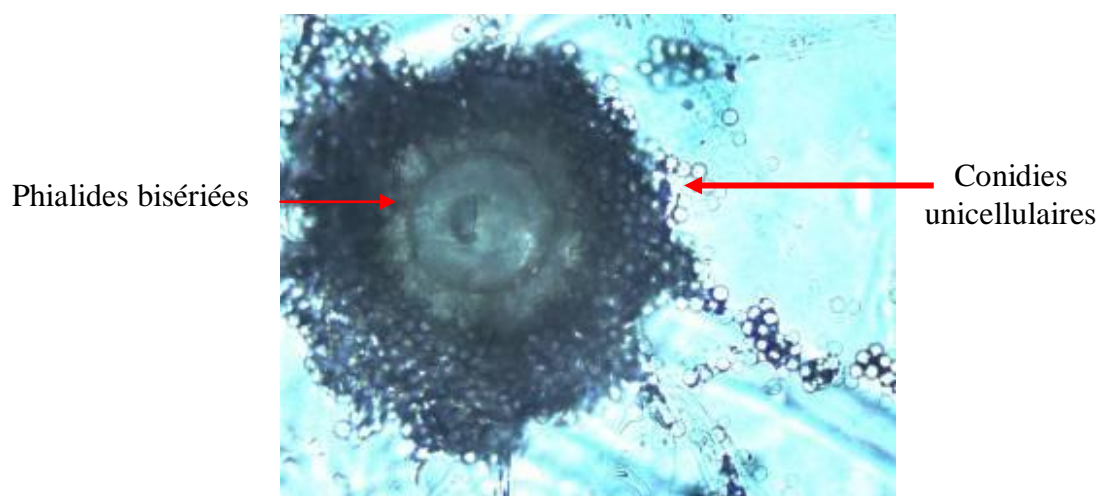
### X.4.2.1.Au microscope photonique

L'examen microscopique a été effectué sur des préparations à l'état frais à l'aide des objectifs x 10 et x 40. Il permet une identification précise de la morphologie d'*Aspergillus*. Le conidiophore est dressé se terminant par une vésicule bisériée (**Figure 14**) de forme radiaire et de diamètre égale environ 69  $\mu\text{m}$ .



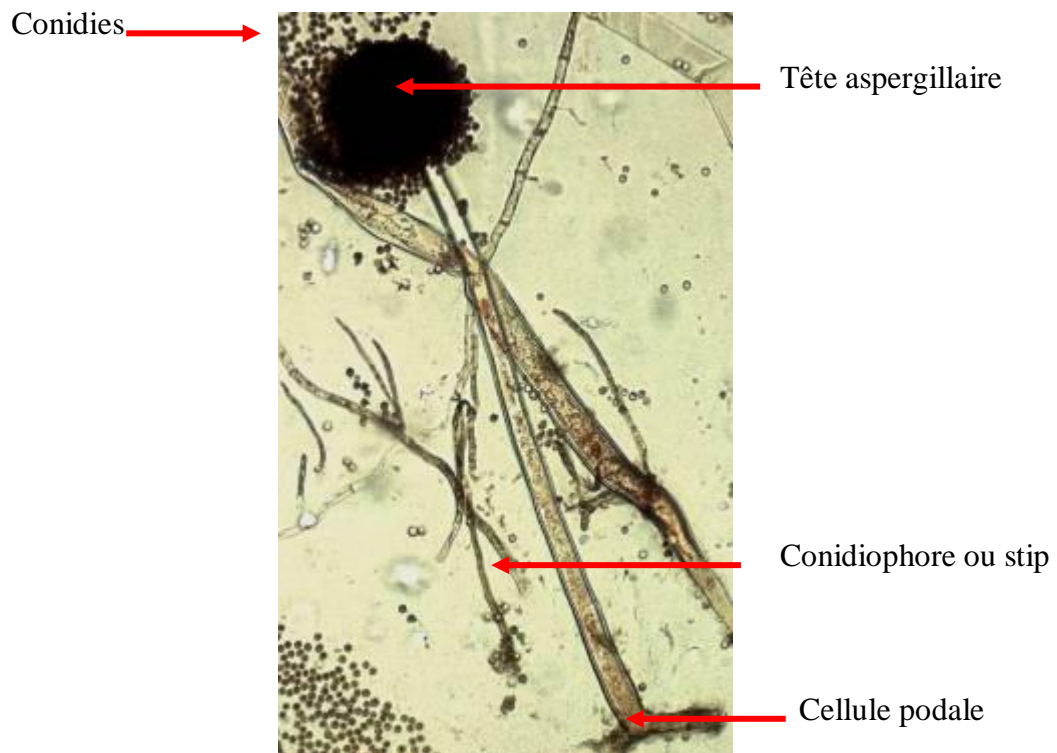
**Figure 14** : Observation microscopique d'*Aspergillus sp Gx 40* (jeune culture)

Des phialides se développent directement sur la vésicule et portent des conidies unicellulaires, rugueuses et échinulées de diamètre avoisinant les 4  $\mu\text{m}$  (**Figure 15**)



**Figure 15** : Observation microscopique d'*Aspergillus sp Gx 40*  
(en phase de sporulation)

Ce mycète, selon les critères morphologiques fait partie des Deutéromycètes (champignons imparfaits), ordre des Hyphomycètes, familles des Moniliaceae qui sont caractérisées par la formation des conidiospores asexués. Sa paroi épaisse montre une partie terminale du conidiophore qui se termine par une vésicule. Celle -ci est sphérique et elle porte les métules et les phialides de forme globuleuse, radiaire et habituellement bisériée, autour desquelles sont disposées directement deux rangées de stérigmates (une rangée de métules portant une rangée de phialides). Enfin à l'extrémité des phialides naissent des spores unicellulaires sphériques de 4 µm de diamètre, noires, disposées en chaînes non ramifiées. Elles sont souvent globuleuses, lisses ou recouvertes d'aspérités ou échinulations. (Nguyen Minh, 2007) (Figure 16). Le mycélium de ce mycète est cloisonné, il produit des ascospores asexuées dans des cellules sacciformes appelées asques.



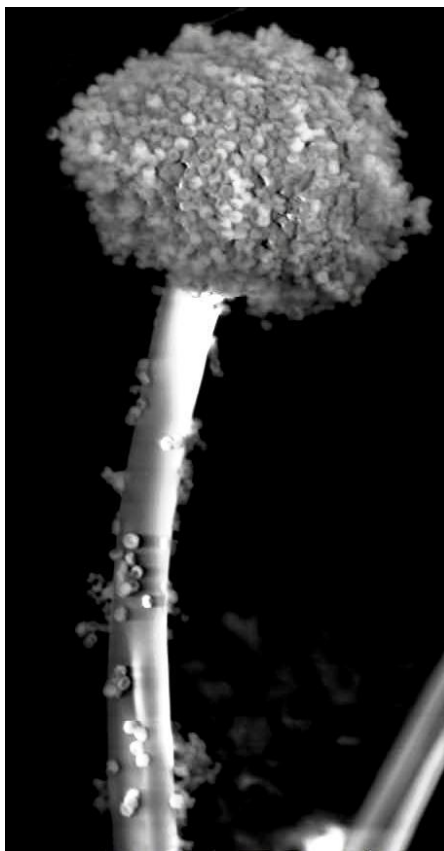
**Figure 16** : *Aspergillus niger* observé au microscope photonique. Gx 40  
Culture sur milieu CYA à 25° C pendant 7 jours

Après étude comparative des caractères morphocultureaux et microscopiques décrite par Pitt (1997), on déduit que ce mycète contaminant le raisin, ne présente aucune similitude pour être confondue avec les deux espèces **aspergillaires ochratoxinogènes** : *A. ochraceus* et *A. carbonarius*

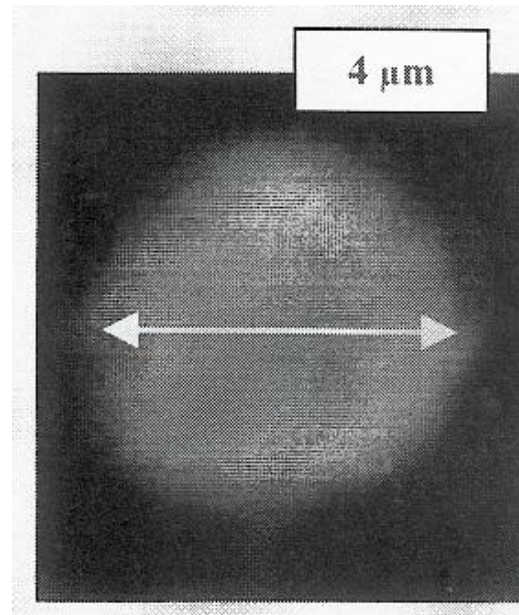
En effet l'ensemble de ces caractères, sont considérées comme suffisamment proches de la troisième espèce d'*Aspergillus ochratoxinogène* pour être incluse au sein de l'*Aspergillus niger*.

#### X.4.2.2. Au Microscope Electronique à Balayage

L'examen microscopique a été effectué sur un prélèvement de champignon sur boîte de Pétri (préparation à l'état frais) à l'aide des objectifs x 3200. Il permet une identification détaillée de la morphologie d'*Aspergillus* en trois dimensions. Le conidiophore présente une longueur d'environ 283  $\mu\text{m}$  se terminant par une tête aspergillaire de diamètre de 99  $\mu\text{m}$ , (**Figure 17**). Les spores sont hyalines échinulées de diamètre avoisinant 4  $\mu\text{m}$  (**Figure 18**).



**Figure 17** : Observation microscopique d'*Aspergillus* Gx 1200

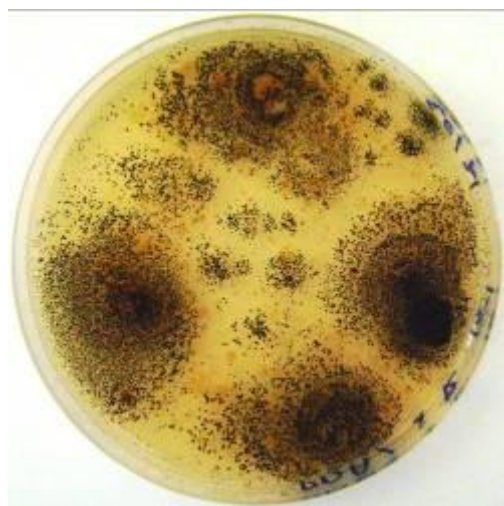


**Figure 18** : Observation microscopique d'une spore d'*Aspergillus* Gx 30.000

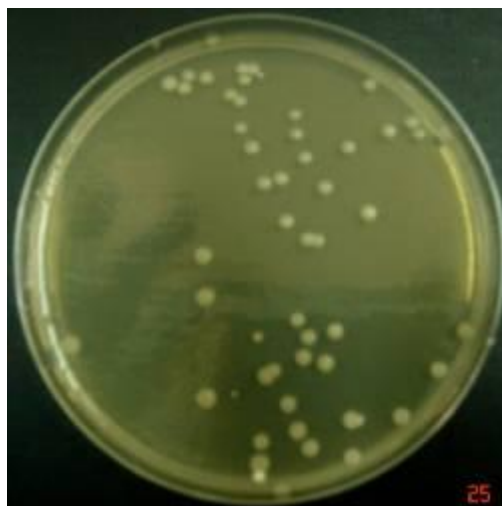
Les résultats obtenus lors des analyses macroscopiques et microscopiques ont montré des ressemblances sur le plan morphologique à *Aspergillus niger* par rapport aux données bibliographiques (Nguyen Minh, 2007).

### **XI-La filtration membranaire (Ultrafiltration)**

Avant filtration, un dénombrement de 200 moisissures et  $32.10^2$  levures a été réalisé sur milieu CYA (**Figure 19**). Après filtration, on observe l'absence de moisissures et présence de 48 levures (**Figure 20**). Ces levures proviennent probablement soit d'une contamination de la membrane au cours de la filtration, soit d'une acidification du produit suite à son état de conservation après filtration.



**Figure 19** : Mise en évidence de la flore fongique et levures) sur milieu CYA  
**Avant filtration**



**Figure 20** : Mise en évidence des (moisissures levures sur milieu CYA  
**Après filtration**

L'ensemble de ces résultats nous ramène à dire que les spores d'*A. niger*, qui est peu producteur d'OTA, peuvent être considérées comme une source potentielle de contamination d'OTA dans les denrées alimentaires puisqu'elles ont la capacité d'accumuler cette toxine.

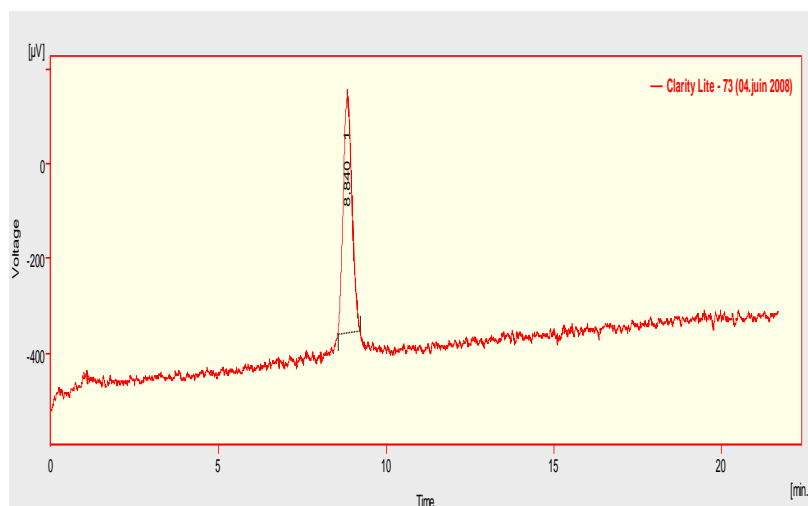
L'accumulation d'OTA se fait au niveau de la paroi externe des spores d'*A. niger*. L'OTA accumulée peut donc avoir un rôle de protection des spores contre les radiations UV comme il a été proposé pour la dityrosine et la citrinine pour les spores de levures et de *P. verrucosum* respectivement (Stormer *et al.*, 1998) car ces composés présentent un maximum d'absorption qui se situe entre 300 et 330 nm.

L'isolat d'*A. niger* (jus de raisin) a été inoculé sur plusieurs milieux de culture différents : CYA, CZ, SM, PDA et OGA. Après la période d'incubation (7 jours à 25°C), le pouvoir producteur de la souche et l'accumulation d'OTA dans les spores sont déterminés. Les résultats montrent que la concentration en spores produite par *A. niger* est différente selon le milieu utilisé.

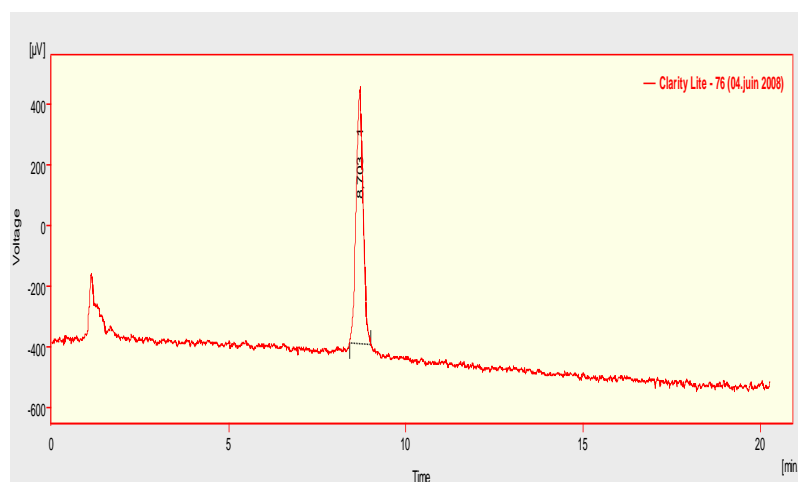
Une quantité importante de spores est produite dans les milieux CYA et PDA alors qu'une faible production en spores est observée sur les autres milieux de culture. La différence de composition des milieux de culture a aussi un effet sur la capacité de stockage de l'OTA au niveau des spores.

## XII-Analyse chromatographique

La production de l'OTA chez *A. niger* a été mesurée au cours de sa croissance par HPLC. L'identification du métabolite secondaire a été réalisée par HPLC grâce à la comparaison, avec les temps de rétention des standards de concentrations croissante et du maximum d'absorption du spectre de la fluorescence (Figures 21, 22, 23, 24 et 25).

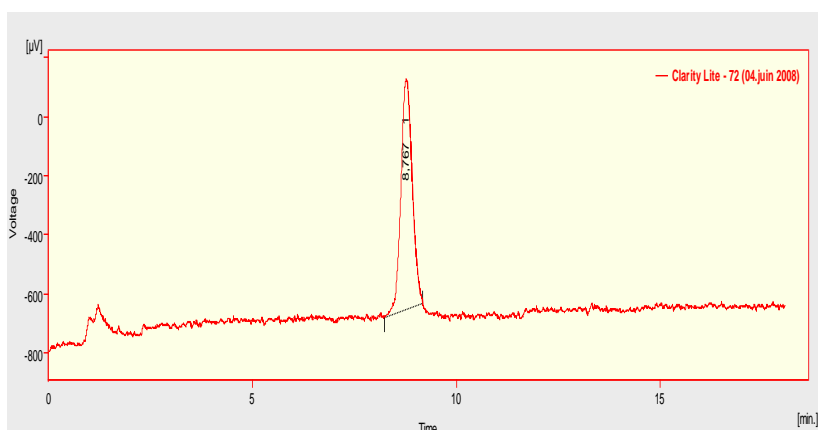


**Figure 21** : Profil chromatographique de l'OTA à une concentration de 0,6 ng/ml

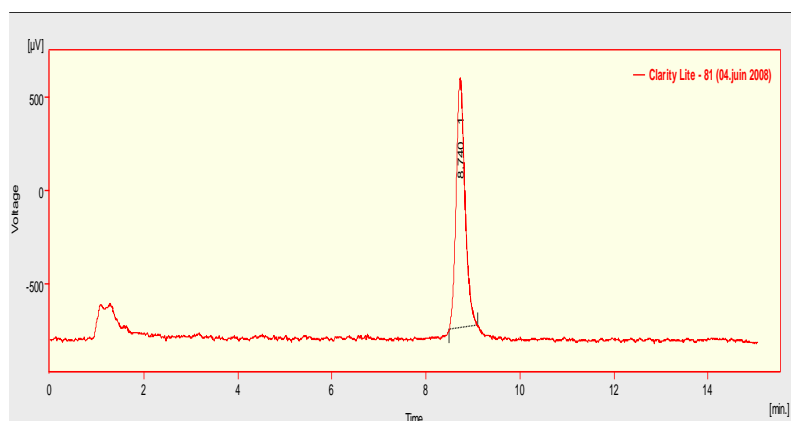


**Figure 22** : Profil chromatographique de l'OTA à une concentration de 2 ng/ml

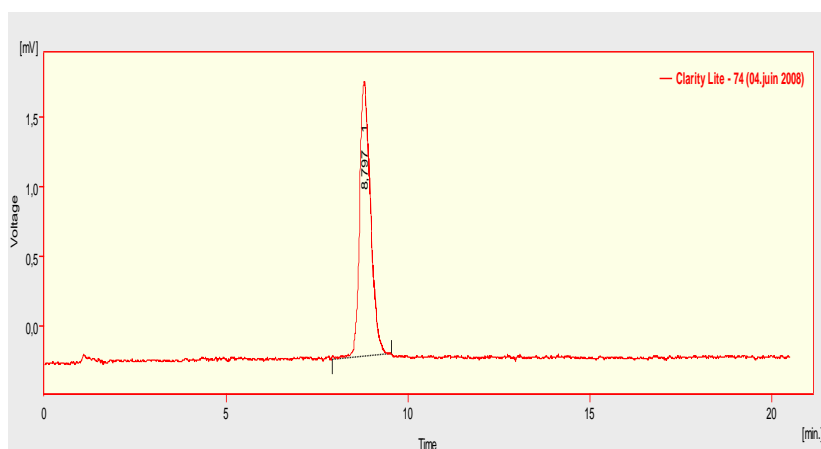
On constate que les temps de rétention pour les concentrations de l'OTA de l'ordre de 0,6 ng/ml et de 2 ng/ml sont respectivement de 8,840 min et de 8,703 min



**Figure 23** : Profil chromatographique de l'OTA à une concentration de 6 ng/ml



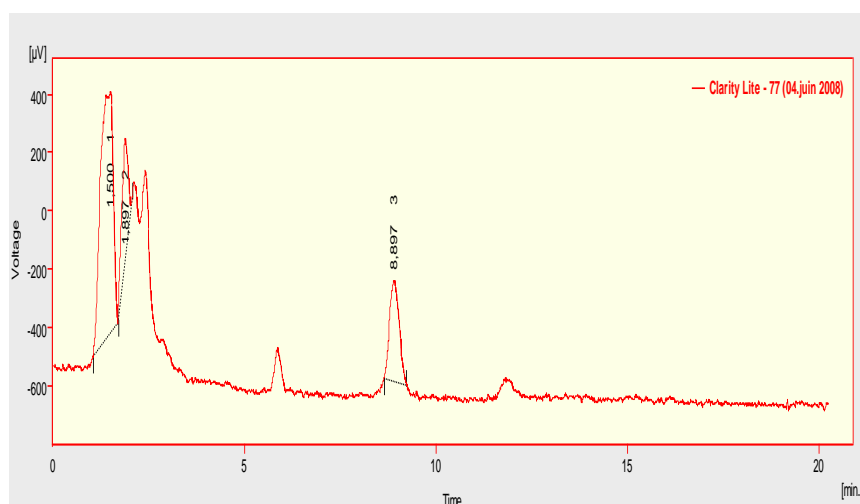
**Figure 24** : Profil chromatographique de l'OTA à une concentration de 20 ng/ml



**Figure 25** : Profil chromatographique de l'OTA à une concentration de 60 ng/ml

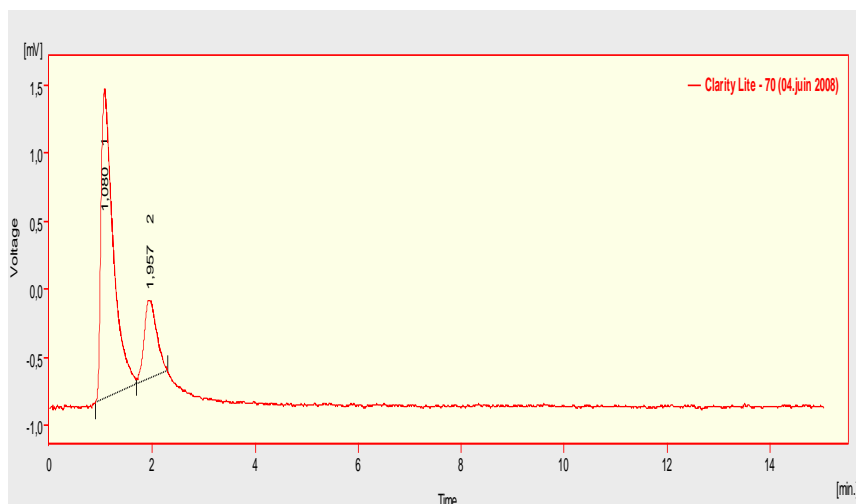
On remarque que les temps de rétention pour les trois autres concentrations de l'OTA ; constituant la courbe de calibration à savoir 6 ng/ml, 20 ng/ml et 60 ng/ml sont respectivement de 8,8767 min, 8,740 min et de 8,797 min

Selon les conditions opératoires de la HPLC en fluorométrie mentionnées dans le chapitre matériels et méthodes, la détection est sélective puisque l'OTA a été identifiée sous forme d'un seul pic. Nous nous sommes intéressés particulièrement à la polycétone telle que l'OTA, qui présente un temps de rétention de 8,808 min, l'aire du pic est égale à 6,145 mV.s, ce qui représente, par comparaison à la courbe de calibration à une concentration inférieure à 0,6 ng/ml (**Figure 26**).



**Figure 26** : Le profil HPLC en fluorescence (333 nm) d'OTA avant filtration membranaire

L'analyse du filtrat par HPLC a montré l'absence de pic, ce qui confirme l'absence de l'OTA après filtration. (**Figure 27**)



**Figure 27** : Le profil HPLC en fluorescence (333 nm) d'OTA après filtration membranaire

L'analyse de l'ochratoxine A par Chromatographe Liquide à Haute Performance (CLHP) à détection fluorimétrique a permis de visualiser la mycotoxine avec un temps de rétention inférieur à 10 minutes. Les résultats obtenus sont comparables à ceux mentionnés dans d'autres études (**Sabaou et al., 2008 ; S. De Saeger, 2004**).

L'HPLC en mode de fluorescence est un outil intéressant pour la détection et la quantification moléculaire de l'OTA dans les denrées alimentaires. Ceci permet de mieux gérer le problème des mycotoxines dans la chaîne alimentaire.

*A.niger* est considéré parmi les principaux responsables de l'ochratoxigénicité au sein de la filière raisin. Nous avons pu montrer une corrélation entre la présence de ce champignon avec la teneur en OTA. Nous avons obtenu une assez bonne corrélation positive entre la quantité de ce champignon (200 germes/ mL) et la teneur en OTA (inférieure à 0,6 ng/mL).

Nous avons donc permis d'une part d'avoir une identification d'*A.niger* efficace et d'autre part une estimation du niveau de la contamination en OTA dans le raisin. Nous avons démontré que la majorité de l'OTA se trouve accumulée au niveau des spores ( $5.10^6$ /mL) qui représentent une source potentielle importante de contamination des jus de raisin par l'OTA.

L'ultrafiltration membranaire s'est avéré une méthode efficace de stérilisation à froid permettant d'éliminer l'OTA sans modifier les principaux caractères organoleptiques du raisin.

De plus, il est à noter que l'analyse de l'ochratoxine A par LC/MS est extrêmement utile pour la confirmation de sa présence dans le jus de raisin. En raison de sa toxicité élevée, l'analyse de l'OTA doit être effectuée dans une gamme de concentration relativement basse pour le jus de raisin. La LC /MS est une excellente méthode permettant une meilleure compréhension de son mode d'action dans le processus de la mutagenèse et de la carcinogenèse chez les animaux et les humains (**A. Malley, 2005**)

## **Conclusion**

Au terme de ce mémoire nous avons utilisé l'ultrafiltration membranaire comme moyen de décontamination, contribuant ainsi à l'amélioration de la qualité sanitaire du raisin, car les mycotoxines en général, et l'Ochratoxine A en particulier, objet de notre étude constituent un problème mondial en économie alimentaire et en santé publique.

La problématique des mycotoxines ressort de l'ubiquité des moisissures dans l'environnement d'où découle une ubiquité de la contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines en général et spécifiquement l'ochratoxine. La très grande stabilité de l'ochratoxine, son transfert dans la chaîne alimentaire, son indéniable degré de toxicité chez l'homme même à l'état de traces par le risque de cancérogénicité, font d'elle un problème de santé publique, ce qui nécessite un traitement de décontamination de l'OTA sans dénaturation de la matrice alimentaire.

L'éradication du problème des mycotoxines est probablement impossible, car il reviendrait à éliminer des quantités importantes de produits agricoles des circuits de transformation et de distribution, mettant ainsi en danger la suffisance alimentaire. Si certains moyens de prévention et de décontamination contribuent à l'amélioration de la qualité sanitaire des denrées, ils nécessitent d'être perfectionnés; la réglementation et la surveillance doivent également être accentuées.

**En perspective**, les procédés de séparation membranaire à des pressions différentes peuvent servir à produire des filtrats de denrées alimentaires exempt de germes et de toxines, à partir des différentes variétés autochtones de raisin, puisqu'ils permettent d'éliminer les spores source de contamination microbienne, ainsi que les techniques de la manipulation génétique de semences afin de rendre résistantes aux infestations par les moisissures les plantes qui en seraient issues ou bien, afin de contenir la toxinogénèse des moisissures hébergées sur ces plantes, pourrait constituer une nouvelle approche de maîtrise des risques potentiels liés à la présence de mycotoxines dans les matrices alimentaires.

Références bibliographiques

**Abramson, D. 1997**, *J. Chromatogr*, 391, 315.

**Adrian Paul, T., 2004**. Etude comparée du colmatage en nanofiltration et en ultrafiltration d'eau de surface, thèse de Doctorat. Université de Laval

**Anselme, C, Jacobs, E.P. 1996**. Ultrafiltration in *Water Treatment Membrane Process*, chapitre 10, McGraw-Hill, 88 p.

**Atoui, A.K. 2006**. Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus Carbonarius* : Etudes moléculaire et physiologique. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. 199 ps.

**Audinos, R. ; Isoard P., 1986**. Glossaire des termes techniques des procédés à membrane, Société Française de filtration. 142 p.

**Belfort, G., Davis, R.H., Zydney, A.L. 1996**. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *Journal of membrane Science*, 96, 1-58.

**Berdy, J. 1995**. Are *Actinomycetes* exhausted as a source of secondary metabolites? Proceedings of the Ninth Symposium on the Actinomycetes, 13–34.

**Carlile, M.J., Watkinson, S.C. 1997**. The fungi. Academic Press. San Diego. CA.

**CAST (Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA) 2003**. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, Task force report No.139/January 2003.

**Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël T., Villard, J. 2005**. Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicooses). *Rev. Fr. Laboratoires*, 373, 61–6.

**Creppy, E.E., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Montcharmont, P., Fouillet, B., Chambon, P., Dirheimer, G. 1991**. Human ochratoxicosis in France. In: Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC scientific publications, No 115, Lyon, pp. 145-151.

**De Saeger, S., Dumoulin, F., Van Peteghem, C. 2004**. *Rapid Commun.mass.Spectrom*, 18, 1965.

**Djerbi, M. 1990**. Méthodes de diagnostic du Bayoud. *Journal of European and Mediterranean plant protection organization*, 7 pp.

**D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. 1997**. Mycotoxins. *Animal Feed ScienceTechnology*, 69, 155-166.

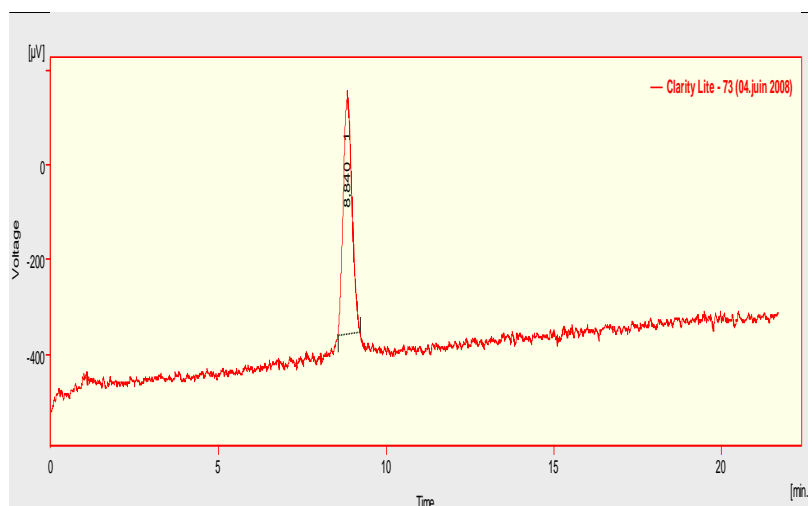
- Esteban, M.L., Abarca, M.R., Bragulat., Cabanes, F.J. 2005.** Influence of pH and incubation time on Ochratoxine A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. *Journal of Food Protection*. Vol 68 N° 7, 1435-1440.
- Faucet, V., Pfohl-Leszkowicz, J., Dai, J., Castegnaro, M., Manderville, R.A. 2004,** *Chemical, Res. Toxicol.* **17**, 1289.
- FAO, 1992,** Manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires, cours de formation sur l'analyse des mycotoxines, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture
- Guiraud, J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire, Edition Dunod, Paris, 188-200.
- Hohler, D. 1998.** Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action.. *Z. Ernahrungswiss*, **37**, 2-12.
- Hong, S, Elimelch, M. 1997.** Chemical and physical aspects of natural organic matter fouling of nanofiltration membrane in *Journal of membrane Science*, **132**, 159-181.
- Hussein, H.S. 2001., J.M. Brasel, Toxicology., 167,** 101.
- IARC (International Agency for research on cancer) 1993.** Ochratoxin A. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56, Lyon, pp. 489-521.
- Kiffer, E., Morelet, M. 1997.** Les Deutéromycètes. Classification et clés d'identification générique. INRA Editions.
- Krogh, P., 1987.**Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. *Nord Vet. Med.*, **29**, 402-408.
- Kuiper - Goodman, T., Scott, P.M. 1989.** Risk assesment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ.Sci.*, **2**, 179-248.
- Lacey, J. 1986.** Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Volkel, W., Hard, G.C., Dekant, W., 2005,** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **206**, 43.
- Monaci, F., Palmisano, F. 2004., Anal. Bioanal. Chem., 378,** 96.

- Moss, M.O., Frank, J.M. 1985.** Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society*, **84**, 585-590.
- Nguyen Minh, M. 2007.** Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam-Etude des conditions pouvant réduire la production de mycotoxines Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Ominski, K.H., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R. 1996,** G.H. Crow, D. Abramson, *Food addit.contamin.***13**, 185.
- Pardo, E., Marin, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2004.** Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiol.*, **21**, 267–274.
- Perry, J.J., Staley J.T., Lory, S. 2004.** Microbiologie. Dunod. France.
- Pfohl-Leszkowicz, A., 1999.** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, Edition Lavoisier, Technique et documentation.
- Pitt J.I., Hocking A.D.,1997.** Fungi an Food Spoilage. Blackie Academic & Professional. London-Weinheim-NewYork-Tokyo-Melbourne-Madras
- Pitt, J.I., Basílico, J.C., Abarca, M.L., Lopez, C. 2000.** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, **38**, 41-46.
- Pitt, J.I. 2000.** Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, **38**, 17-22.
- Pitt, J.I., Basílico, J.C., Abarca, M.L., Lopez, C. 2000.** Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, **38**, 41-46.
- Rajakyla, K., Laasasenaho, P.J.D. Sakkars, J. Chromatog. 384,** 391.
- Reboux, G. 2006.** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, **46**, 208–212.
- Sabaou, N., 2008.** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat, *International Journal of Food Microbiology* **122**, 85-92.
- Scudamore, K.A., Livesey, C.T. 1998.** Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *J. Sci. Food Agr.* **77**, 1-7
- Steyn, P. S. 1995.** Mycotoxins, general view, chemistry and structure
- Steyn, P. S. 1980.** The biosynthesis of mycotoxins. *Acad. Press. N. Y. and London.*

- Stormer, F.C., Sandven, P. , Huitfeldt, H.S., Eduard, W. , Skogstad, A. 1998.** Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*? *Mycopathologia*, **142**, 43–47.
- Strohl, W.R. 1997.** Industrial antibiotics: today and the future. In WR (Ed) *Biotechnology of antibiotics*, 2nd edn. Marcel Dekker. New York. 1-47.
- Valenta, H. 1998,** *J. Chromatogr.A.*, **815**, 75.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z., 2006.** Ochratoxin A in grapes and grape derived products. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 72-81.
- Xiao, H., Marquardt, R.R., Abramson, D., Frohlich, A. 1996.** Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 648-655.
- Yiannikouris, A., Jouany, J.P. 2002.** Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.*, **51**, 81–99.
- Zepnik, H., Volkel, W., Dekant, W., 2003,** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**, 36.
- Zimmerli, B., Dick, R. 1996.** Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food additives and Contaminants*, **13**, 655-668.
- Zoolner, P., Bernhard, M.H. 2006.** Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A.*, **1136**, 123-169.

AnnexeStandard 1 : 0.6 ng/mL

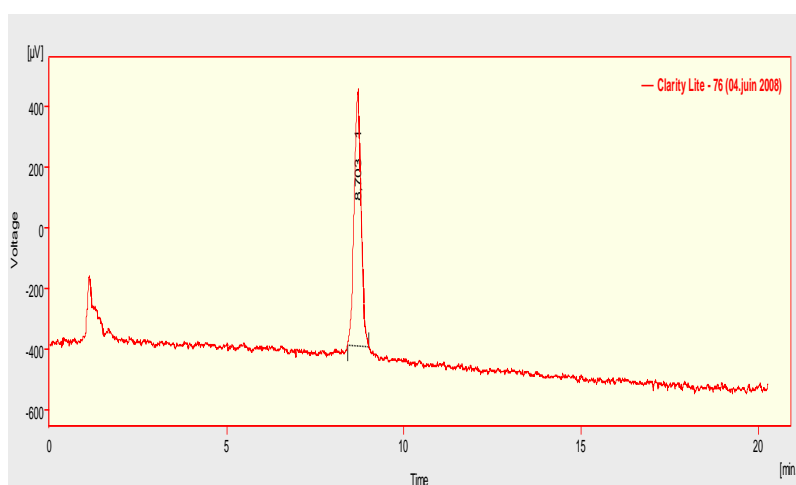
Temps de rétention (min)	Aire du pic (mV .s)
8.840	9463



**Figure 21** : Profil HPLC en fluorescence (d'excitation 333nm,  $\lambda$  d'émission 460 nm) de l'Ochratoxine à 0,6 ng/mL

Standard 2 : 2 ng/mL

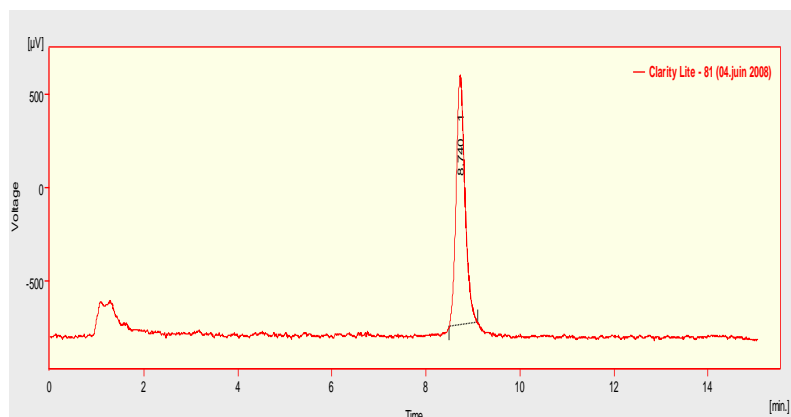
Temps de rétention (min)	Aire du pic (mV .s)
8.703	11604



**Figure 22** : Profil HPLC en fluorescence (d'excitation 333nm,  $\lambda$  d'émission 460 nm) de l'Ochratoxine à 2 ng/mL

**Standard 3 : 6 ng/mL**

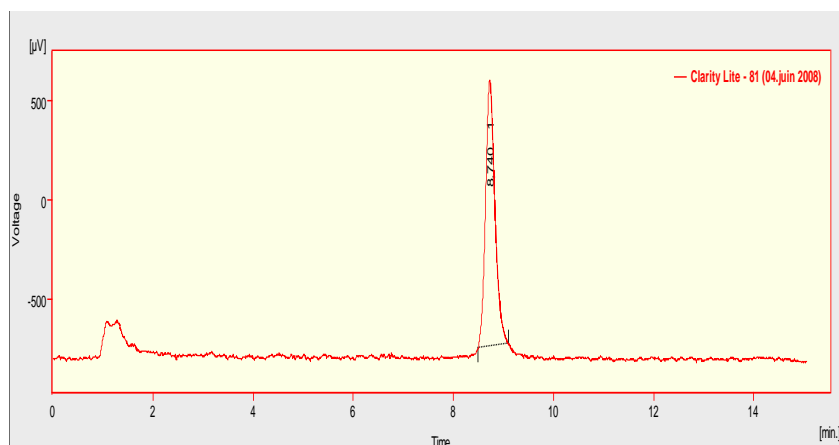
Temps de rétention (min)	Aire du pic (mV .s)
8.767	14925



**Figure 23** : Profil HPLC en fluorescence (d'excitation 333nm,  $\lambda$  d'émission 460 nm) de l'Ochratoxine à 6 ng/mL

**Standard 4 : 20 ng/mL**

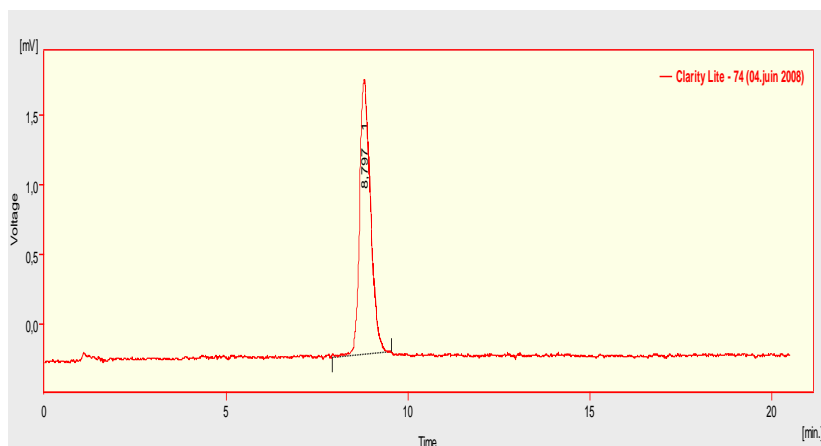
Temps de rétention (min)	Aire du pic (mV .s)
8.740	17243



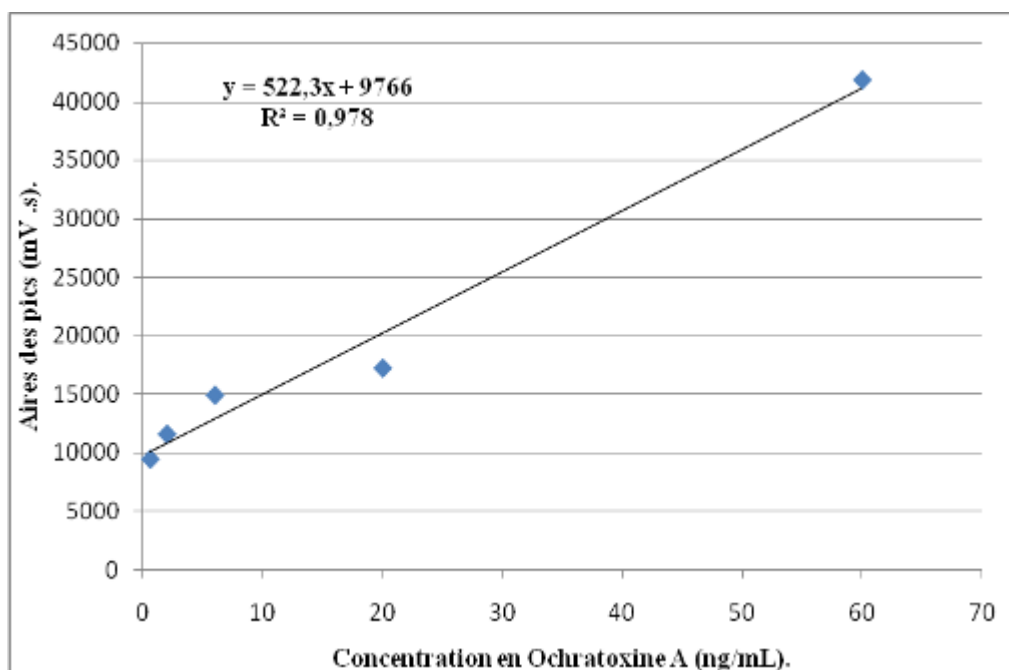
**Figure 24** : Profil HPLC en fluorescence (d'excitation 333nm,  $\lambda$  d'émission 460 nm) de l'Ochratoxine à 20 ng/mL

**Standard 5 : 60 ng/mL**

Temps de rétention (min)	Aire du pic (mV.s)
8.797	41871



**Figure 25** : Profil HPLC en fluorescence (d'excitation 333nm,  $\lambda$  d'émission 460 nm) de l'Ochratoxine à 60 ng/mL



**Figure 26** : Courbe de calibration des solutions standards.

### Solution minérale

Composition pour 1 litre

Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. H<sub>2</sub>O.....70 mg

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. 4H<sub>2</sub>O.....50 mg

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....1000 mg

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O .....30 mg

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O .....11 mg

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....1760 mg

Le pH est ajusté à 2 avec 6 N HCl

## **Résumé**

*Aspergillus niger*, contaminant fongique de raisin, variété Cinsault produit de nombreux polycétones dont les mycotoxines, a été identifié, après sa purification par la technique de culture monospore sur les milieux de culture PDA et CYA. Durant ce travail, l'ochratoxine A (O.T.A.) a été extraite et purifiée sur colonne d'immunoaffinité. Aussi un système de détection et de quantification de l'OTA a été réalisé par la Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance (HPLC) à fluorescence. Ce système chromatographique nous a ainsi permis d'avoir une estimation de la contamination en ochratoxine A dans le raisin qui est inférieure à 0.6 ng/Kg. La concentration conidienne chez *Aspergillus niger* a été estimée à  $5.10^6$  spores /ml.

Enfin, un procédé de filtration membranaire a été réalisé sur le filtrat issu de l'immunopurification. Les résultats ont montré que la toxine accumulée dans les spores avant filtration n'a pas été détectée en HPLC à fluorescence et l'absence de développement du mycète sur les milieux de cultures sélectifs. Ceci montre l'efficacité de l'ultrafiltration dans la décontamination de la mycotoxine.

**Mots clés :** OTA, *Aspergillus niger*, HPLC, fluorescence, ultrafiltration

## **Abstract**

*Aspergillus Niger*, fungic grape contaminant, variety Cinsault product many polycetones from which the mycotoxins, was identified after its purification by the technique of culture monospore on the culture media PDA and CYA. During this work, ochratoxine A (O.T.A.) was extracted and purified on column of immunoaffinity. Therefore a system of detection and quantification of the OTA was the Chromatography in High Performance Liquid Phase (CLHP) with fluorescence. This chromatographic system thus allowed us to have an estimate of the contamination of ochratoxine A in the grape which is lower than 0.6 ng/Kg. The concentration of conidia at *Aspergillus niger* was estimated at  $5.10^6$  conidia / ml.

Lastly, a membrane process of filtration was carried out on the filtrate resulting from immunopurification. The results showed that the toxin accumulated in the conidia before filtration was not detected in CLHP with fluorescence and the absence of development of the mycete on the selective culture media. This shows the effectiveness of ultrafiltration in the decontamination of the mycotoxin.

**Keys words :** OTA, *Aspergillus niger*, CLHP, fluorescence, ultrafiltration.