

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire au biomédicale et à L'environnement

(LAMAABE)

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de

Magister

Option :

Maitrise de la qualité microbiologique et du développement microbien

Contribution à l'étude mycologique et mycotoxicologique du café commercialisé dans la région de Laghouat

Présenté par : Mr.Chetatha Mohamed

Soutenue : 24/09/2013

Devant le jury composé de

Mr. MOUSSA BOUDJEMAA. B	Professeur	Président	Université de Tlemcen
Mr. ABDELOUAHID. D.E	Professeur	Examineur	Université de Tlemcen
Mr.LAZOUNI .H	Maître de conférences A	Examineur	Université de Tlemcen
Mr. BENDAHOU. M	Professeur	Examineur	Université de Tlemcen
Mr. MOUSSAOUI Abdallah	Professeur	Promoteur	Université de Béchar

Année Universitaire : 2013-2014

Remerciements

Ce travail à été réalisé au :

Laboratoire *des Ressources biologique et Sécurité alimentaire des zones semi aride du sud West algérienne de l'université de Bechar. Sous la direction scientifique de monsieur le professeur Abdalah Moussaoui et aux :*

Je tiens également à remercier M^r MOUSSA BOUDJEMAA Boumediene directeur de Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) à UABT, de s'être intéressé à mon travail et de m'avoir fait l'honneur d'assurer la présidence du jury.

Mes vifs remerciements et mon profond respect s'adressent également à M^r ABDELOUAHID Djamel Eddine, M^r LAZOUNI Hammadi et M^r BENDAHOU Mourad d'avoir bien voulu juger ce travail.

Laboratoire des sciences fondamentale (Professeur Mohamed Yousfi), Laboratoire de génie des procédés (Docteur Boubekour Saidat) au sein de l'université de Laghouat.

Laboratoire du centre de transfusion sanguine de l'EPH de Laghouat (Docteur Khaled Elhamel).

Qu'ils reçoivent ma profonde reconnaissance et mes remerciements sincères.

Et je tiens encore à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'y participer.

Mes remerciements vont aussi à Mme Malek et Mme Hssaine, Mme Moussaoui , Mr : Bachir,...qui m'ont apporté aide et soutien lors de mon travail au labo de recherche à Béchar.

Je n'oublier pas l'accueil amical de toutes les personnes des laboratoires à Béchar et Laghouat, Tlemcen (LAMAABE),...

M^{rs} : Moughtite Snoussi, Belmeki Nourdine, Oualide Faride, Gadi Omar, Abdoune Mohamed Elamine, Boumedienne Karima, Medjahdi Khadidja, Liazid Asmaa, Bouali Asmaa, Ben Ammar Ibrahim, Ben Belaide Fethi ...

Résumé :

L'étude de l'état sanitaire des grains de cafés verts et torréfiés type: *Arabica* Brésilienne et *Canifora* (*Robusta*) Indienne, *Robusta* Vietnamiennne, *Robusta* Cote d'Ivoirienne. commercialisé dans la région de Laghouat, et notamment pour l'étude de la myco-toxicoflore notamment certains moisissures filamenteux contaminants, des méthodes différent mais complémentaires ont été utilisées: la méthode de buvard et buvard modifiée pour avoir le taux de contaminations superficiel et profonde des moisissures, dénombrements et culture sur milieu (CDA, PDAac), isolement et purification des souches contaminants et identification par méthode micro-culture et single spore, sélectionnèrent des souches mycotoxinogènes et ochratoxinogènes, test du pouvoir mycotoxinogène sur milieu (YES), révélation et détection de l'ochratoxine A(OTA) par la méthode CCM (chromatographie sur couches minces), dosage et quantifications de l'ochratoxine A et de l'aflatoxine B₁ par méthode immuno-enzymatique (ELISA). Les résultats sont permis de mettre en évidence 13 espèces appartenant à différents champignons. La méthode du buvard modifiées'avère plus intéressante et permet de détecter davantage le pourcentage de contamination interne (profonds). Les espèces fongiques les plus fréquentes sont: *Aspergillusochraceus*, *Aspergillusflavus*, *Aspergillusparasiticus*, *Aspergillusniger*, *Aspergillustamarii*, *Penicilliumsp*, *Fusariumsp*, suivies par *Curvulariasp*, *Mucorsp*, *Rhizopus sp*.

Mots clés: Café vert *Arabica* et *Canifora* (*robusta*) – Café torréfié – Ochratoxine A-Aflatoxine B₁ - CCM – ELISA.

ملخص :

دراسة الحالة الصحية لحبوب البن الأخضر و الحمص لأنواع : أرابيكا البرازيلية والكانيفورا نوعية(روبستا) الهندية وروبيستا الفيتنامية ، روبستا ساحل العاج . التي تسوق في منطقة الأغواط ، وهذا لدراسة المايكوتوكسيكوفلورا بما في ذلك بعض الفطريات الخيطية الملوثة ، تم استخدام طرق فحص مختلفة لاعتبارها متكاملة : طريقة ورق النشاف وورق النشاف المعدل وهذا للكشف على مستويات الاصابة بتلوثات العفنية السطحية والعميقة و طريقة الاستنبات على وسائط الزرع الصلبة (PDAac, CDA) ، وطرق العزل والتنقية للعفنيات و وسيلة الميكروكليتير لتحديد جنس العفنيات المعزولة، وتقنية البوغ الواحد و اختبار قدرة هذه السلالات لتوليف السموم الفطرية المستتبة في وسائط الزرع السائلة (YES) ، وهذا لاضهار و الكشف على وجود الأوكراتوكسين A والافلاتوكسين B1 بواسطة الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، والتقدير الكمي للأوكراتوكسين A و للأفلاتوكسين B1 في مختلف عينات البن المفحوصة بواسطة تقنية اليزا (ELISA) . سمحت لنا النتائج المتحصل عليها من احصاء 13 نوعا تنتمي إلى مختلف العفنيات. طريقة ورق النشاف المعدلة اثبتت نتائج مثيرة وهامة وهذا لاحتاحتها لنا فرصة الكشف عن نسبة التلوث الداخلي (العميق) لحبوب البن. الأنواع الفطرية الأكثر تواجدا :

Aspergillusochraceus, Aspergillusflavus, Aspergillusparasiticus, Aspergillusniger, Aspergillustamarrii, Penicilliumsp, Fusariumsp , ثم يليها *Curvulariasp, Mucorsp, Rhizopussp* .

الكلمات المفتاحية : البن الاخضر ارابيكا و كانيفورا (روبيستا) ، البن الحمص، الاوكراتوكسينA ، الافلاتوكسينB1، TLC ، ELISA .

Abstract:

The study of the health status of green coffee beans and roasted types: Arabica Brazilian and Caniforae (Robusta) Indian , Robusta Vietnami, Robusta Cote d' Ivorian . marketed in the region of Laghouat , particularly for the study of myco - toxicoflora including some filamentous fungi contaminants , of different but complementary methods were used: the method of blotting and blotting modified for the superficial and deep levels of contamination of mold counts and culture medium (PDAac,CDA) , isolation and purification of stem contaminants and identification method micro- culture and single spore of selectionnerent mycotoxinogenesis ochratoxinogenesis and strains test authority mycotoxinogenesis on medium (YES) , revelation and detection ochratoxin A and aflatoxin B₁ by the TLC method, dosage and quantification ochratoxin A and aflatoxin B₁ by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results allowed us to evidence 13 species belonging to different fungi. The modified method of blotting is more interesting and can detect more the proportion of internal contamination (inner). The most common fungal species: *Aspergillusochraceus*, *Aspergillusflavus*, *Aspergillusparasiticus*, *Aspergillusniger*, *Aspergillustamarii*, *Penicilliumsp*, *Fusariumsp*, followed by *Curvulariasp*, *Mucorsp*, *Rhizopus sp*.

Keywords: Green coffee Arabica and Caniforae (robusta), roasted coffee, ochratoxin A, aflatoxin B₁, TLC, ELISA.

Sommaire

Remerciements	
Résumé	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	I
Historique	II

Partie bibliographique

Chapitre I : Le café

I. Introduction.....	01
II. L'écologie du café.....	02
III. Propriétés du café.....	02
III. Production.....	03
IV. Principales variétés.....	04
V. Composition du café.....	04
Caféine	05
VI. Etapes de la fabrication.....	06
VI.1. Récolte et séchage.....	06
VI.2. Torréfaction.....	07
Réaction de Maillard.....	08
Mécanisme de la réaction de Maillard.....	08
Dégradation de Strecker.....	10
VI.3. Préparation du café boisson.....	11
VI.4. Cafés solubles et décaféinés.....	12
VI.4.1. Le café soluble.....	12
VI.4.2. Le café décaféiné.....	12
VII. Substituts du café.....	12
VIII. Le système HACCP.....	12

Chapitre II : Mycoflore toxigène

1. La contamination par les moisissures	14
2. Facteurs favorisant la contamination	14
3. Mycoflore toxigènes	15
4. Formation des mycotoxines dans les végétaux	16
5. Biosynthèse des mycotoxines.....	17
6. Les principales mycotoxines et leurs effets chez l'être humain	17
7. Réglementation concernant les mycotoxines	20

Chapitre III : Ochratoxine A

1. L'alimentation vectrice d'OTA.....	22
2. les moisissures ochratoxinogènes.....	22
3. Ochratoxine A.....	23
4. Dérivés.....	26
5. Propriétés physico-chimiques des mycotoxines	27
6. Toxicocinétiques de l'OTA.....	27
7. Effets toxiques	27
8. Détection des mycotoxines	27
9. Nature de la molécule.....	28
10. Toxicité aigue	28
11. Toxicité subaiguë et chronique.....	28

12.Néphrotoxicité.....	28
13.Carcinogénicité.....	28
14.Mécanismes de génotoxicité et mutagénicité.....	29
15.Formation d'adduits à l'ADN.....	29
16.Voie de biosynthèse de l'OTA.....	30
17.Condition d'ochratoxigénèse.....	30
18.Organisation des gènes de la voie de biosynthèse d'un polycétone.....	30
19.Organisation d'un gène en cluster.....	30

Partie expérimentales

I. Matériels et méthodes

I. Echantillonnage.....	31
II. Présentation de la région d'étude.....	31
III. Prélèvement.....	33
V. Analyses physico-chimiques.....	34
IV.1Détermination du pH.....	34
IV.2Détermination de la teneur en eau (humidité relative).....	34
IV. Analyses mycologiques.....	34
IV.1Méthode buvard (mycoflore externe et interne).....	34
IV.2Méthode buvard modifié (mycoflore interne).....	34
IV.3Méthode de dilution (dénombrement).....	35
IV.4Purification et conservation des souches de moisissures isolées.....	36
IV.5Identification des moisissures isolées.....	36
IV.5.1Identification des genres.....	36
IV.5.1.1Critères d'identification macroscopique.....	37
IV.5.2Identification des espèces.....	37
IV.5.2.1Critères d'identification microscopique.....	37
IV.6 Identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	37
IV.7Confirmation de l'identité des espèces d' <i>Aspergillus flavus</i> et <i>A.parasiticus</i>	38
IV.9Calcul de la fréquence et de l'abondance des espèces fongiques isolées.....	40
V.1 Extraction et purification à partir du milieu de culture liquide (extraction liquide/liquide).....	41
V.2 Extraction et purification à partir du substrat (extraction solide/liquide).....	43
V.2.1Etape d'extraction et concentration.....	43
V.2.2Etape de purification des extraits.....	45
VI. Méthodes de séparation et détections des mycotoxine.....	47
VI.1 Chromatographie sur couches mince monodimensionnelle (CCM).....	47
VI.2 Technique d'ELISA.....	47
VI.2.1 Principe du teste de l'OTA.....	47
VI.2.1.1Protocole du dosage de l'OTA par ELISA.....	48
VI.2.1.1.1 Préparation des échantillons (1 ^{ère} étape).....	48
VI.2.1.1.2 Procédure de test (2 ^{ème} étape).....	49

II. Résultats

I. Résultats et interprétation.....	56
I.1Résultats physico-chimique.....	56
I.1.1Mesure du pH.....	56
I.1.2L'humidité relative (HR%).....	56
I.2 Evaluation de la mycoflore.....	57
II. Description des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	61
II.1Identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> selon la méthode de Pitt et Hocking (2009).....	62

II.2 Identification des espèces de <i>Penicillium</i> selon la méthode de Ramirez (1982), Pitt et Hocking (2009).....	65
III Résultats d'analyses mycotoxicologiques (révélation des chromatogrammes)	66
III.1 Souches productrices des mycotoxines	66
III.2 Détection des mycotoxines l'OTA et l'AFB ₁ au niveau des substrats	67
IV Résultats du dosage de l'OTA et l'AFB ₁ au niveau des substrats par méthode ELISA	68
III. Discussions	70
IV. Conclusion	73
Références bibliographique	75
Annexes	

Liste des figures

Fig 1.1 : Carte de migration du café dans le monde (Mark Pendergrast, 2010)	01
Fig1.2: Principaux producteurs du café vert (FAOstat,2004)	03
Fig 1.3: Représentation schématique d'une cerise de café (Geoffrey S. Ashworth et Pablo Azeveo, 2009)...04	
Fig 1.4: Diagramme de traitement primaire du café vert (Geoffrey S.Ashworth et Pablo Azevedo, 2009)...07	
Fig 1.5: Les principales étapes de la réaction de Maillard (Machiels et Istasse, 2002).....09	
Fig 1.6.Mécanisme de formation des produits d'Amadori (Machiels et Istasse, 2002).....09	
Fig 1.7.Mécanisme de formation des produits de Heyns (Machiels et Istasse, 2002).....09	
Fig 1.8. Enolisation 1-2 et de 2-3 des composés d'Amadori et de Heyns pour aboutir à la formation de mélanoidines (Machiels et Istasse, 2002).....10	
Fig 1.9: Importations mondiale du café torréfié (FAOstat, 2004)	11
Fig 2.1: Classification générale des champignons (Dominique Cabasse, et al, 2002).....14	
Fig 2.2: Biosynthèse des mycotoxines (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007).....17	
Fig 3.1.Principales sources d'OTA, (FAO, 2010).....22	
Fig 3.2 : Structure de base de l'ochratoxine A (Luis Almela et al, 2007).....23	
Fig 3.3: Dérivés de l'ochratoxine A (Luis Almela et al, 2007).....25	
Fig 3.4 : Schéma des dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'OTA (Antonia Gallo et al, 2012).....29	
Fig 3.5: Schéma de l'influence des paramètres extérieurs sur l'activation des gènes de biosynthèse des mycotoxines (Markus Schmidt-Heydt et al, 2011).....29	
Fig 3.6 : Les gènes de biosynthèse de l'ochratoxine A (Markus Schmidt-Heydt et al, 2011).....30	
Fig 4.1: Prix du café vert pendant les trois dernières années (marché locale de Laghouat).....31	
Fig 4.2: Localisation géographique de la wilaya de Laghouat.....32	
Fig 4.3: Préparation de suspension-mère (B.CHAGNIER, Richard-Molard, 1989).....35	
Fig 4.4: Technique d'inoculation des différents isolats de <i>Penicillium</i>38	
Fig 4.5: Technique d'inoculation des différents isolats d' <i>Aspergillus</i>38	
Fig 4.6: Technique de confirmation d'identité <i>Aspergillusflavus</i> et <i>A.parasiticus</i> sur milieu AFPA.....39	
Fig .4.7: Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines (FAO, 1992).....41	
Fig. 4.8 : Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide selon Davis et al. (1966).....42	
Fig. 4.9: Diagramme d'extraction du mycotoxine à partir du substrat solide (1ère étape) selon Betina, (1933).....44	
Fig. 4.10: Diagramme de purification du mycotoxine à partir du substrat solide (2ème étape) selon Betina,(1933) modifié.....46	
Fig. 4.11: Protocole des étapes de préparation des échantillons de café vert pour le dosage de l'OTA par technique d'ELISA (1ère étape).....49	
Fig. 4.12: Protocole de procédure de dosage de l'OTA dans les échantillons de café vert par technique d'ELISA (2ème étape).....51	
Fig. 4.13: Protocole des étapes de préparation des échantillons de café vert pour le dosage de l'AFLA B1 par technique d'ELISA (1ère étape).....53	
Fig. 4.14: Protocole de procédure de dosage de l'AFLA B1 dans les échantillons de café vert par technique d'ELISA (2ème étape).....55	
Fig 5.1: pH de différents échantillons de café.....56	
Fig 5.2: Taux d'humidité relative de différents échantillons de café	56
Fig 4.3: Recensement de la mycoflore totale des prélèvements du café analysés.....57	
Fig 5.5 Taux de contamination de chaque échantillon de café.....58	
Fig 5.6: Taux de contamination de chaque variété de café.....58	
Fig 5.7 Abondance des espèces fongiques du café Arabica Brésillienne.....59	
Fig 5.8 Abondance des espèces fongiques du café Robusta Vietnamiennne.....59	
Fig5.9 Abondance des espèces fongiques du café Robusta Indienne.....60	
Fig 5.10 Abondance des espèces fongiques du café Cote-Divoirienne.....60	
Fig 5.11 Abondance des espèces fongiques du mélange torréfié (25%Arabica, 75%Robusta).....61	
Fig 5.12 Photo de l'espèce du genre <i>Aspergillus ochraceus</i> isolées à partir du café, sur milieux standards d'identification (a,b,c au 7 ^{ème} jour, d au 14 ^{ème} jour).....63	
Fig 5.13 Photo des espèces du genre <i>Aspergillus</i> isolées à partir du café, sur milieux standards d'identification (a,b,c au 7 ^{ème} jour, d au 14 ^{ème} jour).....64	

Fig 5.14 Photo des espèces du genre <i>Penicillium</i> isolées à partir du café sur les milieux standards d'identification au 14 ^{ème} jour	66
Fig 5.15 Révélation des isolats souches mycotoxinogènes sous lampe UV 366nm (Lampe UV type SPECTROLINE®).....	67
Fig 5.16 Détection des mycotoxines l'OTA et l'AFB ₁ au niveau du café vert sous lampe UV 366nm (Chambre UV fort puissance type CAMMAG).....	67
Fig 5.17 Détection des mycotoxines l'OTA et l'AFB ₁ au niveau du café torréfiées sous lampe UV 366nm (Chambre UV fort puissance type CAMMAG).....	68

Liste des tableaux

Tab.1.1: Principaux constituants biochimiques du café (en g/100g) (Jean. Adrian et al, 2003)* et d'après (Clarke, 1987 ; Viani, 1993; Ky et Al., 2001 ; Vasconcelos et al., 2007).....	05
Tab.1.2: Types de torréfaction.....	08
Tab.2.1 : Développement maximum de moisissures sur les aliments (G.Reboux, 2006).....	15
Tab.2.2 : Rappel historique des principales intoxications liées aux mycotoxines (G.Reboux, 2006).....	16
Tab.2.3 : Espèces fongiques productrices de mycotoxines (G.Reboux, 2006).....	16
Tab.2.3: Les principales mycotoxines et leurs effets chez l'être humain (Guy LEYRAL, Elisabeth VIÉRLING, 2007).....	18
Tab. 3.1 : Fiche informative de l'ochratoxine A (service de la sécurité alimentaire/direction de la santé de Luxembourg/ 2010).....	24
Tab. 3.2. Différents formes d'ochratoxines.....	26
Tab. 4.1: Liste des échantillons analysés.....	33
Tab.4.2: Caractéristiques des milieux spécifiques pour la détermination des genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	38
Tab 4.3:Description d' <i>Aspergillus flavus</i> selon la méthode de Pitt et Hocking.....	39
Tab 4.4:Description d' <i>Aspergillus parasiticus</i> selon la méthode de Pitt et Hocking.....	40
Tab 5.1:Identification des <i>Aspergillus</i> isolées selon la méthode de Pitt et Hocking (2009).....	62
Tab 5.2:Identification des <i>Penicillium</i> isolées selon la méthode de Ramirez (1982), Pitt et Hocking (2009).....	65
Tab 5.3 Résultats du dosage de l'ochratoxine A et l'aflatoxine B ₁ dans les échantillons de café vert.....	69

Liste des abréviations

°C: Degré Celsius

µg : microgramme

µl : Micro litre

AFPA: *Aspergillus flavus-parasiticus* agar

CCM : Chromatographie sur couche mince

CDA: Czapek Dox Agar

CE : Conformité Européenne

cm : Centimètre

Code Kemler : code pour le transport de matières dangereuses

CYA: Czapek Yeast Extract Agar

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FAO: Food and Agriculture Organisation of the united nations

Fig : Figure

g : gramme

G25N: 25 % Glycérol Nitrate Agar

HACCP : Hazard analysis critical control point

HPLC: High performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)

I.A.B.T: prélèvement (I) Arabica brésilienne torréfié

I.A.B.V: prélèvement (I) Arabica brésilienne vert

I.M.T: prélèvement (I) Mélange torréfié □

I.R.C.T: prélèvement (I) Robusta Côte-D'ivoire torréfié

I.R.C.V: prélèvement (I) Robusta Côte-D'ivoire vert

I.R.I.T: prélèvement (I) Robusta indienne torréfié

I.R.I.V: prélèvement (I) Robusta indienne vert

I.R.V.T: prélèvement (I) Robusta vietnamienne torréfié

I.R.V.V: prélèvement (I) Robusta vietnamienne vert

IARC: International Association for Research on Cancer

II.A.B.T: prélèvement (II) Arabica brésilienne torréfié

II.A.B.V: prélèvement (II) Arabica brésilienne vert

II.M.T: prélèvement (II) Mélange torréfié

II.R.C.T: prélèvement (II) Robusta Côte-D'ivoire torréfié

II.R.C.V: prélèvement (II) Robusta Côte-D'ivoire vert

II.R.I.T: prélèvement (II) Robusta indienne torréfié

II.R.I.V: prélèvement (II) Robusta indienne vert

II.R.V.T: prélèvement (II) Robusta vietnamienne torréfié

II.R.V.V: prélèvement (II) Robusta vietnamienne vert

III.A.B.T: prélèvement (III) Arabica brésilienne torréfié

III.A.B.V: prélèvement (III) Arabica brésilienne vert

III.M.T: prélèvement (III) Mélange torréfié

III.R.C.T: prélèvement (III) Robusta Côte-D'ivoire torréfié

III.R.C.V: prélèvement (III) Robusta Côte-D'ivoire vert

III.R.I.T: prélèvement (III) Robusta indienne torréfié

III.R.I.V: prélèvement (III) Robusta indienne vert

III.R.V.T: prélèvement (III) Robusta vietnamienne torréfié

III.R.V.V: prélèvement (III) Robusta vietnamienne vert

INPV: Institut national de protection des végétaux

IUAPC: International Union of Pure and Applied Chemistry

JEFCA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

JORADP: Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire

Kg: Kilogramme

L: Litre

m: Mètre

MEA: Malt Extract Agar

mg: milligramme

min: minute

ml: millilitre

N° CAS: Chemical Abstract Service

N° EINECS: European Inventory of Existing Commercial chemical Substances

OMS: organisation mondiale de la santé ou (WHO)

OT α : ochratoxine α

OTA: ochratoxine A

OTB: ochratoxine B

OTC: ochratoxine C

PDA: Potatoes Dextrose agar

PDAac: Potatoes Dextrose agar acid

Phrases R: phrases de risque (directive européenne 67/548/EEC : Safety advice concerning dangerous substances and preparations).

Phrases S: conseils de prudence (directive européenne 67/548/EEC : Nature of special risks attributed to dangerous substances and preparations).

PubChem: Banque de données américaine des molécules chimiques gérée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Rf: rapport frontal

RIA: Radio immunoassay

s: seconde

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

T°: Température

Tab: Tableau

TFC: totale fungal count =UFC/g

UFC: unités formant colonies

UV: Ultra violet

WHO: World Helth Organization ou (OMS)

YES: Yeast Extract Sucrose

Le café a une histoire vieille de plus de cinq cents ans (Antony Wild, 2009). Demeuré l'un des produits les plus consommés au monde et constitue la deuxième boisson consommés quotidiennement après l'eau.

Les pays scandinaves d'où la Finlande et la Suède sont les plus grands consommateurs de café avec respectivement 13,8 et 13,7 Kg par personne annuellement. Paradoxalement l'Amérique latine, le plus grand producteur, consomme peu de café, le Brésil faisant l'exception. L'Afrique à une faible consommation intérieure, sauf en Afrique du nord où la tradition du café est installée.

De nos jours, le café est l'un des principaux produits du commerce mondial, puisque c'est la seconde marchandise échangée dans le monde, derrière le pétrole. C'est –à-dire l'exploitation des caféicultures. Entre outre, l'industrie du café, dont plus d'une centaine de millions de personnes dépendent pour leur subsistance, est maintenant le plus grande employeur mondial et est vitale pour nombre de pays du Tiers Monde (Antony Wild, 2009).

L'objectif de ce travail à été de caractériser la flore fongique contaminent les différents variétés du café commercialisé dans le marché locale de la région de Laghouat, et d'étudier le potentiel toxigène des souches isolées afin d'évaluer le risque mycotoxique associé à la consommation du café.

Pourquoi l'OTA est-elle importante et quels en sont les effets?

Les effets néphrotoxiques de l'OTA ont été démontrés chez tous les mammifères. Dans les études de toxicité aiguës, les valeurs de LD₅₀ varient considérablement selon les espèces, mais le chien est particulièrement sensible. L'OTA est également un puissant tératogène chez les souris, les rats, les hamsters et les poulets. Les effets tératogènes et reproductifs ont été prouvés et l'on sait que la toxine agit sur le système immunitaire de plusieurs mammifères.

Des évaluations de risque ont été réalisées par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JEFCA) ainsi qu'au Canada et en Scandinavie. Le JECFA, comme l'étude plus récente SCOOP 2002 sur l'évaluation de l'absorption alimentaire d'OTA par la population de la CE' montrent que le café est une source relativement marginale d'OTA en Europe.

Ce mémoire s'articule en trois chapitres. Nous allons donc débiter ce travail par le chapitre (I) qui consistera à présenter les constituants du café, ses différents méthodes de traitement, tout en mettant en évidence les différentes réactions qui peuvent avoir lieu. Le chapitre (II) sur la mycoflore toxigènes, et le III^{ème} chapitre sur l'ochratoxine A.

Dans les deux parties qui suivent nous présenterons les matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail. L'autre partie est consacrée aux résultats que nous avons obtenus.

L'historique de la contamination du café par l'OTA ;

La présence d'OTA dans le café vert a été signalée pour la première fois en 1974 par Levi et al., et dans le café infusé en 1995 par Studer-Rohr et en 1988 par Tsubouchi. Des études montrent que la torréfaction détruit de 30 à 90% et plus d'OTA dans le café vert et que l'OTA résiduelle dans le café torréfié peut être facilement extraite dans une solution aqueuse. Il est donc évident qu'en l'absence de contrôles d'hygiène suffisants, le café vert peut être contaminé par l'OTA, ce qui représente un danger potentiel de santé publique. On sait que l'ochratoxine A a des propriétés néphrotoxiques, cancérigène, tératogènes et peut-être également génotoxiques. On sait depuis longtemps que l'OTA est un puissant néphrotoxique et cancérigène rénal auquel les porcins sont particulièrement sensibles. Cette toxine touche surtout les reins et peut provoquer des lésions aiguës et chroniques ; elle a été rattachée à la néphropathie endémique balkanique, maladie rénale mortelle que l'on rencontre souvent, mais pas exclusivement, dans plusieurs vallées des Balkans. L'ochratoxine B (dérivé de chloro de l'OTA), en revanche, n'est pas toxique.

L'OTA dans les produits alimentaires et les réglementations visant à en limiter la Teneur. En 1995, une étude réalisée par le FAO sur les réglementations internationales relatives aux mycotoxines a indiqué que quelques pays seulement avaient pris des dispositions relatives à l'OTA ('Worldwide regulations for mycotoxines 1995-A copendium', 1997, FAO Food and Nutrition Paper N°.64). pourtant, après avoir trouvé de l'OTA dans le sang et dans le lait maternel, il a été prouvé que l'homme était vulnérable à cette mycotoxine, et il est évident que la présence d'OTA dans les denrées alimentaires est indésirable. Au cours des dix dernières années, des travaux ont conclu que le mode de carcinogénicité est 'génotoxique'. La génotoxicité de l'OTA n'a pas été établie avec certitude. De récents travaux financés par le DG XII de l'UE montrent que la fixation à l'ADN ('DNA binding') de l'OTA n'est pas décelable à l'aide de méthodes analytiques sensibles et qu'il est peu probable qu'il représente un mécanisme de formation de tumeur induite par l'OTA.

Au cours du XVII^e siècle, la consommation de café augmentant progressivement en Europe, les Hollandais commencent à le cultiver dans leurs colonies (Java, Ceylan). Durant le premier quart du XVIII^e siècle, les Français, qui ont importé un plant de Hollande, introduisent sa culture à la Martinique. En 1723, les Anglais créent des plantations en Jamaïque, et les Espagnols font de même aux Philippines. La culture du café s'étend peu à peu à toute latine (dès 1723 pour le Brésil, qui devient, un peu plus d'un siècle plus tard, le premier producteur mondial).

Longtemps dominée par les pays d'Amérique du Sud, Brésil en tête, la production de café se répand, au cours du XX^e siècle, à l'Afrique (Madagascar, suivi par le Congo, le Cameroun et l'Angola) puis, dans une moindre mesure, à l'Asie (Indonésie notamment).

II. L'écologie du café :

Le café est une plante tropicale qui pousse entre les altitudes de 25°N. et 25°S. Et dont la culture commerciale nécessite des conditions environnementales très spécifiques. La température, les précipitations, l'ensoleillement, le vent et le sol sont très importants mais les conditions nécessaires changent selon les variétés cultivées. La température idéale est comprise entre 15 et 24°C. Pour l'Arabica et entre 24 et 30°C. Pour le Robusta qui peut supporter des conditions plus chaudes et sèches mais ne tolère pas des températures inférieures à 15°, comme l'Arabica peut le faire pendant de courtes périodes. Le gel, possible dans le sud du Brésil ou à proximité de l'équateur aux altitudes d'environ 2000 mètres, abîme tous les types de café. D'une manière générale, le café nécessite des précipitations annuelles de 1500 à 3000 mm d'eau, l'Arabica à besoin de moins de précipitations que les autres variétés. L'alternance de périodes sèches et de périodes de pluie est importante pour la croissance des arbres, le bourgeonnement et la floraison. Les besoins en eau de pluie dépendent des capacités de rétention du sol, de l'humidité de l'air et de la couverture nuageuse ainsi que des méthodes de cultures. Le Robusta pousse entre le niveau de la mer et 800 mètres d'altitudes alors que l'Arabica prospère à des altitudes plus élevées et est souvent cultivé dans les régions montagneuses. L'altitude ayant une influence sur la température, l'Arabica peut être cultivé à des altitudes moins élevées lorsqu'on s'éloigne de l'équateur jusqu'à ce qu'on se heurte au problème du gel. Toutes les variétés de café nécessitent un bon drainage du sol mais elles peuvent être cultivées sur des sols de profondeur, de pH et de teneurs en minéraux différents à condition d'utiliser les engrais appropriés (Clifford et Willson, 1985).

III. Propriétés du café :

Tous les produits alimentaires possèdent des caractéristiques qui sont fonction de leur état, de leur aspect ou apparence comme le poids, le volume, la taille, la forme, la couleur, la solubilité, la teneur en humidité, la texture, etc. le café ne fait pas exception à cette règle. De l'arbre à la tasse, les diverses caractéristiques physiques du café sous ses différentes formes jouent un rôle important dans son traitement et dans la conception des équipements de traitement. Le café est cueilli au moment où la couleur rouge des cerises indique qu'il est suffisamment mûr. Plus tard, la couleur

sera un guide pour la torréfaction des grains. La séparation par flottation permet d'enlever par densité les cerises défectueuses, Les brindilles et les pierres. Après avoir été séchés pour atteindre un degré d'humidité homogène en vue de leur entreposage, les grains sont classés selon leur taille, forme et couleur. Les grains de café ayant une texture poreuse et spongieuse, ils peuvent facilement être contaminés par des champignons microscopiques à l'origine de défauts d'arome, absorber des odeurs fortes ou se détériorer rapidement si leur taux d'humidité est trop élevé (Sivetz et Desrosier, 1979 ; Clarke et Macrae, 1985).

III. Production:

Le premier producteur de café est le Brésil, avec 1,9 million de tonnes, suivi par le Viêt Nam, La Colombie, l'Indonésie, la Cote d'ivoire, le Mexique, le Guatemala, l'Ouganda et l'Éthiopie. La production mondiale s'élève à environ 6 millions de tonnes, provenant pour les deux tiers du continent américain sous forme d'arabica (seul un sixième de la production est assuré par les pays asiatiques).

Les trois quarts de la production sont destinés à l'exportation, les principaux pays exportateurs sont le Brésil, le Viêt Nam, la Colombie, l'Indonésie et la Cote d'ivoire (figure 1.2). Les pays scandinaves sont les premiers consommateurs mondiaux par habitant (de l'ordre de 11Kg par an), devant les pays d'Europe de l'Ouest et les États-Unis.

Le marché du café est instable, et ses cours sont soumis à d'importantes fluctuations, les crises sont nombreuses et la surproduction fréquente. Dès 1962, les principaux pays producteurs de café ont signé, sous l'égide de l'ONU, un accord destiné à éviter les surproductions, Renégocié en 1968, en 1976 et en 1983, celui-ci s'est avéré inefficace et peu respecté. La signature d'un nouvel accord à échoué en 1989, puis en 1997. Parallèlement, s'est créée, en 1993, l'Association des producteurs de café (27 pays)

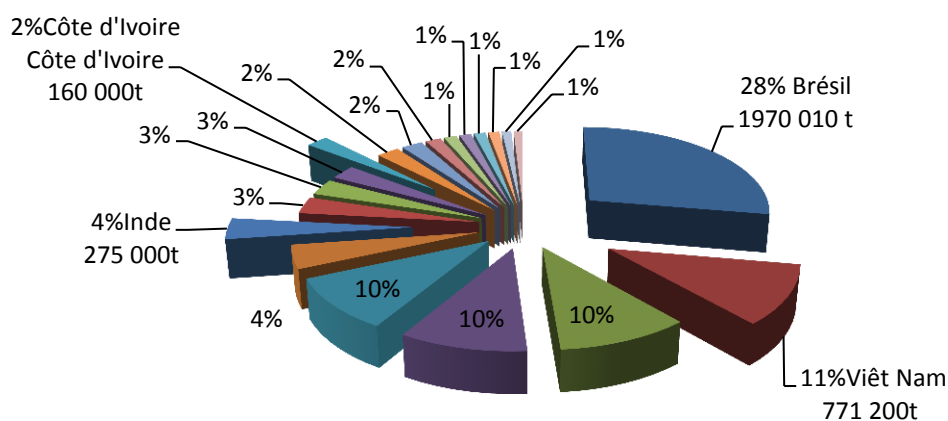


Fig 1.2: Principaux producteurs du café vert (FAOstat,2004)

IV. Principales variétés:

Le café vert est une plante tropicale de la famille des rubiacées. Le genre *Coffea* comprend de très nombreuses espèces et variétés. Mais ce sont surtout les trois espèces principales *Coffea arabica* L., *Coffea robusta* Lind. (*Coffea canephora* Pierre ex. Froehner, var. *laurentii* De Wild), en premier lieu, et *Coffea liberica* Bull. qui sont utilisées pour la culture et qui constitue la plus grande partie de la production du café (MSDA, 2002). Il existe plus d'une centaine d'espèces de caféier sauvage, mais deux espèces d'origine africaine sont principalement cultivées. Ce sont l'*Arabica* et le *Robusta*, qui fournissent les neuf dixièmes de la production mondiale (figure 1.3).

L'*Arabica*, originaire d'Éthiopie, est surtout cultivé en Amérique latine. Ses principales variétés sont le bourbon, le cattura, le maragoype et le munconovo. En Amérique du sud, les variétés sont subdivisées en brésils et en légers. Les brésils se décomposent principalement en santos, parana et rio, du nom des ports d'où ils sont expédiés. Les légers sont identifiés par le nom du pays ou du district où ils ont poussé, comme medellin (très réputé), armenia et manizales pour les cafés de Colombie.

La culture du robusta, une variété de l'espèce *Canephora*, est développée en Afrique (en Cote d'Ivoire principalement) et en Extrême-Orient (notamment au Viêt Nam). Le robusta est plus riche en caféine que l'arabica (2 à 3% contre 1 à 1,3%) ; il convient bien pour le café soluble.

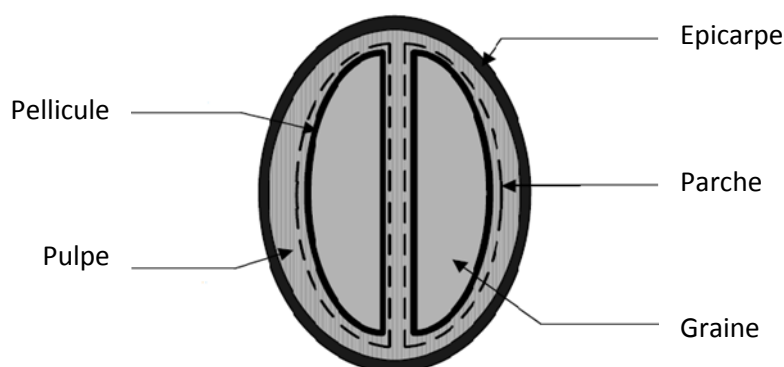


Fig 1.3: Représentation schématique d'une cerise de café (Geoffrey S. Ashworth et Pablo Azeveo, 2009).

V. Composition du café:

La fève renferme un mélange complexe de divers composants. La dégradation partielle de fève lors de la torréfaction entraîne l'apparition d'un certain nombre de produits, notamment des composés aromatiques.

On classe les constituants du café en deux catégories :

-les composants gustatifs, non volatils, qui sont la caféine (0,8 à 2% du poids total dans les variétés sauvages), la trigonelline, l'acide chlorogénique et les acides phénoliques, les acides aminés, les glucides et les minéraux ;

-les composants volatils, dont les principaux sont les acides organiques, les aldéhydes, les cétones, les esters, les amines et tous les composés sulfurés connus sous le nom demercaptans.

Tab 1.1: Principaux constituants biochimiques du café (en g/100g) (Jean. Adrian et al, 2003)* et d'après (Clarke, 1987 ; Viani, 1993; Ky et AL., 2001 ; Vasconcelos et al., 2007).

Composants	Coffea arabica		Coffea canephora	
	Vert	Torréfié	Vert	Torréfié
Caféine	0,8-1,4	0,9-1,6	1,7-4	1,2-2,6
Trigonelline	0,6-1,2	0,1-1,2	0,3-1,2	0,3-1
Acides aliphatiques dont	1-3	1-4,6	1-2	1-4,6
Acide quinique	0,4	0,8	0,4	1
Acide chlorogéniques totaux	5,5-9	0,2-3,5	7-12	0,2-4,6
Oligosaccharides dont	6-8	0-3,5	5-7	0-3,5
Sacharose (ou suchrose)	8	0	4	0
Polysaccharide totaux	50-55	24-39	37-47	--
Protéines	2	0	2	0
Acides aminés libres	2	0	2	0
Lipides totaux	10-18	14,5-2	8-13	8,3-16
Minéraux dont Potassium	3-4,2	3,5-4,5	3,5-4,5	4,6-5
Phénols	2*			
Acide nicotinique	0,025*			
Eau	5-12	0-5	5-12	0-5

Caféine :

Alcaloïde (1,3,7-triméthylxanthine) présent dans les boissons stimulantes et notamment dans le café, le cacao et le thé. Le taux de caféine dans les cafés est sous la dépendance de facteurs génétiques: la teneur des cafés *arabica* est de l'ordre de 1%, celle des cafés *robusta* se situe environs de 2%. La caféine agit comme stimulant du système nerveux et peut entraîner des effets physiologiques importants. Son abus peut entraîner une intoxication appelée caféisme.

Augmentant les perméabilités calciques membranaires et donc la concentration cytoplasmique de calcium, la caféine est une substance stimulante des systèmes nerveux, circulatoire et respiratoire; elle aussi diurétique. Par ces propriétés psychostimulantes, elle est connue pour accroître la vigilance, les capacités intellectuelles, diverses performances telles que l'acuité visuelle. En excès, elle est responsable de palpitations, insomnies, tremblements.

Cependant, il est possible d'éliminer la caféine ; le café ayant subi ce traitement s'appelle «décaféiné».

VI. Etapes de la fabrication:

VI.1. Récolte et séchage:

Le caféier produit des fleurs blanches, puis des fruits rouges, appelés cerises, qui renferment deux graines, ou fèves sont récoltées encore vertes, selon deux méthodes ; l'une est fondée sur la cueillette sélective, l'autre consiste à secouer l'arbre pour en faire tomber les fruits. Les grains de caféier subissent un dépulpage à sec ou un dépulpage humide avant d'être séchées puis torréfiées. Au cours du dépulpage «humide» se produit une fermentation avec pectinolyse. Les micro-organismes impliqués sont des moisissures, des levures et surtout des bactéries lactiques (*Leuconstoc mesenterides*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, etc.) des bacillus et Entéro-bactéries (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, etc.)(Joseph-Pierre Guiraud, 2003).

Selon l'espèce, la variété et la provenance, le café frais est de couleur vert bleu, vert pâle, jaune blanchâtre allant jusqu'au brun. La couleur verte pâlit lors d'un stockage prolongé. Suivant le mode de préparation, on distingue des sortes de café non "lavé" et "lavé" (MSDA, 2002). Les fèves cueillies de façon sélective sont ensuite ramollies à l'eau, débarrassées mécaniquement de leur pulpe, mises à fermenter dans de grands bassins, lavées à nouveau, puis séchées à l'air libre ou dans des cylindres rotatifs chauffants.

La technique dite sèche, généralement appliquée aux fèves récoltées selon la deuxième méthode, se résume à leur séchage au soleil pendant trois semaines et à l'élimination de leur enveloppe. Dans les deux cas (Fig .1.4), le café vert est ensuite trié, puis calibré et mis en sac. 100 Kg de fèves fraîches fournissent 20 Kg de café vert, le rendement au poids pour les deux méthodes est le même (Clarke et Macrae, 1987).

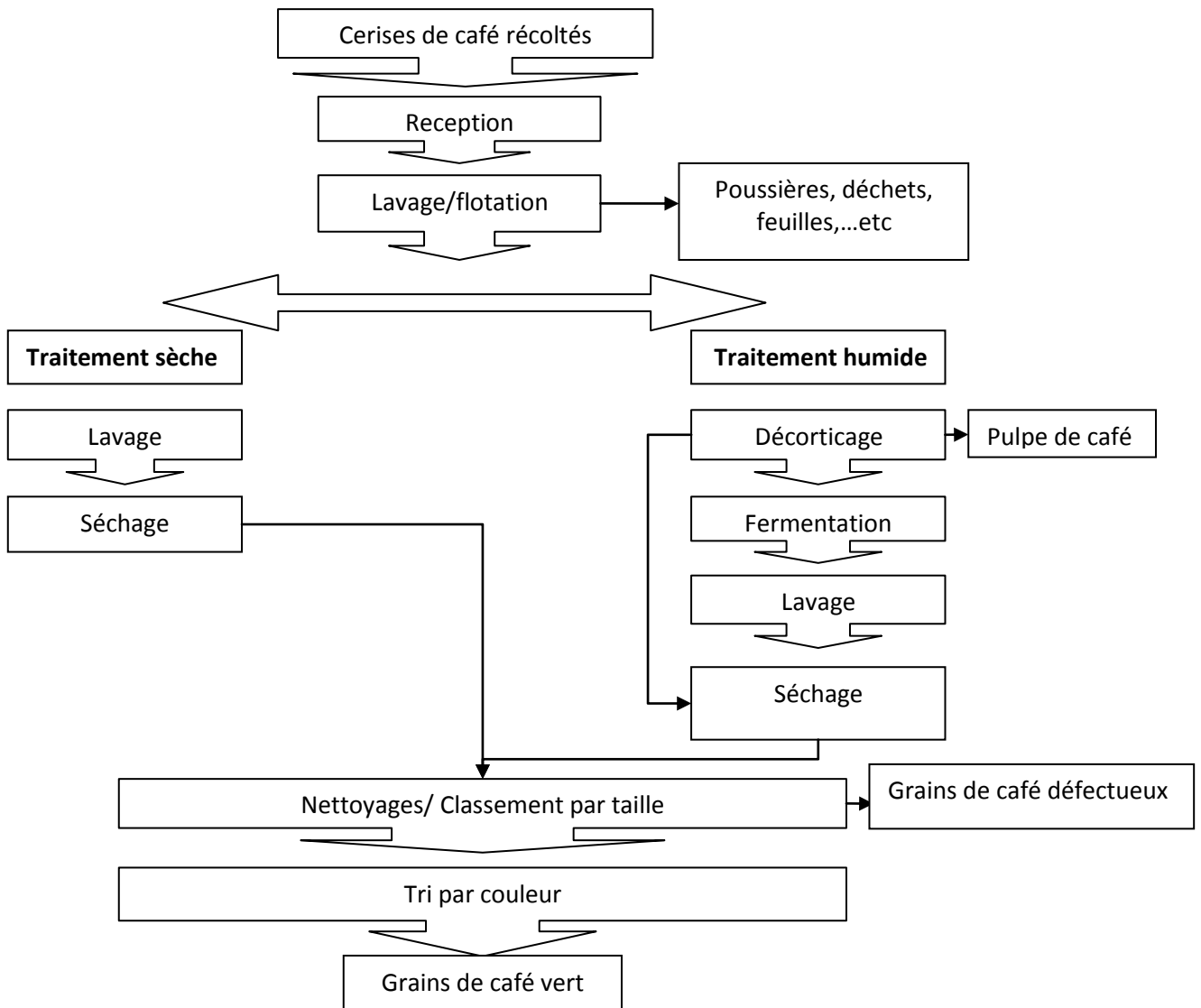


Fig 1.4: Diagramme de traitement primaire du café vert (Geoffrey S.Ashworth et Pablo Azevedo, 2009).

VI.2. Torréfaction:

La torréfaction est un procédé qui consiste à traiter les grains de café vert par la chaleur sèche, pour acquérir la majorité de ses propriétés organoleptiques (couleurs, arôme, gout,...), il y'a trois types de procédés de chauffage, chauffage direct, chauffage indirect ou fluidisation dans un courant d'air chaud. Le chauffage indirect est le procédé le plus utilisé dans l'industrie du café. Il faut 20 kg de café vert pour obtenir 15 kg de café torréfié. La torréfaction du café (effectuée dans le pays importateur) assure la fragmentation du tanin et la suppression de l'huile, et libère l'arôme des fèves. Les paramètres de torréfaction sont variables selon les habitudes des pays consommateurs et l'origine du café utilisé. On peut globalement distinguer trois types de torréfaction selon la teinte du grain obtenue (Tab 1.2.).

Tab 1.2: Types de torréfaction (Daviron et Ponte, 2005).

Type de torréfaction	Pert en poids	Pays consommateurs
Claire	14%	USA, Allemagne
Moyenne ou (Robe du moine)	16-18%	France
Foncées	20-22%	Italie

Cette torréfaction s'effectue en trois phases successives:

1^{ère} phase de séchage: pour des températures du grains inférieures à 160°C, on observe des réactions endothermiques dont l'eau et des substances volatiles sont éliminées au cours de cette phase, le grain passe de la couleur verte au jaune.

2^{ème} phase de torréfaction: des réactions exothermiques, pour des températures du grains comprise entre 160°C et 260°C elle correspond aux réactions chimiques de dégradation et de polymérisation des précurseurs d'arômes réactions dites de Maillard et de Strecker, et réactions de pyrolyse. ; les températures s'échelonnent de 193 °C pour une torréfaction légère à 205 °C pour une torréfaction moyenne et jusqu'à 218 °C pour une torréfaction poussée. Le grain devient marron en raison de réactions de caramélisation et réaction de Maillard, due à la carbonisation de la cellulose et du sucre.

Réaction de Maillard:

La réaction de Maillard est l'ensemble des interactions résultant de la réaction initiale entre un sucre réducteur et un groupement amine. Cette réaction a une importance énorme dans la chimie des aliments. Elle est responsable principale de la production des odeurs, des arômes et des pigments caractéristiques des aliments cuits (Machiels D., Istasse L, 2002).

La réaction de Maillard a été utilisée depuis de très nombreuses années pour produire des aliments qui paraissent attractifs pour les consommateurs ; et aussi bien au niveau de l'apparence et que des saveurs. L'industrie agroalimentaire applique la réaction de Maillard à nombreux processus de transformation des aliments de manière à fournir aux consommateurs les couleurs qu'il désire (Ames, 1998).

Mécanisme de la réaction de Maillard:

La réaction de Maillard se produit dans pratiquement tous les aliments et plus spécifiquement dans les aliments qui sont traités thermiquement, elle met en œuvre des composés contenant une fonction amine (acides aminés, protéines, peptides et même l'ammoniac) et des sucres réducteurs (glucose, ribose, fructose, xylose,...). La réaction de Maillard est subdivisée en trois étapes principales (Machiels et Istasse, 2002) (Fig 1.5.).

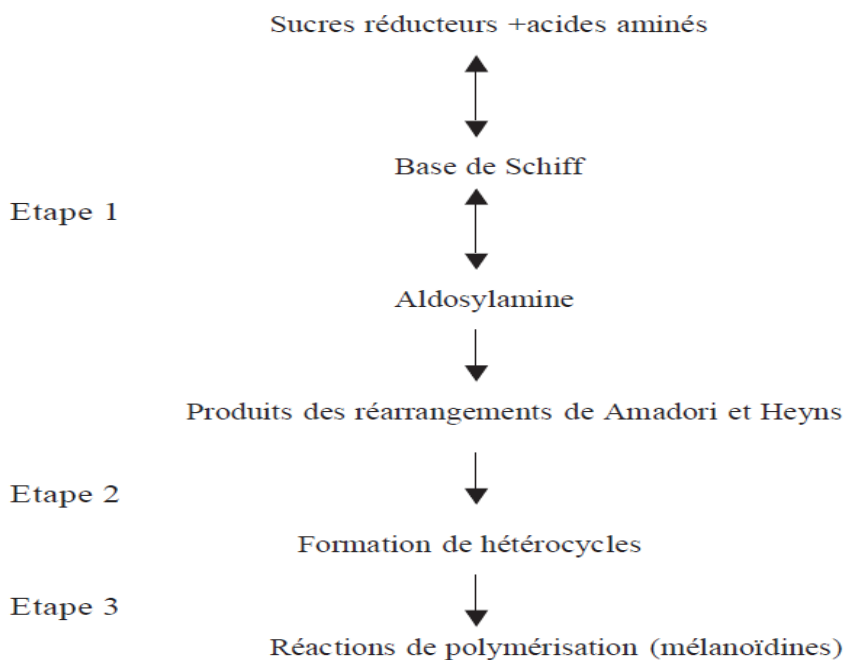


Fig 1.5. Les principales étapes de la réaction de Maillard (Machiels et Istasse, 2002).

La première étape:

Il s'agit de réactions carbonyles amines conduisant à la production de 1-amino-1-désoxy-2-cétose à partir d'un aldose à travers le rearrangement d'Amadori (Fig 1.6), et à la formation de 2-amino-2-désoxy-aldose à partir d'une cétose via la rearrangement de Heyns (Fig 1.7).

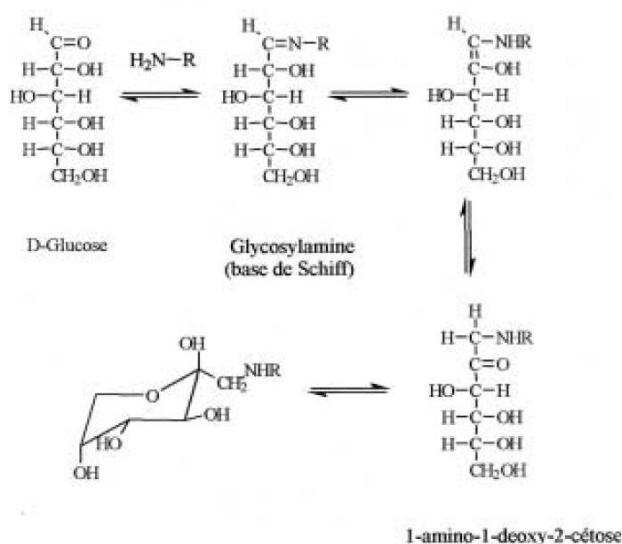


Fig 1.6. Mécanisme de formation des produits d'Amadori (Machiels et Istasse, 2002).

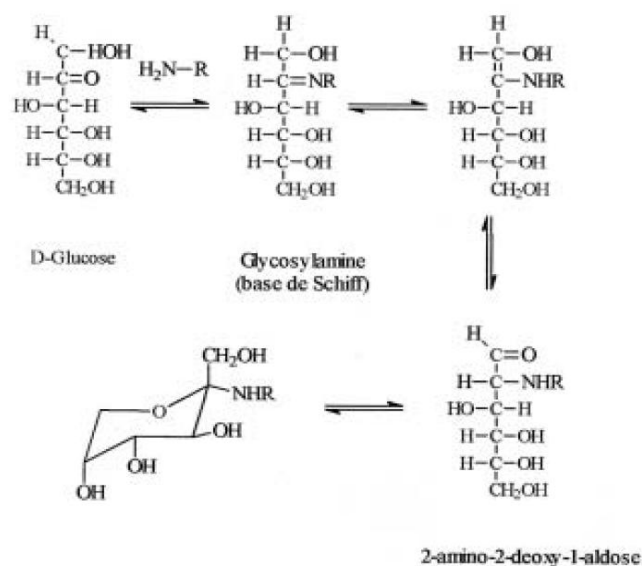


Fig 1.7. Mécanisme de formation des produits de Heyns (Machiels et Istasse, 2002).

La seconde étape:

Correspond à la dégradation des produits des rearrangements d'Amadori et de Heyns, elle conduit notamment à la formation de composés hétérocycliques responsables des odeurs. Une des caractéristiques les plus marquées des produits d'Amadori est leur tendance à former des énols. Leur formation peut se faire aussi bien entre les carbones 1 et 2 du sucre que entre les carbones 2 et 3 du même résidu, à pH 7 et à des pH plus faibles, l'énolisation 1-2 est favorisée tandis qu'à un pH plus élevé, la dégradation des produits d'Amadori se fait principalement via l'énolisation 2-3 (Martins et al., 2001). Dans les deux cas (Fig 1.8.), une décomposition caractéristique est observée dans le premier cas, le groupe hydroxyle en C3 est éliminé. Une liaison double est ainsi créée entre C2 et C3, et favorise la rupture de liaison entre le sucre et le résidu acido-aminé pour former un composé appelé 3-désoxy-hexulose. Le composé est relativement stable et a été identifié dans plusieurs aliments tels que la sauce de soja ou les fruits secs. La réaction se poursuit par des déshydratations successives et par déplacement de la double liaison et donne notamment de l'hydroxyméthylfurfural. Dans le second cas, un énediol est formé entre C2 et C3, la double liaison facilite l'élimination du groupement résiduel acido-aminé et conduit à la formation de 1-désoxy-hexulose. Lors d'étapes ultérieures pour donner du pyruvaldhyde, de l'acétylfuran et essentiellement du 2,5-diméthyl-3-(H)-4-hydroxy furanone.

Dégradation de Strecker: la réaction de Strecker implique une désamination oxydative et une décarboxylation d'un acide aminé en présence d'un dicarbone (Machiels et al., 2000). Elle aboutit à la formation d'un aldéhyde qui correspond à l'acide amine de départ. Avec un carbone de moins et une α -amino-cétone. Les aldéhydes de Strecker sont intermédiaires très importants intervenant dans la formation des mélanoidines. La condensation de deux α -amino-acétones peut former des pyrazines, composés odorants que l'on retrouve dans un grand nombre d'aliments cuits tels que la viande rôtie et café torréfié (Machiels et Istasse, 2002).

La troisième étape:

Correspond à la polymérisation d'intermédiaires réactionnels produits lors de la deuxième étape. Elle conduit à la production de pigments, les mélanoidines (Ledl et Schleider, 1990; Tressl et al., 1998) (Fig 1.8.).

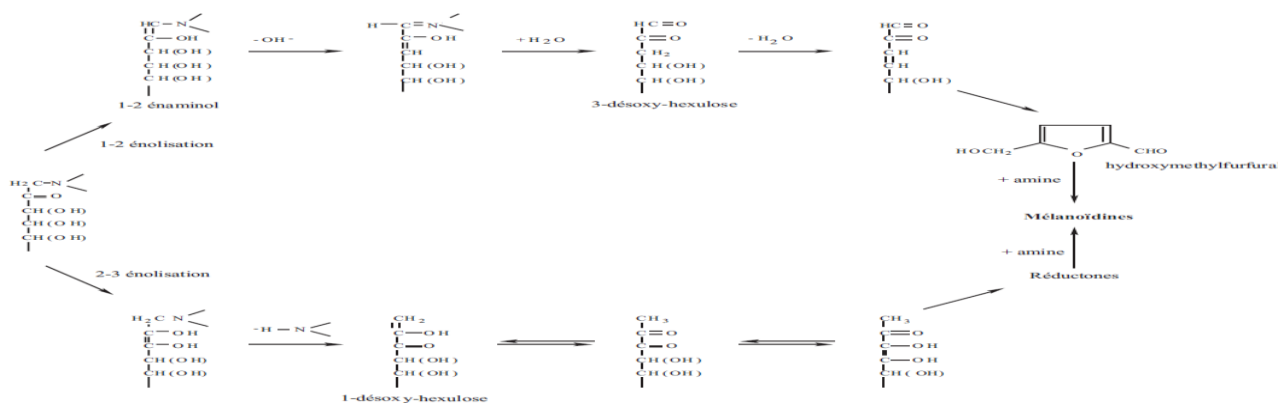


Fig 1.8. Enolisation 1-2 et de 2-3 des composés d'Amadori et de Heyns pour aboutir à la formation de mélanoidines (Machiels et Istasse, 2002).

3^{ème} phase de refroidissement: les fèves torréfiées sont rapidement refroidies qui s'avère indispensable pour éviter de brûler le grain de café.

La torréfaction modifie non seulement la composition des grains, mais également leur texture, les grains de café sont très friable à raisons du volume du grain qui augmente sous l'effet de la pression des gaz produits à l'intérieur du grain. Par des réactions chimiques principalement de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone.

Ensuite, dans la plupart des cas, plusieurs variétés de café vert sont mélangées et torréfiées ensemble de façon à produire les goûts et les arômes chers aux buveurs de café.

Les fèves torréfiées sont ensuite soit emballées et expédiées telles quelles dans les commerces de détail, ou bien moulues avant expédition. Le café moulu perd son parfum en moins d'une semaine s'il n'est pas emballé de façon adéquate. Les emballages associant papier et plastique assurent au mieux sa protection. Scellés hermétiquement sous vide d'air, les paquets conservent la fraîcheur du café pendant trois ans.

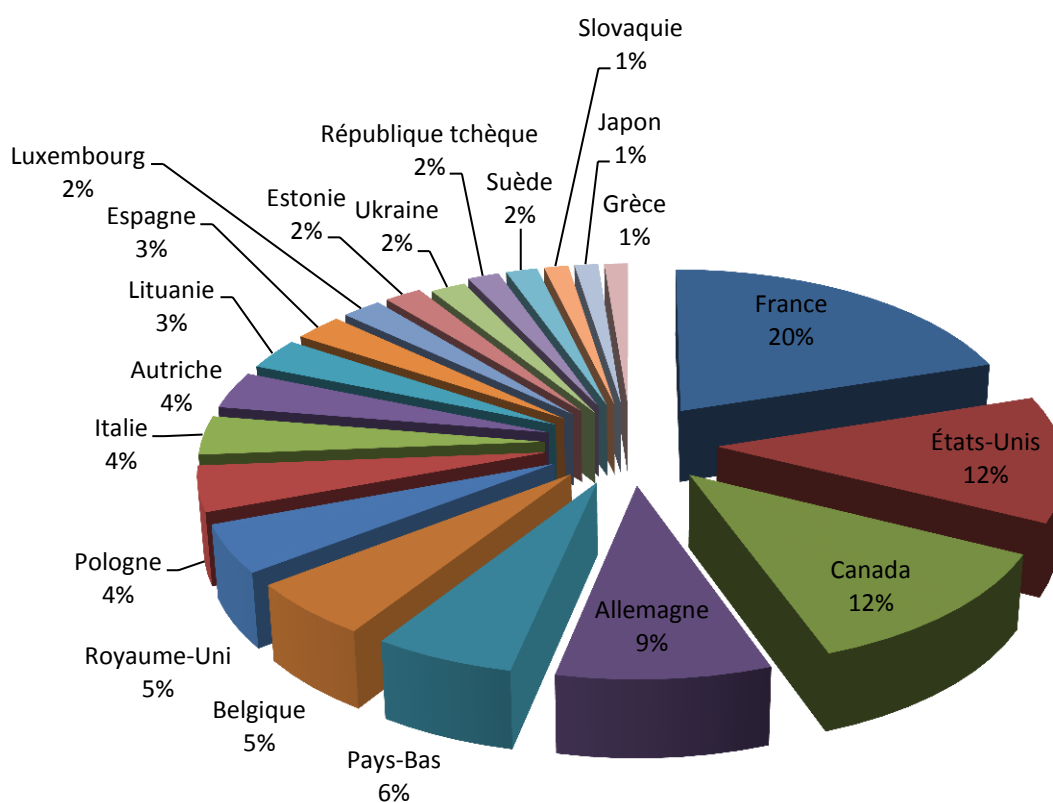


Fig 1.9: Importations mondiale du café torréfié (FAOstat, 2004)

VI.3. Préparation du café boisson:

Six modes de préparation du café. Chacun conférant à la boisson obtenue des propriétés organoleptiques distinctes : la **filtration** (Belloy au XVIII^{ème} siècle), l'**infusion** (Caliman en 1933), la **percolation** (Louis-Bernard en 1822), La **percolation sous haute pression** (*expresso*), La **décoction**, L'**ébullition**.

Et la **dissolution** pour le cas particulier du café instantané, la boisson est préparée en mélangeant simplement du café soluble avec de l'eau bouillante (Justin Koffi Houessou, 2007).

VI.4. Cafés solubles et décaféinés:

VI.4.1. Le café soluble: ou instantané, est un produit phare de l'industrie du café. Il est obtenu par déshydratation d'extraits de café selon deux méthodes différents (Stegen et al., 1997). L'atomisation et la lyophilisation. L'atomisation permet de sécher à chaud les extraits de café. Lors de la fabrication du café lyophilisé, dont l'arôme est meilleur que celui du café obtenu par atomisation, l'extrait de café est congelé, et l'eau éliminée par sublimation. Le produit obtenu est emballé sous vide d'air dans des récipients scellés.

VI.4.2. Le café décaféiné: est obtenu par traitement des fèves vertes avec des solvants aux hydrocarbures chlorés, qui a pour effet d'emporter la caféine. Ce n'est qu'après élimination de ces solvants que les fèves sont torréfiées. Des méthodes de décaféination non chimiques ont vu le jour au cours des années quatre-vingt.

VII. Substituts du café:

L'utilisation de substituts du café est limitée. Le principal est chicorée, habituellement utilisée comme agent de coupage. Dans la plus part des pays, l'addition de chicorée ou de toute autre substance doit être clairement mentionnée sur l'étiquette du produit.

VIII. Le système HACCP:

Selon Duris, la pertinence des normes proposées pour le café (faible contributeur en regard des céréales), les pays producteurs sont obligés de se préparer aux nouvelles restrictions s'ils veulent maintenir leurs parts de marché. La majorité de la production provient de petites plantations, faiblement développées d'un point de vue technique, ayant peu de ressources et n'ayant que peu de pouvoir face aux autres acteurs des filières nationales. Cet ensemble de facteurs rend difficile la mise en place d'une politique d'amélioration de la qualité (Hanak E et al, 2002). Bien qu'il ait été conçu pour assurer la salubrité des aliments à la fois dans l'agriculture et dans les industries de transformation, c'est dans ce dernier secteur que le système HACCP a trouvé jusqu'ici ses applications les plus nombreuses. La raison en est avant tout qu'il est beaucoup plus facile d'appliquer un système HACCP dans une usine ayant une direction ou un "propriétaire" unique et où il est possible d'empêcher complètement, de supprimer ou de ramener à un niveau acceptable le risque pour la santé présenté par un aliment. Dans le système des produits, comme dans notre cas le café où il existe des "propriétaires" nombreux et disparates du produit au fur et à mesure que celui-ci passe du producteur au consommateur, et un contrôle complet du produit peut être impossible à réaliser. D'après l'OIC (Organisation internationale du café), la culture du café s'étend sur une surface de 17 millions d'hectares à travers le monde. 70% de la population mondiale est faite de petits agriculteurs ayant moins de 10ha. ; 50% ont moins de 5ha. 70 pays sont concernés par cette culture. Cela représente 100 millions d'emplois ruraux. Il y'a environ 25 millions de producteurs dépendent de ce produit pour vivre : petits producteurs souvent inorganisés. Les programmes préalables tels que les BPA (Bonne pratiques agricoles), BPF(Bonnes pratiques de fabrications) et BPH(Bonnes pratiques d'hygiène) doivent bien fonctionner dans un système de produits

avant que le système HACCP ne soit appliqué. En s'inspirant le plus étroitement possible des Principes généraux d'hygiène alimentaire du Codex (1997), qui soulignent qu'il importe de s'appuyer solidement sur les codes BPF, BPA et BPH pour intégrer l'approche HACCP et mettre au point un système de gestion de la sécurité sanitaire des aliments qui soit convivial.

Mycoflore toxigènes

1. La contamination par les moisissures :

Plus de cent mille moisissures différentes sont susceptibles de souiller les produits agricoles et alimentaires (Figure 2.1). Ce sont des espèces saprophytes tirant leurs apports nutritionnels des matières organiques (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007). Le développement de moisissures se produit dès les champs. Certains sols sont d'emblée contaminés (exemple : cas de l'arachide contaminée par les *Aspergillus*). Les conditions de récoltes influencent fortement le niveau de colonisation des végétaux. Une saison humide induira le développement de *Fusarium* sur les céréales (G.Reboux, 2006). La contamination se fait par les spores douées d'une grande aptitude à la survie et souvent adaptées au transport par l'air; certaines ont de grandes propriétés d'adhésion et leur transport est favorisé par une ambiance chaude et humide (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007).

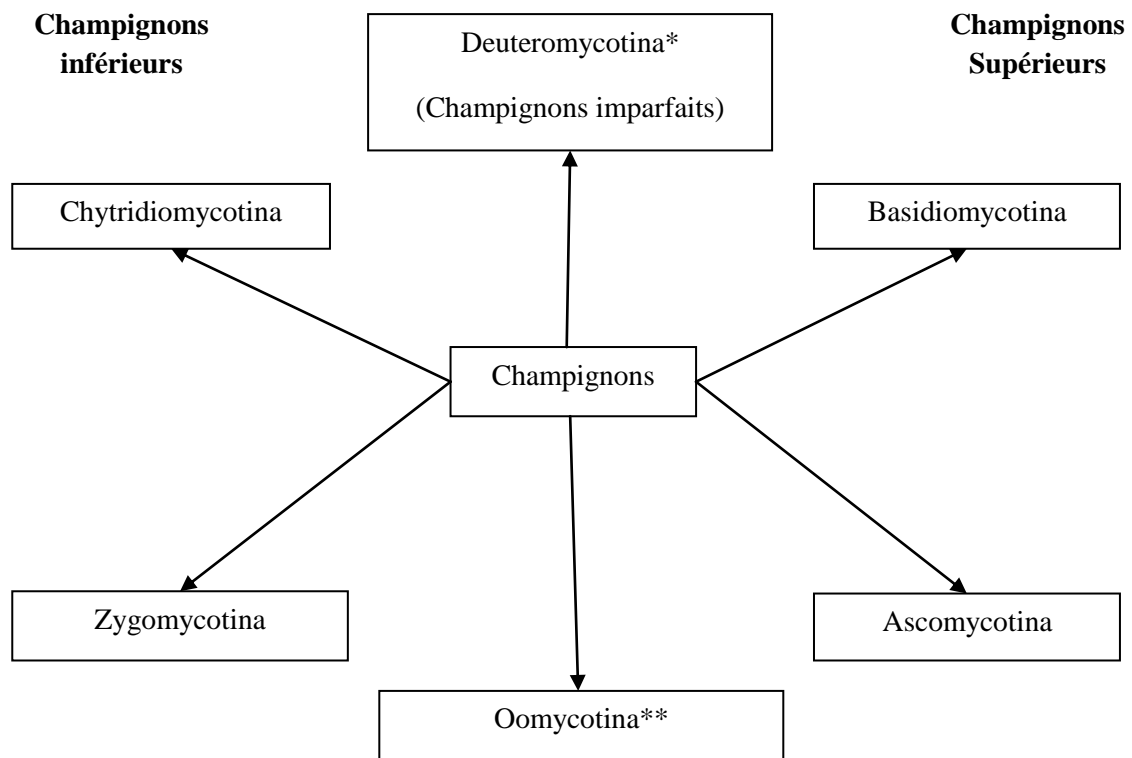


Fig 2.1: Classification générale des champignons (Dominique Cabasse et al, 2002).

*Champignons connus seulement par leur stade asexué, en attente de classification.

**Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les champignons vrais.

2. Facteurs favorisant la contamination :

Le développement des moisissures sur les aliments et sur tous les substrats en général est dépendant à température ambiante, de la disponibilité en eau (a_w) et du pH. Les conditions de croissance de chaque espèce sont spécifiques en termes de condition physicochimique. La plus part des moisissures se développe entre les pH 5,5 à 9 avec une a_w entre 0,85 à 0,98. A une température optimale entre 20 à 30°C (G.Reboux, 2006). Des moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides

ou liquides dès l'instant qu'il ya des éléments nutritifs, de l'humidité (activité en eau A_w supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires contaminés (AFSSA, 2006).

Tab.2.1 : Développement maximum de moisissures sur les aliments (G.Reboux, 2006).

Aliments	pH	a_w
Céréales	6 à 8	0,68 et 0,83
Fruits	3 à 6,5	0,75 et 0,98
Légumes	5,5 à 8,5	0,78 et 0,92

Un certain nombre de facteurs favorisent la colonisation des aliments par les moisissures :

-Les blessures : Les blessures des parois ou des enveloppes externes des aliments, et les dommages mécanique et ceux infligés aux fruits par les intempéries favorisent le développement d'*Alternaria*. Et les insectes propageront le *Fusarium* dans les maïs. Aussi les dommages liés aux conditions de stockage peuvent accroître ou sélectionner certaines populations fongiques (G.Reboux, 2006).

-La température : 20°C à 30°C est une zone optimale de croissance, mais les moisissures peuvent croître dans une gamme très large de températures (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007), tandis qu'*Aspergillus* peut se développer à des températures élevées au-delà de 50°C (Samson RA et al, 1995).

-La composition de l'atmosphère gazeuse : Les moisissures sont généralement aérobies et l'augmentation de l'atmosphère en dioxyde de carbone limite leur croissance ;

-La teneur en eau : C'est le facteur essentiel. Les moisissures sont moins exigeantes en eau que les levures ou les bactéries, cependant un minimum d'eau du milieu leur est nécessaire. Ceci permet la prévention par le maintien à une hygrométrie faible des graines de céréales ou de légumineuses (arachide) en silos (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007). Certaines espèces comme *Wallemia sebi* peuvent se développer sur le sucre avec une a_w très basse (Samson RA et al, 1995).

-Le pH : Le développement le plus fréquemment observé se situe entre le pH 5,5 à 9, pour autant. Certaines espèces peuvent se développer avec des pH très bas comme le *Penicillium roqueforti* sur le pain (Samson RA et al, 1995).

3. Les moisissures toxigènes :

Deux groupes de moisissures toxigènes peuvent être distingués, le premier type est constitué de moisissures envahissant leur substrat et produisant la mycotoxine sur des plantes sénescentes ou stressés : il sera question de toxine de champs. L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte ; on les qualifiera de toxines de stockage. Ainsi, des champignons du sol ou de débris de plantes peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions le permettent (AFSSA, 2006).

Tab.2.2 : Rappel historique des principales intoxications liées aux mycotoxines (G.Reboux, 2006).

Année	Toxicose	Qui ?	Agent étiologique	Mycotoxines
1890	Syndrome cardiaque du Beri-Beri (Japon)	Homme	<i>Penicillium citreonigrum</i>	Citreoviridine
1913	Aleucie toxique alimentaire (ATA) (Russie)	Homme	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	Trichothécènes
1931	Stachybotryotoxicose	Cheval	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Satratoxines
1952	Néphropathie des Balkans	Homme	<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxines
1960	Maladie X des dindes	Dinde	<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines
1993	Hemosidérose (Cleveland, États-Unis)	Homme	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Satratoxines
1994	Feu de Saint-Antoine ou Mal des Ardents	Homme	<i>Claviceps purpurea</i>	Alcaloïdes de l'ergot de seigle

4. Formation des mycotoxines dans les végétaux :

La plus part des plantes peuvent être colonisées par des moisissures et être contaminées par des mycotoxines (G.Reboux, 2006). On connaît actuellement près de 300 mycotoxines produits par environ 200 espèces de moisissures (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007). Pour l'essentiel, les moisissures se développent sur les plantes. Elles sont transportées sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organique. Elles peuvent donc être inhalées par l'homme ou coloniser son environnement domestique. A partir des plantes, elles peuvent être directement ingérées avec des légumes ou des aliments transformés (G.Reboux, 2006). Ces métabolites secondaires synthétisés pendant la phase stationnaire après les stades de multiplication et de croissance semble être des voies de secours utilisées, rarement d'ailleurs, lorsqu'il y a accumulation excessive de métabolites tels triose, acétate... (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007). Les végétaux peuvent également servir à nourrir le bétail qui, à son tour, par la production de viande, lait (Varga, J et al, 2001),... pourra contaminer l'homme que l'aliment soit transformé ou non (G.Reboux, 2006).

Tab.2.3 : Espèces fongiques productrices de mycotoxines (G.Reboux, 2006).

Mycotoxines	Espèces
Aflatoxine	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Penicillium frequentans</i>
Ochratoxines	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. veridicatum</i>
Patuline	<i>P. expansum</i> , <i>Byssoclamys nivea</i> , <i>B. fulva</i> , <i>A. clavatus</i>
Islandicine, citrine, lutéoskyrine	<i>P. islandicum</i> , <i>P. brunneum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>A. terreus</i>
Rubratoxine	<i>P. rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i>
Trichothécènes	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F. sporotrichoides</i>
Fumosines	<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. oxysporum</i>
Diacétoxiscirpénol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. roseum</i>
Nivalénol, fusarénones	<i>F. nivale</i>
Satratoxine, roridine, verrucarine	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Trichodermine, trichoverrine	<i>Trichoderma viride</i>
Chasetoglobosine	<i>Chaetomium globosum</i>
Trichodermol, trichodermine	<i>Memmoniella sp.</i>

5. Biosynthèse des mycotoxines :

Les mycotoxines sont produites par nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxicogène. Elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines de ces champignons (Chapeland-Leclerc Fet al, 2005).

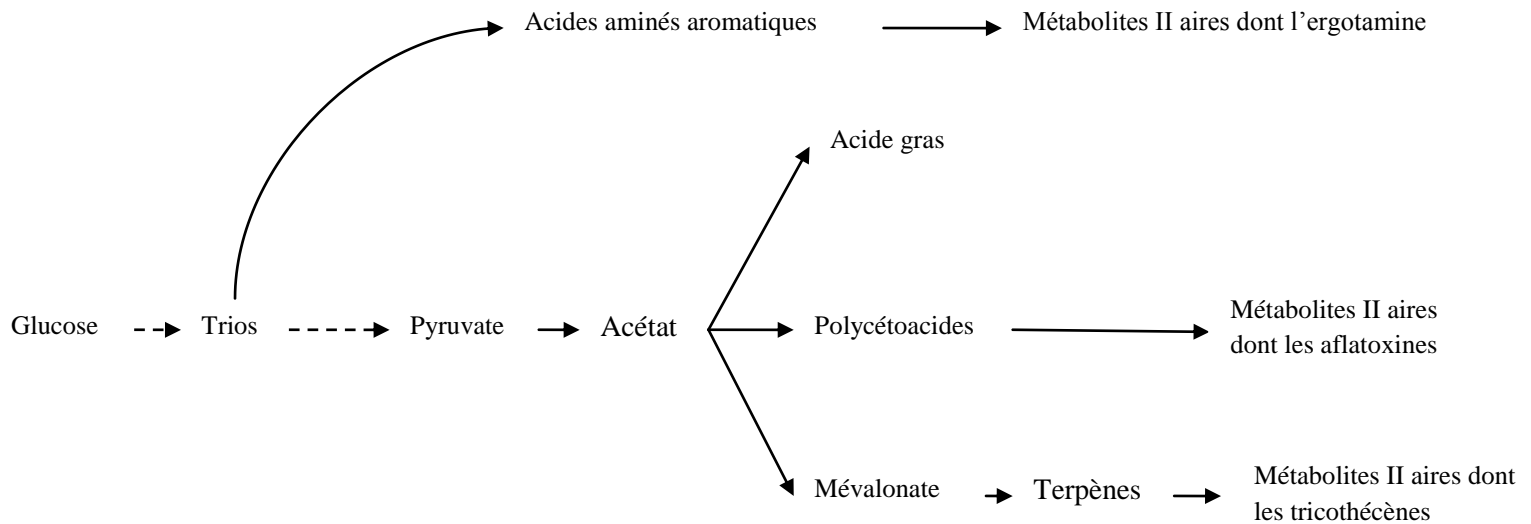


Fig 2.2: Biosynthèse des mycotoxines (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007)

6. Les principales mycotoxines et leurs effets chez l'être humain :

Les mycotoxines peuvent être transportées au delà du champ, pendant le stockage et durant les procédures de transformation et s'accumuler dans le produit alimentaire final, même si la moisissure a été éliminée du produit. Ce pendant, peu de genres fongiques posent des problèmes à l'industrie alimentaire (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria*). L'ochratoxine, l'aflatoxine, la patuline, la citrinine, la fumosine et les trichothécènes sont les mycotoxines les plus communément retrouvées dans les produits alimentaires (G.Reboux, 2006).

Tab.2.3: Les principales mycotoxines et leurs effets chez l'être humain (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007).

Mycotoxine	Moisissures produisant la toxine	Substrat sur lequel la toxine se forme	Effets pathologiques	Concentration maximale admissible LMR $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Prévention ou élimination par :
Ergotamine	<i>Claviceps purpurea</i> =ergot du seigle <i>Claviceps</i> divers	-Seigle -Autres céréales	-Effets neurotoxiques : vasoconstricteurs (contraction des muscles lisses) -Gangrène des extrémités.		Criblage des céréales (le champignon mesure 1 à 1,5 cm de long).
Aflatoxines* B ₁ et B ₂ G ₁ et G ₂ M ₁ (métabolite de B1) Venant de l'anglais, B fluorescence bleue, G fluorescence verte, M milk	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	-Arachide conservée en tas (Afrique), donc tourteau d'arachide, donc lait des animaux. Plus rarement : -céréales ; -graines oléagineuses européennes ; -légumes secs ; -fruits oléagineux tropicaux ; Epices (qui contaminent tous les aliments).	La plus toxique est B ₁ doué de : -cancérogénicité du foie, rein, estomac, colon ; -mutagénicité ; -tératogénicité ; -hépatotoxicité : infiltration lipidiques, signes de cirrhose, hépatique ; -neurotoxicité ; Effets plus marqués si : -subcarence protéiques ; -carence en vitamine A ; -infections...	Aflatoxine B ₁ : -0,1 pour préparations à base de céréales et aliments pour enfants de moins de 3ans ; -2 pour toutes les céréales et les huiles végétales ; -2 pour farines blanches ; -2 pour les arachides, pistaches, amandes, graines oléagineuses pour consommation directe ; -5 pour le maïs avant traitement ou comme ingrédient -8 pour les arachides avant traitement ou comme ingrédient -10 pour tous autres aliments	Elimination par raffinage des huiles, prévention par le stockage des grains en silo. L'ionisation de ces substrats à rôle essentiel préventif.

				non précisés.	
Lutéoskyrine	<i>Penicillium islandicum, citrinum, bruneum</i>	-Riz jauni. -Autres céréales.	Lésions et dégénérescence graisseuse du foie.		
Patuline	Sécrétée par de nombreux <i>Aspergillus</i> et <i>penicillium</i> dont <i>penicillium patulum</i>	-Pommes, jus de pommes et dérivés. - cidre.(compote et confiture sont moins contaminées du fait du tri des végétaux et de la cuisson). -Autres fruits : poires, céréales (rares).	Bloque les groupements thiols, inhibe la synthèse des macromolécules (ARN et ADN). Pouvoir tératogène, effets génotoxiques, Cancérogénicité discutée. Effets immunodépresseurs.	-50 pour cidre et jus de pommes. La patuline est instable dans les jus d'agrumes. -25 pour les produits à base de morceaux de pommes (compote...)	-Apport des pommes le plus rapidement possible à la cidrerie. Contrôler des fruits. La pasteurisation, la cuisson détruisent la patuline. La patuline diminue au cours de la fermentation alcoolique. SO ₂ à forte dose, inactive la patuline.
Ochratoxines A et B*	Certaines souches de <i>Aspergillus, Penicillium</i>	Mais, blé, orge. Toutes céréales. Certaines légumineuses. Café. Cacao.	Hépatotoxicité : infiltration graisseuse du foie. Lésion du rein, tératogénicité. Neurotoxicité.	- 10 cafés soluble ; -5 pour toutes les céréales, le café ; -3 pour les produits dérivés des céréales ; -2 pour les vins, raisins (jus et moût); -0,5 pour les préparations à base de céréales pour enfants en bas âge.	Stockage contrôlé des céréales en silo et traitement par les fumigants fongicides : bromure de méthyle phosphore d'hydrogène.
Tricothécènes* (70 variétés)	<i>Fusarium</i> divers	Céréales.	Très cytotoxiques, secrétés même à 0°C. Neurotoxiques. Immunosuppresseurs.	Valeurs non fixées.	
Zéralénone*	<i>Fusarium gramineum</i>	Mais, blé, autres céréales.	Effets endocriniens, oestrogéniques et effets anabolisants.	-100 pour les céréales brutes ; -75 pour les farines de céréales ;	

				-50g pour les produits dérivés de céréales ; -25 pour les préparations pour nourrissons et les enfants en bas âge.	
--	--	--	--	---	--

*Mycotoxines préoccupant particulièrement l'OMS.

7. Réglementation concernant les mycotoxines :

En Algérie, l'arrêté correspondant au 11 octobre 2006 rendant obligatoire la méthode de dosage de l'aflatoxine B₁ et la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés (Journal officiel N°06/2007 du 11 octobre 2006). En fixent les LMR (limite maximale de résidus) dans les produits d'alimentation humaine et de 10µg/Kg pour l'aflatoxine B₁ et de 20 µg/Kg pour la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ (Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003, étude FAO alimentation et nutrition 81). Et d'après le directeur central des laboratoires au niveau de la DGCERF/Ministère du commerce Algérie, de la conférence du 3^{ème} congrès maghrébin sur les toxi infections alimentaires (TIA3 avril 2013) à l'université de Constantine, à parler des risques liés aux mycotoxines vis-à-vis des produits alimentaire à large consommations et d'origine de l'importation ces pour ce la qu'ils ont fixées les teneurs maximales de l'aflatoxine B₁ de 20 µg/Kg dans les arachides et les amandes car ils sont la base de fabrication de beaucoup de gâteaux traditionnelles et de confiseries utilisés par les familles algérienne aux différents occasions des cérémonies et fêtes religieuse.

Ochratoxine

-NF EN ISO 15141-1, 1998 «Produits alimentaires- Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et **produits dérivés-Partie 1** :

Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par chromatographie sur gel de silice» (norme internationale ; = V 03-121-1, norme homologuée).

-NF EN ISO 15141-2, 1998«Produits alimentaires- Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés-Parti 2 : Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par une solution de bicarbonate» (norme internationale ; =V 03-126PR, projet de norme).

-PR NF EN 14132, 2001 «Produits alimentaires-Dosage de l'ochratoxine a présente dans l'orge et dans le café torréfié-Méthode par CLHP et par purification en colonne d'immunoaffinité» (norme internationale ;=V 03-126PR, projet de norme) (Joseph-Pierre Guiraud, Jean-Philippe Rosec, 2004).

Le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires.

Des méthodes de dosage officielles sont disponibles pour la détermination de l'OTA dans les céréales et les produits dérivés, dans l'orge et le café et dans le vin et la bière (AFSSA, 2006).

1. L'alimentation vectrice d'OTA:

Parmi la multitude de produits contaminants connus à ce jour, les aflatoxines, fumosines, trichotécènes, zéaralénonnes, ochratoxines appartiennent au groupe des mycotoxines et sont responsables de pathologies humaines extrêmement graves. L'ochratoxine A ou l'OTA produite par les champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Figure 3.1), est reconnue comme responsable de certaines pathologies rénales chez le porc est soupçonnées d'être à l'origine de quelques néphropathies humaines (FAO/OMS/PNUE, 1999). Chez le rat, il a été montré que l'OTA a des propriétés carcinogènes et immunotoxique. Outre l'absorption directe, l'OTA, ayant une période biologique longue, demeure dans le circuit sanguin et contamine donc la viande des animaux en ayant absorbé, tout comme elle peut contaminer le lait maternel (Hanak E et al., 2002).

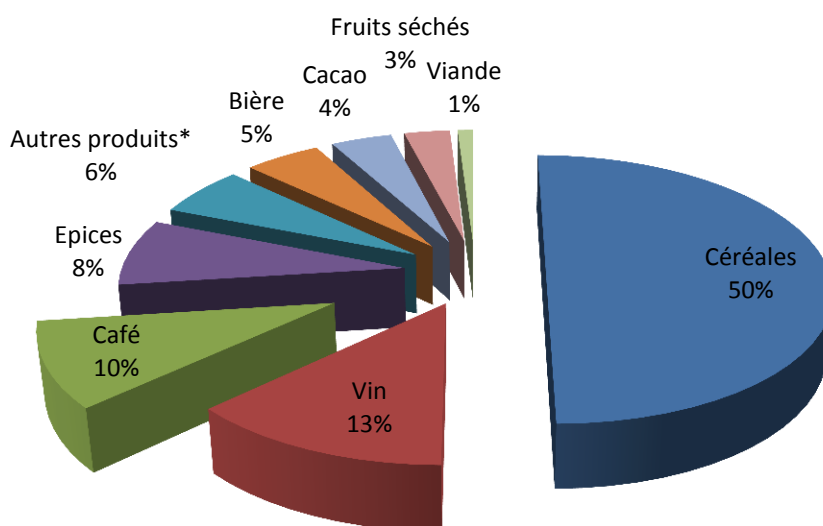


Fig 3.1. Principales sources d'OTA, (FAO, 2010)

(*): Les jus de fruit sont les premiers contributeurs inclus dans cette catégorie

2. les moisissures ochratoxinogènes:

Comme il a été précédemment noté, certains champignons ont une affinité écologique avec des végétaux agricoles spécifiques, et certaines conditions de traitement et de stockage encouragent le développement de champignons particuliers-certains végétaux ont donc tendance à contenir des mycotoxines spécifiques et d'autres non. Le café ne fait pas figure d'exception.

Aucune des espèces de *Penicillium* (*P.verrucosum* et *P.nordicum*) responsables de la production d'OTA n'ont été isolées dans le café. En revanche, on relève souvent la présence du *P.brevicompactum*, membre de la même famille que les deux espèces productrices, mais sans qu'il y ait pour ce la une production d'OTA. Trois espèces ou groupes d'espèces, appartenant à la famille des *Aspergillus*, peuvent jouer un rôle important dans le café :

1. le *Aspergillus niger* (il n'existe pas de consensus concernant la classification des champignons comparables au *A.niger*) est de loin le plus fréquent, notamment dans le *Coffea canephora* (robusta), mais la production d'OTA est rare et généralement faible. Une étude n'a relevé qu'un producteur sur souches isolées testées ;

2. le *Aspergillus carbonarius* est rare. Il a toutefois été prouvé qu'il peut être relativement fréquent dans certaines zones. Des isolats montrent que ce champignon peut produire de l'OTA en quantité non négligeable, mais seulement dans un nombre limité de conditions environnementales ;

3. le *Aspergillus ochraceus* et les champignons apparentés sont bien représentés dans les systèmes de production du café. Souvent responsables de la production d'OTA (environ 80% des souches isolées en produisent spontanément), ce sont les principales espèces productrices d'OTA dans le café.

3. Ochratoxine A:

L'OTA est une mycotoxine produite lors du stockage de nombreuses denrées alimentaires (céréales, café, cacao, fruits secs, épices,...) et au champ de façon occasionnelle sur le raisin. Elle est également susceptible d'être présente dans les abats d'animaux (notamment le sang et les rognons) ayant consommé des aliments contaminés (AFFSA, 2006).

L'ochratoxine A est un dérivé chloré, peu soluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques polaires et dans les solutions aqueuses de bicarbonate. Il s'agit d'un composé stable dans le temps et résistant à la chaleur, détruit par hydrolyse acide qui sépare la phénylalanine de la fraction iso coumarine donnant l'ochratoxine α . Cette molécule se trouve également dans le foie, les urines et les fèces des animaux chez les quels de l'OTA a été administrée, ce qui montre que ce clivage. Peut être réalisé dans l'organisme.

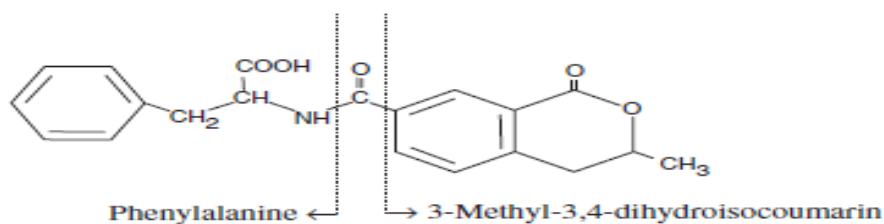




Fig 3.2 : Structure de base de l'ochratoxine A (Luis Almela et al, 2007).

Tab. 3.1 : Fiche informative de l'ochratoxine A (service de la sécurité alimentaire/direction de la santé de Luxembourg/ 2010)

Informations générales	
Nomenclature IUPAC	N-{{[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromén-7-yl]carbonyl}-L-phenylalanine
Numéro CAS	<u>303-47-9</u>
Numéro EINECS	<u>206-143-7</u>
PubChem	<u>442530</u>
SMILES	CC1CC2=C(C=C(C(=C2C(=O)O1)O)C(=O)NC(CC3=CC=CC=C3)C(=O)O)Cl
InChI	InChI=1/C20H18ClNO6/c1-10-7-12-14(21)9-13(17(23)16(12)20(27)28-10)18(24)22-15(19(25)26)8-11-5-3-2-4-6-11/h2-6,9-10,15,23H,7-8H2,1H3,(H,22,24)(H,25,26)/t10-,15+/m1/s1/f/h22,25H
Propriétés chimiques	
Formule brute	<u>C₂₀H₁₈ClNO₆</u>
Masse molaire	403,813 ± 0,021 g·mol⁻¹ C 59,49 %, H 4,49 %, Cl 8,78 %, N 3,47 %, O 23,77 %
Propriétés organoleptiques	
Couleur	cristaux blancs
Propriétés physicochimiques	
Solubilité	0,987 mg·l ⁻¹ eau à 25 °C sol. dans l' <u>éthanol</u>
Point de fusion	169 °C
Absorption	- UV absorption : 213 (ε = 36800), 333 nm (ε = 6400 in ethanol) 331nm (ε = 5979 in acetonitrile) - Fluorescence λ _{ex} = 333 nm, λ _{em} = 428 nm (in ethanol)
Précautions	
Directive 67/548/EEC	 <p>T+ : <u>Très toxique</u></p> <p>Phrases R :</p> <p>R28 : Très toxique en cas d'ingestion.</p> <p>R40 : Effet cancérogène suspecté. Risque possible d'effets irréversibles.</p> <p>Phrases S :</p> <p>S28 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec ... (produits appropriés à indiquer par le fabricant).</p> <p>S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).</p> <p>S36/37 : Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.</p>

	Phrases R : 28, 40, Phrases S : 28, 36/37, 45,
<u>Transport</u>	<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 30px; height: 20px; margin: 0 auto; background-color: orange; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">66</div> <div style="border: 1px solid black; width: 30px; height: 20px; margin: 0 auto; background-color: orange; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">3462</div> </div> <p>Code Kemler :</p> <p>66 : matière très toxique</p> <p>Numéro ONU :</p> <p>3462 : TOXINES EXTRAITES D'ORGANISMES VIVANTS, SOLIDES, N.S.A.</p> <p>Classe :</p> <p>6.1</p> <p>Étiquette :</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>6.1 : Matières toxiques</p> <p>Emballage :</p> <p>Groupe d'emballage I : matières très dangereuses;</p>
	Classification du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer)
Groupe	Groupe 2B : Peut-être cancérigène pour l'homme
Écotoxicologie intrapéritonéal	
DL ₅₀	<p>20 mg·kg⁻¹ rat <u>oral</u></p> <p>12,75 mg·kg⁻¹ rat <u>i.v.</u></p> <p>12,6 mg·kg⁻¹ rat <u>i.p.</u></p>

4. Dérivés:

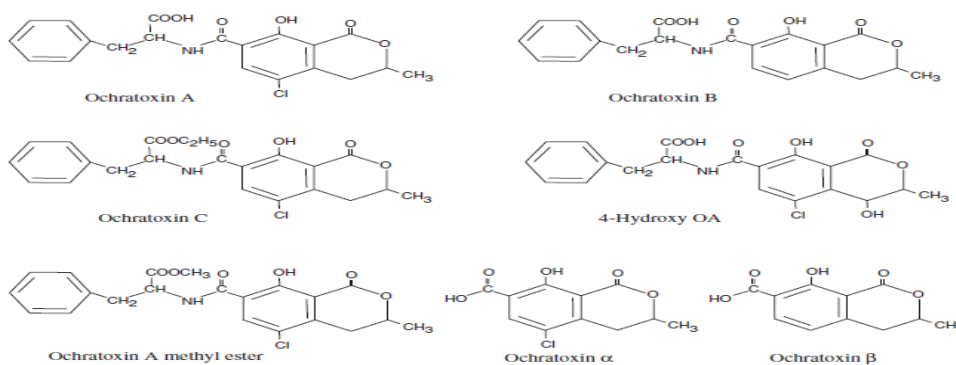
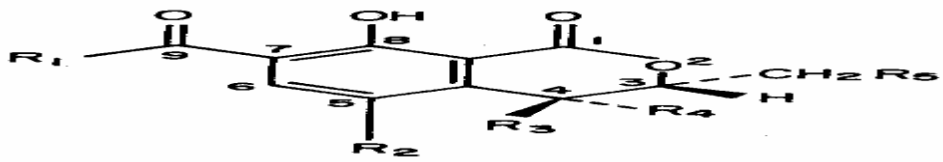


Fig 3.3: Dérivés de l'ochratoxine A (Luis Almela et al, 2007).

Il y a six dérivés de l'OTA représentés dans la (figure 3.3), les radicaux R₁, R₂ et R₃ ce diffèrent pour donner les différentes formes d'ochratoxines existant (tableau 3.2).

Tab 3.2. Différents formes d'ochratoxines.

					
Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
OTA (Ochratoxine A)	Phénylalanine	Cl	H	H	H
OTB (Ochratoxine B)	Phénylalanine	H	H	H	H
OTC (Ochratoxine C)	Phénylalanine, éthyle ester	Cl	H	H	H
4-Hydroxy OA (4-Hydroxy ochratoxine A)	Phénylalanine	Cl	H	OH	H
Ochratoxine A méthyle ester	Phénylalanine, méthyle ester	Cl	H	H	H
OT α (Ochratoxine α)	OH	Cl	H	H	H
OT β (Ochratoxine β)	OH	H	H	H	H

5. Propriétés physico-chimiques des mycotoxines :

Ce sont généralement des substances à prédominance liposoluble que l'on extrait par des mélanges chloroforme-eau la cuisson, le froid et les technologies industrielles ne détruisent pas les mycotoxines. Seule la filtration des huiles les élimine (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007).

6. Toxicocinétiques de l'OTA:

L'OTA agit directement sans métabolisme préalable, les métabolites qui se forment dans l'organisme ou sous l'effet des bactéries intestinales (hydroxy-, déchlorés-, isocoumarine libérée de la partie phénylalanine) sont des produits de détoxification. Sa distribution dans les tissus suit l'ordre : rein > foie > muscle > tissus adipeux (Jean-Denis Bailly et Philippe Guerre, 2009); elle n'est pas stockée dans un organe particulier, mais circule liée à l'albumine sérique, et l'affinité pour l'albumine conditionne la sensibilité d'une espèce donnée.

7. Effets toxiques :

Son mode d'action est simple : elle bloque irréversiblement la synthèse protéique, elle agit pour ce la par l'intermédiaire de son groupement phénylalanine, qui dans le milieu cellulaire est pris en charge par le RNA de transfert correspondant. La molécule d'isocoumarine empêche la suite du processus ; créant ainsi une inhibition par compétition avec l'RNA synthétase. En sens inverse, cet effet peut être utilisé à titre préventif :

expérimentalement, une injection de phénylalanine protège de la toxicité de l'OTA par simple dilution au niveau du rRNA récepteur.

8. Détection des mycotoxines :

Pour la détection de l'ochratoxine A, Les méthodes extractives sont classiques et basées le plus souvent sur de l'extraction solide-liquide (échantillons solides) ou liquide-liquide (vin, bière) associant des solvants de natures très variables chloroforme-acide phosphorique, *tert*-butylméthyléther ou encore méthanol-eau. L'utilisation de colonnes d'immuno-affinité représente l'état de l'art pour la purification de l'OTA dans les denrées alimentaires (AFSSA, 2006). Les méthodes de dosage des mycotoxines utilisent les techniques classiques : chromatographies liquide ou gazeuse, spectrométrie de masse et immunodétection à l'aide de kits de dosage à base d'anticorps (Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007).

Les immuno-essais, tout particulièrement l'ELISA et la RIA, sont des techniques appliquées en dépistage dans une minorité de laboratoires. La chromatographie couche mince est aujourd'hui moins utilisée que dans le passé pour déterminer la teneur en OTA dans les aliments, phénomène lié à des performances limitées notamment en ce qui concerne la spécificité du signal et de la précision/justesse de la mesure (AFSSA, 2009).

La technique de mesure la plus utilisée, au moins en Europe et en Amérique du Nord, est la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique (CLHP-FD). Alors que le couplage GC-MS s'est avéré mal adapté à l'analyse de l'OTA, le couplage LC-MS a démontré sa capacité à répondre aux attentes de la problématique, non pas en améliorant drastiquement la sensibilité mais plutôt en délivrant des signaux plus spécifiques aboutissant à des conclusions non ambiguës eu égard à l'identité de l'analyte. Selon les matrices, les limites de quantification sont comprises entre 0,01 et 0,1 µg/L pour les vins, 0,5 et 2 µg/kg pour les céréales et 0,1 et 0,5 µg/kg pour les abats (AFSSA, 2006).

9. Nature de la molécule:

L'OTA est formée par un groupement isocoumarine substitué (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine (O α)) lié à la L- β -phénylalanine par une liaison amide (figure 3.1) (Abarca et al., 2001).

10. Toxicité aigue :

La toxicité aigue de l'OTA varie en fonction de l'espèce, du sexe et de la voie d'administration, les DL₅₀ sont répertoriées dans le tableau ci-dessus (Tab. 3.1), le rein est l'organe cible de l'OTA (Pohland et al, 1992 ; Pfohl-Leszkovicz, 1999).

11. Toxicité subaiguë et chronique:

L'exposition à des faibles doses d'OTA est à l'origine de néphrotoxicité et de cancers des voies urinaires, l'OTA est aussi immunotoxique, hépatotoxique et tératogène (Pfohl-Leszkovicz, 1999 ; JECFA, 2001).

12. Néphrotoxicité:

Des études épidémiologiques mettent en avant le lien entre la présence d'OTA dans la nourriture et l'incidence de la BEN. Les différents facteurs pouvant intervenir dans l'étiologie des tumeurs du tractus urinaire associées à la BEN (Pfohl-Leszkowicz et al, 2002 ; Pfohl-Leszkowicz et Manderville, 2007). L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces.

13. Carcinogénicité:

L'OTA a été classée dans le groupe 2B « cancérigène possible pour l'homme » lors de la dernière évaluation réalisée par le CIRC (IARC, 1993). Les effets cancérigènes de l'OTA sur des souris ont été vérifiés par plusieurs études (Purchase et Vander Watt, 1971 ; Bendele et al, 1985). L'étude de la (NTP) programme national de toxicologie américain sur des rats mâles et femelles a permis de confirmer le pouvoir cancérigène de l'OTA (Borman, 1989).

14. Mécanismes de génotoxicité et mutagénicité:

A cause des réponses négatives aux tests classiques de mutagénicité. L'OTA a été longtemps considérée comme non génotoxique les tests effectués sur les différentes souches classiques de *Salmonella typhimurium* sont négatifs et n'induit pas d'inhibition de la croissance chez différentes souches de *Bacillus subtilis* testées. Par contre, la génotoxicité de l'OTA a été démontrée en utilisant d'autres types de cellules de mammifères. Une désorganisation de la synthèse d'ADN a été observée dans les hépatocytes de rats et souris en cultures. Malonova et al. (1990) ont montré la présence d'aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains se retrouve chez les patients souffrant de BEN. Des dommages et cassures simple brin ont été observés au niveau de l'ADN de rein et de foie de souris et de rats.

15. Formation d'adduits à l'ADN:

L'OTA induit un flux d'espèces réactives de l'oxygène qui génèrent un stress oxydatif et des dommages oxydatifs à l'ADN. Et aussi l'OTA subit une bio-activation aboutissant à la formation d'espèces électrophiles qui réagissent directement avec l'ADN générant des adduits à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz et al., 1991).

16. Voie de biosynthèse de l'OTA:

La nouvelle représentation schématique des dernières étapes de biosynthèse de l'OTA proposée par Antonia Gallo a remplacé l'ancienne proposition de Harris et Mantle en 2001, qui fait intervenir la voie des acétates poly-malonates qui entraîne la production d'un poly-peptide la melleine à partir de 5 molécules de malonates avec une molécule d'acétate (figure 3.4).

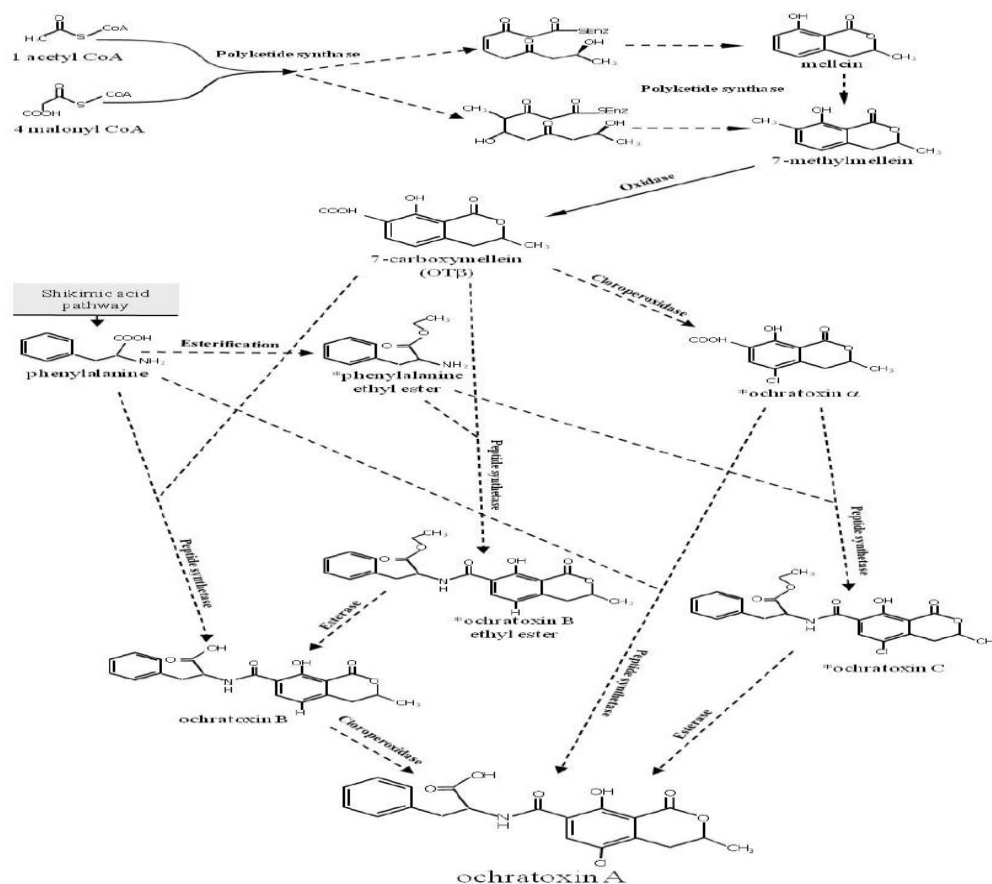


Fig 3.4 : Schéma des dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'OTA (Antonia Gallo et al., 2012)

17. Condition d'ochratoxigénèse:

On connaît assez peu les conditions de contamination par les champignons responsables de la production d'OTA, ni celles de leur prolifération, ni les conditions de production d'OTA par ces champignons. Cependant, il est admis qu'un séchage mal conduit et insuffisant, un stockage sans précautions sont des facteurs aggravants. Les teneurs en OTA dans les produits agricoles sont extrêmement variables et peuvent aller de 0 à plusieurs dizaines de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Hanak E et al., 2002).

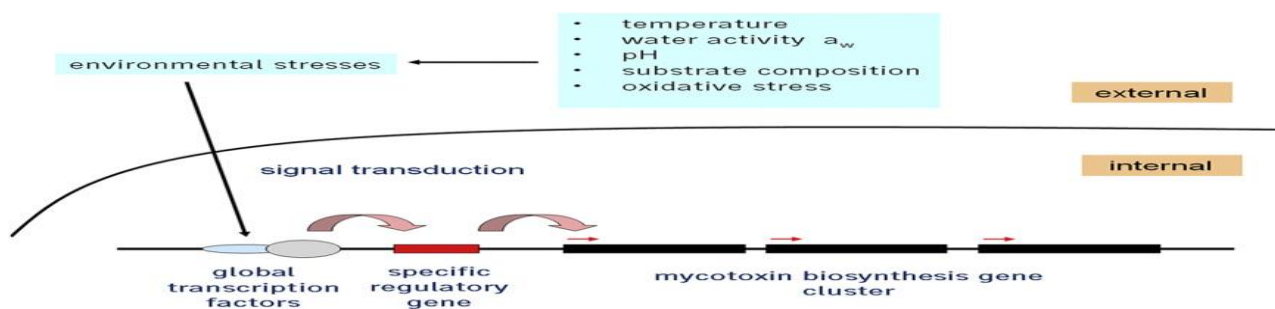


Fig 3.5: Schéma de l'influence des paramètres extérieurs sur l'activation des gènes de biosynthèses des mycotoxines (Markus Schmidt-Heydt et al., 2011).

Plusieurs paramètres ont une grande influence sur la quantité d' ochratoxine A produit (Figure 3.5) , Les paramètres les plus importants par rapport à cet aspect sont la composition du substrat, la température et l' activité de l'eau (Markus Schmidt-Heydt et al., 2011), le pH et les interaction microbiennes .

18. rganisation d'un gène en cluster:

Presque tous les champignons filamenteux produisent un ou plusieurs dérivé polyketide et métabolites secondaire (Demain et Fang , 2000). La voie de biosynthèse de l' aflatoxine B₁ c'est la mieux connue ils ont trouvés deux types de groupes de gènes dans des isolats connus de champignons afltoxine, espèces productrices telles que *A. flavus* et *A. parasiticus* ont des gènes en cluster (Mahendra Rai et al., 2010), l es gènes de biosynthèse connus de l' ochratoxine A. Les gènes de types (*asp*, *otanps*, *otapks*, *otatra*, *otachl*, *ntra*) avec la zone en pointillés indique que cette fragement n'a pas encore été établie entrent dans ca biosynthèse(figure 3.6). Les réactivités des enzymes sont induit par le gène *otanps* pour la formation du peptide, le gène *otapks* induit la formation de la polycétide,et la chloration faite par l'activité de l'enzyme de chloration. L'*asp* et les gènes *ntra* marquent apparemment les limites de la chaine des gènes, ils sont co-régulés, mais leurs implication dans la biosynthèse n'est pas encore connue (Markus Schmidt-Heydt et al., 2011).

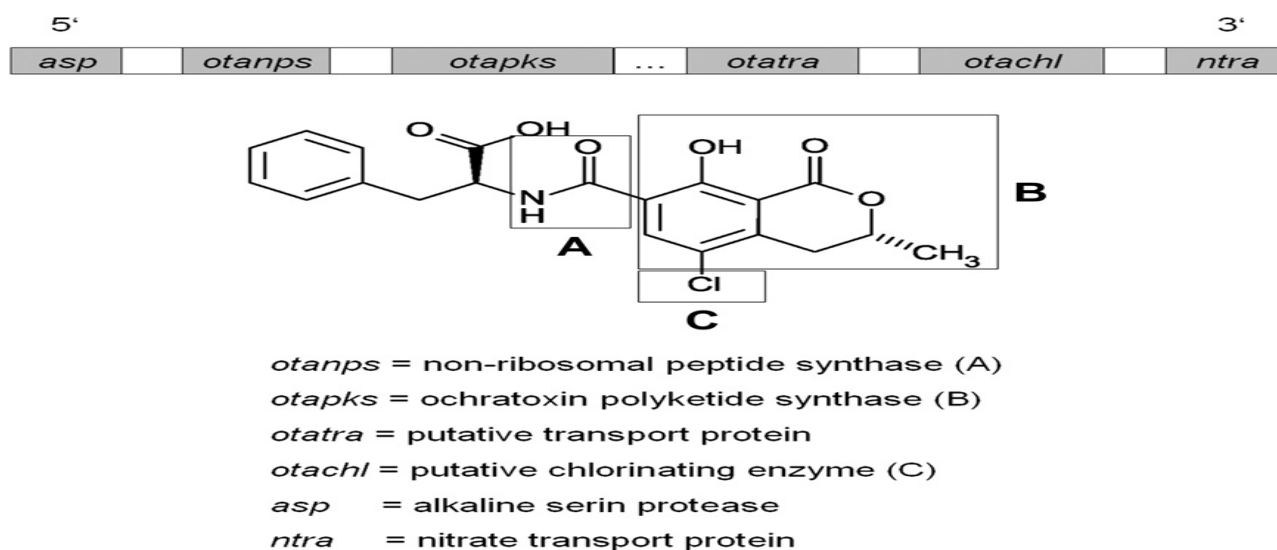


Fig 3.6 : Les gènes de biosynthèse de l' ochratoxine A (Markus Schmidt-Heydt et al., 2011)

I. Echantillonnage:

Au début des années 1990, l'Algérie a engagé des réformes structurelles concrétisant ainsi le passage à l'économie de marché. L'Algérie a aussi opté pour le processus de l'ouverture de son commerce extérieur et son engagement dans le cadre des accords commerciaux internationaux par de réformes économiques engagées qui a permis la libéralisation et l'abolition du monopole de l'état sur le commerce extérieur et qui a influencer sur le marché nationale au temps qualité, quantité, variétés et prix des marchandises ce qui a permis comme de notre cas de constaté de voire plusieurs types de café dans le marché locale (Fig.4.1).

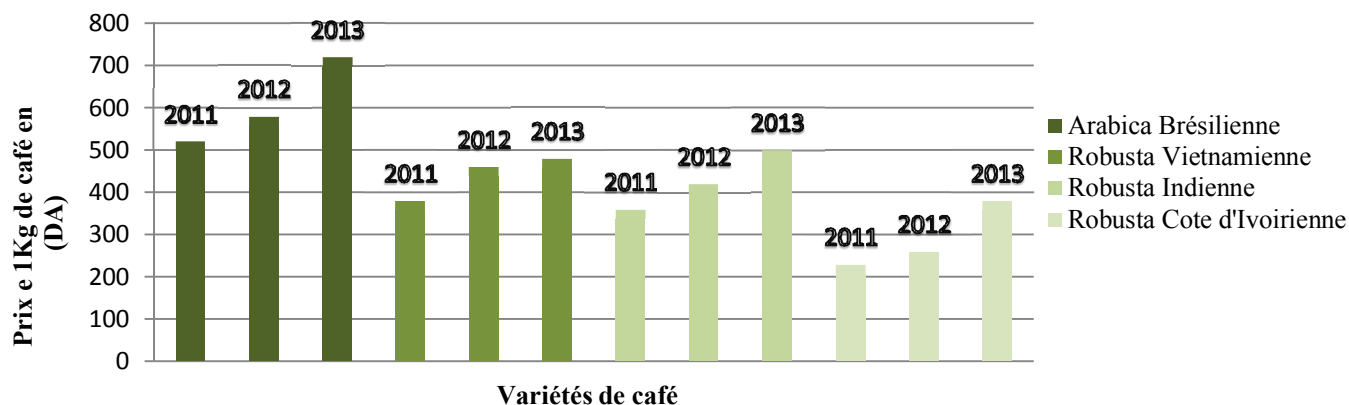


Fig.4.1 Prix du café vert pendant les trois dernières années (marché locale de Laghouat)

L'ensemble des opérations, qui consiste à passer du lot initial à un échantillon analysé au laboratoire, s'appelle échantillonnage. Il est impossible de juger des qualités et des défauts d'un lot important de grains ou de graines sur son ensemble. On peut étudier qu'une fraction de celui-ci (Pierre Gy, 1997). Dans la région de Laghouat le café est commercialisé dans le marché locale sous trois formes: Grains de café vert, grains café torréfié, café torréfier et moulu prête à l'emploi de différentes marques, dans notre étude on a visé juste le café sous forme de grains vert et torréfié ce qui a permis de constater qu'il y a deux variétés botaniques l'une c'est arabica et l'autre c'est canéphore ou bien (robusta), dans la première variété café arabica elle est d'origine brésilienne et pour la deuxième variété botanique café robusta elle vient de trois provenances : Vietnamiennne, Indienne et Cote d'Ivoire.

II. Présentation de la région d'étude:

La région de Laghouat est située à 400 Km de la capitale d'Alger (33°48'N, 02°53'E)(Fig.4.2), couvrant une superficie totale de 25.052 km². Elle est limitée au Nord par la wilaya de Djelfa, à l'Ouest par la wilaya d'El Bayadh, au Nord-ouest par la wilaya de Tiaret et vers le sud par la wilaya de Ghardaïa (C.D.F., 2008). La région de Laghouat est une région steppique. Cette région s'étend sur plusieurs étages bioclimatiques, du semi-aride jusqu'au saharien, elle reçoit entre 150 à 300 mm/an de précipitations. Cette précipitation est caractérisée par son irrégularité spatio-temporelle, le mois le plus arrosé est généralement le mois de

septembre. La région de Laghouat se caractérise par une période sèche qui s'étend sur douze mois. Les températures moyennes annuelles oscillent au alentour de 19°C, la température moyenne maximale du mois le plus chaud est de 39,7°C, et la température moyenne minimale du mois le plus froid est de 1.98 °C (D.S.A.,2008). Et pour la population de la wilaya de Laghouat en compte au 31/12/2008, une population de 483264 habitants. Cette population est inégalement répartie dans l'espace, 30% de la population sont concentrés au niveau du chef-lieu de la wilaya et pour la dispersion de la population 79,60% de la population sont concentrés au niveau des agglomérations chefs-lieux de communes. 4,70% vivent au niveau des agglomérations secondaires et 15,70% vivent en zone éparse.

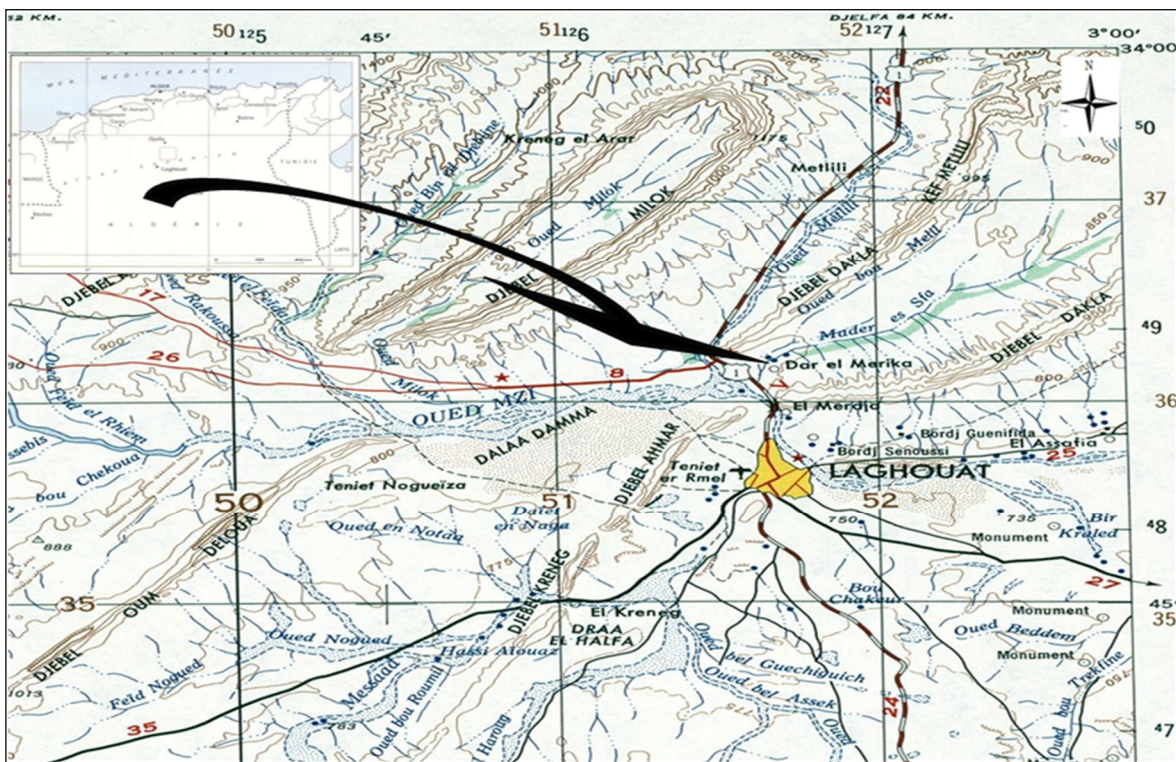


Fig.4.2: Localisation géographique de la wilaya de Laghouat.

(Extrait de la carte topographique de Laghouat 1956, E: 1/250.000). D.S.A, 2012

III. prélèvement:

Vient sept échantillons de grains de cafés vert et torréfié, collectés localement dans la région de Laghouat, on été collectés et analysés du point de vue teneur en eau (humidité relative), microflore est présentes d'ochratoxine A et d'aflatoxine B₁.

Tableau 4.1 nous renseigne sur les trois prélèvements effectués avec les différentes variétés, provenance et leur poids.

Tab 4.1: liste des échantillons analysés

Lot	Echantillon	code	Poids	Date de prélèvement
I	Arabica brésilienne vert	I.A.B.V	500g	22/01/2011
	Robusta vietnamienne vert	I.R.V.V	500g	
	Robusta indienne vert	I.R.I.V	500g	
	Robusta Côte-D'ivoire vert	I.R.C.V	500g	
	Arabica brésilienne torréfié	I.A.B.T	500g	
	Robusta vietnamienne torréfié	I.R.V.T	500g	
	Robusta indienne torréfié	I.R.I.T	500g	
	Robusta Côte-D'ivoire torréfié	I.R.C.T	500g	
	Mélange torréfié [□]	I.M.T	500g	
II	Arabica brésilienne vert	II.A.B.V	500g	25/02/2011
	Robusta vietnamienne vert	II.R.V.V	500g	
	Robusta indienne vert	II.R.I.V	500g	
	Robusta Côte-D'ivoire vert	II.R.C.V	500g	
	Arabica brésilienne torréfié	II.A.B.T	500g	
	Robusta vietnamienne torréfié	II.R.V.T	500g	
	Robusta indienne torréfié	II.R.I.T	500g	
	Robusta Côte-D'ivoire torréfié	II.R.C.T	500g	
	Mélange torréfié [□]	II.M.T	500g	
III	Arabica brésilienne vert	III.A.B.V	500g	23/03/2011
	Robusta vietnamienne vert	III.R.V.V	500g	
	Robusta indienne vert	III.R.I.V	500g	
	Robusta Côte-D'ivoire vert	III.R.C.V	500g	
	Arabica brésilienne torréfié	III.A.B.T	500g	
	Robusta vietnamienne torréfié	III.R.V.T	500g	
	Robusta indienne torréfié	III.R.I.T	500g	
	Robusta Côte-D'ivoire torréfié	III.R.C.T	500g	
	Mélange torréfié [□]	III.M.T	500g	

NB: ([□]) que le mélange torréfié est constitué de 25% grains de café arabica brésilienne et de 75% de grains de café canéphore (robusta).

IV. Analyses physico-chimiques:

IV.1 Détermination du pH:

Mettre 5g de broyat fin d'échantillon de café dans 45 ml d'eau distillée énergétiquement agité et faire la mesure à l'aide d'un pH mètre étalonner après 15 minutes.

NB: la mesure du pH et le résultat de la moyenne de trois essais successifs de chaque échantillon.

IV.2 Détermination de la teneur en eau (humidité relative):

Prendre 5g d'échantillon ($P_{éch}$) de café légèrement broyé dans une boîte pétrie en verre à fond plat tarée (t), puis mis dans une étuve ventilée à $105 \pm 0,2^\circ\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'un poids constant (P_f) de notre échantillon la perte de poids observée est équivalente à la quantité d'eau présente dans les grains, normalisé par la méthode Afnor (1980) l'humidité relative et calculé par la relation suivante:

$$HR_{\%} = 100 \left(\frac{P_{éch} - P_f}{P_{éch} - t} \right)$$

HR_%: humidité relative en pourcentage

$P_{éch}$: poids de la prise d'essai avant l'étuvage

P_f : poids de la prise d'essai après l'étuvage

t : poids tarée du boîte pétrie

NB: la mesure de l'HR_% et le résultat de la moyenne de neuf essais de chaque échantillon.

V. Analyses mycologiques:

Dénombrement et isolement, purification de la mycoflore totale associée aux grains de café:

Pour l'isolement des moisissures affectant les grains de café, deux méthodes sont utilisées, la méthode directe de buvard et la méthode de dilution.

IV.1 Méthode buvard (mycoflore externe et interne):

L'analyse à porté sur 50 grains pris aseptiquement au hasard de chaque échantillon analysé, déposés sur papier buvard imbibé d'eau distillé stérile à raison de 10 grains de café par boîte pétrie, les boîtes sont ensuite incubées à une température de 25°C pendant 7 jours. Cette méthode elle ne donne aucune indication sur l'identité des contaminations. Par contre, elle permet de mettre en évidence des genres peu sporulants comme *Alternaria*, *Fusarium*, même en présence de genres très sporulants comme *Penicillium* ou *Aspergillus* (Cahagnier B et Richard-Molard, 1998)

IV.2 Méthode buvard modifié (mycoflore interne):

Parallèlement à la détermination de la mycoflore externe et interne, nous avons analysé la mycoflore interne (contamination profonde), les grains de café sont désinfectés superficiellement par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium titrée à 6° pendant 5 min, puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile, séchés à l'aide d'une compresse stérile et déposés aseptiquement sur papier buvard imbibé d'eau distillé stérile à raison de 10 grains par boîte.

Les boîtes sont incubées dans les mêmes conditions que précédemment, les colonies développées sont purifiées par un repiquage successif sur milieu PDAac et puis les souches pures sont collecté et conservées à 4°C dans des tubes de PDAac incliné.

NB: pour les deux méthodes buvard et buvard modifié chaque échantillon est divisé en trois sous échantillons.

IV.3 Méthode de dilution (dénombrement):

La méthode de dénombrement, est plus sensible, elle rend mieux compte de la progression des microorganismes sur les grains, dans des séries évolutives déterminées, à la condition que soient effectuées les identifications d'espèces qui seules permettent de suivre l'évolution des populations en présence (Cahagnier B et Richard-Molard, 1989).

1^{ère} étape préparation de la suspension-mère Figure. 4.3,

Mètre aseptiquement 5g de café broyé dans 45ml d'eau physiologique stérile avec l'ajoute de deux gouttes de tween 80 stérile pour émulsifier la solution mère. Dans la recherche des levures et des moisissures, l'emploi de surfactants est conseillé. En effet il augmente la dispersion des conidies et empêche la formation d'agrégats qui fausserait les résultats (Chagnier B et Richard-Molard, 1989). Pour avoir une énumération adéquat en à utilisé pour ce la, deux milieux de culture de composition chimiques différents l'un et organique c'est le PDAac et l'autre de base minérale c'est le CDA.

Et c'est à partir de la dilution 10^{-1} , deux boîtes de chaque milieu sont écouvillonnées par 0,1ml d'inoculum sur la surface, l'incubation et faite à $25^{\circ}\text{C} \pm 02^{\circ}\text{C}$ pendant 5 à 7 jours.

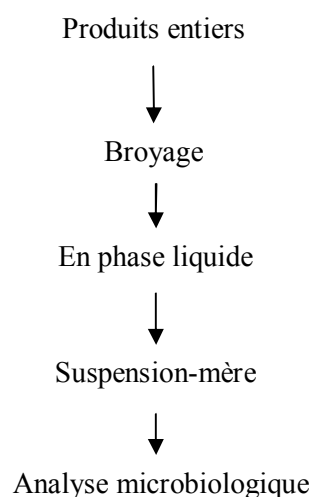


Fig.4.3: Préparation de suspension-mère (Cahagnier B et Richard-Molard, 1989).

IV.4 Purification et conservation des souches de moisissures isolées:

Elle consiste à transférer aseptiquement les différentes souches pure de moisissures isolées à partir des différents techniques (méthode buvard, buvard modifier et méthode classique de dilution, sur des tubes de PDAAc inclinés conservées au frais à 4°C, afin de faciliter leur identification ultérieurement.

IV.5 Identification des moisissures isolées:

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification. L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier B et Richard-Molard, 1998).

IV.5.1 Identification des genres:

Les moisissures isolées des différents échantillons analysés sont identifiées selon plusieurs critères d'ordre macroscopiques (morphologiques) tel que l'aspect et couleur et diamètre de la colonie et de leur reverse, présence des exsudats...etc. Et d'ordres microscopiques tels que la présence ou absence des spores, leur forme et leur structure et leur taille, l'aspect de mycélium...etc.

IV.5.1.1 Critères d'identification macroscopique:

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies Elle peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

Les structures de fructification la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose

(Botton *et al.*, 1990). A titre d'exemple voila les Caractères généraux des principaux *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, susceptible de contaminer dans le tableau ci-dessous.

IV.5.2 Identification des espèces:

IV.5.2.1 Critères d'identification microscopique :

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998). Et pour l'étude de nous souches pures isolées précédemment en procède à la technique de micro-culture décrite par Harouis en 1989 qui consiste à étaler les spores sur les bords périphériques du petit carreaux cubique de milieu de culture PDAac recouvert d'une lamelle et lame porte objet déposé sur anneau en verre sous forme (U) sur papier filtre stérile humidifier d'eau distillé stérile dans une boîte pétrie (Joseph-Pierre Guiraud, 2003), les incubés à 25°C pendant 5 à 7 jours. Après la culture des cubes carrés ensemencés par les moisissures à identifier, en récupèrent les lamelles qui contenant des filaments du champignon à identifier adhérant au verre de la lamelle et en ce débarrassent des cubes de culture, pour réalisé une observation microscopique à l'état frais, les lamelles aux quelles s'adhère le mycélium sont transférées sur d'autres lames porte objets contenant un ou deux gouttes de bleu coton, c'est pour améliorer la qualité du contraste et mettre en relief certaines d détails de la structure. Les observations ont été réalisées aux différents grossissements du microscope photonique au (X10) et (X40), les genres de moisissures sont ainsi identifiés sur la base des caractéristiques morphologiques et microscopiques et à l'aide des différentes clés de détermination (Botton *et al.*, 1990) et (Barnet et Hunter., 1999) et (Pitt et Hocking., 2009).

IV.6 Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* :

Elle repose cette méthode d'identification de l'espèce, sur la relation entre la température d'incubation et l'activité de l'eau (A_w) du milieu de culture, et à la vitesse de croissance, et sur l'appréciation de nombreuses caractéristiques morphologiques sur plusieurs milieux de culture spécifiques. La méthode de (RAMIREZ., 1982) et (Pitt et Hocking., 2009) et recommandée pour l'identification des espèces des moisissures tel que les (*Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*) par technique d'inoculation Fig.4.4 et Fig.4.5, et ce la consiste à préparé des inoculum à partir des spores des culture jeune d' *Aspergillus* ou *Penicillium* à identifier ensemencés dans des tubes à hémolyse contenant une suspension semi solide à base de 0,2% d'agar et de 0,05% de Tween 80, vortexer et puis ensemencer par touches sur différents milieux spécifiques MEA, CDA, G25N et CYA voire tableau.4.2, et les incubés à différentes températures (5°C, 25°C, 37°C et 4°C), l'observation et la notations et calcules des diamètres des colonies sont faites à partir du 7ème jour. NB: que chaque touche ensemencé contient théoriquement une spore.

Tab.4.2: Caractéristiques des milieux spécifiques pour la détermination des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Pitt et Hocking, 1997).

Milieux de culture	T° d'incubation	A _w	Caractéristique
CDA	25°C	Elevé due à sa composition à base minérale	Vitesse de croissance qui varie en fonction de l'A _w à une température constante
G25N	25°C	Base due au glycérol capteur d'eau dans le milieu de culture	Vitesse de croissance qui varie en fonction de l'A _w à une température constante
CYA	5°C		Vitesse de croissance qui varie en fonction de deux températures différentes
CYA	37°C		
MEA	25°C		Informe sur la couleur du thalle

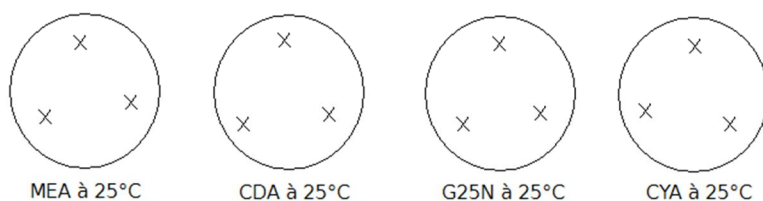


Fig.4.4: Technique d'inoculation des différents isolats de *Penicillium*.

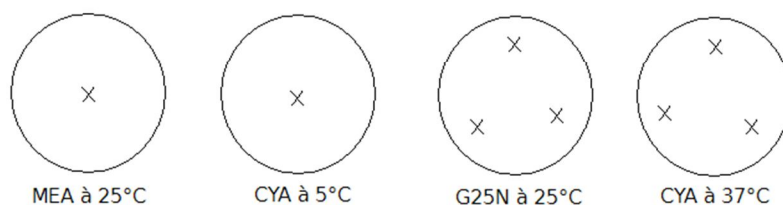


Fig.4.5: Technique d'inoculation des différents isolats d'*Aspergillus*.

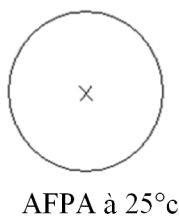


Fig.4.6: Technique de confirmation d'identité *Aspergillus flavus* et *A.parasiticus* sur milieu AFPA.

IV.7 Confirmation de l'identité des espèces d'*Aspergillus flavus* et *A.parasiticus*:

Pour confirmer l'identité des espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* isolées sont cultivées sur milieu spécifique l'AFPA (*Aspergillus flavus* et *parasiticus* Agar) recommandé par Pitt et al. (2009) (Fig.4.6), dans ce milieu, ces souches produisent une couleur jaune –orangé à orange qui colore l'envers de la colonie, cette coloration est due à la production de l'acide aspergillique (acide noaspergillique) par ces

deux espèces fongiques qui réagit avec le citrate d'ammonium ferreux enforment un complexe coloré après une incubation à 25°C pendant 5 jours. Et ce l'on Botton et al., 1990 en peu différencier entre les deux espèces *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* que les spores de ce dernier révèle une coloration rose si elle est laisser agir avec des gouttes de p-Methoxybenzaldehyde, sous microscope photonique.

Tab 4.3:Description d'*Aspergillus flavus* selon la méthode de Pitt et Hocking, 1997.

Milieu de culture	T° d'incubation	Ø de la colonie (cm)	Caractères culturaux
MEA	25°C	5-7,5	Aspect granuleux, vert à vert-jaunâtre dont la croissance rapide et rayonnante, le centre et vert puis la couleur s'alterne entre le vert et le jaune pâle à blanc.
CYA	25°C	5-8	Le mycélium surmontant la surface des colonies est cotonneux, parsemé de petits points noirs (les sclérotés), présence d'un halo blanchâtre de 2cm d'épaisseur. Le centre de la colonie est d'aspect laineux et de couleur vert d'olive, l'envers de la colonie est blanc-jaunâtre et devient marron clair avec l'âge.
G25N	25°C	2-3	La croissance est lente, d'aspect laineux à velouteux, de couleur vert foncé à marron jaunâtre au centre, l'envers est beige jaunâtre.

Tab 4.4:Description d'*Aspergillus parasiticus* selon la méthode de Pitt et Hocking, 1997.

Milieu de culture	T° d'incubation	Ø de la colonie (cm)	Caractères cultureux
MEA	25°C	4-6	Aspect granuleux à laineux, vert à vert foncé avec une croissance plus ou moins rapide. En vieillissant le mycélium aérien devient marron et plus foncé au centre.
CYA	25°C	4-7	Aspect est duveteux, danse parfois granuleux de couleur vert foncé à vert d'olive. il ya apparition de quelques gouttelettes d'exsudats vers le 6 ^{ème} jour. L'envers de la colonie est jaune à rosâtre et devient légèrement orange âtre avec l'âge.
G25N	25°C	2-3	La croissance est lente, d'aspect laineux à velouteux, de couleur vert foncé à marron jaunâtre au centre, l'envers est beige jaunâtre.

IV.9 Calcul de la fréquence et de l'abondance des espèces fongiques isolées:

Pour évaluer les taux de contamination de nos prélèvements on procède à calculer la fréquence qui nous renseigne sur le nombre de foie de champignon dans les échantillons analysés, elle est calculée par le rapport: Nombre d'échantillons contaminés par le champignon/Nombre totale des échantillons analysés. Et pour l'abondance est déterminée par le nombre total des individus de chaque espèce dans l'échantillon total.

V. Analyses mycotoxicologiques:

Les méthodes chimiques d'extraction et de purification et de dosage des mycotoxines, utilisent le même schéma analytique qui correspond en première étape en une extraction (liquide/liquide ou bien solide /liquide), suivie d'une étape de purification de l'extrait, suivie d'une étape de concentration ou condensation et puis l'étape de détection par chromatographie figure.4.7,.

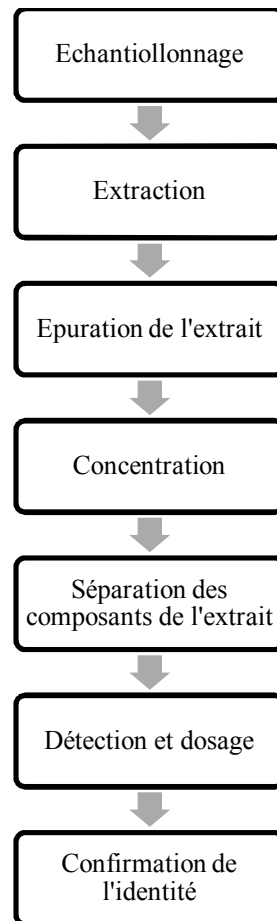


Fig.4.7: Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines (FAO, 1992).

V.1 Extraction et purification à partir du milieu de culture liquide (extraction liquide/liquide):

Pour tester le pouvoir de productivité d'ochratoxine A et l'aflatoxine B₁, en à inoculer aseptiquement les neuf souches d'*Aspergillus* représentatifs (3 souches *A.ochraceus*, 3 souches *A.flavus* et 3 souches *Aspergillus parasiticus*), dans 50ml du milieu semi synthétique YES (Davis et al, 1966) dans des flacons de 250ml stérile, après une période d'incubation de 14 jours à 25°C, les milieux de cultures ont été filtrés à travers papiers Wathman, en récupèrent le filtrat et en se débarrasse de la biomasse fongique (Galtier et al, 1974). 50 ml de chaque échantillon est additionnés à 100ml de chloroforme avec une agitation énergétique pendant 30min, en sépare la phase aqueuse de la phase chloroformique à l'aide d'une ampoule à décanter. En répète l'expérimentation en additionne successivement 50ml, et 30ml pendant 15 et 10min, du chloroforme à la phase aqueuse récupérée chaque fois. Les filtrats récupérés en dernier phase se concentrent à 1ml par rotavaporation, A fin pour être chromatographies figure.4.8.

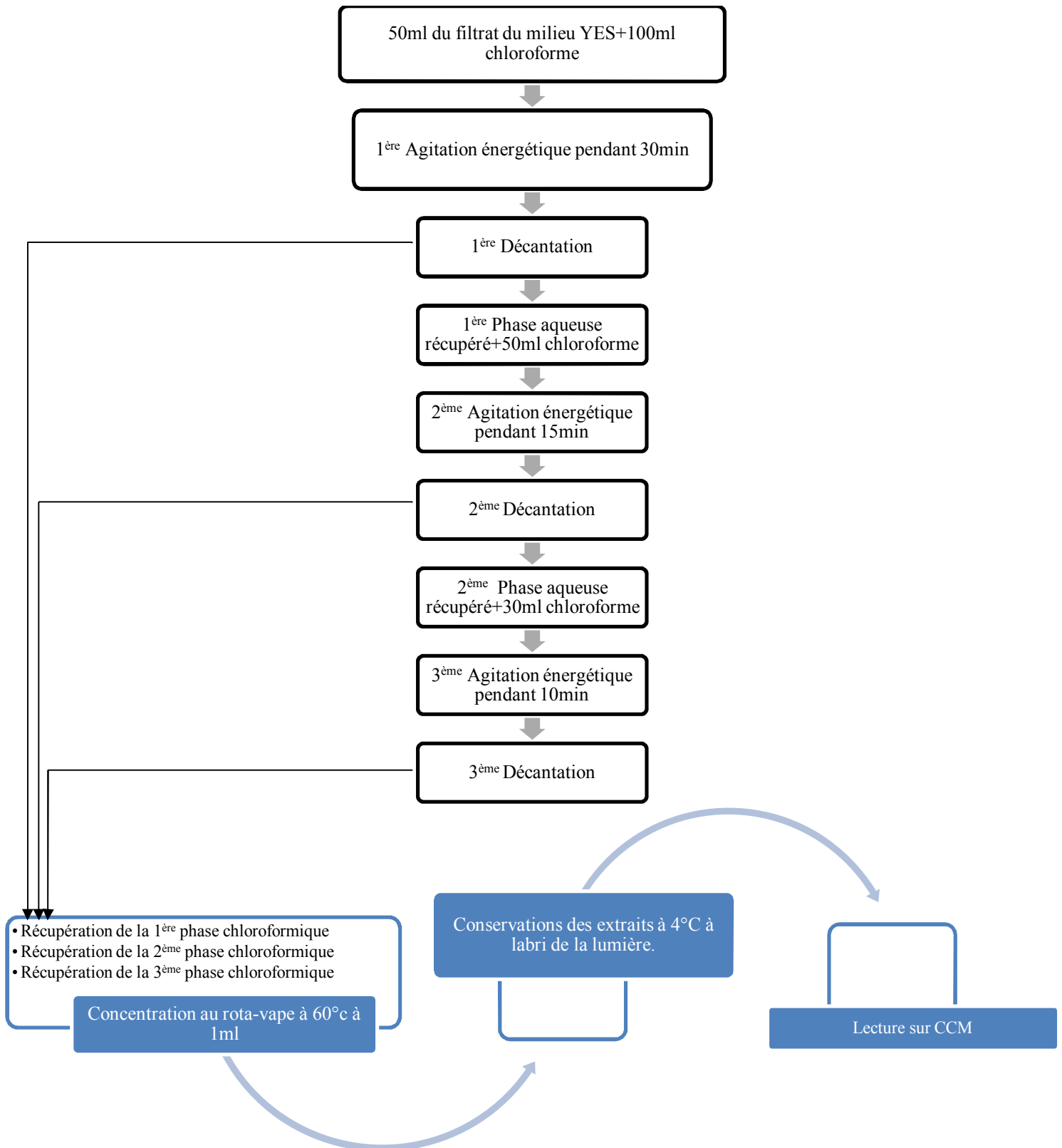


Fig. 4.8 : Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide selon Davis et al. (1966).

V.2 Extraction et purification à partir du substrat (extraction solide/liquide):**V.2.1 Etape d'extraction et concentration:**

Un échantillon de 50g de café est moulu légèrement fine introduit dans un flacon de 250ml, auquel est additionné d'une solution d'extraction composé d'une mélange (v/v) du chloroforme et du méthanol, la suspension obtenue est mélangée et agitée vigoureusement pendant 30min à l'aide d'un agitateur, le mélange est filtré au papier Wathman préalablement saupoudré de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour éliminer l'eau. En répète la même manipulation précédente, en additionne successivement 50ml, et 30ml, du mélange d'extraction chloroforme et méthanol (v/v) à la phase solide (résidus du café moulu) récupérée chaque fois.

Les filtrats sont rassemblés, concentrés par rota-vape jusqu'à l'obtention d'un extrait visqueux d'environ 1ml.

Figure.4.9.

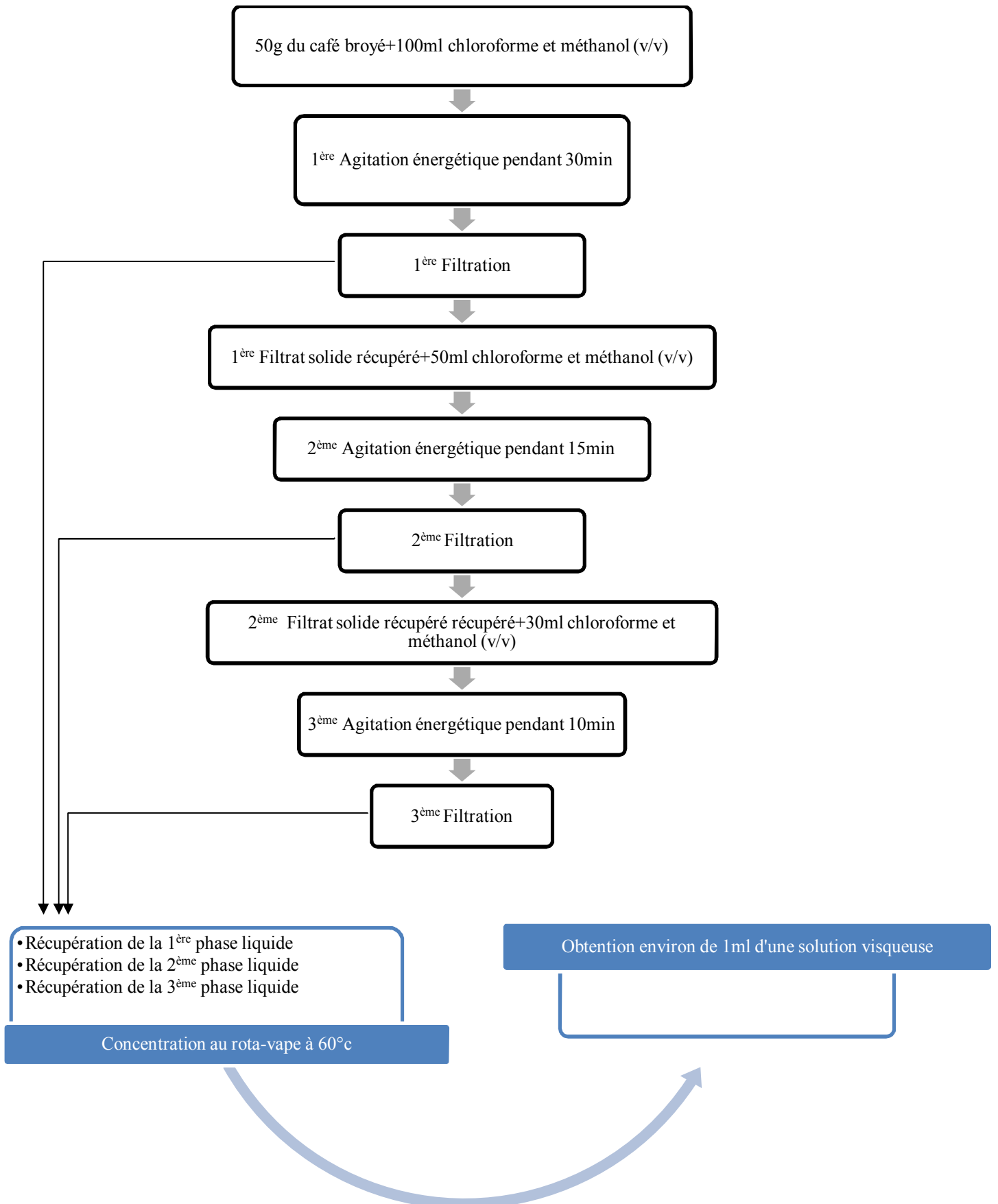


Fig.4.9: Diagramme d'extraction du mycotoxine à partir du substrat solide (1ère étape) selon Betina, (1933).

V.2.2 Etape de purification des extraits:

Les extraits récupérés de l'étape d'extraction précédente sont étalés sur la surface solide de l'agar à 2% coulé sur boîte de Pétrie, les boîtes sont laissées entrouvertes à l'air pour permettre l'évaporation du solvant d'extraction, puis conservées et stockées au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures, en raison de permettre de la diffusion des mycotoxines à l'intérieur des emails de l'agar, en suite les surfaces des boîtes Pétri sont essuyés à l'aide d'une compresse imbibé d'hexane pour ce débarrasser des macromolécules et à la matières grasses .

L'agar est ensuite découpé en petites cubes, mélangé avec 100ml du chloroforme, l'extraction se fait par une agitation vigoureuse pendant 30min, le mélange est filtré à travers du papier filtre contenant une petite pincée de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), l'opération est répétée plusieurs fois encore avec le filtrat qu'on ajoute successivement du 50ml et 30ml du chloroforme, suivi d'une agitation énergique pendant 15 et 10min successivement.

Enfin les extraits chloroformiques récupérés sont mélangés et concentrés par rota-vape jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 1ml. A fin pour être chromatographiés. Figure. 4.10,

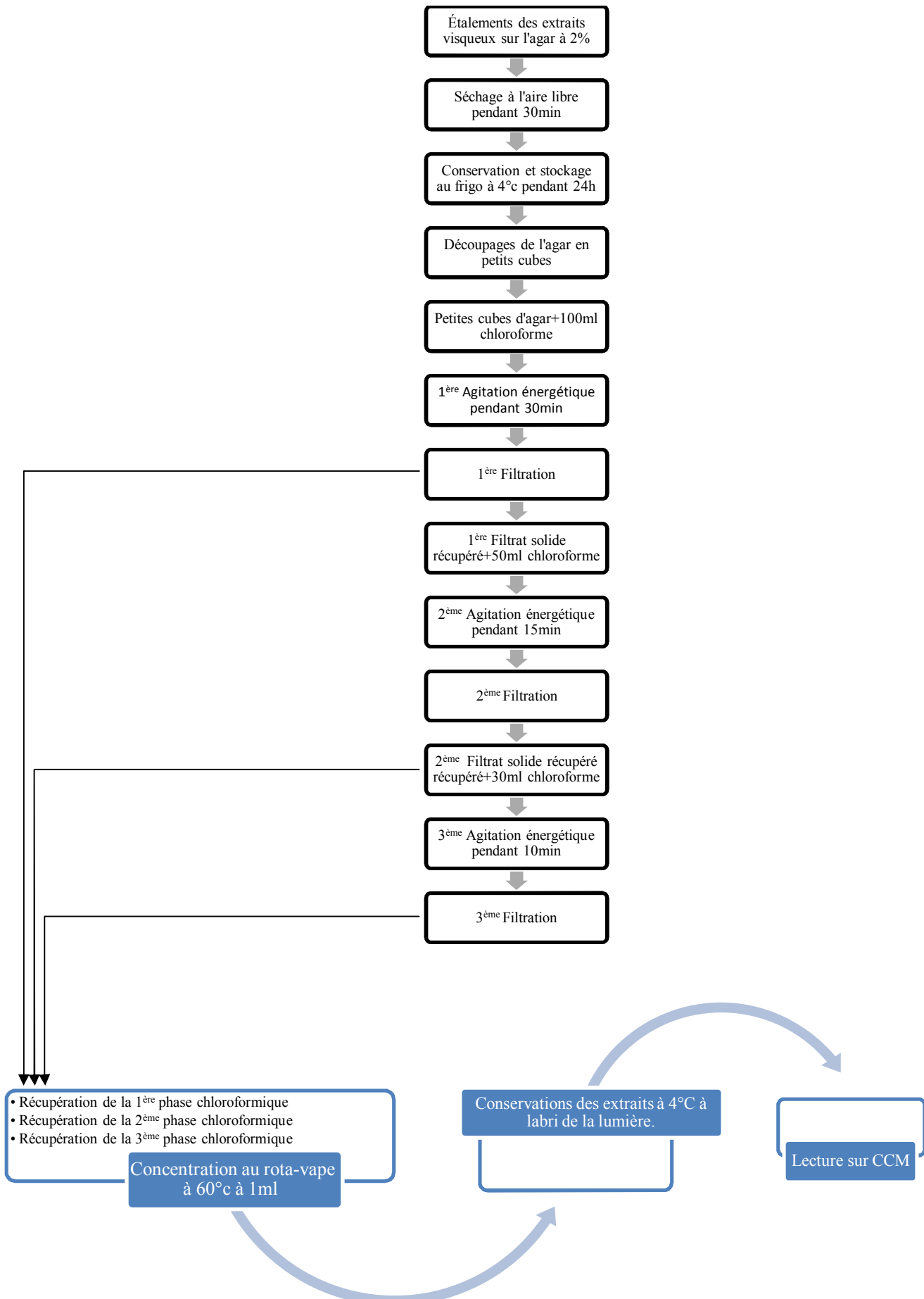


Fig.4.10: Diagramme de purification du mycotoxine à partir du substrat solide (2^{ème} étape) selon Betina,(1933) modifié.

VI. Méthodes de séparation et détections des mycotoxine:

VI.1 Chromatographie sur couches mince monodimensionnelle (CCM):

la CCM c'est une méthode physique classique, qui permet la séparation des composés constituant d'un échantillon entre deux phases solide et mobile, en fonction de leurs affinités pour l'un ou l'autre phase.

Technique: sur une chromatoplaque prête à l'emploi de gel de silice (20cm, 20cm), on trace deux lignes en parallèles de la départ et l'arrivé, de 1cm des deux bords supérieure et inférieur de la plaque. Dans la ligne de départe en dépose en première position 10µl de l'étalon standard d'ochratoxine A et en 2^{ème} position 10µl d'étalon standard aflatoxine B₁ suivie des extraits concentrés des 9 souches sélectionnés suspectés de synthèses des mycotoxines à l'ordre de 40µl par spot déposé à des intervalles de 1cm.

Et une deuxième chromatoplaque pour les extraits à partir des substrats de café aussi en dépose dans la ligne de départ en première position 10µl de l'étalon standard d'ochratoxine A et en 2^{ème} position 10µl d'étalon standard aflatoxine B₁ suivie des extraits concentré des 27 échantillons du café vert et café torréfié à l'ordre de deux spots pour chaque substrat, l'une de 20 µl et l'autre de 40 µl déposé à des intervalles de 1cm.

Développement des chromatogrammes:

Les chromatoplaques sont mis verticalement dans la cuve de migration remplie à une hauteur de 0,5 cm du solvant de migration composées de (toluène 5v/ acétate d'éthyle 4v/ acide formique 1v), les constituants de l'échantillon sont élués par la phase mobile qui migre par capillarité vers le haut de la plaque, ils peuvent alors être identifiés par comparaison à l'élution simultanée du témoin standard en comparant leurs rapports frontaux (Rf).

Les chromatoplaques sont développées jusqu'à ce que le solvant atteint la limite du bord supérieur, elles seront ensuite retirés rapidement est séchés dans une armoire de séchages.

Révélation des chromatogrammes:

La lecture des plaques de CCM dans une chambre noire sous lampe à UV à 366nm d'où la révélation de l'ochratoxine A ce traduit par une fluorescence bleu-vert (Galtier et al, 1974), et la présence de l'aflatoxine B₁ ce traduit par une fluorescence bleu.

VI.2 Technique d'ELISA:

L'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Dans notre cas de détection des mycotoxine en à procédé à l'ELISA par compétition de liaison. Elle permet le dosage d'un antigène :

VI.2.1 Principe du teste de l'OTA:

Le dosage est réalisé dans des micro-puits en polystyrène qui ont été revêtue d'Anticorps (IgG) anti-IgG de lapin, l'enzyme conjuguée de l'OTA-HRP et un anticorps spécifique d'anti-ochratoxine A et l'OTA des solutions d'étalon standards et l'OTA des échantillons sont ajoutés dans les puits au cours de l'incubation, les molécules de l'OTA libre et l'OTA-HRP entre en compétition aux sites de fixation aux anticorps anti-OTA fixés aux polystyrène ou bien (la phase solide), donc toute enzyme non lié à l'OTA-HRP est alors automatiquement débarrassé au cour de l'étape de lavage. La détermination de l'enzyme fixé à l'OTA-HRP

par l'addition d'un substrat chromogène, l'enzyme va convertir le substrat incolore en un produit bleu. L'addition de la solution stoppe va aboutir à un virage de couleur en jaune. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde 450nm. La couleur de développements est inversement proportionnelle à la concentration de l'OTA dans notre échantillon (Angelini E, et al 2008) Brera, C.,(Brera, C.,et al 2004)(Persic,L., et al 2003).

VI.2.1.1 Protocole du dosage de l'OTA par ELISA :

VI.2.1.1.1 Préparation des échantillons (1^{ère} étape) :

- Moudre les 12 échantillons du café vert finement
- Ajouter 10ml de 0,1M d'acide ortho-phosphorique à 5g de café broyés
- Ajouter 100ml de chloroforme et 2g de célite (SiO₂)
- Agiter à faible vitesse à 400rpm pendant 15 min
- Laisser reposer (décompter)
- Filtrer sur papier Whatman n°1
- Pour 50ml de filtrat, ajouter 10 ml de bicarbonate du sodium
- Agiter pendant 30 secondes, laissé reposer et l'apparition des deux phases. Prenez la phase supérieure aqueuse
- Centrifuger le surnageant pour éliminer les traces de solvant chloroformique
- Utiliser le surnageant pour le teste (Protocole de travaille fournie avec le Kit *l'screen*OCHRA code OR361).

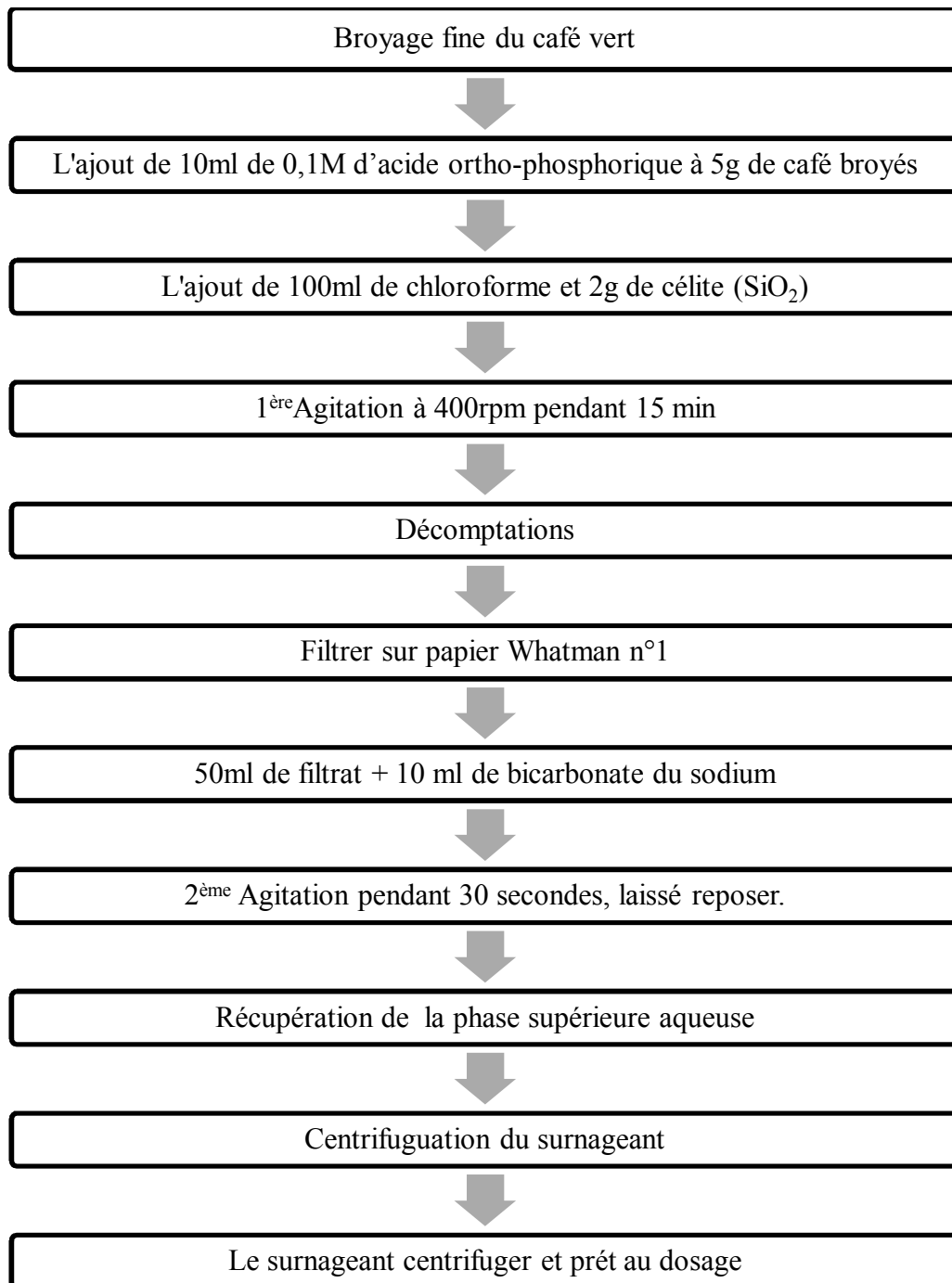


Fig.4.11: Protocole des étapes de préparation des échantillons de café vert pour le dosage de l'OTA par technique d'ELISA (1^{ère} étape).

VI.2.1.1.2 Procédure de test (2^{ème} étape) :

Pour exécutés ces testes selon les normes recommandées par le fabriquant du kit (Tecnalab), toutes les testes réaliser en double.

- Mets 50µl de chaque étalon standard et échantillon dans les puits de la plaque d'ELISA
- Ajouter de 100µl de l'enzyme conjuguée à l'aide d'une micropipette multicanaux
- Ajouter de 50µl de l'anticorps dans chaque puits à l'aide d'une micropipette multicanaux
- Agitation orbitale léger de la plaque pendant quelque secondes
- Incubation à 20°C pendant 20min

- Quatre cycles de lavage de la plaque
- Éliminer les gouttelettes restantes en tapissent la plaque contre un papier buvard sans faire déshydratées complètement nous puits
- L'ajout de 200µl de la solution de développement à l'aide d'une multicanaux
- Mélanger par mouvement orbitale votre plaque pendant quelque secondes
- Incubation à une température ambiante pendant 20min
- L'ajout de 50µl la solution stop aux puits à l'aide d'une multicanaux
- Mélanger soigneusement par mouvement orbitale pendant quelque secondes
- Fait la lecture à de l'absorbance à 450nm.

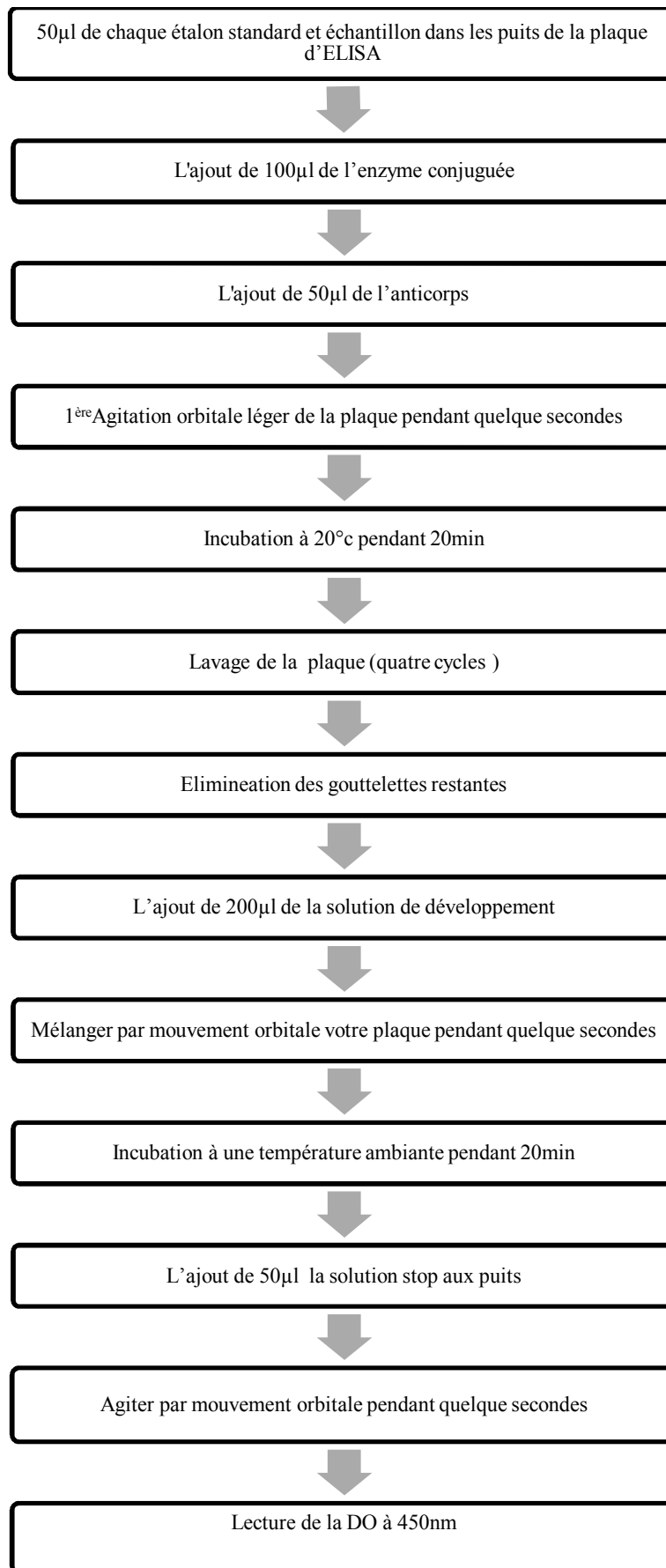


Fig.4.12: Protocole de procédure de dosage de l'OTA dans les échantillons de café vert par technique d'ELISA (2^{ème} étape).

VI.3.1 Principe du teste de l'AFLA B₁:

Le dosage est réalisé dans des micro-puits en plastique qui ont été revêtus d'anticorps anti-aflatoxine, les enzymes d'AFLA B₁ et les solutions standards étalons et les échantillons sont pré-mélangés et puis sont transférés dans la microplaque qui contient l'anti-aflatoxine B₁, au cours de l'incubation l'aflatoxine B₁, les AFLA B₁ libres dans les solutions d'étalons et dans les échantillons (substrats à dosés) les sites d'anticorps anti-aflatoxine B₁ fixés sur la phase solide et marqués par une enzyme de compétition, toute enzyme conjuguée non liée à l'AFLA B₁ est ensuite libérée au cours de la phase de lavage, la détermination de la limite de l'activité enzymatique par l'ajout du substrat chromogène incolore qui va aboutir à un produit bleu. L'ajout de la solution stoppe provoque un virage de couleur au jaune, l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 450nm (Diana, F. et al 2009) (Rapporti ISTISAN 10/32, Rome, Mycotoxins in agri-foodchain, 2009).

1. Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps (en défaut).
2. Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
3. La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés sont éliminés.

La compétition joue donc entre les antigènes marqués et non marqués pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut. Ainsi plus les antigènes à doser (non marqués) sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

VI.3.1.1 Protocole du dosage de l'AFLA B₁ par ELISA :

VI.3.1.1.1 Préparation des échantillons (1^{ère} étape) :

- Mélangés et homogénéisés les échantillons à analyser
- Moudre 50g des échantillons
- Ajouter 10g de NaCl à 50g de café broyé
- Ajouter 250ml de méthanol 70%
- Agiter pendant 3 min
- Filtrer sur papier Whatman n°1
- Utiliser le filtrat pour le dosage (Protocole de travail fourni avec le Kit *Celer* AFLA B₁ code MA221).

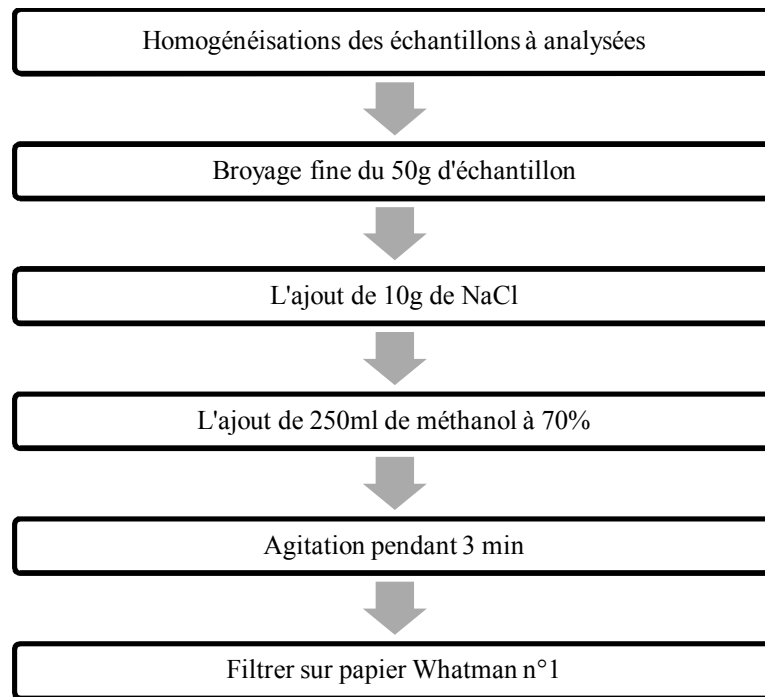


Fig.4.13: Protocole des étapes de préparation des échantillons de café vert pour le dosage de l'AFLA B₁ par technique d'ELISA (1^{ère} étape).

VI.3.1.1.2 Procédure de test (2^{ème} étape) :

Avant de procéder aux tests est l'utilisation du kit d'ELISA il faut d'abord amener tous les réactifs à température ambiante pendant au moins une heure, pour le dosage de l'AFLA B₁ les tests sont réalisés une seule fois selon les recommandations du fabricant du kit (Tecnalab).

- Mets 100µl de l'enzyme conjugué dans les puits de la plaque de pré-mélange
- Ajoutés 50µl de chaque standards et échantillons dans les puits de la plaque de pré-mélange correspondants
- Mélanger à l'aide de la micropipette multicanaux en pipetant trois fois en haut et en bas le contenu de chaque micropuits de pré-mélange
- Transférer immédiatement 100µl dans les micropuits correspondant de la microplaque revêtus d'anticorps anti-aflatoxine B₁
- Incuber pendant 10min à température ambiante
- Verser le liquide des micropuits
- Trois cycles de lavage de la microplaque
- Éliminer les gouttelettes restantes en tapissant la plaque contre un papier buvard sans faire déshydratées complètement nos puits
- L'ajout de 100µl de la solution de développement à l'aide d'une multicanaux
- Mélanger par mouvement orbitale votre microplaque pendant quelques secondes
- Incubation à une température ambiante pendant 5min

- L'ajout de 50 μ l la solution stop aux puits à l'aide d'une multicanaux
- Mélanger soigneusement par mouvement orbitale pendant quelque secondes
- Lire l'absorbance à 450nm.

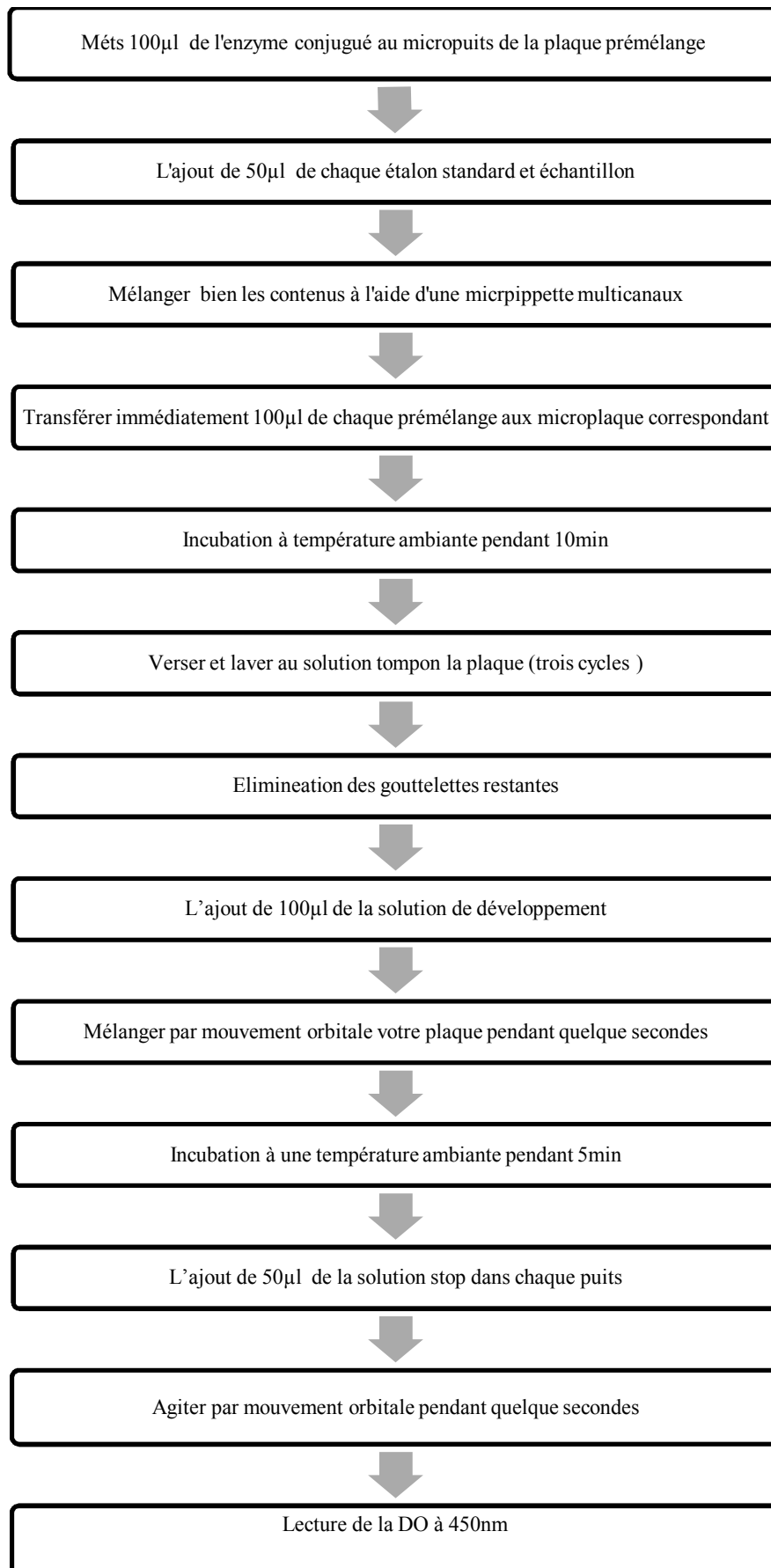


Fig.4.14: Protocole de procédure de dosage de l'AFLA B₁ dans les échantillons de café vert par technique d'ELISA (2^{ème} étape).

I. Résultats et interprétation:

Le contrôle du pH, et la teneur en eau (humidité relatives HR%) des sous échantillons sont déterminés dès leur arrivée au laboratoire, les sous échantillons destinés au test de la mycoflore et au analyses des mycotoxines sont mis dans des sacs stériles type (*Naso WHIRL-PAK®*) bien fermés, pour garder la mycoflore original et apprécier leur degré de contamination.

I.1 Résultats physico-chimique:

I.1.1 Mesure du pH:

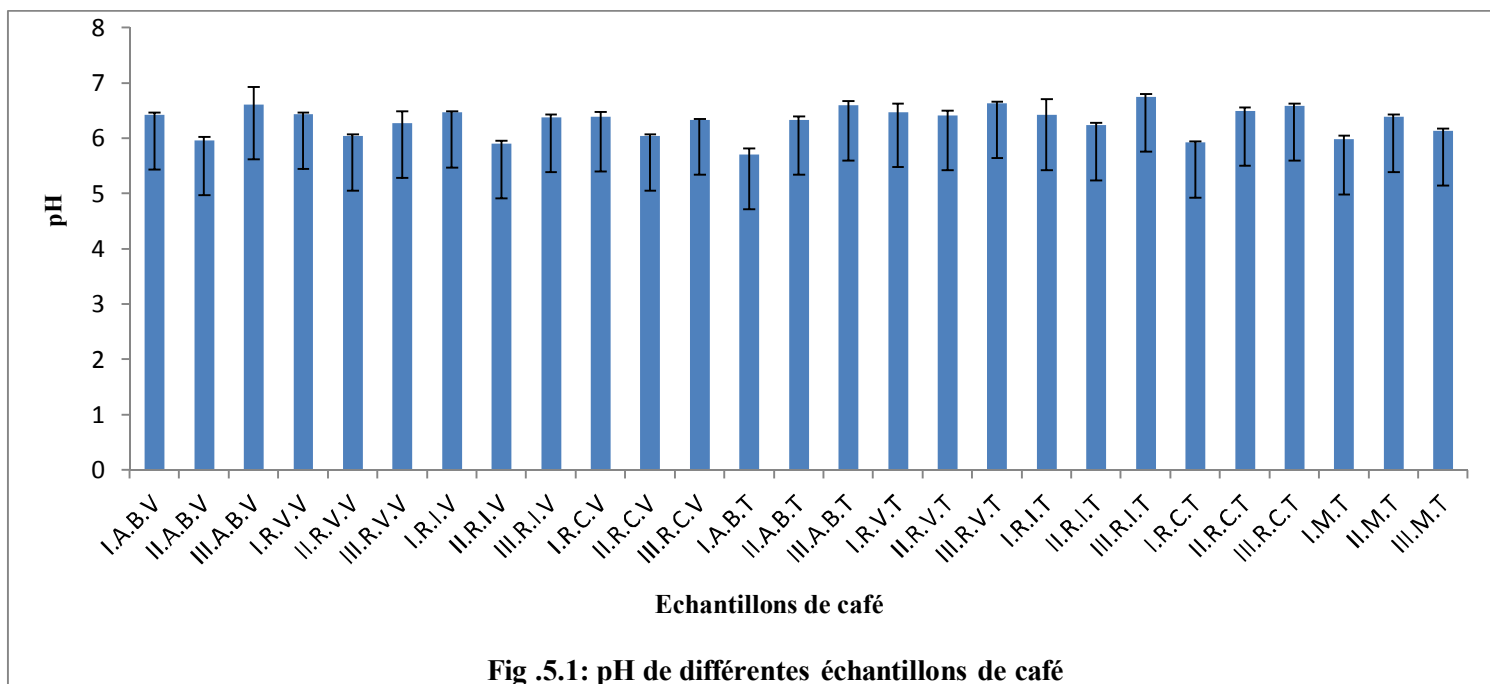


Fig .5.1: pH de différents échantillons de café

Le dosage du pH des différents échantillons de café montrent une légère acidité (Fig.5.1).

I.1.2L'humidité relative (HR%):

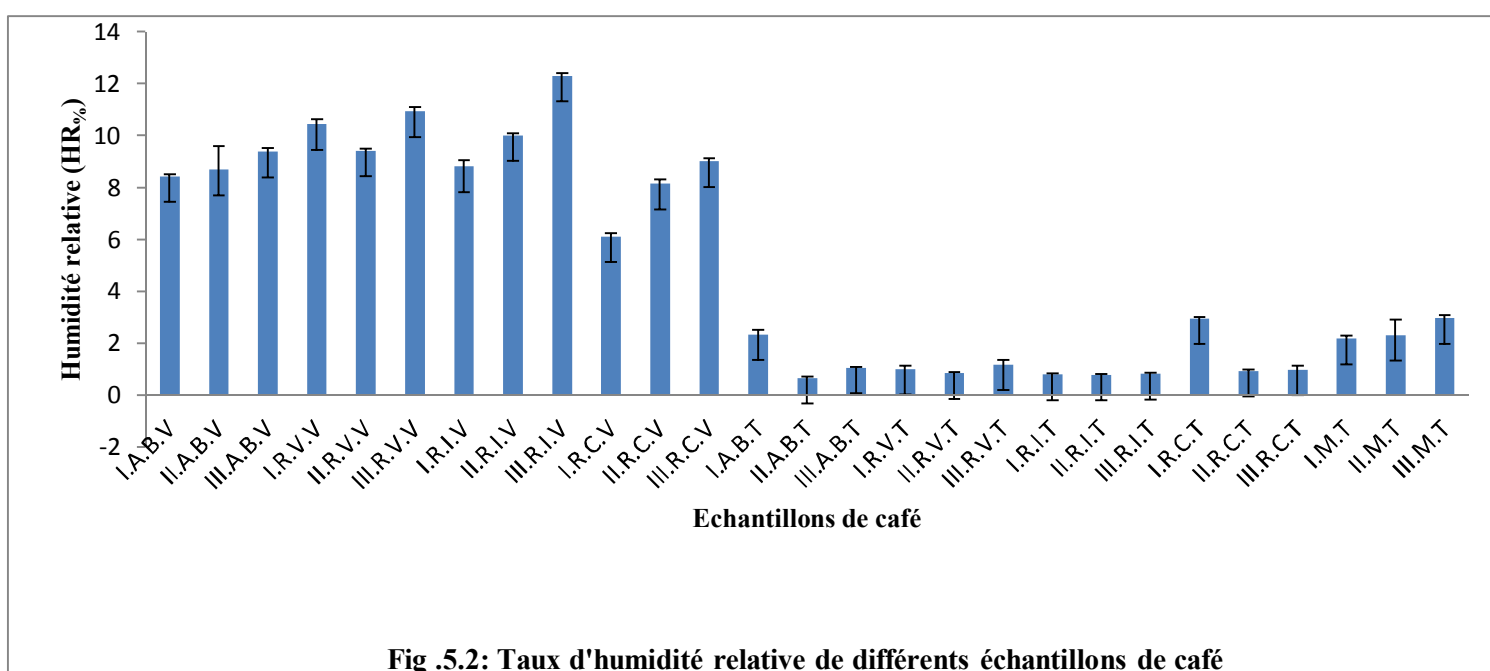


Fig .5.2: Taux d'humidité relative de différents échantillons de café

Les teneurs en eau (humidité relative) pour les tous échantillons de café vert ne dépassent pas 12% ce qui est conforme soit à l’égislation Algérienne et aussi aux recommandations de l’office international du café (OIC) qui fixe les teneurs tolérables en humidité relative maximum 12,5%. Les taux d’humidité relative pour les échantillons de café torréfié compris dans un intervalle entre [1% jusqu’à 4%] cette différence est due aux différents qualités du café (Arabica, Canéphore) et aussi aux conditions de torréfaction comme les facteurs du temps et de la température employés pendant la préparation du café torréfié (Fig.5.2).

I.2 Evaluation de la mycoflore:

Les analyses mycologiques réalisées sur les différents échantillons du café, ont révélé la présence des levures et des moisissures avec une dominance de cette dernière.

La recherche de la mycoflore totale concerne l’ensemble de moisissures présentes au niveau des grains de cafés. A cet effet les isollements sont effectués sur des grains entières désinfectés et non désinfectés méthode directe (méthode buvard et buvard modifié), et sur la méthode classique de dénombrements sur différents milieux (méthodes de dilution sur milieux PDAac et CDA), différentes techniques standardisées à l’échelle internationale pour le contrôle ont été utilisées.

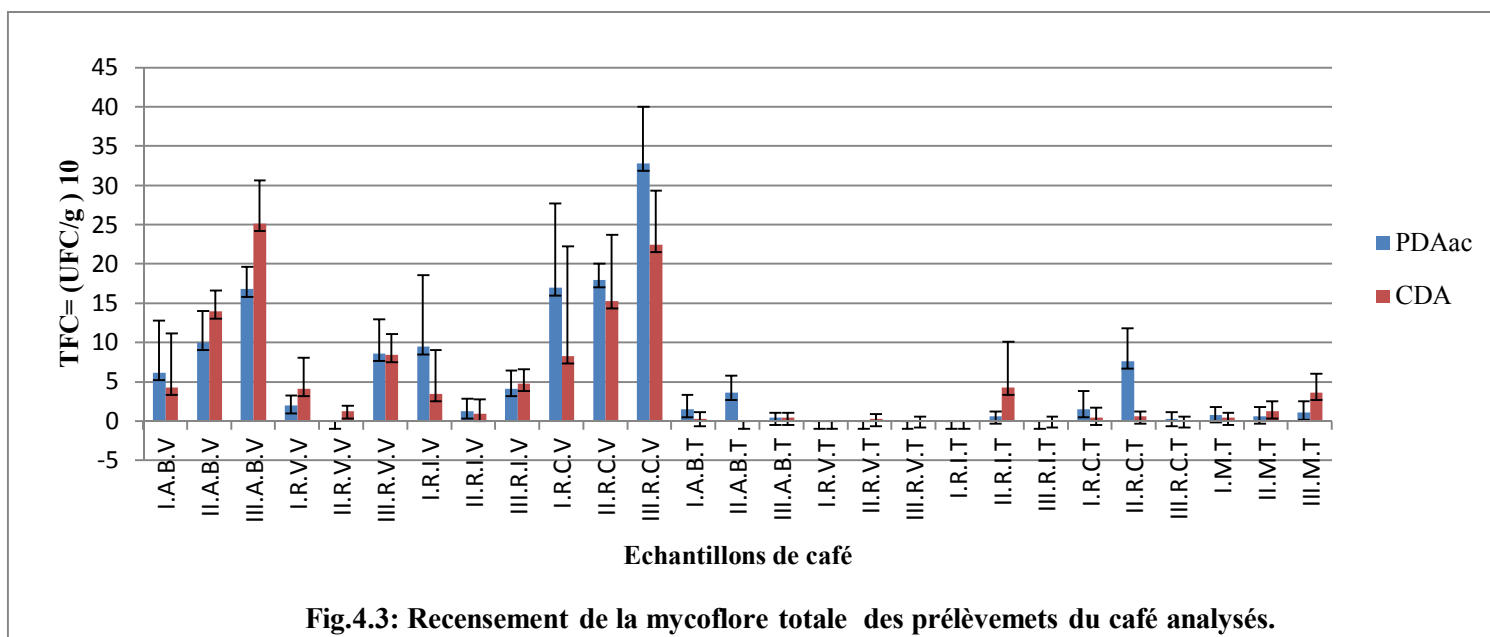


Fig.4.3: Recensement de la mycoflore totale des prélèvements du café analysés.

Sur l’ensemble des résultats de la méthode de dilution sur les deux milieux (PDAac et CDA), le café vert d’origine Côte d’Ivoire s’avère la plus contaminée par rapport aux autres cafés, suivie par l’Arabica Brésilienne avec des taux assez élevés et pour les deux cafés d’origine Vietnamiennne et Indienne ce classent en troisième rang d’une contamination un peu légère. Pour les différents échantillons du café torréfié les taux de contaminations ne dépassent pas les 100UFC/g dans les deux milieux de dilution (Fig.5.3).

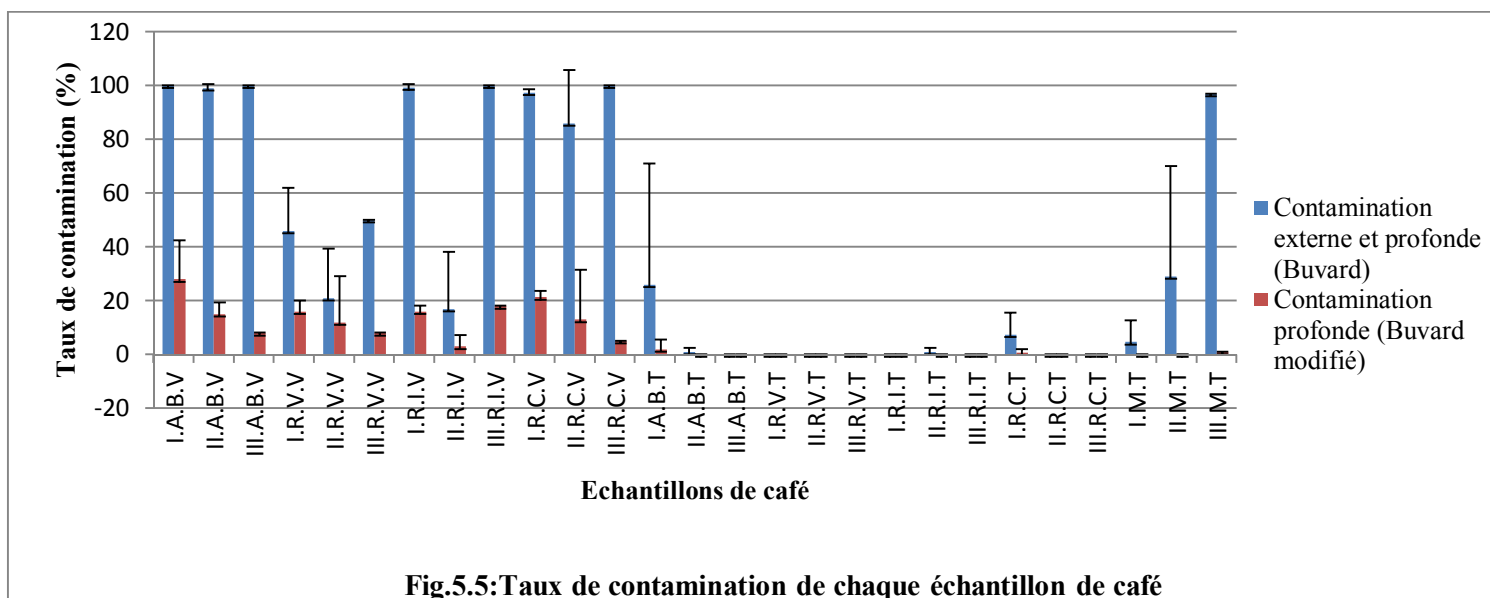


Fig.5.5: Taux de contamination de chaque échantillon de café

L'effet de la torréfaction fait réduire la totalité de la mycoflore interne ou bien la contamination profonde, généralement les taux de contamination interne ne dépassent pas les 30% pour les échantillons du café vert. Les taux de contamination un peu élevé enregistré pour le type de café mélange torréfié (25% Arabica et 75% Robusta) et justifier que ces mélanges sont préparé par des qualités de café inférieur et peu due aussi aux quantité d'humidité relative qui influence sur la prolifération des moisissures (Fig.5.5).

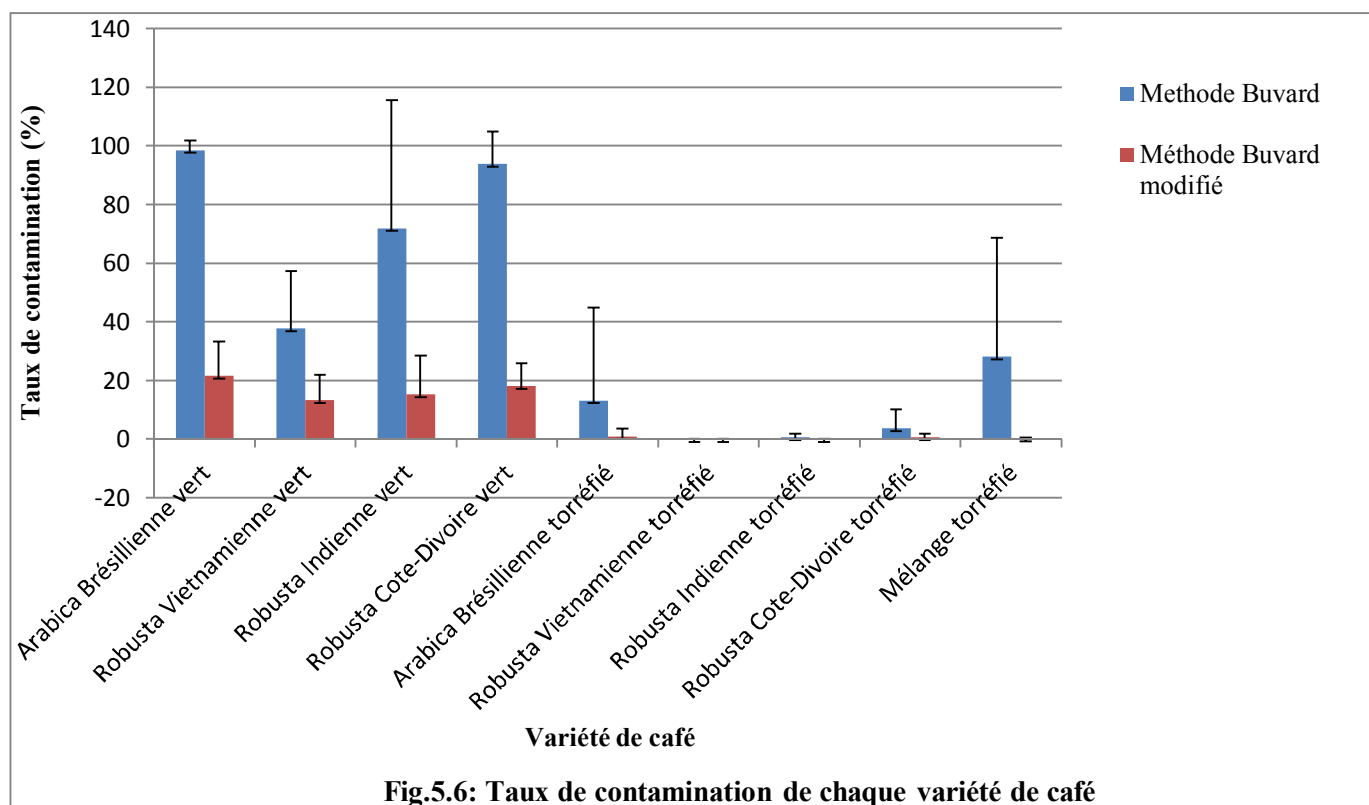
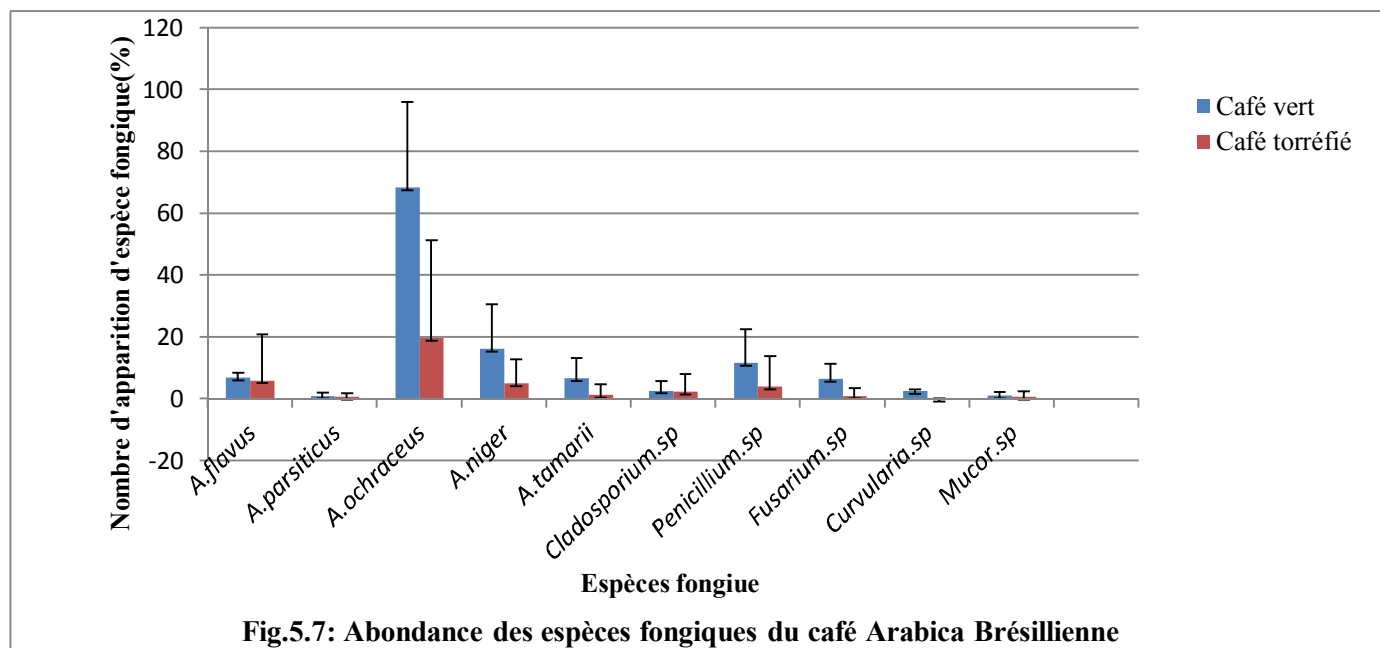


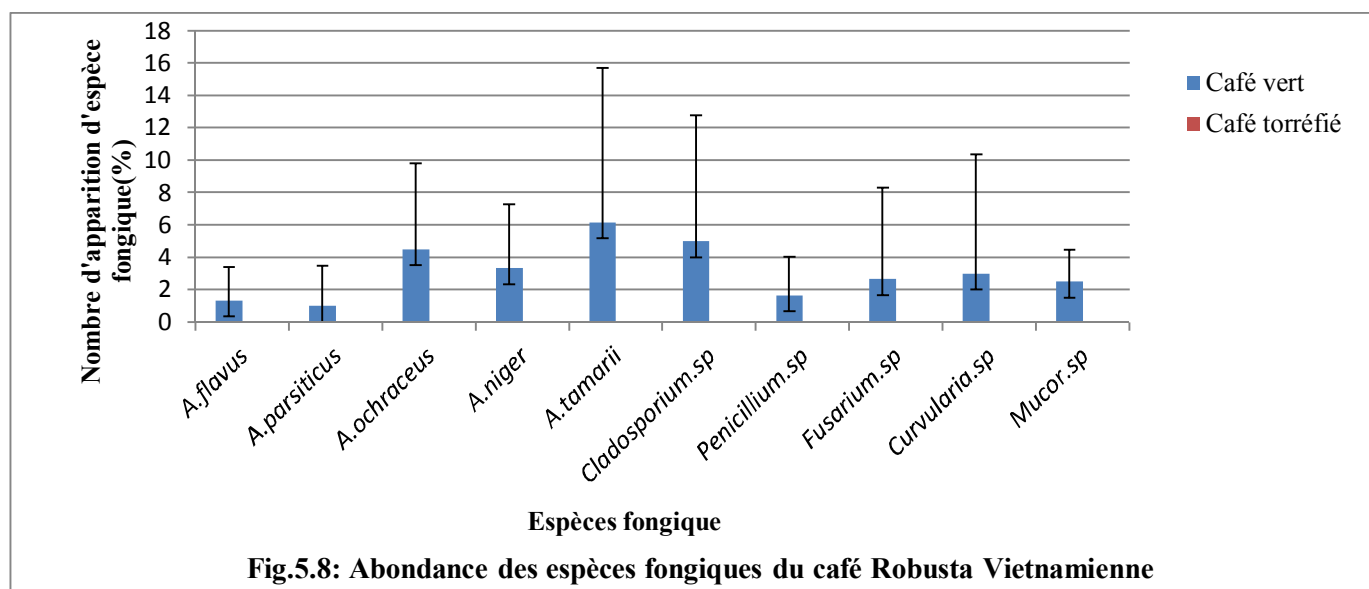
Fig.5.6: Taux de contamination de chaque variété de café

Ces résultats montrent que la variété du café Arabica Brésilienne vert elle à les taux de contamination les plus élevées par rapport aux autres variétés du café vert, suivi par Robusta Cote d'Ivoire, Robusta Indienne, Robusta Vietnamienne. En remarque aussi que le mélange torréfié (25% arabica, 75% Robusta) est le plus

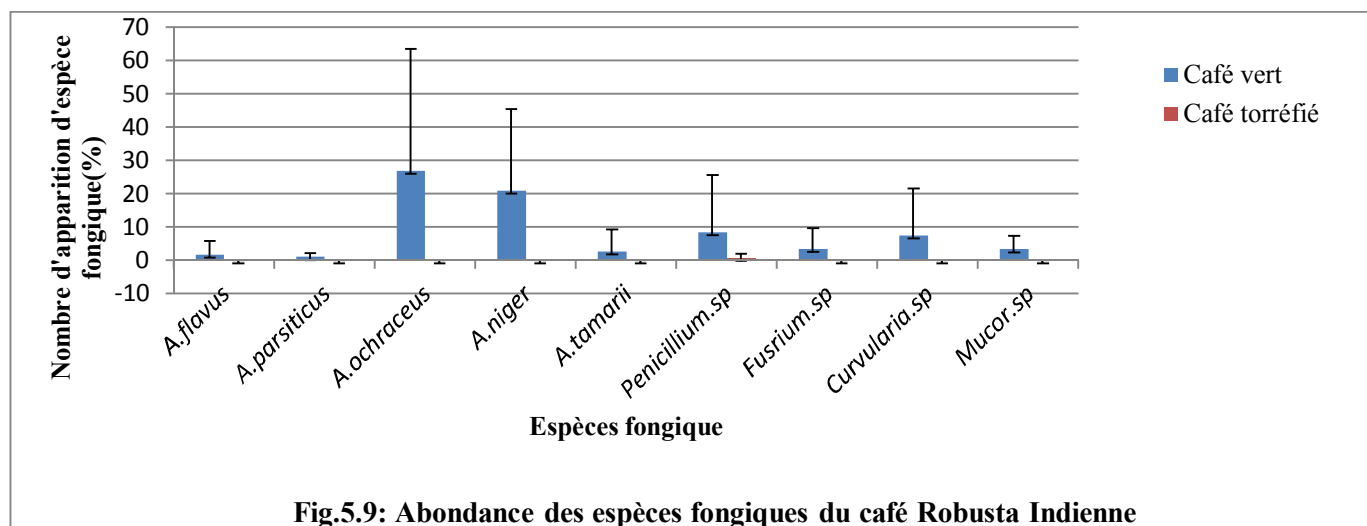
contaminé par rapport aux autres variétés du café torréfié suivie par l'Arabica Brésilienne, Robusta Cote d'Ivoire, Robusta Indienne (Fig.5.6).



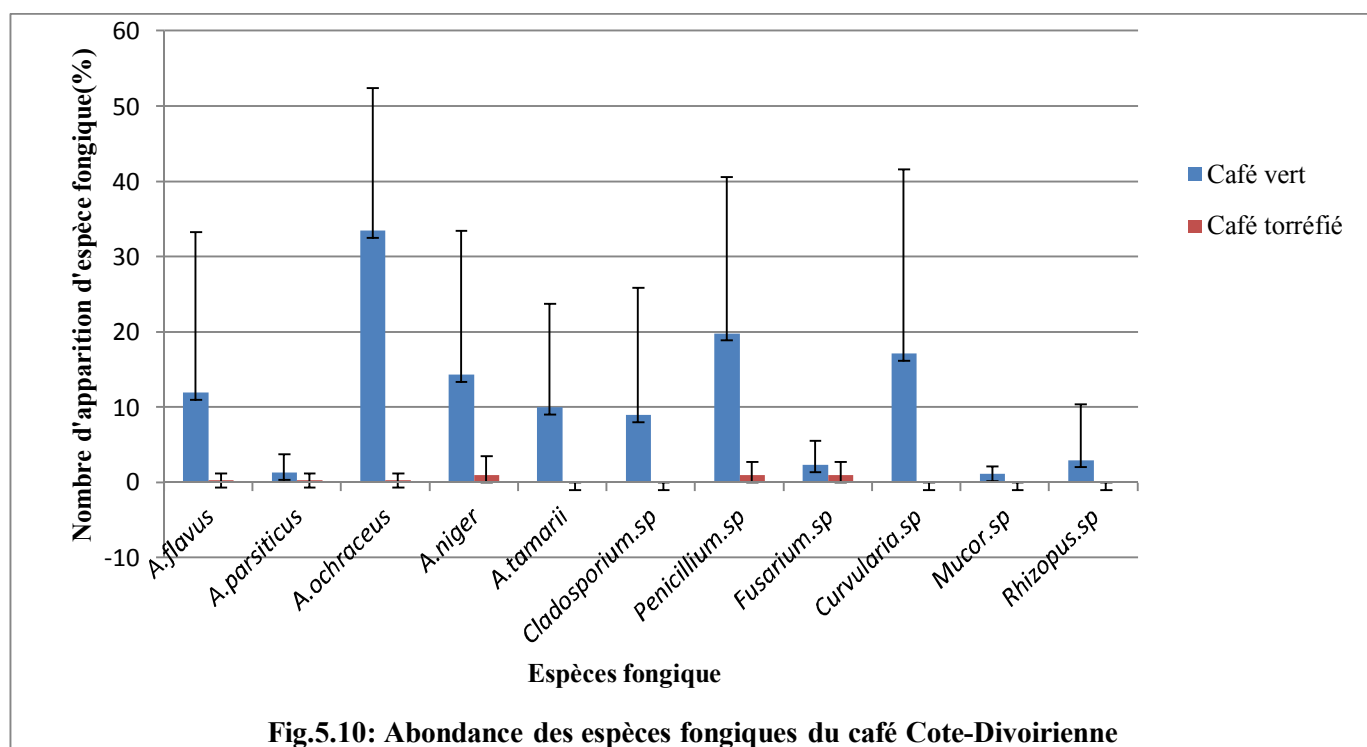
La figure 5.7 montre que les espèces *Aspergillus* et *Penicillium* est les plus fréquents avec une grande abondance de l'*Aspergillus ochraceus*, ce qui fait que la mycoflore de stockage est la plus abondante par rapport la mycoflore intermédiaire et la mycoflore pathogène dans le café Arabica Brésilienne.



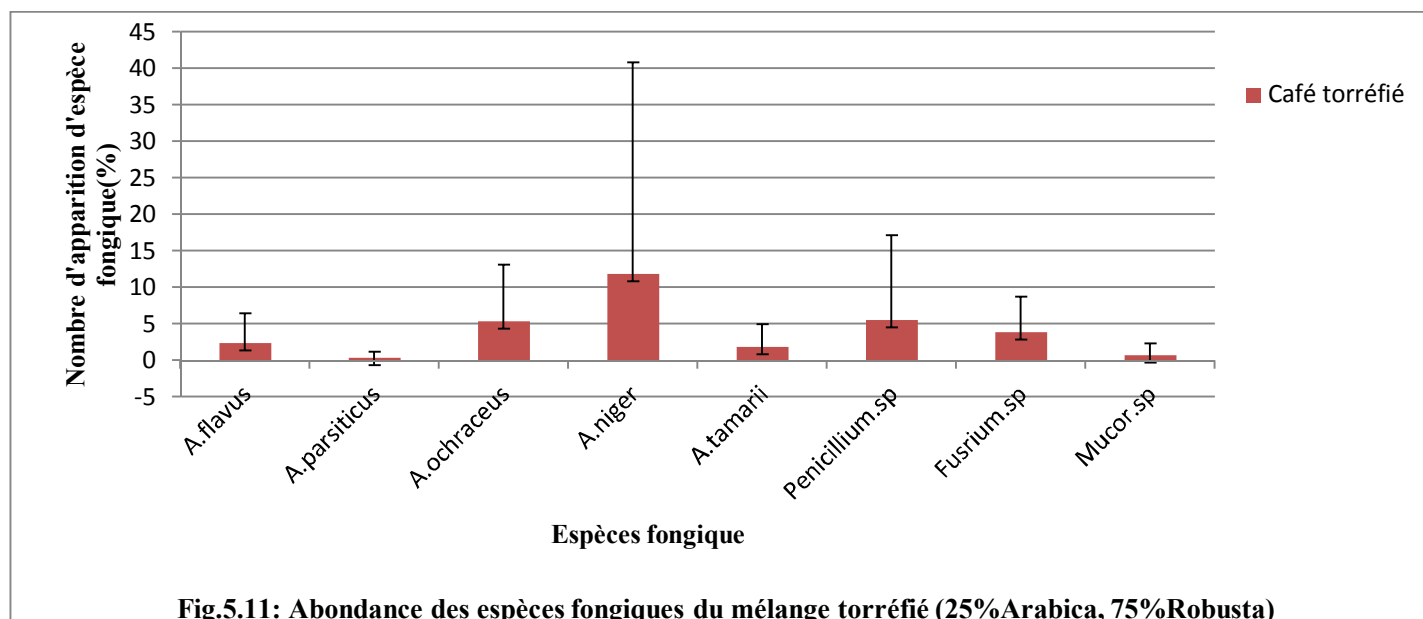
Et pour la figure 5.8 les *Aspergillus* sont les espèces les plus fréquents dans les échantillons du café Robusta Vietnamienne avec la dominance de l'espèce *Aspergillus tamaritii*, ce qui fait que la mycoflore de stockage est la plus abondante par rapport aux autres mycoflore. La torréfaction a fait éliminé totalement la contamination profonde, et ce qui est confirmé par les résultats précédentes dans la figure 4.6 que la variété Robusta Vietnamienne vert est le moins contaminé des autres variétés du café vert analysés.



En n'enregistre que les deux espèces *Aspergillus ochraceus* et l'*Aspergillus niger* sont les plus abondant dans les échantillons de café Robusta Indienne (Fig.5.9).



Pour le cas du café Cote d'Ivoire, les espèces le la mycoflore de stockage est la plus abondante avec une dominance de l'espèce *Aspergillus ochraceus*, suivie par la mycoflore intermédiaire (*Cladosporium sp* et *Curvularia sp*) dans la figure 5.10.



L'effet de la torréfaction sur les échantillons de café mélange et très réduit car en à enregistrés la présence des différents mycoflore de stockage, intermédiaire et aussi une mycoflore pathogène dans la figure 5.11 montre que l'*Aspergillus niger* et l'espèce le plus dominant isolé au mélange café torréfié.

Les résultats ont permis de mettre en évidence 13 espèces appartenant à différents champignons. Les espèces fongiques les plus fréquentes sont *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Penicillium sp*, *Cladosporium sp*, *Rhizopus sp*, suivies par *Curvularia sp* et *Fusarium sp*, *Mucor sp*. Nous avons identifié les différentes moisissures isolées en se basant sur la description précise des caractères cultureux et microscopiques, avec l'utilisation des différentes clés de détermination. Les moisissures isolés et identifiés englobent une mycoflore pathogène (*Fusarium.sp*), une mycoflore du stockage (deux principaux genres *Aspergillus* et *Penicillium* et *Mucor*, *Rhizopus*) et ces la plus abondantes des mycoflores, et des champignons intermédiaires (*Cladosporium*, *Curvularia*), pour chacune de ces catégories nous avons calculé la fréquence et l'abondance de chaque espèce isolée.

II. Description des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* :

Les tableaux 5.1 et 5.2 présentent les résultats décrivant les diamètres des colonies et les caractères cultureux rencontrés dans les quatre milieux de culture (MEA, G25N, CDA et CYA) à différentes température d'incubation (5°C, 25°C et 37°C).

II.1 Identification des espèces d'*Aspergillus* selon la méthode de Pitt et Hocking (2009):

Les figures 5.12 et 5.13 au dessous montrent des photos des souches d'*Aspergillus* isolées à partir du café.

Tab 5.1: Identification des *Aspergillus* isolées selon la méthode de Pitt et Hocking (2009).

Espèce	Milieu	T°	Lecture			
			Surface	Reverse	□ (mm)	Exsudat
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CYA	37°C	Crème, chamois rosé ou près olive foncé	Jaune terne brun	31	Incolore
	CYA	5°C	/	/	Pas de croissance	/
	G25N	25°C	Jaune claire		60	Absence
	MEA	25°C	Jaune crème	Jaune terne brun pâle Auburn	54	Absence
<i>Aspergillus flavus</i>	CYA	37°C	Jaune à vert olive	Crème chamois	55	Incolore
	CYA	5°C	/	/	Pas de croissance	/
	G25N	25°C	Jaune	Pale à orange	52	Absence
	MEA	25°C	Citrine jaune aux vert serpentine raisins verts	Incolore	67	Absence
	AFPA	25°C	Blanc	Orange	45	Absence
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CYA	37°C	Jaune à jaune citrine	Pale	66	Absence
	CYA	5°C	/	/	Pas de croissance	/
	G25N	25°C	Jaune	Pale	60	Absence
	MEA	25°C	Jaunâtre huile verte	Incolore	65	Sclérotés bruns
	AFPA	25°C	Blanc	Orange	46	Absence
<i>Aspergillus niger</i>	CYA	37°C	Sombres momies brun à brunâtres proximité	Jaune	48	Claire
	CYA	5°C	/	/	Pas de croissance	/
	G25N	25°C	Noir, jaune claire	Pale	55	Absence
	MEA	25°C	Brunâtre olive à brun de girofle	Crème	60	Absence
<i>Aspergillus tamarii</i>	CYA	37°C	Citrine orange à la médaille de bronze	Chamois clair à pâle	64	Absence
	CYA	5°C	/	/	Pas de croissance	/
	G25N	25°C	Marron	Chamois clair	63	Absence
	MEA	25°C	Un peu zonâtes, près de vieil or pour polir la citrine	Chamois clair	65	Absence

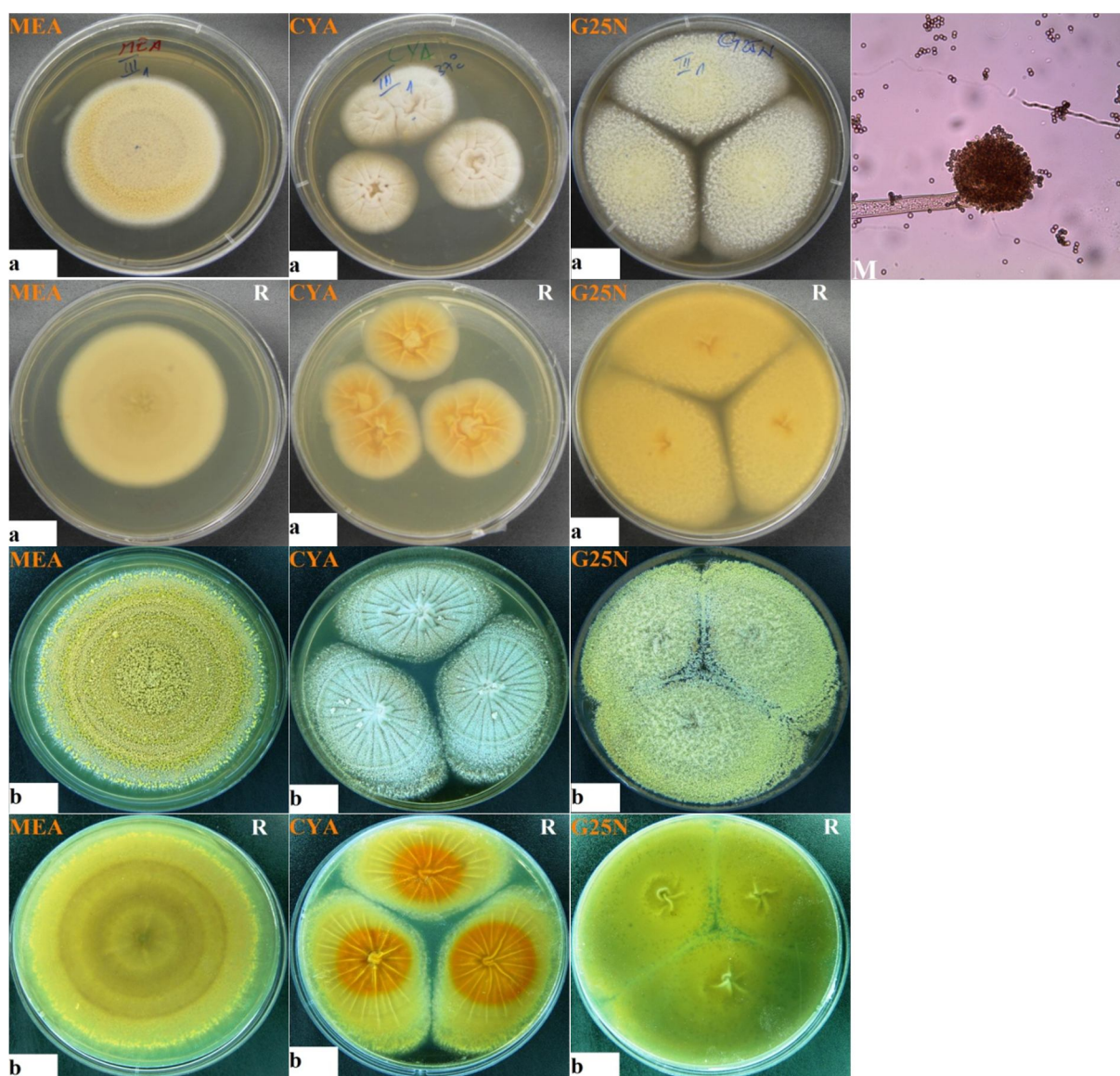


Fig.5.12 Photo de l'espèce du genre *Aspergillus ochraceus* isolées à partir du café, sur milieux standards d'identification (a au 7^{ème} jour, b au 14^{ème} jour) ; (R) reverse de la boîte ; (M) aspect microscopique (Gr.x40) ; AFPA : *Aspergillus flavus* and *parsiticus* agar, 25°C ; CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; MEA : Malt extract agar, 25°C.

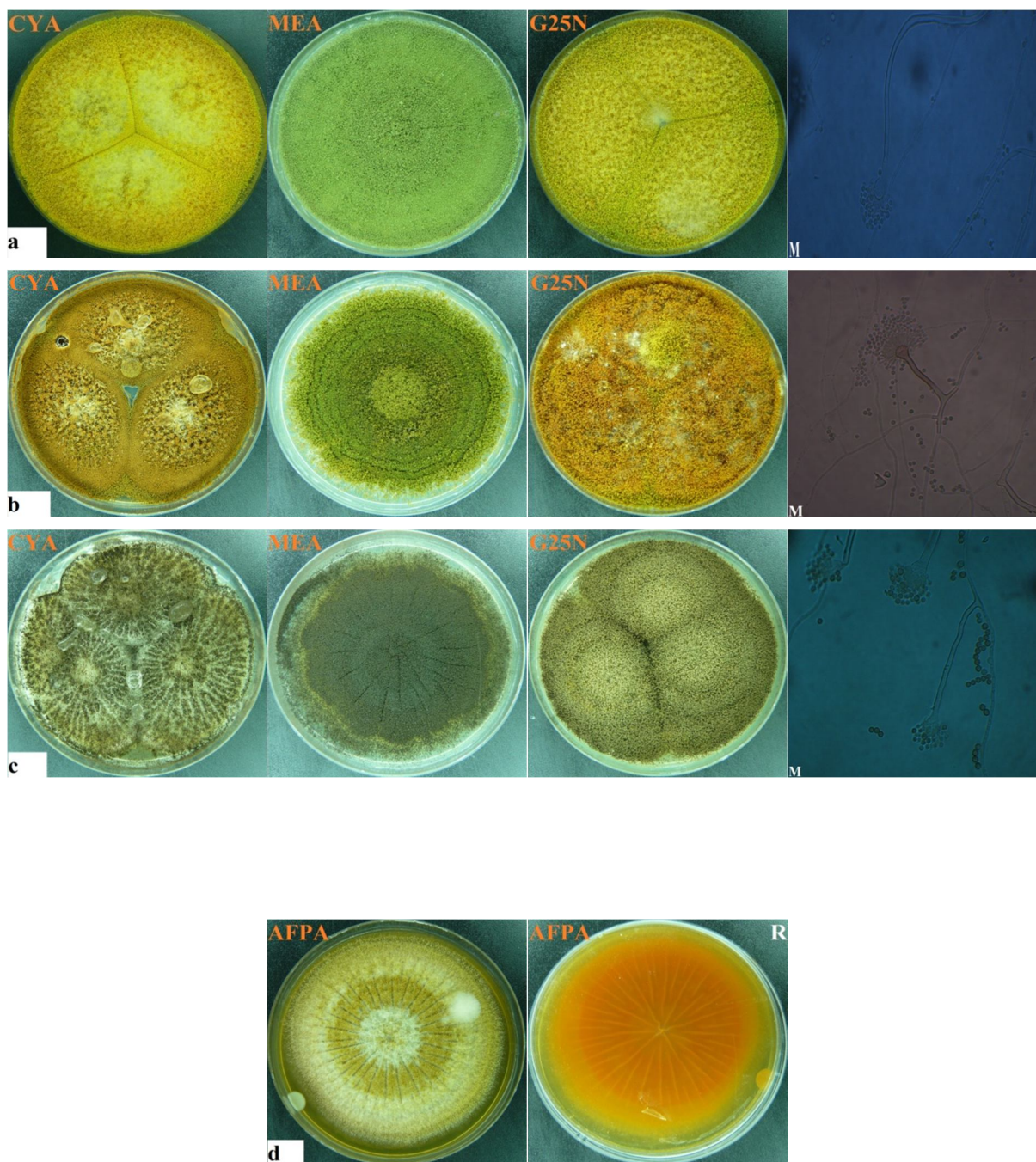


Fig.5.13 Photo des espèces du genre *Aspergillus* isolées à partir du café, sur milieux standards d'identification (a,b,c au 7^{ème} jour, d au 14^{ème} jour) ; (a) : *Aspergillus parasiticus*; (b,d) *Aspergillus flavus* ; (c) : *Aspergillus niger* ; (R) reverse de la boîte ; (M) aspect microscopique (Gr.x40) . AFPA : *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar, 25°C ; CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; MEA : Malt extract agar, 25°C.

II.2 Identification des espèces de *Penicillium* selon la méthode de Ramirez (1982), Pitt et Hocking (2009):

Les résultats de l'inoculation du *Penicillium* sur différents milieux (CDA, CYA, G25N, MEA) pour identifier les espèces isolées sont dans la figure 4.14 ci-dessous.

Tab 5.2: Identification des *Penicillium* isolées selon la méthode de Ramirez (1982), Pitt et Hocking (2009).

Espèce	Milieu	T°	Lecture			
			Surface	Reverse	□ (mm)	Exsudat
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CDA	25°C	Vert à bleuâtre	Jaune	40	Absence
	CYA	37°C	Vert foncé	Jaune pale	39	Absence
	G25N	25°C	Jaune claire	Jaune orange	34	Jaune
	MEA	25°C	Bleu à vert	Jaune	36	Absence
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	CDA	25°C	Gris bleu	Jaune	32	Absence
	CYA	37°C	Vert à gris bleu	Jaune	38	Absence
	G25N	25°C	Bleu vert à gris bleu	Orange	35	Absence
	MEA	25°C	Bleu à verdâtre	Jaune	25	Absence
<i>Penicillium thomii</i>	CDA	25°C	Vert	Jaune	44	Absence
	CYA	37°C	Blanc	Blanc	22	Absence
	G25N	25°C	Vert	Jaune claire	28	Absence
	MEA	25°C	Vert pale	Jaune maron	35	Sclérotés roses

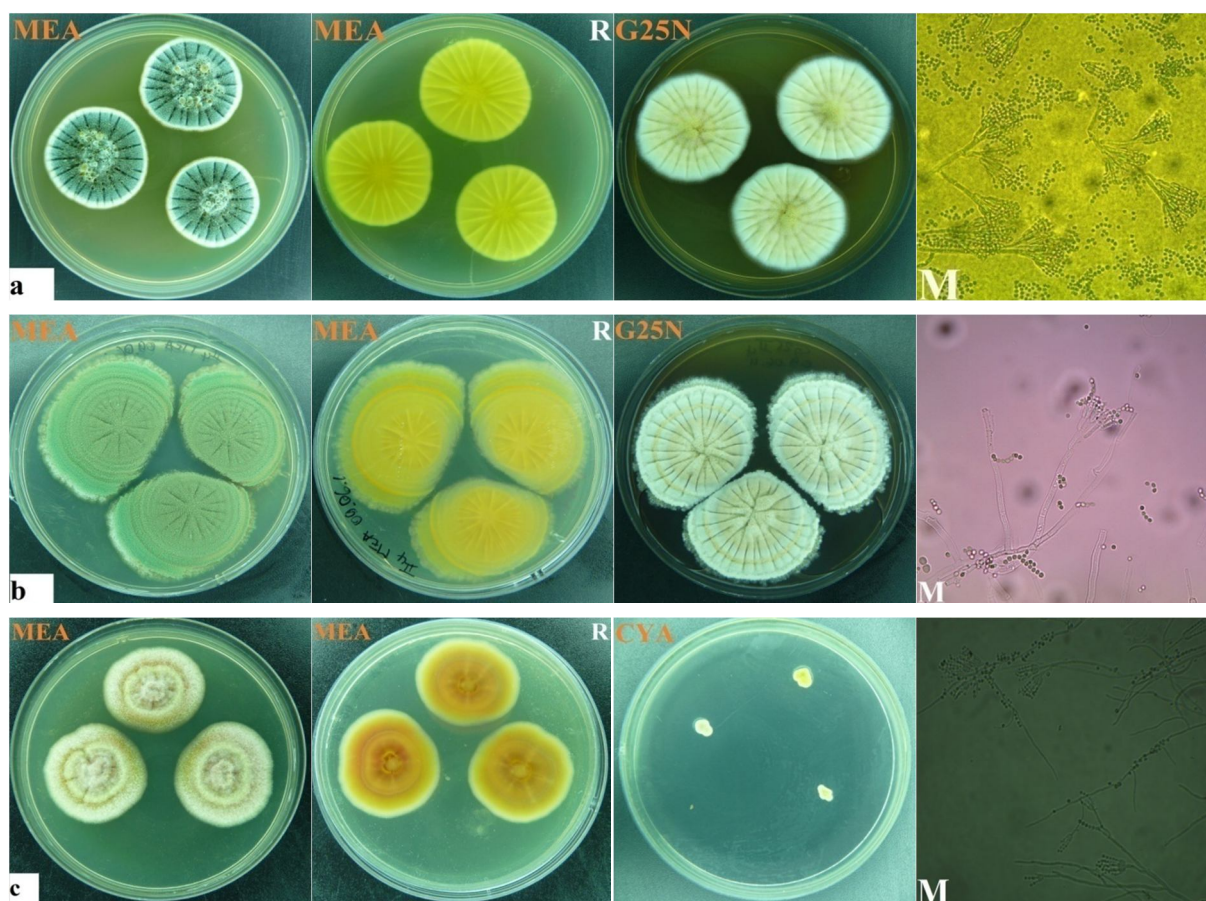


Fig.5.14 Photo des espèces du genre *Penicillium* isolées à partir du café sur les milieux standards d'identification au 14^{ème} jour ; (a) : *Penicillium chrysogenum*; (b) : *Penicillium aurantiigriseum*, (c) : *Penicillium thomii*; (R): reverse de la boîte ; (M) : aspect microscopique (Gr.x40). CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; MEA : Malt extract agar, 25°C.

III Résultats d'analyses mycotoxicologiques (révélation des chromatogrammes) :

III.1 Souches productrices des mycotoxines :

La figure 5.15 présente la chromatoplaque du test du pouvoir mycotoxinogénèse (ochratoxinogénèse et l'aflatoxinogénèse) des isolats souches d'*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus Flavus* et *Aspergillus parasiticus* dans le substrat de café testés.

Les rapports frontaux (Rf) calculées des étalons standards OTA et de l'AFB₁ :

-Rapport frontal de l'ochratoxine A : (Rf_{OTA}= 0,77 avec une distance de migration de d=14cm)

-Rapport frontal de l'aflatoxine B₁:(Rf_{AFB1}= 0,405 avec une distance de migration de d=7,3cm)

Il est enregistré qu'il y'à 33% d'isolats des souches d'*Aspergillus ochraceus* sont dotés du pouvoir ochratoxinogène et aussi le 1/3 des isolats d'*Aspergillus flavus* et 2/3 d'*Aspergillus parasiticus* ont fortement productrices d'aflatoxine B₁ et d'autres métabolites secondaires sur milieux YES.

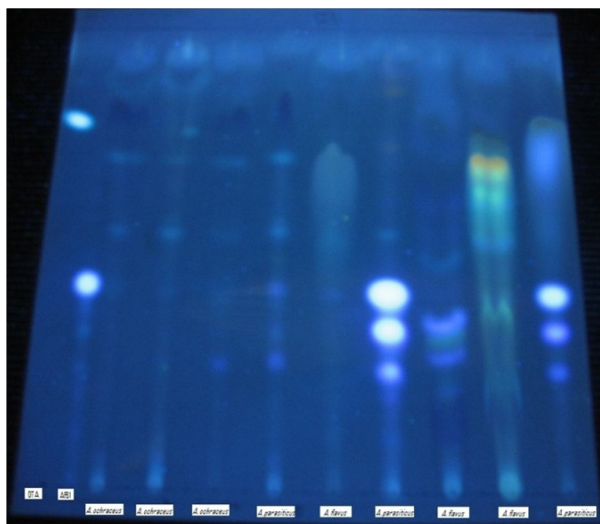


Fig.5.15 Révélation des isolats souches mycotoxinogènes sous lampe UV 366nm (Lampe UV type SPECTROLINE®).

III.2 Détection des mycotoxines l'OTA et l'AFB₁ au niveau des substrats :

Les figures ci dessous (5.16 et 5.17) présentent les chromatoplaques des mycotoxines et les métabolites secondaires révélés dans les échantillons du café vert et café torréfié.

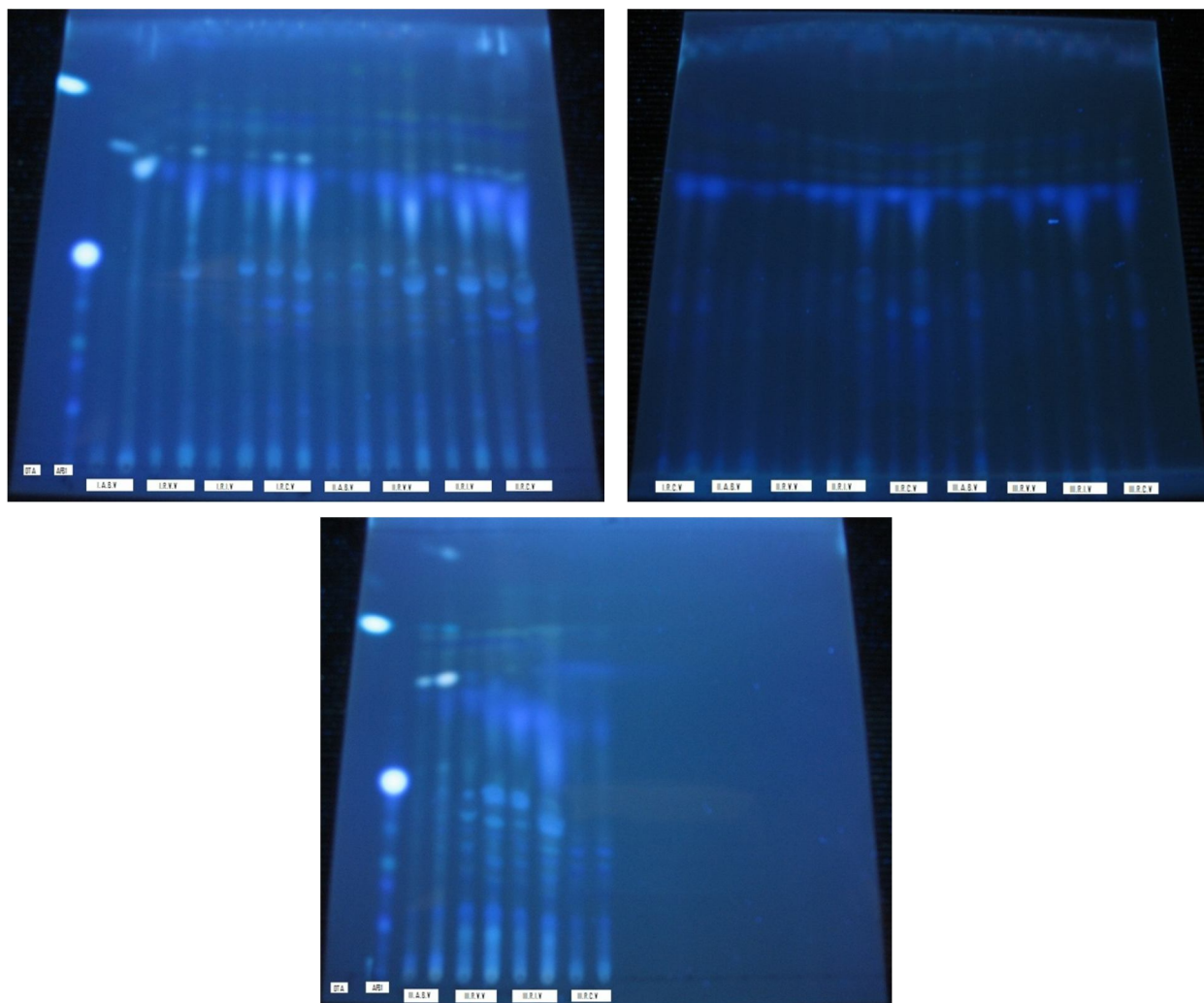


Fig.5.16 Détection des mycotoxines l'OTA et l'AFB₁ au niveau du café vert sous lampe UV 366nm (Chambre UV fort puissance type CAMMAG).

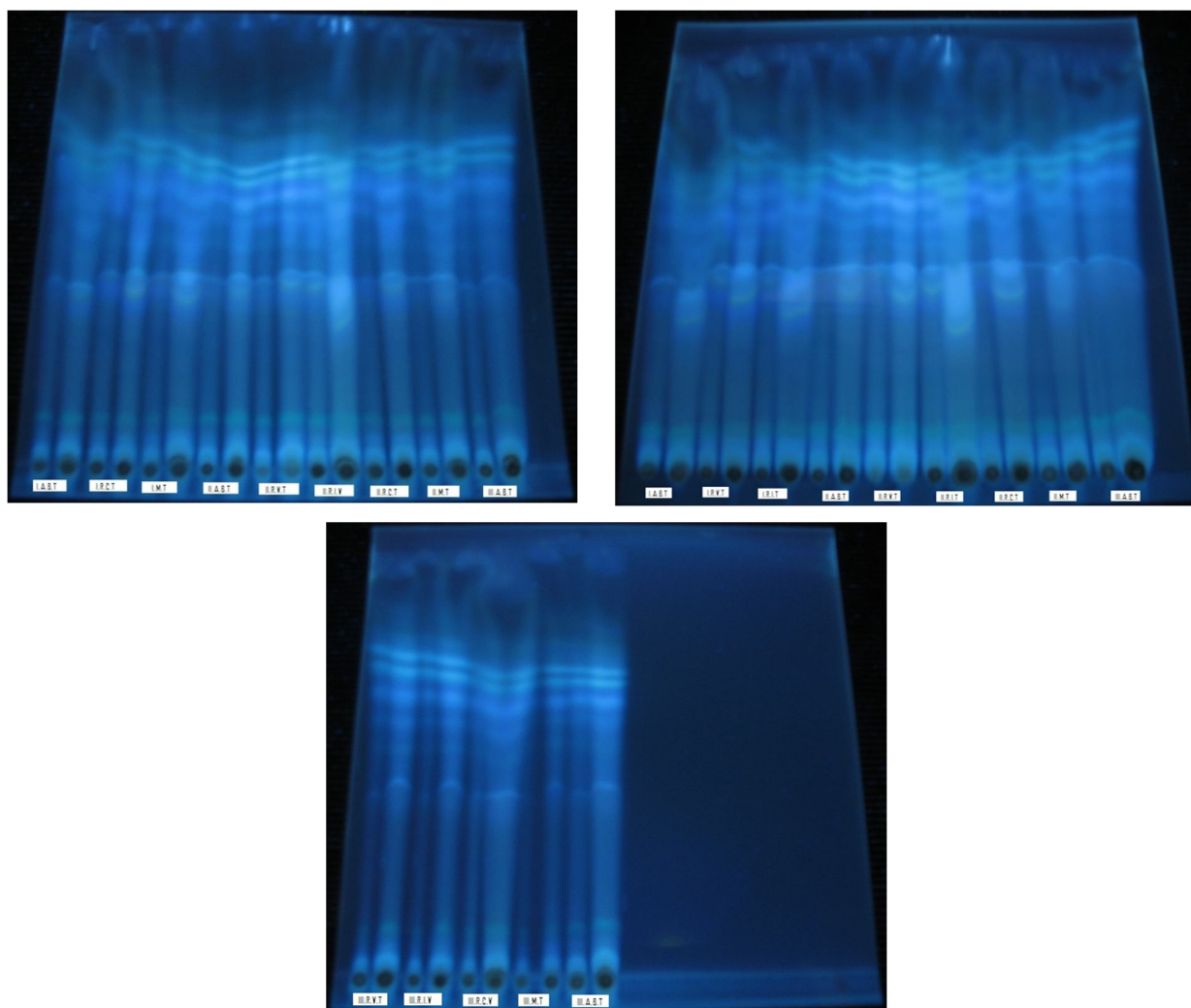


Fig.5.17 Détection des mycotoxines l'OTA et l'AFB₁ au niveau du café torréfiées sous lampe UV 366nm (Chambre UV fort puissance type CAMMAG).

La CCM a révélées la présence d'OTA, et d'aflatoxine B₁ en quantités considérable dans notre substrats.

IV Résultats du dosage de l'OTA et l'AFB₁ au niveau des substrats par méthode ELISA :

La technique d'ELISA a permet de quantifier la quantité d'ochratoxine A et de l'afltoxine B₁. Les teneurs en OTA enregistrés dans les échantillons de café en µg/Kg (ppb) et de [0,947-5,533] en parallèles avec les concentrations de l'AFB₁ et de [1,683-6,778] dans le tableau ci-dessous (Tab 5.3).

Tab 5.3 Résultats du dosage de l'ochratoxine A et l'aflatoxine B₁ dans les échantillons de café vert.

échantillon	Ochratoxine A (OTA) en ppb	Aflatoxine B1 (AFB ₁) en ppb
I ARABICA BRESILIENNE	0,947	1,683
II ARABICA BRESILIENNE	2,378	1,942
III ARABICA BRESILIENNE	1,849	1,868
I ROBUSTA VIETNAMIENNE	1,131	3,000
II ROBUSTA VIETNAMIENNE	1,706	3,580
III ROBUSTA VIETNAMIENNE	2,898	3,060
I ROBUSTA INDIENNE	2,686	3,279
II ROBUSTA INDIENNE	1,059	3,754
III ROBUSTA INDIENNE	1,073	3,914
I ROBUSTA COTE D'IVOIRIENNE	0,409	4,645
II ROBUSTA COTE D'IVOIRIENNE	5,533	6,778
III ROBUSTA COTE D'IVOIRIENNE	2,204	4,203

Discussion:

La teneur en eau est déterminée dans tous les échantillons analysés et les résultats obtenus montrent que le taux d'humidité dans un seul échantillon a dépassé le seuil critique de conservation donné par l'office internationale du café (OIC) et (Pfohl-Leszkowicz, 2003), qui est de 12-12,5% pour les grains de café. Ce paramètre est important puisque lorsque le taux d'humidité augmente le taux de contamination augmente également certains auteurs tels que (Kumari et Reddy, 1993) ont montré que l' A_w est un facteur limitant du développement de la flore fongique des denrées peu hydratées et toute variation légère peut avoir une influence sur les grains et les moisissures. La répartition des agents fongiques isolés dans toutes les parties de la graine fait apparaître une certaine hétérogénéité de contamination. La mycoflore externe est plus abondante que la mycoflore interne, ces résultats sont confirmés par Weidenborner (2001) et Jianqiang et al 1999 qui ont montré une différence assez nette entre le taux de contamination des grains non désinfectés mycoflore externe et celui des grains désinfectés (mycoflore interne).

La possibilité de contamination par l'ochratoxine A dans les grains de café a été soulevée il y a plusieurs années (Pitt et Hocking, 2009).

La flore fongique mise en évidence dans nos différents lots analysés est comparable à celle identifiées sur les grains de café depuis des années par plusieurs chercheurs notamment (Levi et al, 1974; Tsubouchi et al, 1984; Micco et al, 1989; Studer-Rohr et al, 1995) et (Pitt et Hocking, 2009) c'est une mycoflore diversifiée que nous avons classée en trois catégories : mycoflore pathogène, mycoflore intermédiaire et mycoflore de stockage, en accord avec les résultats de : les résultats montrent que dans tous les lots analysés, les agents saprophytes et intermédiaire sont prédominants par rapport aux agents pathogènes Fayret et al (1996) expliquent ce pourcentage élevé des saprophytes par leur compétition trophique vis-à-vis des pathogènes qui défavorisent, voire empêchent leur développement. L'inventaire réalisé et le calcul de la fréquence de l'abondance de chaque agent fongique, révèlent que la mycoflore est dominée par le genre *Aspergillus* pour la totalité des lots analysés, des résultats similaires ont été trouvés par (Pitt et Hocking, 2009) mais sa présence avec celle du genre *Fusarium* et du genre *Cladosporium* déprécie lourdement la qualité des grains.

Du fait que les *Fusarium* font partie des champignons de champ. Ce qui suppose que les grains de café analysés étaient contaminés par les champignons au voisinage, ou bien au cours de leurs traitements par méthodes humides ou sèches avant leur stockage. Et les études les plus récentes sur la mycoflore des grains de café vert se sont concentrées sur l'occurrence des moisissures potentiellement ochratoxigènes. Mislivec et al. (1983) a rapporté que les espèces d'*Aspergillus* dominent la flore fongique de 944 échantillons de grains de café, et que l'*A. ochraceus* a été l'espèce la plus toxigène la plus souvent isolée.

Les *Aspergillus* et les *Penicillium* sont responsables de moisissures nuisibles au stockage, altèrent la qualité des grains en produisant éventuellement les mycotoxines telles que les aflatoxines, les ochratoxines, l'acide penicillique, la citrinine, la patuline, ... etc. Nos résultats révèlent la présence des

deux genres dans la totalité des lots analysés, ainsi chez les grains du café les agents fongiques isolés sont en général les mêmes genres et même espèces cités dans la littérature (Mislivec et al. (1983) ; Pitt et Hocking., 2009) la présence d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, a retenu particulièrement notre attention et ce, par leur taux d'isolement élevé. En effet Giorni et al (2007) expliquaient que l'abondance relative de différents champignons varie entre les années, avec une incidence plus importante d'*Aspergillus flavus* en année sèche et chaude comparée aux années froides et pluvieuses. Alors que Pietri et al (2004) attribuaient cette situation à la nature du substrat (Jean. Adrian et al, 2003) et qui est l'un des plus favorables au développement des *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Sachant que le café contient de protéines et des acides aminés libres en teneur cumulées.

Nous avons identifié ces espèces d'*Aspergillus* en nous basant sur les critères morphologiques et microscopiques, en accord avec (Botton B et al, 1990), (Cahagnier et Richard-Molard, 1998) et (Pitt et Hocking., 2009) et nous avons confirmé l'identité des deux espèces d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* par la coloration jaune orange sur milieu AFPA, la même identification a été faite par Monga et Mahipal (1999) et Frandberg en 2003. Horn et Dorner en (2002) Rapportent que le transfert successif des souches d'un milieu de culture à l'autre affaiblit la capacité des souches à produire des mycotoxines. En effet, les analyses statistiques ne montrent aucune corrélation entre le taux de contamination et le pH et pour la relation entre l'humidité relative et le taux de contamination en constatent qu'il ya une légère relation à cause des taux normaux de HR% des prélèvements.

Pholfleszkowicz et Monilié (2003) révèlent qu'il existe une corrélation significative entre la contamination par les moisissures et les conditions climatique, d'après (Cahagnier et Richard-Molard, 1998) l'humidité et la température sont les principaux facteurs physique ayant une influence considérable sur la croissance et la production des mycotoxines.

Dans l'analyse de la mycoflore, malgré la présence de toute une gamme d'agents fongiques dans tous les lots examinés, la totalité sont indemnes de mycotoxines. Ces données sont en accord avec les conclusions d'observations rapportées par de nombreux auteurs notamment (Chapeland-Leclerc F, 2005 et Pholf-Leskowicz, 1999) qui ont montré que la présence d'agent fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par la présence d'un champignon bien spécifique. Ainsi les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique (Pholf-Leskowicz, 2002). Ces résultats montrent que quelque isolats soumis à l'analyse ne sont pas toxinogènes, ce qui est comparable à ceux de (Pholf-Leskowicz, 2002).

L'examen des chromatogrammes des extraits de filtrats de culture sur milieu YES que quelque isolats d'*Aspergillus ochraceus* et d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ont secrété non seulement l'ochratoxine A et l'aflatoxine B₁, mais aussi nous a permis de détecter plusieurs spots correspondant à d'autres mycotoxines et métabolites secondaires secrétés par les isolats d'*Aspergillus* testés. Les résultats montrent que tous les isolats d'*Aspergillus parasiticus* sont toxinogènes et certains d'entre eux

ont secrétés des mycotoxines et métabolites secondaires, tandis que les isolats d'*Aspergillus flavus* n'ont secrété que l'aflatoxine B₁ en accord avec les travaux de (Davis N. D. et al, 1966)

Dans les milieux YES, le taux d'aflatoxine B₁ dans le filtrat de culture est élevé par rapport à celui détecté dans les grains. Les chercheurs en particulier Yin et al. (2008) et Abbas et al. (2006) expliquent cette variation par l'existence d'une possible interaction compétitive entre les souches non toxigènes et les souches toxigènes. Selon (Wicklow et al 1980) et Pitt et Hocking, (2006) l'*Aspergillus flavus* produit moins d'aflatoxine lorsqu'*Aspergillus niger* est présent.

Les analyses sur les échantillons du café torréfiés ne révèlent aucune présence de mycotoxine, malgré que certain échantillons soient fortement contaminés par des agents fongiques, (Duris, 2002) rapporte que les conditions de conservations mal contrôlées posent un risque majeur pour la formation des mycotoxines (Duris et Hanak et al, 2002) rapportent que la durée de stockage à une grande influence sur le développement de la flore fongique et la contamination en mycotoxines.

Conclusion et perspectives:

Ce modeste travail s'ajoute à beaucoup des travaux réalisés en Algérie sur les mycotoxines contaminants les différentes denrées alimentaires Food et Feed, tel que les céréales : blé dure et blé tendre, maïs, ... par M. Sabaou (Ecole Normale Supérieure de Kouba), M. Bouznade (ENSA El Hararch), M. Guermouche (la Fac Central d'Alger), M. Moussaoui (Université de Béchar), ... ce qui on confirmés la présence des aflatoxines, les ochratoxines et d'autres mycotoxines en fort concentrations. Qui à fait augmenter nous contraintes et soucis vis-à-vis à ces métabolites secondaires. Et selon l'étude FAO concernant les réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003, l'Algérie fixe les teneurs maximales tolérés dans les produits d'alimentation humaine pour les : arachides, fruits à coque et les céréales en Afla B1 de 10µg/kg et en aflatoxines totaux Afla (B1, B2, G1, G2) de 20µg/kg, et pour les aliments pour bétail juste en Afla B1 de 20µg/kg. Et cela et jugés comme insuffisant et ne couvrent pas la totalité des produits alimentaire importés en Algérie.

Dans notre travail en à constatés que les analyses statistiques ne montrent aucune corrélation entre les taux de contaminations et le pH, et pour la relation entre l'humidité relative et le taux des contaminations en constatent qu'il ya une léger relation à cause des taux normaux de l'humidité relative (HR%) des prélèvements.

La présence des agents fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par les facteurs endogène et exogène.

L'examen des chromatoplaques des extraits de filtrats de culture sur milieu YES de quelque isolats d'*Aspergillus ochraceus* et d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ont secrété non seulement l'ochratoxine A et l'aflatoxine B₁, mais aussi nous a permis de détecter plusieurs spots correspondent à d'autres mycotoxines et métabolites secondaires.

Dans les milieux YES, les taux d'aflatoxine B₁ et l'ochratoxine A dans les filtrats de culture sont élevés par rapport à celui détecté dans les grains.

La technique d'ELISA à permet de quantifier des quantités d'ochratoxine A normale dans tous nous échantillons sauf pour l'échantillon II du café Cote d'Ivoire de 5,533ppb qui dépasse un peu les normes fixé par l'EU **regulatorylimits – food, ochratoxin** (Regulation (UE) 105/2010 of February 2010), la technique immuno-enzymatique ELISA à aussi montré la présence de l'aflatoxine B₁ en quantité considérable dans le café vert de l'ordre de 1,683 jusqu'à 6,778ppb.

Il est donc évident qu'en l'absence de contrôles d'hygiène suffisants, le café vert peut être contaminé par l'OTA et par l'afltoxine B₁, ce qui représente un danger potentiel de santé publique.

Bibliographies

- A.Esteban, M.L. Abarca, M.R. Bragulat, F.J. Caban~ es, 2006, Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxine A production by *Aspergillus carbonarius*, *Food Microbiology*, 23, 634–640.
- A.Riba a, S. Mokrane a, F. Mathieu b, A. Lebrihi b, N. Sabaou, 2008, Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat, *International Journal of Food Microbiology*, 122, 85–92.
- Abdellah Zinedine, Jordi Mañes, 2009, Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco, *Food Control*, 20, 334–344.
- AMES J. M. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.*, 1998, 62, 431-439.
- Ana Valero, Joan Ramón Farré, Vicente Sanchis, Antonio J. Ramos, Sonia Marín, 2006, Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and aw, *International Journal of Food Microbiology* 110, 160–164.
- Anastasia E. Kapetanakou, Efstathios Z. Panagou, Maria Gialitaki, Eleftherios H. Drosinos, Panagiotis N. Skandamis, 2009, Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins, *Food Control* 20:725–732.
- Angelina E., Bazzo I., Savino M., Borgo M. (2008). Ochratoxin A : Comparison of Extraction Methods from Grapes and Quantitative Determination by Different Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits. *Journal of Food Protection*, 71(12) : 2488-2496.
- Antonia Gallo, Kenneth S.Bruno, Michele Solfrizzo, Giancarlo Perrone, Giuseppina Mute, Angelo Visconti and Scott E.Baker, 2012, Rol of an *Aspergillus carbonarius* NRPS in OTA biosynthesis, *American Society for Microbiologiy, Appl. Environ. Microbiol.* doi : 10.112/AEM.02508-12.
- Antony Wild, 2009, LE CAFE UNE SOMBRE HISTOIRE, Traduit de l'anglais par Paul Bouffartigue, ©Edition Belin, ISBN 978-2-7011-4970-7.
- ARMANDO VENÂNCIO AND RUSSELL PATERSON,2006, 2. The Challenge of Mycotoxins, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal. P26-49.
- Astoreca, C. Barberis , C. Magnoli , M. Combina, A. Dalcerro, Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds, *International Journal of Food Microbiology* 129 , 131–135.
- BAUDRIMONT, I., BETBEDER, A.M. & CREPPY, E.E. (1997) Prevention of toxic effects of ochratoxin A, a natural contaminant of mouldy food and feed : effect of a A19 (structural analogue of phenylalanine), on the nephrotoxicity in rats and on the inhibition of protein synthesis in Vero cells.- *Chem. Biol. Interactions*, 104, 29-40.
- Betina Vladimir.1993. Chromatography of mycotoxins techniques and applications,*Journal of chromatography library*, Elsevier science edition. -0-444-81521-X.
- Botton.B, Breton.A, Fevre.M, Gauthier.S, Guy.Ph, Larpent J.P, Reymond.P, Sanglier J.J, Vayssier.Y, Veau.P, 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, 2ème edition, MASSON.ISBN :2-225-81987-4.
- Brera, C., Bentivoglio, M. Ocratossina A nelvino : Valutazione delle prestazioni di un Kit ELISA. ATTI I Convegno nazionale “le micotossine nella filiera agroalimentare”.29-30 novembre 2004. Roma. In press.

- Caroline Bogs, Paola Battilani, Rolf Geisen, 2006, Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats, *International Journal of Food Microbiology* 107: 39 – 47.
- CASTEGNARO, M., MOHR, U., PFOHL-LESZKOWICZ, A., ESTEVE, J., STEINMANN, J., TILMANN, T., MICHELON, J. & BARTSCH, H. (1998).- Sex and Strain specific induction of renal tumours by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int. J. Cancer*, 77, 70-75.
- CHAGNIER B., Richard-Molard, 1989, moisissures des aliments peu hydratés, collection sciences et techniques agroalimentaires, 171-175.
- Chapeland-Leclerc F, Papon N, Noël T, Villard J. 2005. Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Rev Fr Laboratoires*;373:61–6.
- CHRISTIANE J.DUCAUZE. FRAUDES ALIMENTAIRES APPROCHE REGLEMENTAIRES ET METHODOLOGIE ANALYTIQUE, 2003.
- Christine BAR-L'HELGOUAC'H, 2001, contrôle de la qualité des céréales et des protéagineux Guide pratique, Nouvelle édition mise à jour, ©ITCF Institut Technique des Céréales Et des Fourrages, ISBN n°2.86492.436.6.
- Clarke R.J. (1987). "Quality Control in the Food Industry" (Coffee Technology), Academic Press, London. vol.4. 2è ed.
- Clarke, R. J. and Macrae,1985. Coffee . Londres, Elsevier Applied Science Publishers ,R. (Editors),Vol. 1Chemistry.
- Clarke, R. J. and Macrae,1987. Coffee. Londres, Elsevier Applied Science Publishers.R. (Editors), Vol. 2 Technology.
- Clifford, M.N. and Willson, K.C. (Editors) - Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage. Londres, Croom Helm, 1985. Wrigley, G. - Coffee. Londres, Longman, 1988.
- CODEX ALIMENTARIUS, 2007, Céréales, Légumes secs, Légumineuses et matières protéiques végétales, première édition, Organisation mondiale de la santé, Lavoisier EDITION diffusinon, ©FAO et OMS, Rome.Italie, ISBN 978-92-5-205842-7.
- CREPPY, E.E., CHAKOR, K., FISHER, M.J. & DIRHEIMER, G. (1990).- The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo.- *Arch.Toxicol.*, 64, 279-284.
- CREPPY, E.E., CASTEGNARO, M., GROSSE, Y., MERIAUX, J., MANIER, C. & MONTCHARMONT, P. (1993).- Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France : Alsace, Aquitaine et région Rhône Alpes.- In : Human ochratoxicosis and its pathologies, Creppy, E.E., Castegnaro, M. & Dirheimer, G.- INSERM/John Libbey Eurotext, 231, 147-158.
- Daiana Garcia, Antonio J. Ramos, Vicente Sanchis, Sonia Marín, 2010, Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*, *Food Microbiology* xxx: 1e12.
- Daviron B.,S. Ponte. 2005, *The Coffee Paradox*, Zed Books, New York
- Davis N. D., U. L. Diener.,D. W. Eldridge.1966. Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, *Applied Microbiology, American Society for Microbiology*, Vol. 14, No. 3.
- DEGEN, G.H., GERBER, M.M., OBRECHT, S., PFOHL-LESZKOWICZ, A. & DIRHEIMER, G. (1994).- Genotoxicity and cytotoxicity of ochratoxin A in ovine seminal vesicle cells cultures.- *Archives of Pharmacology*, 349, 121 (Abstract).
- Diana,F., Bacer, V., Puppini, B., Persic, L. E Paleologo, M.Celer AFLA B1 : a rapid and practical ELISA for Aflatoxin B1 determination in foodstuffs. 3th National Congress.

- Dominique Cabasse, Jean-philipe Bouchara, Ludovic de Gentile, Sophie Brun, Bernard Cimon, Pascale Pen, Mars 2002, Les moisissures d'intérêt médical, cahier de formation (version numérique), Biologie médicale, N°25, Bioforma.
- DRAGACCI, S. & FRÉMY, J.-M. (1999).- Techniques analytiques pour la recherche des mycotoxines dans les aliments dans : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque, chapitre 7, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 141-169.
- Dragan Milic'evic , Verica Juric´ , Srd'an Stefanovic´ , Tatjana Baltic´ , Sas'a Jankovic, 2010, Evaluation and Validation of Two Chromatographic Methods (HPLC-Fluorescence and LC-MS/MS) for the Determination and Confirmation of Ochratoxin A in Pig Tissues, Arch Environ Contam Toxicol, 58:1074-1081.
- EL ADLOUNI, C., PINELLI, E., AZÉMAR, B., ZAOUI, D., BEAUNE, P. & PFOHLESZKOWICZ, A. (2000).- Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A : role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase.- Environmental and Molecular Mutagenesis, 35, 123-131.
- E. Pardo, V. Sanchis, A.J. Ramos, S. Mari'n, 2006, Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxine A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*, Food Microbiology, 23 , 351-358.
- E. Pardo, V. Sanchis, A.J. Ramos, S. Marin, 2006, Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*, Food Microbiology 23:351-358.
- E. Ribeiro & A. Alves, 2008, Comparative study of screening methodologies for ochratoxin A detection in winery by-products, Anal Bioanal Chem, 391:1443-1450.
- Esteban, M.L. Abarca, M.R. Bragulat, F.J. Cabañes, 2006, Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species, International Journal of Food Microbiology 108, 188-195.
- Fuchs, Binder, Schatzmayr, Heidler, Klimitsch, 1994, and Krska, Monitoring of residues of ochratoxin A in blood and kidney of chicken using HPLC-FLD, P142-145.
- G. J. Diaz, D. Ariza, N.S. Perilla, 2004, Method validation for the determination of ochratoxin A in green and soluble coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography. Mycotoxin Research, Vol. 20.
- G. J. Diaz, D. Ariza, N.S. Perilla, 2004, Method validation for the determination of ochratoxin A in green and soluble coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography, Mycotoxin Research, Vol. 20.
- GALTIER, P., LARRIEU, G. & ALVINERIE ,M. (1993).- Influence de l'ochratoxine A sur le devenir des xénobiotiques. In : Human ochratoxicosis and its pathologies., Creppy, E.E., Castegnaro, M., Dirheimer, G., Eds. John Libbey, Eurotext, 231, 59-65.
- Galtier. P, C.Eeckhoutte et M.Alvienne, 1974, Isolement par chromatographie sur couches mince de l'ochratoxine A obtenue à partir de milieux liquides faiblement concentrés en toxine, Toxines d'*Aspergillus ochraceus* WILHELM, Ann. Rech. Vétér.,5(2), 155-166.
- GROSSE, Y., CHEKIR-GHEDIRA, L., HUC, A., OBRECHT-PFLUMIO, S., DIRHEIMER, G., BACHA, H. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1997b).- Retinol, ascorbic acid and á tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. Cancer letters, 114, 225-229.
- GROSSE, Y., MONJE, M.C., MACÉ, K., PFEIFER, A. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1997a).- Use of bronchial epithelial cells expressing human cytochrome P450 for study on metabolism and genotoxicity of ochratoxin A.- In vitro Toxicology, 10, 97-106.
- GROSSE, Y., CASTEGNARO, M., MACÉ, K., BARTSCH, H., DIRHEIMER, G., PINELLI, E., PFEIFER, A. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1995b).- Evaluation of ochratoxin A genotoxicity by DNA-adducts detection: cytochromes P450 implicated.- Clin. Chem., 12, 1927-1929.
- GROSSE, Y., BAUDRIMONT, I., CASTEGNARO, M., BETBEDER, A.-M., CREPPY, E.E., DIRHEIMER, G. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1995a).-

Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cell.-
Chem. Biol. Interactions, 95, 175-187.

- Giuseppe Meca, Alberto Ritieni, 2009, Production and analysis of ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus* ITEM 5137 in submerged culture, Food Chemistry 117: 470–472.
- Guy LEYRAL, Elisabeth VIERLING, 2007, microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires, 4^{ème} éd,-Rueil –Malmaison : Doin ; Bordeaux : CRDP d’Aquitaine, (Biosciences et techniques : Sciences des aliments).
- Hanak.E, Boutrif.E, Fabre.P, Pineiro. M, 2002. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l’atelier international, CIRAD-FAO. Cédérom du CIRAD, Montpellier, France.
- HARRIS, J.P. & MANTLE, P.G. (2001).- Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*.- Phytochemistry, 58, 709-716.
- HENNING, A., FINKS-GREMMELS, J. & LEISTNER, L. (1991).- Mutagenicity and effects of Ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In : Castegnaro, M., Plëstina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H., eds. Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC Scientific Publications No115, IARC, Lyon, pp.225-260.
- IARC (1993). International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances : food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume 56, IARC, Lyon.
- Inês Almeida, H. Marina Martins, Marta F. Marques, Salomé Magalhães & Fernando Bernardo, 2010, Mycobiota and Ochratoxin A in laboratory mice feed: preliminary study, Vet Res Commun, 34:381–386.
- J. W. Bennett, Mary W. Trucksess and Albert, F. Pohland, Mycotoxin Protocols, 2000, *Mycopathologia* 152: 109–110.
- Jean-Denis Bailly and Philippe Guerre, 2009, Mycotoxins in Meat and Processed Meat Products, Safety of Meat and Processed Meat, Food Microbiology and Food Safety, Chapter 4, pp 83-124.
- Jens C. Frisvad, J. Mick Frank, Jos A.M.P. Houbraken, Angelina F.A. Kuijpers, Robert A. Samson, New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*, 2004, *STUDIES IN MYCOLOGY* 50: 23–43.
- Jéssica Gil-Serna , Covadonga Vázquez , Noelia Sardiñas , Ma Teresa González-Jaén , Belén Patiño, 2010, Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination, Food Control, xxx ,1e3.
- Jéssica Gil-Serna, Amaia González-Salgado, M^a Teresa González-Jaén Covadonga Vázquez, Belén Patiño, 2009, ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR, International Journal of Food Microbiology 131:162–167.
- John O’Callaghan a, Patricia C. Stapleton a, Alan D.W. Dobson, 2006, Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli, Fungal Genetics and Biology 43: 213–221.
- JOSEPH-PIERRE GUIRAUD, 2003, MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE, DUNOD.
- Joseph-Pierre Guiraud, Jean-Philippe Roesec, 2004, Pratiques des normes en microbiologie alimentaire, AFNOR, 266-267.
- Jianqiang, L., Xili, L. Feng, W. and Muhai, Z., 1999. Microscopy and scanning electron microscopy of black embryo of wheat seed and the seed borne fungi. *Acta phytopathologica sinica* 29(1) 22-26.
- KHAN, S., MARTIN, M. BARTSCH, H. & RAHIMTULA, A.D. (1989).- Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A.- Biochem.Pharmacol., 38, 67-72.

- Kristian Fog Nielsen, Jesper Mølgaard Mogensen, Maria Johansen, Thomas O. Larsen, Jens Christian Frisvad, 2009, Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group, *Anal Bioanal Chem*, 395:1225–1242.
- Kumari, R and Reddy, S.M., 1993. Influence of water activity on seed mycoflora of fennel *Indian phytopathology* 46(4): 389-392.
- Ky C. L., Louarn J., et al. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75: 223-230.
- LEDL F., SCHLEIDER E. 1990. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem.*, 29, 565-594.
- L'ETAT DE L'INSECURITE ALIMENTAIRE DANS LE MONDE 2006, 2006, FAO.
- Long-Shan T. Lai, Chih-Sheng Hung, and Chi-Chu Lo, 2007, Effects of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542, *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, Vol. 104, No. 1, 9–13.
- Luis Almela, Virginia Rabe, Blas Sa´nchez, Francisco Torrella, Jose´ P. Lo´pez-Pe´rez, Jose´ A. Gabaldo´nc, Lucı´a Guardiola, 2007, Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material, *Food Microbiology*, 24, 319–327.
- Luı´s Roberto Batista, Sara Maria Chalfoun, Cristina Ferreira Silva, Marcelo Cirillo, Eugênia Azevedo Varga, Rosane Freitas Schwan, 2009, Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods, *Food Control*, 20, 784–790.
- M. Rosa Bragulat, F. Javier Cabañes, 2008, Effect of gentian violet on the growth of the N and T RFLP types of the *Aspergillus niger* aggregate, *Journal of Microbiological Methods* 75, 81–85.
- MACHIELS D., CLINQUART A., EPPE G., DOTREPPE O., DE PAUW E., ISTASSE L. 2000. Caractéristiques et techniques d'analyse des odeurs de la viande cuite. *Ann. Méd. Vét.*, 144, 279-287.
- Machiels D., Istasse L. 2002. La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments, *Ann, Méd, Vét.*, 146, 347-352.
- Mahendra Rai, Ajit Varma, 2010. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, ISBN 978-3-642-00724-8.
- MAJERUS, P., BRUN, G. & BARTSCH, H. (1991).- Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in *E. Coli* stains, studies on their mode of actions. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch H., eds, *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Scientific Publs. N°115, IARC, Lyon, 261-266.
- MALAVEILLE, C., BRUN, G. & BARTSCH, H. (1991).- Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in *E. Coli* strains, studies on their mode of actions. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H. eds, *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC. Scientific Publs. No115, IARC, Lyon, 261-266.
- MALAVEILLE, C., BRUN, G. & BARTSCH, H. (1994).- Structure-activity studies in *E.coli* strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites.- *Mutat. Res.*, 307, 141-147.
- MANOLOV, G., MANOLOVA, Y., CASTEGNARO, M. & CHERNOZEMSKY, I.N. (1991).- Chromosomal alterations in lymphocytes of patients with Balkan endemic nephropathy and of healthy individuals after incubation *in vitro* with ochratoxin A. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H. eds, *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC. Scientific Publs. No115, IARC, Lyon, 267-272.

- MANOLOVA, Y., MANOLOV, G., PARVANOV, L., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CASTEGNARO, M. & CHERNOZEMSKY, I.N. (1990).- Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat. Res.*, 231, 143-149.
- MARESCA, M., MAHFAUD, R., PFOHL-LESZKOWICZ, A. & FANTINI, J. (2000).- Toxicité de l'ochratoxine A sur les cellules épithéliales intestinales Caco-2 et HT-29- D4: diminution de la résistance trans-épithéliale et inhibition de l'activité du cotransporteur Na⁺/glucose.- Communication orale, 4ème réunion des centres de recherche en Nutrition humaine, 12-13 octobre 2000, Marseille.
- Marcin Bizukojc, Beata Pawlowska, Stanislaw Ledakowicz, 2007, Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*, *Journal of Biotechnology* 127:258–268.
- Marcin Bizukojc, Stanislaw Ledakowicz, 2007, A macrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*, *Journal of Biotechnology* 130: 422–435.
- Marcin Bizukojc, Stanislaw Ledakowicz, 2007, Simultaneous biosynthesis of (+)-geodin by a lovastatin-producing fungus *Aspergillus terreus*, *Journal of Biotechnology* 132:453–460.
- Maren A. Klich, Sean Tang, David W. Denning, 2009, Aflatoxin and Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species Under Ex Vivo Conditions, *Mycopathologia*, 168:185–191.
- Mariano B.M. Ferraz , Adriana Farah , Beatriz T. Iamanaka , Daniel Perrone , Marina V. Copetti , Viviane X. Marques , Alfredo A. Vitali , Marta H. Taniwaki, 2010, Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting, *Food Control*, 21, 872–877.
- Marion Raters, Reinhard Matissek , Winni van Haren, Koop Fledderus, 2010, Determination of ochratoxin A in liquorice products using HPLC-based analytical methods. Part II: harmonized method and method validation study, *Mycotox Res*, 26:101–108.
- Marion Raters, Reinhard Matissek, Winni van Haren, Koop Fledderus, 2010, Determination of ochratoxin A in liquorice products using HPLC-based analytical methods. Part II: harmonized method and method validation study, *Mycotox Res*, 26:101–108.
- Mark Pendergrast, 2010, *uncommon grounds : the history of coffee and how it transformed our world*, published by basic books group, Basic books, eISBN : 978_O_465_02404_9.
- Markus Schmidt-Heydt , Tobias Schunck , Rolf Geisen, 2009, Expression of a *gfp* gene in *Penicillium nordicum* under control of the promoter of the ochratoxin A polyketide synthase gene, *International Journal of Food Microbiology* 133:161–166.
- Markus Schmidt-Heydt, Eva Graf, Julia Batzler and Rolf Geisen, 2011. The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin A biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloride rich dry cured foods, *Trends in Food Science & Technology* xx, 1-10.
- MARTINS S.I.F.S., JONGEN W.M.F., VAN BOEKEL M.A.J.S. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 364-373.
- Massimo Reverberi, Federico Punelli, Marzia Scarpari, Emanuela Camera, Slaven Zjalic, Alessandra Ricelli, Corrado Fanelli, Anna Adele Fabbri, 2010, Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds, *Appl Microbiol Biotechnol*, 85:1935–1946.
- Micco, C., Grossi, M., Miragli, M. and Brera, C. 1989. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Addit. Contam.* 6: 333–339.

- Mislivec, P.B., Bruce, V.R. and Gibson, R. 1983. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *J. Food Prot.* 46: 969–973.
- *Monica Olsen, Nils Jonsson, Naresh Magan, John, Banks, Corrado Fanelli, Aldo Rizzo, Auli Haikara, Alan Dobson, Jens Frisvad, Stephen Holmes, Juhani Olkku, Sven-Johan Persson, Thomas Börjesson*, 2004, PREVENTION OF OCHRATOXIN A IN CEREALS IN EUROPE, 317-342.
- Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di sanità. Rome, Settembre 28-30. 2009. Proceedings : Rapporti ISTISAN 10/32, pag. 197-203.
- P.V. Martínez-Culebras, D. Ramón, 2007, An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine, *International Journal of Food Microbiology* 113: 147–153.
- Paola Battilani, Silvia Formenti, Tania Toscani, Roberta Virgili, 2010, Influence of abiotic parameters on ochratoxin A production by a *Penicillium nordicum* strain in dry-cured meat model systems, *Food Control* xxx: 1e6.
- Paramee Noonim, Warapa Mahakarnchanakul, Kristian F. Nielsen, Jens C. Frisvad, Robert A. Samson, 2008, Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand, *International Journal of Food Microbiology*, 128, 197–202.
- Paul Bayman, James L. Baker, 2006, Ochratoxins: A global perspective, *Mycopathologia*, 162: 215–223.
- PETKOVA-BOCHAROVA, T., STOICHEV, I., CHERNOZEMSKY, I.N., CASTEGNARO, M. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1998).- Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother.- *Env. And Molecular Mutagenesis*, 32, 155-162.
- Persic, L., Perorone, P. and Paleologo Oriundi, M. Rapid and sensitive screening of ochratoxin A in wine samples by competitive ELISA. Poster presentation at the VIIth International Conference on Agri-Food Antibodies. Sept. 10-13, 2003. Uppsala, Sweden.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., CHAKOR, K., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1991).- DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H., eds, *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Sci. Publ. N° 115, IARC, Lyon, 245-253.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GROSSE, Y., OBRECHT, S., KANE, A., CASTEGNARO, M., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1993a).- Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment by the mycotoxin ochratoxin A.- *Mutat. Res.*, 289, 265-273.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GROSSE, Y., OBRECHT, S., KANE, A., CASTEGNARO, M., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1993b).- Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A exposure. I: Creppy, E.E., Castegnaro, M. & Dirheimer, G., eds. *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*, vol 231, John Libbey Eurotext Ltd., 199-207.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GROSSE, Y., CASTEGNARO, M., NIKOLOV, I.G., CHERNOZEMSKY, I. N., BARTSCH, H., BETBEDER, A.M., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1993c).- Ochratoxin A related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. In: Philips, D.H., Castegnaro, M. & Bartsch, H., eds. *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts*. IARC Sci. Publ., N° 124, Lyon, 141-148.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., PINELLI, E., BARTSCH, H., MOHR, U. & CASTEGNARO, M. (1998).- Sex and Strain-Specific Expression of Cytochrome P450s in ochratoxin A-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity in Rats.- *Molecular Carcinogenesis*, 23, 76-85.

- PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1999a).- Ecotoxicogénèse In : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque .- Chapitre 2, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 17-30.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.& CASTEGNARO, M. (1999b).- L'ochratoxine A In : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque.- Chapitre 9, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 249-267.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GUERRE, P. & GALTIER,P. (1999c).- Métabolisation des mycotoxines In : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque, chapitre 3, Lavoisier, Tec & Doc, Paris,46-50.
- Ph. BOUCHET, J.-L. GUIGNARD, J.VILLARD, 1999, ABREGES Les champignons Mycologie fondamentale et appliquée, Masson, Paris.
- Pierre Gy, 1997, Hétérogénéité, échantillonnage, Homogénéisation, Elsevier Masson, Parti 1, EAN13 : 9782225813139.
- Pitt John I. et Hocking Ailsa D. 2009. Fungi and Food Spoilage. Third edition, Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Pitt J.I., A.D. Hocking, Fungi and Food Spoilage, 2009, *Penicillium* and Related Genera, Chapter 7, 169-273.
- Pitt J.I., A.D. Hocking,2009, Fungi and Food Spoilage, Spoilage of Stored, Processed and Preserved Foods, Chapter 12.
- Pitt J.I., A.D. Hocking,2009, Fungi and Food Spoilage,2009, Methods for Isolation, Enumeration and Identification, Chapter 4.
- Pitt J.I. et Hocking A.D.1997. Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- PITT, J.I. (1987).- *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A.- Appl. Environ. Microbiol., 53, 266-269.
- STEINMANN, J., TILMANN, T., MICHELON, J. & BARTSCH, H. (1998).- Sex and Strain specific induction of renal tumours by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. Int. J. Cancer, 77, 70-75.
- R. Geisen, M. Schmidt-Heydt, A. Karolewicz, 2006, A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*, Mycotoxin Research Vol. 22, No. 2, 134-141.
- R. Verrone ,L. Catucci ,P. Cosma ,P. Fini, A. Agostiano ,V. Lippolis,2007, M. Pascale, 2007,Effect of *b*-cyclodextrin on spectroscopic properties of ochratoxin A in aqueous solution, J Incl Phenom Macrocycl Chem, 57:475–479.
- Rajesh R. Parvatkar, Celina D'Souza, Ashootosh Tripathi, Chandrakant G. Naik, 2009, Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*, Phytochemistry 70:128–132.
- Reinhard Matissek, Marion Raters, Winni van Haren, Koop Fledderus, 2010, Determination of ochratoxin A in liquorice products using HPLC based analytical methods. Part I: proficiency test of methods commonly used by the confectionary industry, Mycotox Res 26:93–99.
- Reinhard Matissek, Marion Raters,Winni van Haren, Koop Fledderus,2010, Determination of ochratoxin A in liquorice products using HPLC based analytical methods. Part I: proficiency test of methods commonly used by the confectionary industry, Mycotox Res , 26:93–99.
- S.L. Leong, A.D. Hocking, J.I. Pitt, B.A. Kazi, R.W. Emmett, E.S. Scott, 2006, Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A, International Journal of Food Microbiology 111,S10–S17.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O.1995, Introduction to food-borne fungi. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Sidjè Paule-Marina Nanguy , Jean-Marie Perrier-Cornet , Maurice Bensoussan , Philippe Dantigny, 2010, Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and *Penicillium* species, International Journal of Food Microbiology 142, 273–276.

- Sivetz, M. and Desrosier, N.W. 1979. Coffee technology. Westport, Connecticut, AVI Publishing Company.
- Stella M. Romero , Virginia Fernández Pinto, Andrea Patriarca, Graciela Vaamonde, 2010, Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature, International Journal of Food Microbiology 140, 277–281.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J. and Schlatter, C. 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food Chem. Toxicol. 33: 341–355.
- Systèmes d'inspection et de certification des importations et des exportations alimentaires : textes complets, Auteur Commission mixte FAO-OMS du codex alimentarius, 2e éd. 2005, Organisation des Nations Unies pour l'alimentaire et l'agriculture.
- Thomas B. Whitaker & Mary W. Trucksess & Carol M. Weaver & Andrew Slate, 2009, Sampling and analytical variability associated with the determination of aflatoxins and ochratoxin A in bulk lots of powdered ginger marketed in 1-lb bags, Anal Bioanal Chem, 395:1291–1299.
- Thomas B. Whitaker, Mary W. Trucksess ,Carol M. Weaver & Andrew Slate, 2009, Sampling and analytical variability associated with the determination of aflatoxins and ochratoxin A in bulk lots of powdered ginger marketed in 1-lb bags, Anal Bioanal Chem, 395:1291–1299.
- Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. and Sakabe, Y. 1985. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. Mycopathologia 90: 181–186.
- Ulrich Schillinger, Jéssica Varela Villarreal, 2010, Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods, Food Control 21:107–111.
- Varga, J., Rigo, K., Teren, J., Mesterhazy, A., 2001, Recent advances in ochratoxin research I. production, detection and occurrence of ochratoxins. Cereal Research Communications, 29, 85-92.
- Vasconcelos A. L. S., Franca A. S., et al. (2007). A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food Chemistry* ,101: 26-32.
- Viani R.1993. The composition of coffee. In: S. Garattini Ed. Caffeine, Coffee and Health. Raven Press ,17-41 New York.
- Wafa Masoud, Christa Høj Kalsoft, 2006, The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*, International Journal of Food Microbiology 106: 229 – 234.
- Weidenborner, M., 2001. Pine nuts: The mycobiota and potential mycotoxins. *Canadian journal of microbiology* 47(5):460-464.
- Xiangjiu He, Yihai Wang, Hui Hu, Yixuan Wu, Xiaobin Zeng, 2011, Novel bioconversion products of andrographolide by *Aspergillus ochraceus* and their cytotoxic activities against human tumor cell lines, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 68:89–93.
- Zanzotto, S. Burruano, P. Marciano, 2006, Digestion of DNA regions to discriminate ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains in the *Aspergillus niger* aggregate, International Journal of Food Microbiology 110, 155–159.

Encyclopédie :

1. Encyclopédie des plantes médicinales, 2001, LAROUSSE, ISBN : 2-03-560252-1.

Annexe 1:

Tableau : résultats des trois essayes et les moyennes du dosage de pH des différents échantillons de café.

Echantillon	Sous échantillon	pH	pH moyenne	Écart-type (^δ)
I.A.B.V	1	6,44	6,42666667	0,0321455
	2	6,45		
	3	6,39		
I.R.V.V	1	6,42	6,44333333	0,02081666
	2	6,45		
	3	6,46		
I.R.I.V	1	6,48	6,47	0,01732051
	2	6,45		
	3	6,48		
I.R.C.V	1	6,34	6,39666667	0,07371115
	2	6,37		
	3	6,48		
I.A.B.T	1	5,6	5,71	0,10148892
	2	5,73		
	3	5,8		
I.R.V.T	1	6,42	6,47333333	0,1474223
	2	6,64		
	3	6,36		
I.R.I.T	1	6,24	6,42333333	0,28360771
	2	6,75		
	3	6,28		
I.R.C.T	1	5,92	5,92666667	0,01154701
	2	5,92		
	3	5,94		
I.M.T	1	5,91	5,98333333	0,06429101
	2	6,03		
	3	6,01		
II.A.B.V	1	5,9	5,96333333	0,06027714
	2	5,97		
	3	6,02		
II.R.V.V	1	6,03	6,05	0,02
	2	6,05		
	3	6,07		
II.R.I.V	1	5,92	5,90666667	0,04163332
	2	5,86		
	3	5,94		
II.R.C.V	1	6,02	6,04666667	0,02516611
	2	6,07		
	3	6,05		

II.A.B.T	1	6,29	6,3366667	0,05033223
	2	6,33		
	3	6,39		
II.R.V.T	1	6,5	6,42	0,07211103
	2	6,4		
	3	6,36		
II.R.I.T	1	6,28	6,24	0,03605551
	2	6,23		
	3	6,21		
II.R.C.T	1	6,52	6,5	0,05291503
	2	6,54		
	3	6,44		
II.M.T	1	6,36	6,39	0,03605551
	2	6,43		
	3	6,38		
III.A.B.V	1	6,97	6,6166667	0,306159
	2	6,45		
	3	6,43		
III.R.V.V	1	6,52	6,2766667	0,21221059
	2	6,13		
	3	6,18		
III.R.I.V	1	6,43	6,38	0,05
	2	6,33		
	3	6,38		
III.R.C.V	1	6,34	6,34	0,01
	2	6,35		
	3	6,33		
III.A.B.T	1	6,63	6,5966667	0,07571878
	2	6,65		
	3	6,51		
III.R.V.T	1	6,64	6,64	0,02
	2	6,66		
	3	6,62		
III.R.I.T	1	6,8	6,7566667	0,03785939
	2	6,73		
	3	6,74		
III.R.C.T	1	6,63	6,5933333	0,03511885
	2	6,59		
	3	6,56		
III.M.T	1	6,17	6,1433333	0,0305505
	2	6,15		
	3	6,11		

Annexe 2:

Tableau : résultats des trois essayes et les moyennes des taux d'humidités relatives.

Lot	Echantillon	Moyenne Humidité relative (HR ₉₆)	Écart-type (δ)
I	I.A.B.V	8,44111111	0,06313566
	I.R.V.V	10,4566667	0,16454483
	I.R.I.V	8,82555556	0,22046038
	I.R.C.V	6,12277778	0,11976829
	I.A.B.T	2,33888889	0,16289908
	I.R.V.T	1,01227778	0,10254606
	I.R.I.T	0,80333334	0,03464474
	I.R.C.T	2,96511111	0,04795947
	I.M.T	2,18	0,09656604
II	II.A.B.V	8,70444444	0,88122232
	II.R.V.V	9,42666667	0,0587367
	II.R.I.V	10,0233333	0,06041523
	II.R.C.V	8,16111111	0,15161171
	II.A.B.T	0,66444444	0,04003471
	II.R.V.T	0,84666667	0,0295804
	II.R.I.T	0,78555556	0,03205897
	II.R.C.T	0,931875	0,04720302
	II.M.T	2,323	0,59240237
III	III.A.B.V	9,38555556	0,13049053
	III.R.V.V	10,94	0,16278821
	III.R.I.V	12,3133333	0,10404326
	III.R.C.V	9,02333333	0,10392305
	III.A.B.T	1,0555	0,02275334
	III.R.V.T	1,17788889	0,17551171
	III.R.I.T	0,82111111	0,03723051
	III.R.C.T	0,98266667	0,14669782
	III.M.T	2,97077778	0,11139095

Annexe 3:

Tableau : résultats des recensements de la mycoflore totale par méthode de dilution sur milieux PDAac et CDA.

Echantillon	PDA ac (UFC/g) 10	CDA (UFC/g) 10	Écart-type (δ) PDA ac	Écart-type (δ) CDA
I.A.B.V	6,166666667	4,33333333	6,61563804	6,83130051
II.A.B.V	10	14	4	2,64575131
III.A.B.V	16,83333333	25,1666667	2,786874	5,49241902
I.R.V.V	2	4,16666667	1,26491106	3,86867764
II.R.V.V	0	1,33333333	0	0,57735027
III.R.V.V	8,66666667	8,5	4,3204938	2,58843582
I.R.I.V	9,5	3,5	9,09395404	5,50454358
II.R.I.V	1,33333333	1	1,52752523	1,73205081
III.R.I.V	4,16666667	4,83333333	2,22860195	1,72240142
I.R.C.V	17	8,33333333	10,6957936	13,8660256
II.R.C.V	18	15,3333333	2	8,38649708
III.R.C.V	32,83333333	22,5	7,19490561	6,83373983
I.A.B.T	1,5	0,33333333	1,87082869	0,81649658
II.A.B.T	3,66666667	0	2,081666	0
III.A.B.T	0,5	0,5	0,54772256	0,54772256
I.R.V.T	0	0	0	0
II.R.V.T	0	0,33333333	0	0,57735027
III.R.V.T	0	0,16666667	0	0,40824829
I.R.I.T	0	0	0	0
II.R.I.T	0,66666667	4,33333333	0,57735027	5,77350269
III.R.I.T	0	0,16666667	0	0,40824829
I.R.C.T	1,5	0,5	2,34520788	1,22474487
II.R.C.T	7,66666667	0,66666667	4,163332	0,57735027
III.R.C.T	0,33333333	0,16666667	0,81649658	0,40824829
I.M.T	0,83333333	0,5	0,98319208	0,54772256
II.M.T	0,66666667	1,33333333	1,15470054	1,15470054
III.M.T	1,16666667	3,66666667	1,32916014	2,33809039

Annexe 4:

Tableau : résultats des taux de contamination de chaque échantillon de café par méthode Buvard et Buvard modifié.

Echantillon	Contamination externe et profonde (méthode Buvard)	Contamination profonde (méthode Buvard modifié)	Écart-type (^δ) méthode Buvard	Écart-type (^δ) méthode Buvard modifié
I.A.B.V	100	28	0	14,4222051
II.A.B.V	99	15	1,41421356	4,24264069
III.A.B.V	100	8	0	0
I.R.V.V	46	16	15,8745079	4
II.R.V.V	21	12	18,3847763	16,9705627
III.R.V.V	50	8	0	0
I.R.I.V	99,33333333	16	1,15470054	2
II.R.I.V	17	3	21,2132034	4,24264069
III.R.I.V	100	18	0	0
I.R.C.V	97,33333333	21,33333333	1,15470054	2,30940108
II.R.C.V	86	13	19,7989899	18,3847763
III.R.C.V	100	5	0	0
I.A.B.T	26	2	45,033321	3,46410162
II.A.B.T	1	0	1,41421356	0
III.A.B.T	0	0	0	0
I.R.V.T	0	0	0	0
II.R.V.T	0	0	0	0
III.R.V.T	0	0	0	0
I.R.I.T	0	0	0	0
II.R.I.T	1	0	1,41421356	0
III.R.I.T	0	0	0	0
I.R.C.T	7,333333333	0,66666667	8,08290377	1,15470054
II.R.C.T	0	0	0	0
III.R.C.T	0	0	0	0
I.M.T	4,666666667	0	8,08290377	0
II.M.T	29	0	41,0121933	0
III.M.T	97	1	0	0

Annexe 5:

Tableau : résultats des moyennes des taux de contamination (%) de chaque variété de café.

Variété de café	Moyenne de la contamination externe et profonde	Moyenne de la contamination profonde	Écart-type (^δ) (Buvard)	Écart-type (^δ) (Buvard modifié)
Arabica Brésilienne vert	98,6666667	21,6666667	3,26598632	11,6218186
Robusta Vietnamiennne vert	37,8333333	13,3333333	19,3743817	8,6409876
Robusta Indienne vert	72	15,3333333	43,6531786	13,0025638
Robusta Cote-Divoire vert	94	18,1666667	10,8811764	7,65288617
Arabica Brésilienne torréfié	13,1666667	1	31,7642357	2,44948974
Robusta Vietnamiennne torréfié	0	0	0	0
Robusta Indienne torréfié	0,6666667	0	1,15470054	0
Robusta Cote-Divoire torréfié	3,6666667	0,6666667	6,50128192	1,03279556
Mélange torréfié	28,1666667	0,1666667	40,51872	0,40824829

Annexe 6:

Tableau : résultats des abondances des espèces fongiques dans le café arabica Brésilienne.

	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café vert	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café torréfié	Écart-type (δ) Café vert	Écart-type (δ) Café torréfié
<i>A.flavus</i>	7	6	1,41421356	14,6969385
<i>A.parsiticus</i>	1	0,66666667	1	1,03279556
<i>A.ochraceus</i>	68,4444444	19,6666667	27,5304545	31,5573552
<i>A.niger</i>	16,2222222	5	14,2413066	7,77174369
<i>A.tamaritii</i>	6,66666667	1,33333333	6,42910051	3,26598632
<i>A.versicolor</i>	2,66666667	2,33333333	3,05505046	5,71547607
<i>A.fumigatus</i>	3,11111111	0,33333333	5,38860251	0,81649658
<i>Penicillium.sp</i>	11,6666667	4	10,6926766	9,79795897
<i>Fusarium.sp</i>	6,44444444	1	4,85722067	2,44948974
<i>Curvularia.sp</i>	2,55555556	0	0,50917508	0
<i>Mucor.sp</i>	1,11111111	0,66666667	1,01835015	1,63299316

Tableau : résultats des abondances des espèces fongiques dans le café robusta Vietnamiéenne.

	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café vert	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café torréfié	Écart-type (δ) Café vert	Écart-type (δ) Café torréfié
<i>A.flavus</i>	1,33333333	0	2,06559112	0
<i>A.parsiticus</i>	1	0	2,44948974	0
<i>A.ochraceus</i>	4,5	0	5,28204506	0
<i>A.niger</i>	3,33333333	0	3,93276832	0
<i>A.tamaritii</i>	6,16666667	0	9,51665207	0
<i>A.fumigatus</i>	5	0	7,77174369	0
<i>Penicillium.sp</i>	1,66666667	0	2,33809039	0
<i>Fusarium.sp</i>	2,66666667	0	5,60951572	0
<i>Curvularia.sp</i>	3	0	7,34846923	0
<i>Mucor.sp</i>	2,5	0	1,97484177	0

Tableau : résultats des abondances des espèces fongiques dans le café robusta Indienne.

	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café vert	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café torréfié	Écart-type (δ) Café vert	Écart-type (δ) Café torréfié
<i>A.flavus</i>	1,66666667	0	4,0824829	0
<i>A.parsiticus</i>	1	0	1,09544512	0
<i>A.ochraceus</i>	27	0	36,589616	0
<i>A.niger</i>	21	0	24,4540385	0
<i>A.tamaritii</i>	2,66666667	0	6,53197265	0
<i>Penicillium.sp</i>	8,5	0,66666667	17,0146995	1,15470054
<i>Fusrium.sp</i>	3,5	0	6,12372436	0
<i>Curvularia.sp</i>	7,5	0	14,0534693	0
<i>Mucor.sp</i>	3,33333333	0	3,93276832	0

Tableau : résultats des abondances espèces fongiques dans le café Cote d'Ivoirienne.

	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café vert	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café torréfié	Écart-type (δ) Café vert	Écart-type (δ) Café torréfié
<i>A.flavus</i>	12	0,33333333	21,2790977	0,81649658
<i>A.parsiticus</i>	1,33333333	0,33333333	2,42212028	0,81649658
<i>A.ochraceus</i>	33,5	0,33333333	18,8865031	0,81649658
<i>A.niger</i>	14,3333333	1	19,1171825	2,44948974
<i>A.tamaritii</i>	10	0	13,7404512	0
<i>A.versicolor</i>	9	0	16,8641632	0
<i>Penicillium.sp</i>	19,8333333	1	20,7308144	1,67332005
<i>Fusrium.sp</i>	2,33333333	1	3,20416396	1,67332005
<i>Curvularia.sp</i>	17,1666667	0	24,3837378	0
<i>Mucor.sp</i>	1,16666667	0	0,98319208	0
<i>Rhizopus.sp</i>	3	0	7,34846923	0

Tableau : résultats des abondances espèces fongiques dans le café mélange torréfiée.

	Nombre d'apparition d'espèce fongique(%) Café torréfié	Écart-type (δ) Café torréfié
<i>A.flavus</i>	2,33333333	4,0824829
<i>A.parsiticus</i>	0,33333333	0,81649658
<i>A.ochraceus</i>	5,33333333	7,76316087
<i>A.niger</i>	11,8333333	28,9856286
<i>A.tamaritii</i>	1,83333333	3,12516666
<i>Penicillium.sp</i>	5,5	11,6232526
<i>Fusrium.sp</i>	3,83333333	4,83390801
<i>Mucor.sp</i>	0,66666667	1,63299316

Annexe 7:

Tableau : les températures de torréfaction pour chaque type de café.

Café	Temps (min)	Température
Arabica brésilienne	06	195°C
Robusta vietnamienne (canéphore)	10	210°C
Robusta indienne (canéphore)	09	195°C
Robusta cote d'ivoirienne (canéphore)	08	190°C

Annexe 8 :

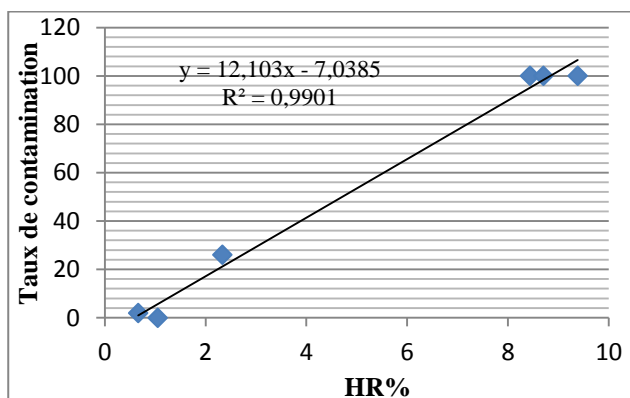


Fig.Correlation entre le taux de contamination et l'humidité relative (HR%) des échantillons du café Arabica Brésilienne.

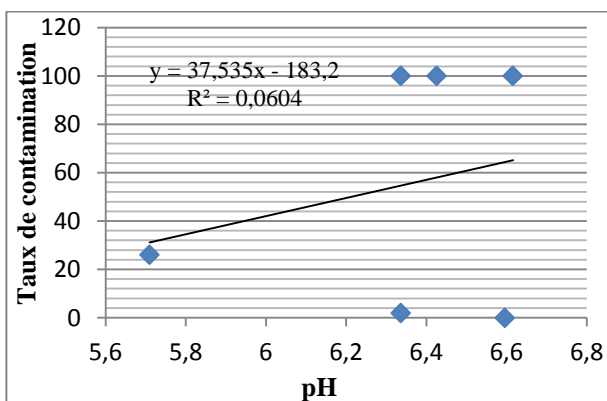


Fig.Correlation entre le taux de contamination et le pH des échantillons du café Arabica Brésilienne.

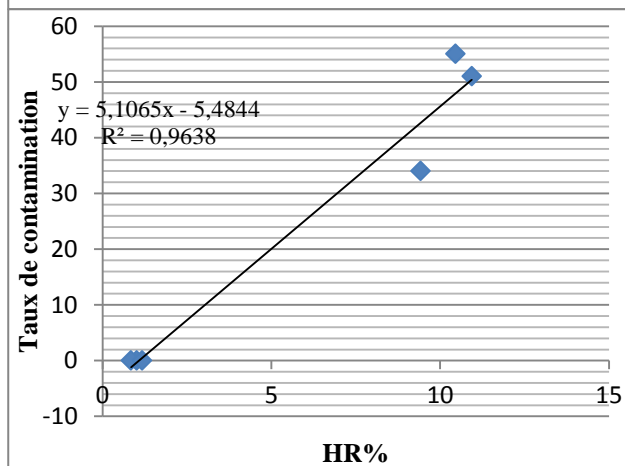


Fig.Correlation entre le taux de contamination et l'humidité relative (HR%) des échantillons du café Robusta Vietnamienne.

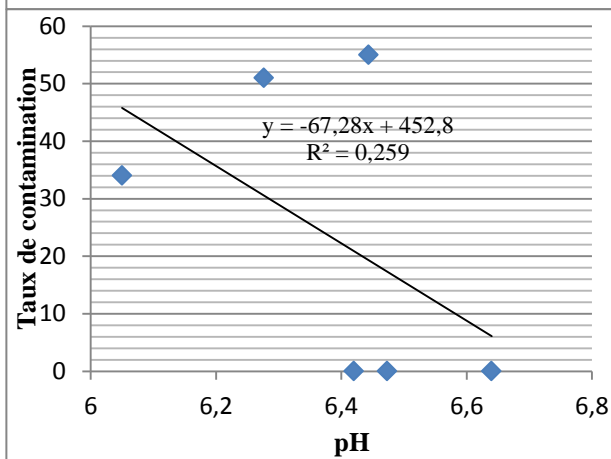


Fig.Correlation entre le taux de contamination et le pH des échantillons du café Robusta Vietnamienne.

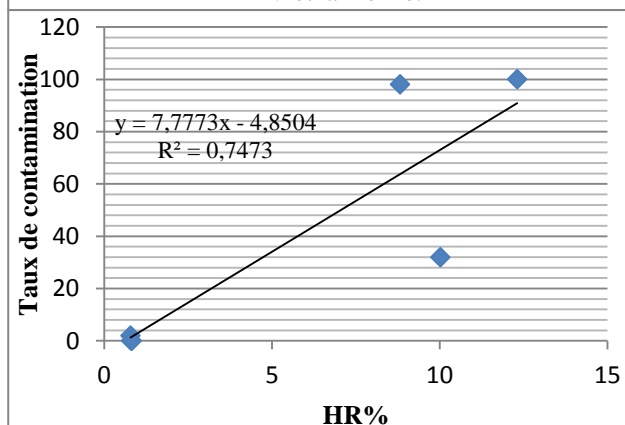


Fig.Correlation entre le taux de contamination et l'humidité relative (HR%) des échantillons du café Indienne.

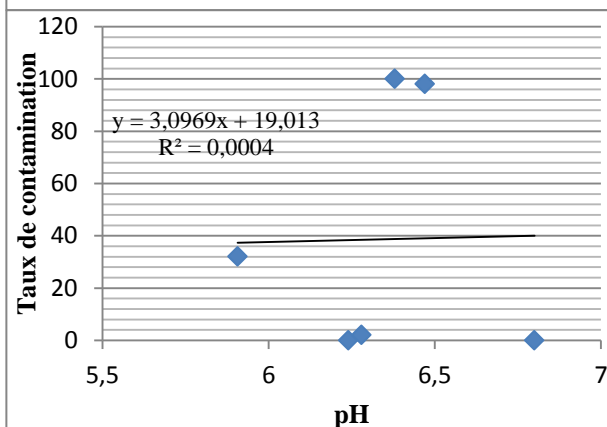


Fig.Correlation entre le taux de contamination et le pH des échantillons du café Robusta Indienne.

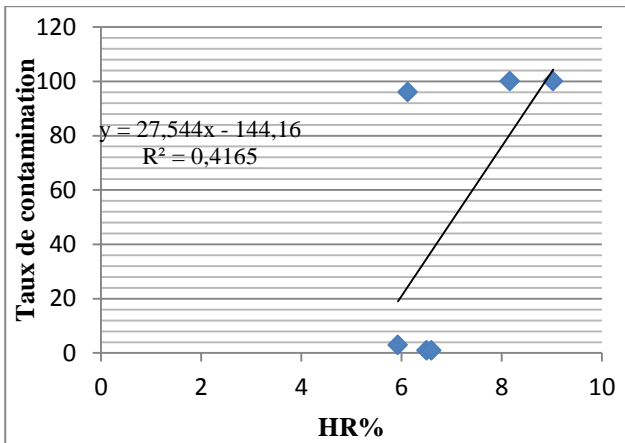


Fig. Correlation entre le taux de contamination et l'humidité relative (HR%) des échantillons du café Cote d'Ivoirienne.

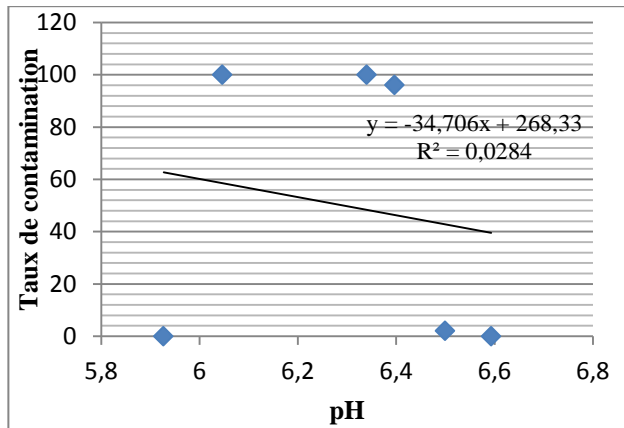


Fig. Correlation entre le taux de contamination et l'humidité relative (HR%) des échantillons du café Cote d'Ivoirienne.

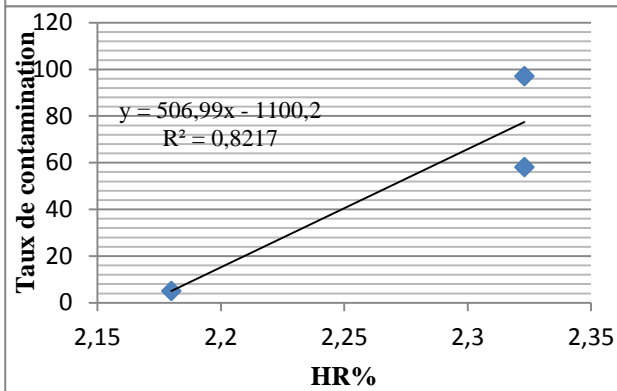


Fig. Correlation entre le taux de contamination et l'humidité relative des échantillons du Mélange torréfié Arabica 25% Robusta 75%

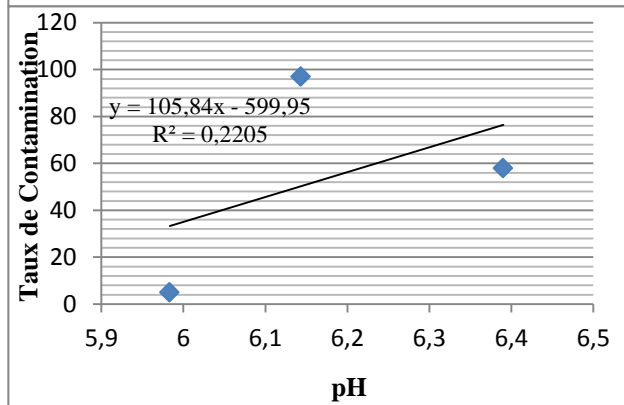


Fig. Correlation entre le taux de contamination et le pH des échantillons du Mélange torréfié Arabica 25% Robusta 75%

Tableau : résultats des calculs des concentrations de l'OTA en ppb des échantillons de café avec leur courbe d'étalonnage.

NB : Que ces résultats, courbe d'étalonnage et l'évaluation de la conformité du test, calculé par spreadsheet et vérifié par les spécifications du Kit décrit dans les instructions du lot utilisé.



Laboratory name CTS /EPH DE LAGHOUAT

SPREADSHEET for *I'screen* OCHRA (Code OR360-OR361)

rev.4

Lot.N°: 01012

Date: 17/05/2012

Op: 1

Notes:

Std. (ng/ml)	O.D.1	O.D.2	Mean	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	1,439	1,328	1,384	5,673	
0,05	1,454	1,272	1,363	9,442	98,518
0,1	1,310	1,265	1,288	2,471	93,061
0,3	1,075	0,814	0,945	19,540	68,269
1	0,701	0,695	0,698	0,608	50,452
2,5	0,484	0,480	0,482	0,587	34,839
5	0,462	0,421	0,442	6,567	31,912

Tableau : résultats des calculs des concentrations de l'OTA en ppb des échantillons de café avec leur courbe d'étalonnage.

NB : Que ces résultats, courbe d'étalonnage et l'évaluation de la conformité du test, calculé par spreadsheet et vérifié par les spécifications du Kit décrit dans les instructions du lot utilisé.



Laboratory name CTS/EPH LAGHOUAT

SPREADSHEET for *Celer* AFLA B1 (Code MA220-MA221)

rev.1

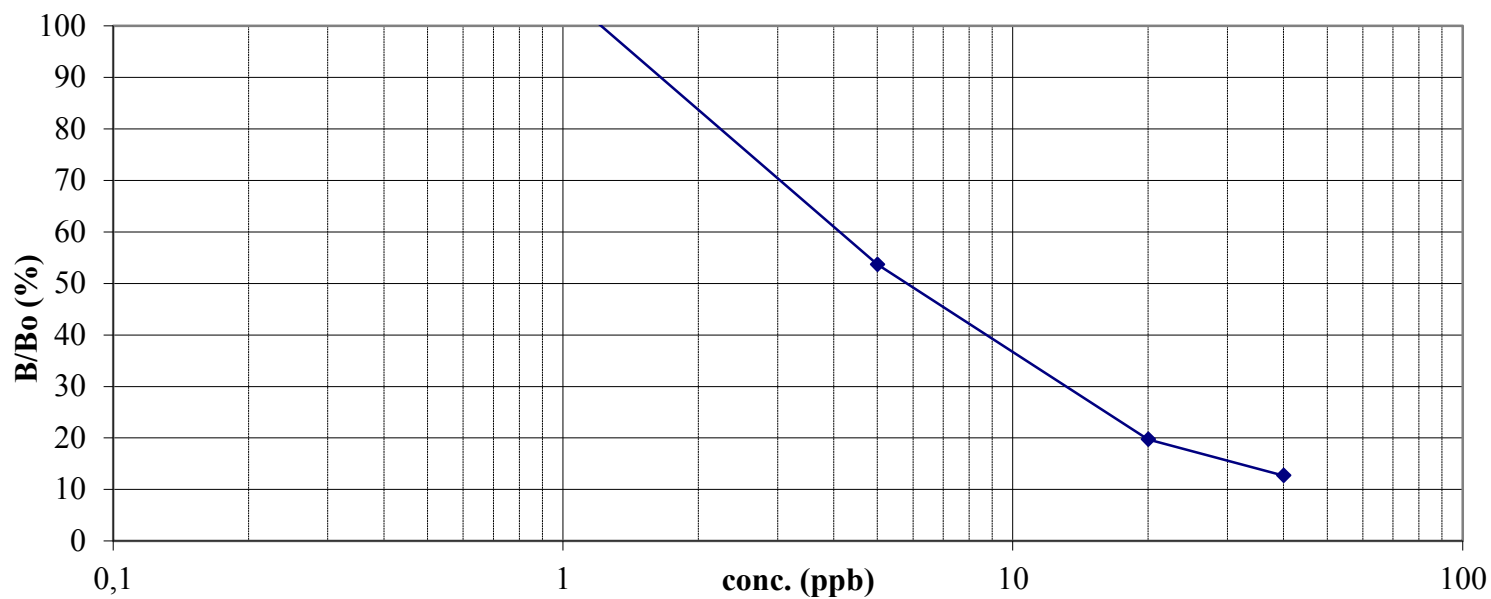
Lot.N°: 2111

Date: 22/05/2012

Op: N°1

Notes:

Std.(ppb)	O.D.	B/Bo(%)
0	2,777	
1	2,956	106,446
5	1,491	53,691
20	0,548	19,734
40	0,353	12,712



Intercepts

B/Bo(%)	O.D.	ppb
50	1,389	5,813

Sample		O.D.	B/Bo (%)	Cereals/Feed Nuts/Dried Fruits (ppb)
1	I ARABICA BRESILIENNE	2,482	89,377	1,683
2	II ARABICA BRESILIENNE	2,352	84,696	1,942
3	III ARABICA BRESILIENNE	2,387	85,956	1,868
4	I ROBUSTA VIETNAMIENNE	1,956	70,436	3,000
5	II ROBUSTA VIETNAMIENNE	1,795	64,638	3,580
6	III ROBUSTA VIETNAMIENNE	1,938	69,788	3,060
7	I ROBUSTA INDIENNE	1,875	67,519	3,279
8	II ROBUSTA INDIENNE	1,752	63,090	3,754
9	III ROBUSTA INDIENNE	1,714	61,721	3,914
10	I ROBUSTA COTE D'IVOIRIENNE	1,558	56,104	4,645
11	II ROBUSTA COTE D'IVOIRIENNE	1,284	46,237	6,778
12	III ROBUSTA COTE D'IVOIRIENNE	1,649	59,381	4,203
13			#DIV/0!	#DIV/0!

Annexe 10:

Tab., Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003, étude FAO alimentation et nutrition 81.

UNION EUROPÉENNE [EU] 2003									
États membres de l'UE: Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, Finlande, France, Grèce, Irlande, Italie, Luxembourg, Pays-Bas, Portugal, Suède et Royaume-Uni									
Pays candidats à l'adhésion à l'Union: Chypre, Estonie, Hongrie, Lettonie, Lituanie, Malte, Pologne, République Tchèque, Slovaquie et Slovénie (adhéreront à l'Union européenne le 1er mai 2004); les autres pays candidats - Bulgarie, Roumanie et Turquie - pourraient adhérer à l'Union à une date ultérieure.									
Produits d'alimentation humaine									
Produits	(Somme des mycotoxine(s))	Limite (µg/kg)	Base juridique	Autorité compétente	Méthode d'échantillonnage		Méthode d'analyse		Observations
					situation	réf.	situation	réf.	
arachides, fruits à coque et fruits déshydratés et produits transformés dérivés, destinés à la consommation humaine directe ou à servir d'ingrédients dans les produits d'alimentation humaine	afla B1	2	EU2	diverses	officielle	EU7	officielle	EU7	Des critères de résultat sont fixés pour les méthodes d'analyse. Une limite spécifique a été proposée pour l'afla B1 dans les aliments pour nourrissons et les aliments transformés à base de céréales destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, ainsi que dans les aliments de régime destinés aux nourrissons et servant à des fins médicales particulières; ces limites devraient entrer en vigueur en mai 2004.
	afla B1B2G1G2	4			EU9				
arachides à trier ou à soumettre à tout autre traitement avant de servir à la consommation humaine ou comme	afla B1 afla B1B2G1G2	8 15							

ingrédient dans les produits d'alimentation humaine									
fruits à coque et fruits déshydratés à trier ou à soumettre à tout autre traitement avant de servir à la consommation humaine (suite)	afla B1	5							
ou comme ingrédient dans les produits d'alimentation humaine	afla B1B2G1G2	10							voir ci-dessus
céréales (y compris sarrasin, Fagopyrum sp.) et produits transformés dérivés, destinés à la consommation humaine directe ou à servir d'ingrédients dans les produits d'alimentation humaine	afla B1 afla B1B2G1G2	2 4							
maïs à trier ou à soumettre à tout autre traitement avant de servir à la consommation humaine ou comme ingrédient dans les produits d'alimentation humaine	afla B1 afla B1B2G1G2	5 10	EU3						
épices: Capsicum spp. (fruits séchés,	afla B1 afla B1B2G1G2	5 10	EU4						

entiers ou moulus, y compris piment fort, poudre de piment, poivre de cayenne et paprika); Piper spp. (fruits, y compris pouvoir blanc et poivre noir); Myristica fragans (noix de muscade); Zingiber officinale (gingembre); Curcuma longa									
céréales en vrac (y compris riz et sarrasin en vrac)	ochratoxine A	5	EU4	diverses			EU9		Des critères de résultat sont fixés pour les méthodes d'analyse. Une limite spécifique a été proposée pour l'ochratoxine A1 dans les aliments pour nourrissons et les aliments (suite)
tous les produits dérivés des céréales (y compris les produits céréaliers transformés et les céréales en grains destinées à la consommation humaine directe)		3							
raisin déshydraté (raisin de Corinthe, raisin sec et raisin sec de Smyrne)	ochratoxine A	10	EU4	diverses	officielle			EU9	transformés à base de céréales destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, ainsi que dans les aliments de régime destinés aux nourrissons et servant à des fins médicales particulières; ces limites devraient entrer en vigueur en mai 2004.
jus et nectars de fruits, en particulier jus de pomme et jus de fruits	patuline	50	EU5		officielle	EU10	officielle	EU10	depuis le 1er novembre 2003; prévention et réduction de la contamination par la patuline [voir EU 11]; des

servant d'ingrédients dans d'autres boissons									critères de résultat sont fixés pour les méthodes d'analyse.
jus de fruits concentré après réhydratation selon instructions du fabricant		50							
spiritueux, cidre et autres boissons fermentées dérivées des pommes ou contenant du jus de pomme		50							
produits solides dérivés des pommes, y compris compote et purée, destinés à une consommation directe	patuline	25	EU5	diverses	officielle	EU10	officielle	EU11	
autres aliments pour nourrissons (tels que définis par l'article 1 de [EU1])		10							
produits céréaliers tels que consommés et autres produits céréaliers au stade de la vente au détail	DON	500	EU6						projet de recommandation de la Commission
farine utilisée comme matière première dans des produits d'alimentation humaine	DON	750	EU6						voir ci-dessus
Produits laitiers									
lait (lait cru, lait destiné à la	afla M1	0.05	EU2	Diverses	Officielle	EU7	officielle	EU7	Des critères de résultat sont fixés pour les méthodes

fabrication de produits laitiers et lait ayant subi un traitement thermique tel que défini par la Directive 92/46/CEE du Conseil, amendée par la Directive 94/71/CE du Conseil)									d'analyse. Une limite spécifique a été proposée pour l'afla M1 dans les préparations pour nourrissons et les aliments de suite, y compris le lait maternisé et le lait de suite; ces limites devraient entrer en vigueur en mai 2004.
Produits d'alimentation animale									
tous les matériaux entrant dans la composition des aliments pour animaux	afla B1	20	EU12	diverses	Officielle	EU14	Officielle	EU15 EU16	Contenu maximal par rapport à un produit d'alimentation animal ayant une teneur en eau de 12 %
aliments complets pour bovins, ovins et caprins, à l'exception de: - aliments complets pour bétail laitier - aliments complets pour veaux et agneaux		20							
aliments complets pour bétail laitier		5							
aliments complets pour veaux et agneaux		10	EU12	Diverses	officielle	EU14	officielle	EU15 EU16	Contenu maximal par rapport à un produit d'alimentation animal ayant une teneur en eau de 12 %
aliments complets pour les porcs et la volaille (à l'exception des jeunes animaux)		20							

autres aliments complets pour animaux		10							
aliments d'appoint pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments d'appoint pour le bétail laitier, les veaux et les agneaux)		20							
aliments d'appoint pour les porcs et la volaille (à l'exception des jeunes animaux)		20							
autres aliments d'appoint pour animaux		5							
tous les aliments pour animaux contenant des céréales non broyées	ergot du seigle *) (<i>Claviceps purpurea</i>)	1000000	EU13						Contenu maximal par rapport à un produit d'alimentation animal ayant une teneur en eau de 12 %; *) voir note en bas de page
ALGÉRIE [DZ] 2003									
Produits d'alimentation humaine									
arachides, fruits à coque, céréales	afla B1	10		MT	non officielle		officielle	DZ1	
	afla B1B2G1G2	20							
Produits d'alimentation animale									
aliments pour bétail	afla B1	20		MT	non officielle		officielle	DZ2	
MAROC [MA] 2003									
Produits d'alimentation humaine									
tous les produits d'alimentation humaine	afla B1	10							législation proposée par MA1
arachides, pistaches, amandes, huiles végétales en pâte, aliments									

pour enfants									
farine de blé fourragère		3							
son de blé		10							
huiles végétales, céréales, farine de blé fourragère (complète)									
jus de pomme (produits)	patuline	50							
céréales, huiles végétales	zéaralénone	200							
céréales	ochratoxine A	30							
Produits d'alimentation animale									
aliments simples pour animaux (sauf arachides, coprah, graines de coton, babassu, maïs et produits dérivés)	afla B1	50							législation proposée par MA1
arachides, coprah, graines de coton, babassu, maïs et produits dérivés		20							
aliments complets pour bovins, ovins et caprins (sauf bétail laitier, veaux et agneaux)		50							
aliments complets pour bétail laitier		5							
aliments complets		10							

pour veaux et agneaux									
aliments complets pour les porcins et la volaille (à l'exception des jeunes animaux)		20							
autres aliments complets pour les animaux		10							
aliments d'appoint pour bovins, ovins et caprins (sauf bétail laitier, veaux et agneaux)		50							
aliments d'appoint pour les porcins et la volaille (à l'exception des jeunes animaux)		30							
autres aliments d'appoint pour animaux, en particulier les animaux laitiers		10							
TUNISIE [TN] 2003									
Produits d'alimentation humaine									
tous produits	afla B1	2	TN1	MH-DHMPE	non officielle		non officielle	TN2	
Produits laitiers									
lait	afla M1	inconnue		ANCSEP			non officielle	TN2	

* Epuisé

** En préparation

Annexe 11:**I- Réactifs et produits chimiques:**

- Acide acétique (CHERMINOVA)
- Acide acétique (Cherminova, CH₃COOH)
- Acide ortho-phosphorique (H₃PO₄) min 85% PROLABO Merck
- Agar (VWR-PROLABO-09C110007-1KG)
- Célite (O₂Si) Quartz, Fluka Analytical.
- Chloroforme (SIGMA-ALDRICH-CHROMSLOV[®] -CHCl₃)
- Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄-MERCK-100g, Crist, très pure.)
- Ethanol (LABORATORY Reagent- BIOCHEM CHEMOPHARMA-C₂H₆O)
- Extrait de levure (FLUKA, Biochemika-70161-500g)
- Extrait de malt (FLUKA analytical-Biochemika 70145-500G)
- Fer II sulfate (RECTAPUR[™] –code article: 24240295)
- Glycérol (Riedel-deHaen-D-3016SeelZe1)
- Magnésium sulfate (MgSO₄ – BIOCHEM Chemopharma -500g)
- Méthanol (SIGMA-ALDRICH[®])
- Nitrate de sodium très pure (MERK)
- Kits d'ELISA (Celer AFLA B1 cod.MA221- I'screen OCHRA cod.OR361) Tecnalab Italie
- Papiers WATMAN N°1
- Papiers buvards
- Plaque CCM (FLUKA-Silica Gel\TLC-Cards 60778)
- PDA (SIGMA-ALDRICH-LIFE SCIENCE-P2182-250g)

- Phenol pure (Ridel-deHaen, 16016- C₆H₆O)
- Toluene (RIDEL-deHaen® - 24526)

II- Appareillages:

- Agitateur orbitale type Maker
- Autoclave semi-automatique (PBInternational ANNO 2007 Serial n° 028526)
- Bain-marie (MEMMERT Type : WNB9 –max 96 °C)
- Balance OHAUS B 610 S, (Mettler, type B6C 200, Mettere E Mettler)
- Balance analytique 10⁻⁴ (SARTORIUS, TE214S)
- Balance analytique 10⁻³ (KERN, Deutsch)
- Balance analytique 10⁻⁴ (KERN, Deutsch)
- Centrifugeuse moyenne ventilée type SIGMA Allemande
- CHAMBRE UV forte puissance pour 2 plaques CCM 20x20cm Type CAMMAG
- Incubateur (Incucell –MMM Group- LSIS- B2V /IC111, 55L)
- Lampe d'UV (SPECTROLINE® SERIAL N° 1282998)
- Laveur de microplaques d'ELISA ELx50 (Bio-Tek instruments) made in UK
- Lecteur de micro-plaques d'ELISA ELx800 UV (Bio-Tek instruments) made in UK
- Microscope-photonique trinoculaire (Leica, Leitz DM 2000)
- Microscope-photonique trinoculaire (ZEISS, Axio star)
- Micropipette fixe de 100 µl Type ISOLAB Gmbh
- Micropipette multicanaux réglable de 50µl à 100µl, Type BIOHIT
- Micropipette multicanaux réglable de 20 à 50µl, Type SOCOREX made in Swiss
- Mixeur WARING BLENDER Made in USA

- pH-mètre de paillas (Eutech 510)
- pH-mètre (HANNA instruments modèle 211)
- Pipette pump automatique volume 25ml
- Rotavapeur (BUCHI Rotavapor R_200 + chauffe Ballon Type ER BIBBY)

III- Milieux de cultures:

AFPA (*Aspergillus flavus-parasiticus* agar)

Extrait de levure	20g
peptone	10g
Citrate ferrique ammoniacal	0.5g
chloramphenicol	0.1g
Dichloran solution ethanolique à 0.2%	1 ml
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Czapek Concentre

KCL	5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	5 g
FeSO ₄	0.1g
NaNO ₃	30g
Eau distillée	100ml

CYA (Czapek Yeast Extract Agar)

	pH 7,3
Czapek Concentre	10ml
KH ₂ PO ₄	1g
Extrait de levure	5g
Saccharose	30g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

CDA (Czapek Dox Agar)

	pH 7,3
NaNO ₃	30g
KCL	5g
MgSO ₄	5g
FeSO ₄	0.1g
Eau distillée	100ml

Eau physiologique

NaCl	9g
------	----

Eau distillée	1000ml
G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)	pH 7,3
KH ₂ PO ₄	0.75g
Czapek Concentre	7.5ml
Extrait de levure	3.7g
Glycérol	250g
Agar	12g
Eau distillée	750ml
MEA (Malt Extract Agar)	
Extrait de malt en poudre	20g
Peptone	1g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
PDA (Potatoes Dextrose agar)	pH 5,6
Pomme de terre (macération 700ml de filtrat)	200g
Sucrose	10 g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
PDAac (Potatoes Dextrose agar acid)	pH 3,5
Acide lactique à 10% ou bien (Acide tartrique à 10% 9ml)	12ml
YES (Yeast Extract Sucrose)	
Saccharose	40g
Extrait de Levure	20g
Eau distillée	1000ml
Colorants	
Lactophénol	
Phénol pure cristallisé	100g
Acide lactique	100ml
Glycérol pure	100ml
Eau distillée	100ml
Bleu de coton	
Bleu de coton	0,05g
Lactophénol	100ml

IV Kits ELISA :

S.A.R.L. LIBIOS

Chemin de la Plagne

69210 Bully

France

Capital : 15 000 Euros

R.C.S. : 489 401 034 RCS Lyon

SIRET : 489 401 034 00017

Tél : +33 (0)4 74 26 85 17

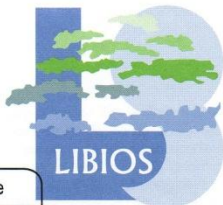
Fax : +33 (0)4 74 26 05 47

E-mail : info@libios.fr

Web : www.libios.fr

Facture / Invoice
FAC33992

Date	Code Client	Page
23/04/2012	LAGHOUATALG...	1/1



UNIVERSITE DE LAGHOUAT
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE
BP 37G ROUTE DE GHARDAIA
03000 LAGHOUAT
Algérie

Mode de règlement	Echéance	N/ld CEE : FR56489401034
VIREMENT ANTICIPE	23/04/2012	V/ld CEE :

Références : Votre commande confirmée par mail du 18 avril 2012 / Devis en Euros

Référence	Désignation	Quantité	P.U. HT	Montant HT	TVA
MA221	CELER AFLA B1 Kit immuno-enzymatique pour le dosage quantitatif de l'aflatoxine B1 dans diverses matrices alimentaires Conditionnement : 48 puits sécables	1,0	298,00	298,00	0
OR361	I'screen OCHRA Kit immuno-enzymatique pour le dosage quantitatif de l'Ochratoxine A dans diverses matrices Conditionnement : 48 puits	1,0	298,00	298,00	0

*Facture déjà payée
Lors de la date du 23/04/2012*

*Cede douanier : 38 22 090 000
Réactif de laboratoire non toxique
non dangereux.*

LIBIOS
Chemin de la Plagne
69210 BULLY
Tel 04 74 26 85 17
Fax 04 74 26 05 47
Mail info@libios.fr

Remarque : Bon de livraison - BL63841 du 23/04/2012

Pénalités de retard (taux annuel) : 15,00%
Escompte pour paiement anticipé (taux mensuel) : %

Bases HT	Remise	MT TVA	% TVA	Port	Totaux	Total TTC	Acompte	Net à payer
0	617,00	Tx:		21,00	H.T. : 596,00	TVA : 617,00		617,00

LIBIOS - Chemin de la Plagne - 69210 Bully - FRANCE - Tél : +33 (0)4 74 26 85 17 - Fax : +33 (0)4 74 26 05 47 - Mail : info@libios.fr - Site : www.libios.fr
SARL au capital de 15 000 € - Siret 489 401 034 00017 - RCS Lyon - APE 4618Z - TVA intra-communautaire FR56 489 401 034
RIB : 10278 07315 00020149901 65 (Crédit Mutuel - 52 avenue de la République - 69160 Tassin-la-Demi-Lune - FRANCE)
Bank details: IBAN: FR76 1027 8073 1500 0201 4990 165 - SWIFT Code: CMCIFR2A - Currency: Euros



CERTIFICATE OF CONFORMITY

MO 44 - PRO

Issued by
TECNA S.r.l. – Area Science Park
Padriciano, 99
34149 Trieste
Italy
Tel: 040 / 3755341
Fax: 040 / 3755343
e-mail: tecna@tecnalab.com
Internet: <http://www.tecnalab.com>

DATE: 24-01-2012

Tecna S.r.l. certifies that the product:



I'screen
OCHRA

Ochratoxin A ELISA kit
48 determinations
Cod. OR361

Lot. 01012

Exp: November 30th, 2012



R35

has been approved by the Quality Control Department and conforms with specifications stated in the instruction booklet.

Quality Control Responsible
Federica Vascotto

Since this certificate is electronically edited, the signature is not present.



CERTIFICATE OF CONFORMITY

MO 44 - PRO

Issued by
TECNA S.r.l. – Area Science Park
Padriciano, 99
34149 Trieste
Italy
Tel: 040 / 3755341
Fax: 040 / 3755343
e-mail: tecna@tecnalab.com
Internet: http://www.tecnalab.com



DATE: 28-11-11

Tecna S.r.l. certifies that the product:

Celer Aflatoxin B1 ELISA kit
 AFLA B₁ 48 determinations
Cod.MA221

Lot.02111 Exp: January 31 st, 2013



R35.R11-39/23/24/25

has been approved by the Quality Control Department and conforms with specifications stated in the instruction booklet.

Quality Control Responsible
 Federica Vascotto

Since this certificate is electronically edited, the signature is not present.

Résumé :

L'étude de l'état sanitaire des grains de cafés verts et torréfiés type: *Arabica* Brésilienne et *Canifora (Robusta)* Indienne, *Robusta* Vietnamienne, *Robusta* Cote d'Ivoirienne. commercialisé dans la région de Laghouat, et notamment pour l'étude de la myco-toxicoflore notamment certains moisissures filamenteux contaminants, des méthodes différentes mais complémentaires ont été utilisées: la méthode de buvard et buvard modifiée pour avoir le taux de contaminations superficielle et profonde des moisissures, dénombrements et culture sur milieu (CDA, PDAac), isolement et purification des souches contaminants et identification par méthode micro-culture et single spore, sélectionnerent des souches mycotoxinogènes et ochratoxinogènes, test du pouvoir mycotoxinogène sur milieu (YES), révélation et détection de l'ochratoxine A(OTA) par la méthode CCM (chromatographie sur couches minces), dosage et quantifications de l'ochratoxine A et de l'aflatoxine B₁ par méthode immuno-enzymatique (ELISA). Les résultats sont permis de mettre en évidence 13 espèces appartenant à différents champignons. La méthode du buvard modifiée s'avère plus intéressante et permet de détecter davantage le pourcentage de contamination interne (profonds). Les espèces fongiques les plus fréquentes sont: *Aspergillusochraceus*, *Aspergillusflavus*, *Aspergillusparasiticus*, *Aspergillusniger*, *Aspergillustamarii*, *Penicilliumsp*, *Fusariumsp*, suivies par *Curvulariasp*, *Mucorsp*, *Rhizopus sp*.

Mots clés: Café vert *Arabica* et *Canifora* (robusta) – Café torréfié – Ochratoxine A-Aflatoxine B₁ - CCM – ELISA.

ملخص :

دراسة الحالة الصحية لحبوب البن الأخضر والمحمص لأنواع: أرابيكا البرازيلية والكانيفورا نوعية (روبيستا) الهندية وروبيستا الفيتنامية، روبيستا ساحل العاج. التي تسوق في منطقة الأغواط، وهذا لدراسة المايكوتوكسيكوفلورا. بما في ذلك بعض الفطريات الخيطية الملوثة، تم استخدام طرق فحص مختلفة ولكنها متكاملة: طريقة ورق النشاف وورق النشاف المعدل وهذا للكشف على مستويات الإصابة بتلوثات العفنة السطحية والعميقة و طريقة الاستنبات على وسائط الزرع الصلبة (PDAac, CDA)، وطرق العزل والتنقية للعفنات و وسيلة الميكروكولتير لتحديد جنس العفنات المعزولة، وتقنية البوغ الواحد واختبار قدرة هذه السلالات لتوليف السموم الفطرية المستتبة في وسائط الزرع السائلة (YES)، وهذا لاضهار والكشف على وجود الأوكراتوكسين A والأفلاتوكسين B₁ بواسطة الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، والتقدير الكمي للأوكراتوكسين A والأفلاتوكسين B₁ في مختلف عينات البن المفحوصة بواسطة تقنية اليزا (ELISA). سمحت لنا النتائج المتحصل عليها من احصاء 13 نوعا تنتمي إلى مختلف العفنات. طريقة ورق النشاف المعدلة أثبتت نتائج مثيرة وهامة وهذا لانتاجها لنا فرصة الكشف عن نسبة التلوث الداخلي (العميق) لحبوب البن. الأنواع الفطرية الأكثر تواجدا:

Aspergillusochraceus, *Aspergillusflavus*, *Aspergillusparasiticus*, *Aspergillusniger*, *Aspergillustamarii*, *Penicilliumsp*, *Fusariumsp* ثم يليها *Curvulariasp*, *Mucorsp*, *Rhizopus sp*.

الكلمات المفتاحية: البن الاخضر ارابيكا و كانيفورا (روبيستا)، البن المحمص، الاوكراتوكسين A، الافلاتوكسين B₁، TLC، ELISA.

Abstract:

The study of the health status of green coffee beans and roasted types: Arabica Brazilian and Canifora(Robusta) Indian , Robusta Vietnami, Robusta Cote d' Ivorian . marketed in the region of Laghouat , particularly for the study of myco - toxicoflora including some filamentous fungi contaminants , of different but complementary methods were used: the method of blotting and blotting modified for the superficial and deep levels of contamination of mold counts and culture medium (PDAac,CDA) , isolation and purification of stem contaminants and identification method micro- culture and single spore of selectionnerent mycotoxinogenesis ochratoxinogenesis and strains test authority mycotoxinogenesis on medium (YES) , revelation and detection ochratoxin A and aflatoxin B₁ by the TLC method, dosage and quantification ochratoxin A and aflatoxin B₁ by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results allowed us to evidence 13 species belonging to different fungi. The modified method of blotting is more interesting and can detect more the proportion of internal contamination (inner). The most common fungal species: *Aspergillusochraceus*, *Aspergillusflavus*, *Aspergillusparasiticus*, *Aspergillusniger*, *Aspergillustamarii*, *Penicilliumsp*, *Fusariumsp*, followed by *Curvulariasp*, *Mucorsp*, *Rhizopus sp*.

Keywords: Green coffee Arabica and Canifora (robusta), roasted coffee, ochratoxin A, aflatoxin B₁, TLC, ELISA.