



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة مولاي الطاهر، سعيدة
Université MOULAY Tahar, Saida

كلية العلوم
Faculté des Sciences
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

**Mémoire Elaboré en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée**

Etude Mycologique et mycotoxicologique du thé vert (*Camelia Senensis*) commercialisé au niveau de la wilaya de Saïda

Présenté par:

- ❖ Maata Lina Ikram
- ❖ Daoudi Chaimaa

Soutenu le: 24/06/2026

Devant le jury composé de :

Présidente	Mme : CHIBANI Bahi Amar Amira
Encadrante	Mme : GHOUTI Dalila
Examineur	Mme : ALIOUI Latifa

Année universitaire 2025/2026



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ

أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ﴾

سورة البقرة (32)

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ



Remerciements

Avant tout, nous rendons grâce à Dieu qui nous a guidés et aidés à mener à bien ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadreuse Madame Ghouti Dalila, pour son soutien, ses conseils et sa précieuse supervision tout au long de ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance et notre gratitude à l'ensemble des professeurs de la Faculté des sciences naturelles et de la vie pour tout ce qu'ils ont fait pour nous, ainsi que pour les connaissances et les conseils qu'ils nous ont transmis tout au long de notre parcours universitaire.

Nous adressons également nos sincères remerciements et notre profonde gratitude aux membres du jury Madame CHIBANI Bahi Amar Amira et Madame ALIOUI Latifa pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce travail.

Nous remercions également les ingénieurs du laboratoire de microbiologie, en particulière Madame Hajira, pour leur aide, leur patience et leurs conseils constants tout au long de nos travaux en laboratoire.

Enfin, nous adressons nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace



C'est avec une profonde gratitude et les mots les plus sincères que je dédie ce modeste travail de fin d'études :

À ma mère, Toi qui as fait partie intégrante de mon parcours scolaire depuis ma tendre enfance. Mes réussites ne sont que le fruit de tes efforts, tout autant que des miens. Tu as cru en moi quand moi-même j'en doutais, tu as veillé tard pour que je puisse étudier dans de bonnes conditions, et tu m'as appris que la persévérance est la clé de tout. Ce travail est le reflet de ton amour et de tes sacrifices. Merci d'être mon premier et mon plus beau modèle.

À mon père, Pour ta sagesse, ta force tranquille et tes conseils toujours justes. Tu m'as appris à ne jamais baisser les bras et à regarder l'avenir avec courage. Ton soutien silencieux mais constant a été ma colonne vertébrale durant ces longues années d'études. Ce mémoire est aussi le tien.

À mes sœurs et mon frère, Vous qui êtes bien plus que ma famille : mes amis, mes confidents et mes compagnons de route. Sans vous, la vie serait bien moins douce et le chemin bien plus long. Merci pour votre présence lumineuse, vos encouragements et ces moments de complicité qui m'ont aidée à progresser. Vous êtes ma plus grande source de motivation.

À ma grand-mère et ma tante, Mes secondes mères. Vous avez contribué à mon éducation avec tendresse et bienveillance. Vos mains ont semé en moi les graines de la patience, du respect et de l'amour du savoir. Ces pages sont également les vôtres, en reconnaissance de tout ce que vous m'avez donné.

À ma binôme Chaimaa, Toi qui as été bien plus qu'une simple partenaire de travail. Merci d'avoir été à mes côtés durant ma maladie, de m'avoir soutenue, épaulée et portée dans les moments les plus difficiles. Ton aide, ton écoute et ta générosité m'ont permis de ne jamais abandonner. Merci d'avoir cru en nous et en ce travail. Cette réussite est aussi la tienne.

Lina Ikram



Dédicace

Louange à Dieu, par la grâce duquel s'accomplissent les bonnes œuvres, et qui m'a permis de mener à bien ce modeste travail malgré les circonstances difficiles auxquelles j'ai été confronté. À Lui soient la louange et la gratitude jusqu'à l'infini. C'est avec une profonde gratitude et une grande émotion que je dédie mes efforts :

À mon cher père « Mohammed » À celui que Dieu a fait une cause de Sa satisfaction, qui m'a appris que la vie est un combat et que ses armes sont la science et la connaissance, qui a été mon soutien, ma source d'appui et d'encouragement. Que Dieu inscrive tout cela dans la balance de tes bonnes actions et te récompense de tout bien en mon nom.

À ma mère : À celle à qui Dieu a placé le paradis sous les pieds, dont les prières précédaient mes pas, qui a été la lumière de mon chemin et mon soutien dans l'adversité. Je t'offre cette réussite avec fierté.

À mes chers frères et sœurs : Mon pilier qui m'a fortifiée, votre soutien, votre encouragement et votre présence à mes côtés en toutes circonstances.

À ma collègue « Lina » : Merci pour ta collaboration, ta patience et tes efforts, et pour ces pas que nous avons franchis ensemble dans la compréhension et la motivation. À celle qui s'est tenue à mes côtés dans les moments difficiles, alors que la maladie m'accablait, tu as été mon meilleur soutien et ma plus fidèle amie.

À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, j'adresse mes sincères remerciements et ma gratitude.

À moi-même : qui n'ai pas baissé les bras face aux difficultés et qui ai persévéré avec détermination pour réaliser mes ambitions futures.

Chaimaa

Table de Matériel

Remerciement

Dédicace

Liste des Figure

Liste des Tableaux

Liste des Photo

Liste Abréviation

Résumé

Introduction Générale1

Chapitre I : Généralités sur le Thé

I.1 Histoire et origines du thé3

I.1.1 L'origine légendaire du thé3

I.1.2 Origine géographique3

I.2 Définition du thé3

I.3 Classification botanique du thé5

I.4 Les différentes compositions chimiques du thé5

I.4.1 Composés phénoliques et catéchiques6

I.4.2 Alcaloïdes et acides aminés6

I.4.3 Vitamines et minéraux7

I.5 Les différents types de thé7

I.5.1 Classification générale7

I.5.2 Thé vert.....7

I.5.3 Thé noir8

I.5.4 Thé Oolong et thé Blanc	8
I.6 Histoire et origines du thé vert	9
I.7 Classification botanique du thé vert	9
I.8 Composition chimique du thé vert	9
I.9 Procédé de production du thé vert	9
I.9.1 La cueillette	9
I.9.2 Le Flétrissage (étalage)	10
I.9.3 La Fixation	10
I.9.4 Le roulage	10
I.9.5 Le séchage	10
I.10 Importance nutritionnelle et thérapeutique du thé vert	11
I.10.1 Importance nutritionnelle	11
I.10.2 Prévention des maladies Cardiovasculaires	12
I.10.3 Propriétés anticancéreuses	12
I.10.4 Effets sur le métabolisme et le diabète	12
I.10.5 Effets neuroprotecteurs et relaxants	12
I.11 Conditions de stockage du thé vert	13
I.11.1 Humidité et température	13
I.11.2 Lumière et oxygène	13
I.11.3 Durée de conservation	13
I.12 Microflore associée au thé vert	14
I.12.1 Microflore endogène et contaminante	14
I.12.2 Contamination fongique et mycotoxines	14
I.12.3 Impact de la transformation	14

Chapitre II : Étude mycologique

II.1 Définition de la mycologie	17
II.2 Définition de champignon	17
II.3 Classification des champignons	17
II.3.1 Ascomycètes	17
II.3.2 Basidiomycètes	17
II.3.3 Zygomycètes	18
II.3.4 Gloméromycètes	18
II.3.5 Chytridiomycètes	18
II.4 Caractères Généraux des champignons	19
II.5 Structure des champignons	20
II.5.1 Morphologie du système végétal (thalle)	20
II.5.2 Spores	21
II.6 Modes de vie des champignons	22
II.6.1 Le Saprophytisme	22
II.6.2 Le Parasitisme	22
II.6.3 La Symbiose	22
II.7 Besoins nutritionnels des champignons contaminés par le thé	22
II.7.1 Source de Carbone	22
II.7.2 Source d'azote	22
II.7.3 Éléments minéraux	22
II.7.4 Vitamines	23
II.8 Conditions de croissance des moisissures	23
II.8.1 Humidité (activité de l'eau - aw)	23

II.8.2 Température	23
II.8.3 Oxygène	23
II.8.4 pH (acidité moyenne)	23
II.9 Modèles de reproduction des champignons	23
II.9.1 Reproduction sexuée	23
II.9.2 Reproduction asexuée	24
II.10 Développement de champignons filamenteux	24
II.10.1 Germination des germes (spores)	24
II.10.2 Croissance apicale	24
II.10.3 Formation de mycélium	25
II.10.4 Sporulation	25
II.11 Culture et identification des champignons	26
II.11.1 La mise en culture	26
II.11.2 Examen macroscopique	26
II.11.3 Technique de Microculture (Culture sur lame)	26
II.11.4 Examen microscopique au Bleu de Méthylène	26
II.12 Principaux genres fongiques contaminant le thé	27
II.12.1 <i>Aspergillus</i>	27
II.12.2 <i>Penicillium</i>	28

Chapitre III : Étude mycotoxicologique

III.1 Définition et origine de mycotoxines	32
III.2 Principale mycotoxine associée au thé	32
III.2.1 Les Aflatoxines	32
III.2.2 Les maladies causées par les aflatoxines	33

III.2.3 L'ochratoxine A (OTA)	34
III.2.4 Les maladies causées par l'ochratoxine	35
III.2.5 La patuline	36
III.2.6 Les maladies causées par la patuline	37
III.2.7 La trichothécine	38
III.2.8 Les maladies causées par les trichothécines	39
III.3 Les voies de contamination chez l'homme	40
III.3.1 Voie respiratoire	40
III.3.2 Voie cutanée	40
III.3.3 La voie digestive (ingestion)	40
III.4 Prévention des mycotoxines	41
III.4.1 Prévention primaire	41
III.4.2 Prévention secondaire	42
III.4.3 Prévention tertiaire	42
III.5 Les méthodes pour contrôler les mycotoxines	42
III.5.1 Méthodes physiques	42
III.5.2 Méthodes chimiques	42
III.5.3 Méthodes biologiques	42
III.6 Les méthodes de détection des mycotoxines	43
III.6.1 Détection par chromatographie sur couche mince (CCM)	43
III.6.2 Chromatographie haute performance	43
III.6.3 ELISA	44

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

IV. 1. Présentation du questionnaire de consommation (enquête).....	46
a. Échantillons utilisés.....	46
b. Milieux de culture.....	47
IV.2 Analyses physico-chimiques.....	48
IV.2.1 Déterminez le niveau d'humidité.....	48
IV.2.2 Déterminez le pH.....	48
IV.3Analyses mycologique.....	49
IV.3.1 Méthode de dilution.....	49
IV.3.2 Isolement et dénombrement de la flore fongique sur milieux PDA et CDA.....	49
IV.3.3 Identification des isolats.....	50
IV.3.4 Identification macroscopique.....	50
IV.3.5 Repiquage et purification des souches.....	51
IV.3.6 Conservation des isolats fongiques.....	51
IV.3.7 Identification des moisissures.....	51
IV.3.8 Identification des genres.....	52
IV. 3.9 l'identification des espèces <i>Pénicillium</i> et <i>Aspergillus</i>	53
IV. 3.9.1 Identifier les types d' <i>Aspergillus</i>	54
IV. 3.9.2 Identifier les types de <i>Pénicillium</i>	54
IV.4 Analyse mycotoxilogique.....	56
IV.4.1 Ensemencement sur milieu YES.....	56
IV.4.2 Filtration.....	57
IV.4.3 Séparation chromatographique (CCM).....	59

Chapitre V : Résultat

V.1 Les résultats relatifs aux variétés de thé les plus consommées.....	61
V.2 Les résultats physico-chimiques.....	61
V.2.1 Humidité.....	62
V.2.2 PH.....	62
V.3 Les résultats mycologiques du thé vert.....	64
V.3.1 Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de thé vert.....	64
V.3.2 Identification des souches fongiques isolées.....	65
V.3.2.1 Dénombrement.....	65
V.3.2.2 Identification macroscopique.....	66
V.3.3 Identification microscopique des champignons.....	73
V.4 Résultat mycotoxique.....	79
V.4.1 Ensemencement sur milieu liquide YES.....	79
V.4.2 Identification des espèces.....	80
V.4.3 La chromatographie sur couche mince (CCM).....	96
V.4.3.1 Résultats de l'analyse par CCM des métabolites secondaires.....	97
Discussion	99
Conclusion Générale	107
Référence bibliographique	110
Annexe	126

Liste des Figure

Figure 1 : (A) Morphologie générale de <i>Camellia sinensis</i> (Source : Pixabay.com), (B) Structure anatomique de la feuille de thé (coupe transversale) (Wheeler, 2019)	4
Figure 2 : Structures cycliques de base de divers flavanols (Mahmood et al., 2010)	6
Figure 3 : Aspects morphologiques des principaux types de thé : (A) Thé vert, (B) Thé noir, (C) Thé blanc et (D) Thé Oolong (Source : Pixabay.com; Unsplash.com).....	8
Figure 4 : illustration des cinq principales étapes de la transformation du thé vert (Shi et al., 2021)	11
Figure 5 : Classification phylogénétique des champignons (Tedersoo, L., et al., 2018)	19
Figure 6 : Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe & Stevens, 2008).....	20
Figure 7 : Représentation schématique de l'hyphe (Decocq, 2011).....	21
Figure 8 : Cycle de vie des moisissures (Deffontaine, 2015).....	25
Figure 9 : (A) Microscope image d' <i>Aspergillus</i> (Pickova et al., 2021). (B) Morphologie d' <i>Aspergillus</i> (Klich, 2009).....	27
Figure 10 : Microscope images de <i>Penicillium</i> (Samson et al., 2004) et Morphologie de <i>Penicillium</i> (Samson et al., 2010).....	29
Figure 11 : Structures chimiques des principales mycotoxines : Aflatoxines, Patuline, Ochratoxine A et Trichothécènes (Bennett & Klich, 2003).....	39
Figure 12 : Distribution systémique des mycotoxines et impacts sur les organes cibles (Adaptée de Sudakin, 2003).....	41
Figure 13 : Types d'inoculation dans les différents milieux de culture.....	55
Figure 14 : Diagramme circulaire montrant les résultats relatifs aux variétés de thé les plus consommées.....	61
Figure 15 : Taux d'humidité des différents échantillons de thé vert analysés.....	62

Figure 16 : Diagrammes à barres des valeurs de pH pour les quatre types de thé les plus

Consommés.....63

Figure 17 : Diagramme circulaire de la flore fongique contaminant le thé le plus

consommé.....64

Figure 18 : Distribution relative du nombre de colonies fongiques selon les échantillons de thé
vert.....66

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification botanique du thé (Prince et al., 2022) (Mondal, 2020)	5
Tableau 2 : Principales espèces d' <i>Aspergillus</i> et leurs mycotoxines associées.....	28
Tableau 3 : Principales espèces de <i>Penicillium</i> et leurs mycotoxines associées.....	29
Tableau 4 : Dénombrement des souches fongiques isolées.....	65
Tableau 5 : Aspects macro-microscopique et les caractéristiques des souches.....	67
Tableau 6 : Caractères microscopiques des souches isolées des échantillons du thé.....	75
Tableau 7 : Identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> par la méthode de « Single spore ».....	81
Tableau 8 : Identification des 15 souches fongiques sur différents milieux de culture.....	87
Tableau 9 : Les résultats de CCM et le Rapport frontal Rf	97

Liste des Photo

Photo 1 : (A) les types de thé les plus consommés dans la wilaya de Saïda. (B) le lieu d'achat de ces thés (la supérette ADEM shop).....	47
Photo 2 : Différents échantillons de thé en cours de séchage dans un four Pasteur.....	48
Photo 3 : Mesure de pH d'un échantillon par le pH mètre.....	49
Photo 4 : Ensemencement des dilutions sur milieux PDA et CDA.....	50
Photo 5 : Conservation des isolats dans des tubes inclinés.....	51
Photo 6 : Identification des genres par la méthode HARIS.....	52
Photo 7 : coloration et observation microscopique des isolats.....	53
Photo 8 : la méthode de la spore unique (single spore) sur milieu semi-solide.....	53
Photo 9 : Ensemble de boîtes de Pétri contenant quatre milieux différents pour l'identification des espèces fongiques.....	55
Photo 10 : Ensemencement des souches d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> sur milieu YES.....	57
Photo 11 : Filtration de biomasse formée sur le milieu YES.....	57
Photo 12 : Extraction et concentration de l'extrait qui contient des métabolites secondaires....	58
Photo 13 : la chromatographie surcouche mince (CCM) des mycotoxines.....	59
Photo 14 : Production de biomasse fongique sur milieu YES en vue de l'analyse toxigène....	80
Photo 15 : détection des souches productrices de mycotoxine sous UV.....	96

Liste Abréviation

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATA : Aléucie Toxique Alimentaire

aw : activité de l'eau

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDA : Czapek Dextrose Agar / Czapek Dox Agar

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CPA : Acide Cyclopiazonique

CYA : Czapek Yeast Extract Agar / Czapek Yeast Autolysate Agar

DON : Déoxynivalénol ·

EC : épicatechine

ECG : épicatechine-3-gallate

EGC : épigallocatechine

EGCG : épigallocatechine-3-gallate

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FMAT : flore mésophile aérobie totale ·

G25N: Glycerol 25% Nitrate Agar

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LDL: low-density lipoprotein

MEA: Malt Extract Agar

MPA : Acide Mycophénolique

OTA : Ochratoxine A

OTB: Ochratoxine B

OTC: Ochratoxine C

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDA: Potato Dextrose Agar

PH : potentiel hydrogène

Rf : Rapport frontal

T-2 : Toxine T-2

UFC/g : unité formant colonie par gramme

UV : ultraviolet

VHB : Virus de l'Hépatite B

YES : Yeast Extract Sucrose

Résumé

Le thé vert (*Camellia sinensis*) est mondialement valorisé pour ses propriétés préventives et thérapeutiques. Néanmoins, ses bénéfices sanitaires peuvent être altérés par des contaminations fongiques au cours des étapes de production, favorisant la dégradation de la matrice et la synthèse de mycotoxines délétères pour le consommateur. Cette étude a pour objectifs d'identifier la mycoflore contaminante de plusieurs variétés de thé vert commerciales (Al-Barad, Al-Raqim, Al-Marwan, Al-Diyaf) et d'évaluer leur potentiel mycotoxinogène. Une enquête préliminaire portant sur les habitudes de consommation locale (n = 633 réponses) a permis de sélectionner les quatre variétés les plus plébiscitées, le thé Al-Barad arrivant en tête avec 540 suffrages. L'analyse des paramètres physico-chimiques des échantillons a révélé des valeurs de pH comprises entre 5,30 et 5,53, ainsi que des taux d'humidité oscillant entre 2,19% et 5,05%. L'évaluation de la charge fongique globale a mis en évidence une contamination maximale chez la variété Al-Raqim ($6,4 \times 10^5$ UFC/ml), suivie d'Al-Marwan ($3,3 \times 10^5$ UFC/ml), d'Al-Barad ($2,1 \times 10^5$ UFC/ml) et d'Al-Diyaf (2×10^5 UFC/ml). Après isolement et purification, l'examen macroscopique et microscopique par microculture a permis d'affilier les isolats à quatre genres principaux : *Aspergillus* (7 souches), *Penicillium* (8 souches), *Mucor* (1 souche) et *Rhizopus* (1 souche). L'inoculation sur milieux sélectifs spécifiques a conduit à l'identification de 15 espèces distinctes, parmi lesquelles : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* et *Penicillium corylophilum*. Enfin, l'évaluation du potentiel d'expression de métabolites secondaires toxiques a été réalisée par culture en milieu liquide YES pendant 14 jours, suivie d'une analyse par chromatographie en couche mince (CCM). Les profils chromatographiques ont confirmé la présence de mycotoxines majeures, notamment l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A. Ces résultats soulignent l'impérieuse nécessité d'instaurer une surveillance mycologique et mycotoxicologique rigoureuse de la filière du thé vert afin de garantir la sécurité sanitaire des consommateurs.

Mot clé : thé vert, contamination fongique, mycotoxines, CCM, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Abstract

Green tea (*Camellia sinensis*) is globally valued for its preventive and therapeutic properties. However, its health benefits can be altered by fungal contamination during production stages, promoting the degradation of the matrix and the synthesis of mycotoxins harmful to the consumer. This study aims to identify the contaminating mycoflora of several commercial green tea varieties (Al-Barad, Al-Raqim, Al-Marwan, Al-Diyaf) and to evaluate their mycotoxinogenic potential. A preliminary survey on local consumption habits (n = 633 responses) allowed the selection of the four most popular varieties, with Al-Barad tea coming first with 540 votes. Analysis of the physicochemical parameters of the samples revealed pH values between 5.30 and 5.53, as well as moisture levels ranging between 2.19% and 5.05%. Assessment of the total fungal load revealed maximum contamination in the Al-Raqim variety (6.4×10^5 CFU/ml), followed by Al-Marwan (3.3×10^5 CFU/ml), Al-Barad (2.1×10^5 CFU/ml), and Al-Diyaf (2×10^5 CFU/ml). After isolation and purification, macroscopic and microscopic examination by microculture allowed the isolates to be affiliated with four main genera: *Aspergillus* (7 strains), *Penicillium* (8 strains), *Mucor* (1 strain), and *Rhizopus* (1 strain). Inoculation on specific selective media led to the identification of 15 distinct species, including: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, and *Penicillium corylophilum*. Finally, the evaluation of the potential for expression of toxic secondary metabolites was carried out by culture in YES liquid medium for 14 days, followed by analysis by thin layer chromatography (TLC). The chromatographic profiles confirmed the presence of major mycotoxins, notably aflatoxin B1 and ochratoxin A. These results underscore the urgent need to establish rigorous mycological and mycotoxicological monitoring of the green tea sector to ensure the health safety of consumers.

Keywords: green tea, fungal contamination, mycotoxins, CCM, *Aspergillus*, *Penicillium*

المخلص

الشاي الأخضر (*Camellia sinensis*) يُقدَّر عالميًا لخصائصه الوقائية والعلاجية. ومع ذلك، يمكن أن تتأثر فوائده الصحية بالتلوث الفطري خلال مراحل الإنتاج، مما يعزز تدهور المادة الخام وتخليق السموم الفطرية الضارة بالمستهلك. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد الميكروفلورا الفطرية الملوَّعة لعدة أنواع من الشاي الأخضر التجارية (البراد، الرقيم، المروان، الضياف) وتقييم قدرتها على إنتاج السموم الفطرية. أسفر تحقيق أولي حول عادات الاستهلاك المحلية (عدد الاستجابات = 633) عن اختيار الأنواع الأربعة الأكثر تفضيلاً، حيث جاء شاي البراد في المقدمة بـ 540 صوتاً. كشف تحليل المعايير الفيزيائية والكيميائية للعينات عن قيم أس هيدروجيني (pH) تتراوح بين 5.30 و 5.53، بالإضافة إلى نسب رطوبة تتراوح بين 2.19% و 5.05%. أظهر تقييم الحمل الفطري الإجمالي تلوثاً أقصى في صنف الرقيم (6.4×10^5 وحدة تشكيل مستعمرة/مل)، يليه المروان (3.3×10^5)، ثم البراد (2.1×10^5)، وأخيراً الضياف (2×10^5). بعد العزل والتنقية، أتاح الفحص العياني والمجهري عبر الزرع المجهرى تصنيف العزلات إلى أربعة أجناس رئيسية:

(سلالة واحدة) *Rhizopus* et (سلالة واحدة) *Mucor*, (سلالات 8) *Penicillium*, (سلالات 7) *Aspergillus*

أدى التلقيح على الأوساط الانتقائية المحددة إلى التعرف على 15 نوعاً متميزاً، من بينها:

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* et *Penicillium corylophilum*.

أخيراً، تم تقييم قدرة التعبير عن المستقلبات الثانوية السامة عبر الزرع في الوسط السائل YES لمدة 14 يوماً، يليها تحليل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) أكدت الملامح الكروماتوغرافية وجود سموم فطرية كبرى، وبالأخص الأفلاتوكسين B1 والأوكراتوكسين A. تبرز هذه النتائج الحاجة الملحة لوضع مراقبة فطرية وسمية فطرية صارمة لقطاع الشاي الأخضر لضمان السلامة الصحية للمستهلكين.

الكلمات المفتاحية: الشاي الأخضر ، التلوث الفطري ، السموم الفطرية. *Aspergillus* ، *Penicillium* ، CCM

Introduction

Le thé vert, extrait des feuilles de la plante *Camellia sinensis*, est considéré comme l'une des boissons les plus populaires et les plus consommées au monde (**Diby et al, 2017**), car il occupe une place importante dans la consommation quotidienne de plus de 30 % dans de nombreux pays (**Statista, 2018**). Le thé vert est une boisson riche en polyphénols, notamment en catéchines, qui lui confèrent une activité antioxydante car elle n'est pas soumise à la fermentation (**Tiwari, 2005**), qui joue un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires, en améliorant le taux de cholestérol en plus de ses propriétés qui inhibent la croissance de certains micro-organismes et de certains types de cancer (**Sedova et al., 2018**).

Cependant, ces bienfaits pour la santé peuvent être sous-estimés en raison de la présence de polluants chimiques nocifs. Cette pollution peut survenir lors de différentes étapes de la chaîne de production, comme la culture, la récolte, le séchage, le transport et le stockage, notamment dans des conditions inappropriées en termes d'humidité, de température et de ventilation, particulièrement en ce qui concerne les mycotoxines (**Li et al., 2013**). Les mycotoxines font partie des risques chimiques non biotiques les plus importants qui menacent la sécurité du thé. Ce sont des métabolites produits par certains types de champignons, à savoir les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, la zéaralénone, la patuline et le déoxynivalénol. Les mycotoxines les plus dangereuses trouvées dans le thé vert sont les aflatoxines et l'ochratoxine A (**Sedova et al., 2018**).

Au niveau mondial, l'intérêt scientifique pour l'étude de la contamination fongique du thé augmente, mais à Saïda, les études dans ce domaine sont encore rares ou limitées, même s'il s'agit de la boisson la plus consommée au quotidien.

Ce travail vise donc à contribuer à l'évaluation de la sécurité sanitaire du thé vert commercialisé localement dans la région de Saïda à travers :

- Mener une enquête par questionnaire préliminaire pour déterminer les types de thé les plus consommés et sélection d'échantillons pour une étude.

- Collecte d'échantillons de thés commerciaux.
- Réaliser une étude microbiologique pour isoler et identifier les champignons présents, notamment les espèces productrices de toxines comme *Aspergillus* et *Penicillium*.
- Analyse des mycotoxines afin détecter leur présence.
- Relier les résultats de l'étude microbiologique aux résultats de toxicologie pour d'évaluer la qualité du thé et les risques sanitaires qui y sont associés.

Cette situation soulève une problématique majeure. Malgré les propriétés uniques du thé vert et ses nombreux bienfaits pour la santé, nous ne pouvons ignorer les risques potentiels liés à sa consommation, notamment la présence de champignons, en particulier toxiques. Dans quelle mesure le thé vert commercialisé dans l'État de Saïda est-il exposé à la contamination fongique, et dans quelle mesure ces champignons isolés sont-ils capables de produire des mycotoxines ?

Chapitre I

Généralités sur le Thé

Camellia sinensis

I.1 Histoire et origines du thé

I.1.1 L'origine légendaire du thé

Selon une légende chinoise, le thé aurait été découvert accidentellement par l'empereur Shen Nong en 2737 av. J.-C. Alors qu'il faisait bouillir de l'eau, des feuilles d'un arbuste tombèrent dans sa théière, créant ainsi une boisson parfumée (Vitaux, 2015). La légende raconte que l'empereur goûta diverses plantes pour leurs propriétés médicinales, et que le thé fut ainsi considéré comme médicament avant de devenir une boisson. (Vitaux, 2015).

I.1.2 Origine géographique

Le théier, *Camellia sinensis*, est originaire d'une région située entre le sud-ouest de la Chine, le nord du Myanmar et le nord-est de l'Inde (Meegahakumbura et al., 2018).

Des études génétiques ont confirmé que les plus anciens centres de diversité du thé se trouvent dans la région du Yunnan en Chine et dans l'État indien du Nagaland (Wambulwa et al., 2021). Le thé a été domestiqué vers 3000 av. J.-C (Wambulwa et al., 2021).

Les tombes chinoises constituent les plus anciennes preuves de l'existence du thé. Sous la dynastie Han (206 av. J.-C. - 220 apr. J.-C.), on a retrouvé du thé dans des vases funéraires (Lu et al., 2016).

Sous la dynastie Tang en Chine (618-907 ap. J.-C.), l'usage du thé évolua considérablement, passant de médicament à boisson, notamment parmi les lettrés, les moines bouddhistes et les taoïstes, ce qui modifia son statut dans la société (Vitaux, 2015).

Le thé se répandit ensuite dans le reste de l'Asie par les routes commerciales, puis dans le reste du monde grâce aux explorateurs et colons européens à partir du XVI^e siècle (Wambulwa et al., 2021).

I.2 Définition du thé

Le thé rivalise avec l'eau en termes de popularité, se classant deuxième au niveau mondial. Plus de 50 pays cultivent le théier (Khan & Mukhtar, 2018).

Le thé est obtenu par infusion des feuilles du théier (*Camellia sinensis*). Il existe plusieurs types de thé (vert, noir, blanc et Oolong). Cependant, contrairement à une idée reçue, tous ces types proviennent de la même plante. La différence entre eux ne réside pas dans la plante elle-

même, mais dans les différents niveaux d'oxydation enzymatique appliqués aux feuilles après la récolte, ce qui entraîne des différences de goût, de couleur et d'arôme (Zhang et al., 2019).

Le théier (*Camellia sinensis*) existe à l'état naturel sous deux formes : *Camellia sinensis* var. *sinensis*, caractérisée par ses petites feuilles et sa capacité à résister au froid, ce qui lui permet de pousser dans les régions montagneuses et tempérées ; et *Camellia sinensis* var. *assamica*, aux feuilles larges, qui nécessite un climat chaud et tropical (Chen et al., 2012).

Ces deux variétés ont des habitats de croissance différents : var. *sinensis* est principalement cultivée en Chine, au Vietnam et au Japon, et est privilégiée pour la production de thé vert. var. *assamica* a été découverte dans la région d'Assam en Inde et est principalement utilisée pour la production de thé noir dans des régions comme l'Inde, le Kenya et le Sri Lanka (Xia et al., 2020)



Figure 1 : (A) Morphologie générale de *Camellia sinensis* (Source : Pixabay.com), (B) Structure anatomique de la feuille de thé (coupe transversale) (Wheeler, 2019)

I.3 Classification botanique du thé

Le théier est classé dans la famille des Théacées et, selon les classifications botaniques modernes (**Prince et al., 2022**), il suit une hiérarchie précise, du règne à l'espèce. Malgré la diversité du genre *Camellia*, qui comprend plus de 200 espèces, l'espèce dominante dans la production mondiale est *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (**Mondal, 2020**).

Tableau 1 : classification botanique du thé (Prince et al., 2022) (Mondal, 2020)

Rang taxonomique	Nom scientifique
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Ericales
Famille	Théaceae (Théacées)
Genre	<i>Camellia</i>
Espèce	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze

Du point de vue taxonomique, nous distinguons le genre de *Camellia* de nombreux autres genres grâce à des critères morphologiques et évolutifs tels que la forme des fleurs et aussi les caractéristiques génétiques (**Zhang et al., 2021**).

I.4 Les différentes compositions chimiques du thé

Comme plante riche en métabolites secondaires, le thé est constitué en grande partie de produits aromatiques et amers, dont la composition chimique est variable en fonction du spécifique de la feuille, de son âge, du terroir de plantation, etc. Comme tout organisme vivant, le thé contient une grande quantité d'eau, en moyenne 75 à 80 %. La matière sèche du thé est constituée par les groupes suivants de substances chimiques : 20 à 35% de polyphénol ; 25% de glucide ; 15% de protéines et 2-3% de lipides. Il contient également des alcaloïdes puriques, des acides aminés libres, des vitamines et des minéraux (**Baranauskaite et al., 2022**).

I.4.1 Composés phénoliques et catéchiques

Les polyphénols sont au cœur de la composition du thé. En fait, ils représentent la plus grande part en poids sec. Ce groupe, qu'on appelle aussi flavanols ou catéchines, donne au thé sa capacité antioxydante bien connue. Parmi les catéchines présentes, on en distingue surtout quatre : l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), l'épigallocatechine (EGC), l'épicatéchine-3-gallate (ECG) et l'épicatéchine (EC). Ces composés forment le cœur du profil chimique du thé (Cabrera *et al.*, 2021).

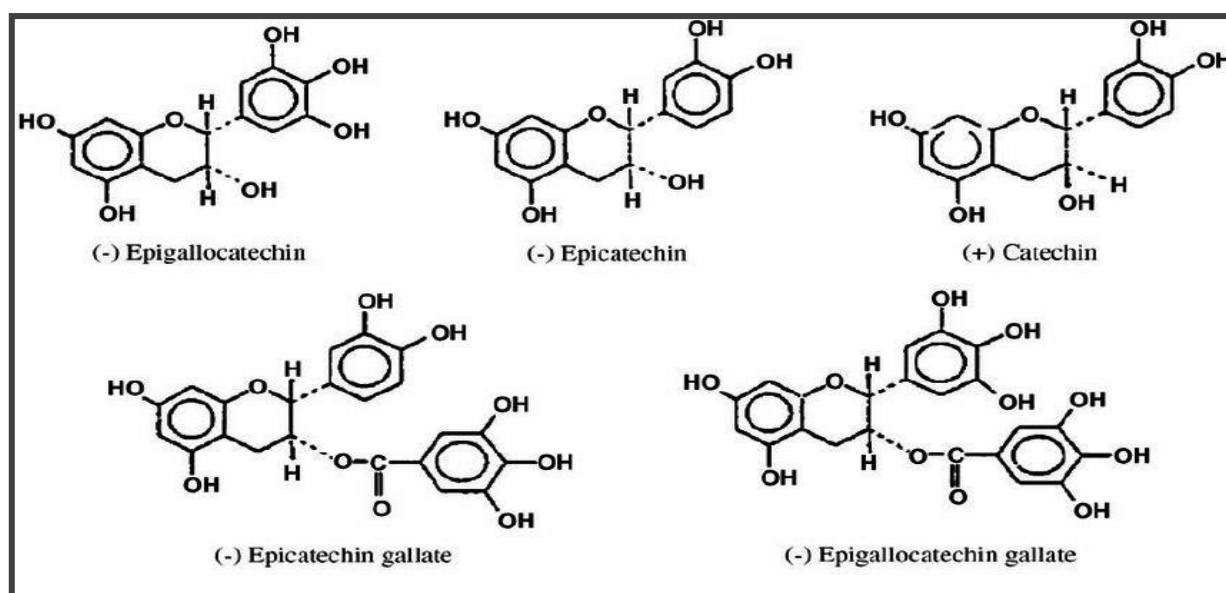


Figure 2 : Structures cycliques de base de divers flavanols (Mahmood *et al.*, 2010)

I.4.2 Alcaloïdes et acides aminés

Un autre composant du thé, ce sont les alcaloïdes puriques, et le plus important, celui que tout le monde connaît, c'est la caféine. Elle représente entre 2 et 5 % du poids sec des feuilles. Le thé contient aussi des acides aminés, ce qui lui donne une caractéristique vraiment unique. Le principal acide aminé du thé n'est même pas un acide aminé protéique : il s'agit de la L-

théanine (5-N-éthylglutamine), qui atteint 50 % du total des acides aminés qu'on trouve dans la plante (Xia et *al.*, 2020).

La théanine est synthétisée dans les racines de la plante, puis elle est naturellement transportée jusqu'aux feuilles. Chez l'humain, cet acide aminé traverse la barrière hémato-encéphalique et induit un effet relaxant. Il vient donc contrebalancer les propriétés excitantes de la caféine (Yao et *al.*, 2023).

I.4.3 Vitamines et minéraux

Le thé, surtout ses feuilles, offre une grande variété de vitamines, dont les vitamines B et la vitamine E (tocophérols) qui jouent un rôle clé dans la santé de la plante. On retrouve aussi de la vitamine C (acide ascorbique), richement présente dans les feuilles de thé fraîches, sauf dans le thé noir, où l'oxydation réduit fortement sa teneur (Bancirova, 2020).

Les études en laboratoire montrent aussi que le thé fournit beaucoup de minéraux, surtout le fluor et le manganèse, ce qui en fait un vrai allié pour la santé. Il apporte en plus du potassium, du calcium et du magnésium en quantité (Bancirova, 2020).

I.5 Les différents types de thé

I.5.1 Classification générale

Le thé se classe selon son niveau d'oxydation, qui dépend des méthodes de transformation appliquées après la récolte. Le thé vert, non oxydé, voit son processus d'oxydation stoppé par l'inactivation de ses enzymes (polyphénol oxydases) grâce à l'application de chaleur sur les feuilles après la récolte. Le thé noir, quant à lui, est entièrement oxydé naturellement, transformant les catéchines en théaflavines et théarubigines. Le thé oolong, intermédiaire entre le thé vert et le thé noir, est partiellement oxydé. Enfin, le thé blanc, dont les feuilles flétrissent et sèchent naturellement, est le moins transformé de tous (Zhang et *al.*, 2019).

I.5.2 Thé vert

Comme mentionné précédemment, les enzymes responsables de l'oxydation du thé vert sont désactivées par un procédé appelé fixation, qui consiste à chauffer à la vapeur ou à la poêle. Ce procédé permet aux feuilles de conserver leur couleur verte et une forte teneur en catéchines,

notamment en EGCG. Le thé vert possède ainsi une composition chimique très proche de celle de la feuille fraîche d'origine (Cabrera *et al.*, 2021).

I.5.3 Thé noir

La production de thé noir comprend quatre étapes : le flétrissage des feuilles, le roulage, l'oxydation complète et le séchage. Lors de l'oxydation, « les catéchines monomériques sont polymérisées pour former des pigments complexes ». Ces composés sont responsables de la couleur caractéristique du thé noir ainsi que de sa saveur prononcée (Bancirova, 2020).

I.5.4 Thé Oolong et thé Blanc

Le thé Oolong parfois nommé thé bleu-vert, subit une oxydation partielle, entre 10 % et 70 % suivant des procédés ancestraux. Sa saveur se tient en équilibre : elle emprunte la fraîcheur du thé vert tout en intégrant la densité caractéristique du thé noir (Khan & Mukhtar, 2018).

Issu des jeunes pousses du printemps restées closes, le thé blanc fait l'objet d'une élaboration très légère, ce qui limite son degré d'oxydation (Khan & Mukhtar, 2018).



Figure 3 : Aspects morphologiques des principaux types de thé : (A) Thé vert, (B) Thé noir, (C) Thé blanc et (D) Thé Oolong (Source : Pixabay.com; Unsplash.com)

I.6 Histoire et origines du thé vert

Le thé vert s'inscrit dans une longue tradition chinoise. Selon une histoire de 2737 avant notre ère, l'empereur Shennong a vu des feuilles tomber dans son bol d'eau chaude. Cela lui a donné une nouvelle boisson, à la fois revigorante et bonne pour la santé **(Heiss & Heiss, 2007)**. Rapidement, cette boisson est devenue populaire en Chine. Les habitants l'ont utilisée pour soigner divers problèmes de santé. Plus tard, pendant l'ère Tang, la préparation du thé vert est devenue une pratique culturelle, qui a ensuite été adoptée par le Japon **(Benn, 2015)**.

I.7 Classification botanique du thé vert

Le thé vert vient d'une plante appelée *Camellia sinensis* var. *sinensis*. Cette plante a des feuilles fines et tendres, ce qui la rend facile à manipuler. Elle peut survivre à des températures froides et pousse bien dans les montagnes de Chine et du Japon, ce qui assure un bon produit **(Mondal, 2020)**.

I.8 Composition chimique du thé vert

Le thé vert est connu pour ses antioxydants appelés catéchines. L'EGCG est un des plus importants, car il aide à protéger les cellules humaines. Comme le thé vert subit peu d'oxydation lors de sa fabrication, il garde bien ces éléments bénéfiques **(Yang et al., 2002)**. Il contient aussi de la caféine, qui aide à rester éveillé, et de la L-théanine, un acide aminé qui aide à se sentir calme et clair d'esprit **(Graham, 1992)**.

I.9 Procédé de production du thé vert

I.9.1 La cueillette

La cueillette des feuilles de thé est l'étape initiale et essentielle. Ce processus délicat exige une grande minutie, car il détermine la qualité du produit final. Le moindre dommage aux feuilles lors de la cueillette peut entraîner une oxydation indésirable **(Mondal, 2020)**.

Cette étape consiste à sélectionner et à cueillir les plus jeunes feuilles du théier, car elles sont riches en éléments chimiques caractéristiques du thé vert, tels que les catéchines, la caféine et la théanine **(Yashin et al., 2017)**.

I.9.2 Le Flétrissage (étalage)

Il s'agit d'une opération rapide consistant à étaler les feuilles fraîchement coupées en une fine couche dans un endroit ombragé et bien aéré. L'objectif est de réduire leur taux d'humidité à 10 - 15 % afin d'éviter qu'elles ne se cassent lors des étapes de transformation ultérieures (Cabrera *et al.*, 2021).

I.9.3 La Fixation

L'étape de fixation est ce qui distingue le thé vert des autres types. Son but est de préserver les propriétés antioxydantes uniques du thé vert en inactivant de manière irréversible les enzymes polyphénol oxydases, protégeant ainsi les catéchines et maintenant la fraîcheur du thé (Khan & Mukhtar, 2018).

Cette étape consiste à exposer le thé à des températures allant jusqu'à 80 °C afin d'inactiver les enzymes. Il existe deux principales méthodes : la méthode japonaise, qui utilise la vapeur, et la méthode chinoise, qui utilise la torréfaction (pan-firing) (Heiss & Heiss, 2007).

I.9.4 Le roulage

Le roulage, manuel ou mécanique, s'effectue par pression. Il permet de créer des formes variées qui mettent en valeur l'esthétique des feuilles de thé (Heiss & Heiss, 2007). Son rôle est cependant plus profond. Ce procédé brise les membranes cellulaires, libérant ainsi les composés et les sucs présents à la surface des feuilles (Bancirova, 2020). De plus, il influence la vitesse à laquelle les feuilles se déploient lors de l'infusion (Heiss & Heiss, 2007).

I.9.5 Le séchage

Le séchage est l'étape finale de la transformation du thé et revêt une importance particulière. Ce procédé vise à réduire la teneur en eau des feuilles de thé à un niveau critique compris entre 3 % et 5 %. Cette diminution significative de l'humidité permet l'arrêt des réactions chimiques résiduelles et réduit considérablement l'activité de l'eau (*aw*), empêchant ainsi la prolifération de la grande majorité des micro-organismes, notamment les moisissures, l'eau étant essentielle à leur croissance (Mondal, 2020).

Cette opération est réalisée à l'aide d'air chaud appliqué aux feuilles à une température comprise entre 80 °C et 110 °C. Cet air chaud est appliqué uniformément sur les feuilles, évitant

ainsi les chocs thermiques indésirables et préservant l'intégrité des tissus foliaires (**Han et al., 2016**).

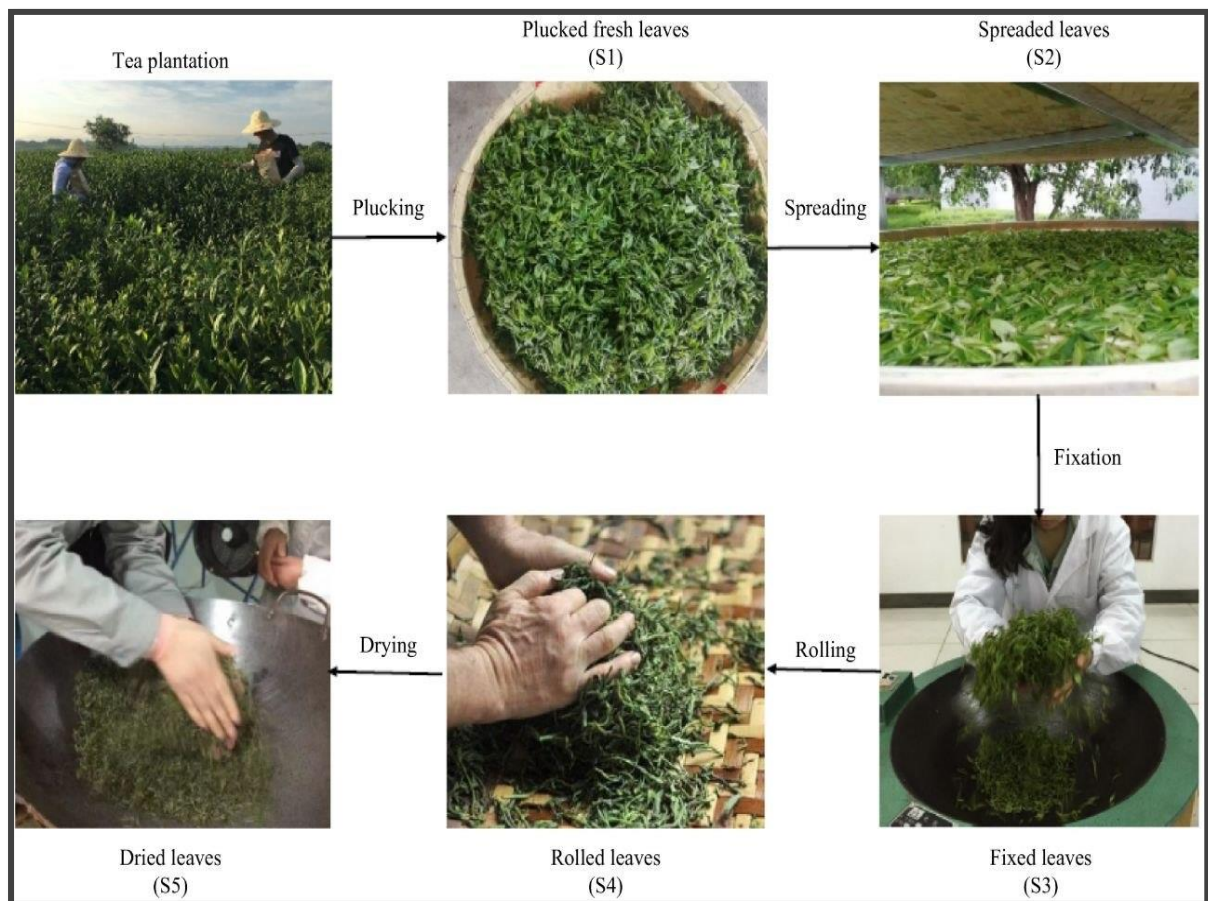


Figure 4 : illustration des cinq principales étapes de la transformation du thé vert (**Shi et al., 2021**)

I.10 Importance nutritionnelle et thérapeutique du thé vert

I.10.1 Importance nutritionnelle

Le thé vert est considéré comme un alicament, reconnu pour sa richesse en vitamines et minéraux, notamment les vitamines B2, C et E, ainsi que des minéraux comme le potassium, le

sodium et le fluor. Il est également riche en métabolites secondaires et en antioxydants, ce qui en fait un aliment contribuant au maintien de l'équilibre de l'organisme (**Cabrera et al., 2006**).

I.10.2 Prévention des maladies Cardiovasculaires

Le cœur est le moteur de la vie et nécessite une protection continue. Des études ont montré qu'une consommation régulière et constante de thé vert protège le cœur et les vaisseaux sanguins en abaissant le taux de mauvais cholestérol (LDL) et en inhibant l'oxydation des lipides grâce aux catéchines, en particulier l'EGCG. Cela contribue à prévenir l'athérosclérose et réduit ainsi le risque d'accident vasculaire cérébral et d'hypertension artérielle (**Chacko et al., 2010**).

I.10.3 Propriétés anticancéreuses

Bien que nous ayons longuement abordé le sujet de l'EGCG, il n'a pas encore reçu l'attention qu'il mérite. L'une de ses propriétés les plus importantes est sa capacité à combattre différents types de cancer. Ce composé neutralise les radicaux libres et perturbe les voies de signalisation cellulaire entre les cellules cancéreuses, affectant ainsi leur croissance et leur prolifération. Tout cela fait du thé vert un aliment sain qui apporte des bienfaits à l'organisme au niveau moléculaire. Parmi les types de cancer les plus notables pour lesquels le thé vert est bénéfique, on peut citer : le cancer du système digestif, en particulier de l'estomac et du côlon ; le cancer du sein ; le cancer du poumon ; et le cancer de la prostate (**Khan & Mukhtar, 2018**).

I.10.4 Effets sur le métabolisme et le diabète

La consommation régulière de thé vert contribue à réguler et à améliorer le métabolisme du glucose. Les polyphénols qu'il contient stimulent la sécrétion d'insuline, améliorant ainsi la sensibilité à celle-ci. Ceci est particulièrement bénéfique pour les personnes obèses et celles atteintes de diabète de type 2, car le thé vert favorise également l'oxydation des graisses corporelles (**Hursel & Westerterp-Plantenga, 2013**).

I.10.5 Effets neuroprotecteurs et relaxants

Le thé vert contribue à réduire la fatigue et le stress, protégeant ainsi le système nerveux. Grâce aux propriétés de l'acide aminé L-théanine, qui traverse la barrière hémato-encéphalique, il induit une sensation de relaxation sans somnolence, procurant ainsi un effet relaxant à l'état d'éveil (**Nobre et al., 2008**). De plus, le composé EGCG protège les neurones de

l'inflammation, du stress et des lésions, prévenant ainsi les risques de troubles de la mémoire et de déclin cognitif (Schmidt et *al.*, 2014).

I.11 Conditions de stockage du thé vert

I.11.1 Humidité et température

Les conditions de conservation sont cruciales pour la préservation du thé, car même de légères variations peuvent affecter l'oxydation des polyphénols et foncer les feuilles. Pour maintenir une bonne teneur en EGCG, l'humidité et la température doivent être faibles, idéalement inférieures à 5 % et 20 °c (Li et *al.*, 2020).

I.11.2 Lumière et oxygène

Le thé vert doit être conditionné dans des récipients opaques et fermés ou sous atmosphère modifiée (azote), car l'oxygène et la lumière du soleil ont un impact négatif sur ses caractéristiques. L'exposition aux rayons UV provoque l'oxydation du thé, entraînant la dégradation de la chlorophylle. Les feuilles de thé deviennent alors pâles et jaunâtres, leurs propriétés organoleptiques se modifient, ce qui provoque une perte d'arôme et une altération du goût, compromettant ainsi sa qualité (Zhang et *al.*, 2019). Par ailleurs, le but de réduire le niveau d'oxygène et d'utiliser une atmosphère modifiée est pour empêcher la plupart des organismes vivants de croître et de se multiplier, notamment les champignons *Aspergillus* et *Penicillium*, qui ont besoin d'oxygène pour leur croissance et pour la production de toxines (Pitt & Hocking, 2009).

I.11.3 Durée de conservation

Même dans des conditions de conservation optimales, la composition chimique du thé évolue avec le temps. Par exemple, les catéchines simples se combinent pour former des composés plus complexes comme les théarubigines, ce qui altère la clarté de l'infusion, donc la présence d'un trouble. De même, une étude menée sur du thé conservé 12 mois à température ambiante a montré une diminution de 20% à 40 % des niveaux d'EGCG, entraînant une réduction de la teneur en antioxydants du thé (Chaturvedula & Prakash, 2011).

I.12 Microflore associée au thé vert

I.12.1 Microflore endogène et contaminante

Bien que les procédés de séchage et de fixation du thé vert réduisent le pourcentage de micro-organismes présents, la microflore associée au thé vert est généralement tellurique et de l'environnement. Même après transformation, on retrouve des bactéries sporulées et des champignons filamenteux. Parmi les bactéries, le genre *Bacillus* est le plus fréquent, et parmi les champignons, les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus* sont prédominants. Ces micro-organismes peuvent survivre et se multiplier dans des conditions de faible activité de l'eau (a_w) ; ils représentent donc un risque pour la qualité et la sécurité du thé vert s'il n'est pas conditionné dans des conditions appropriées (Hala et al., 2021).

I.12.2 Contamination fongique et mycotoxines

Les champignons jouent un rôle crucial dans la microflore du thé vert, car ils produisent des métabolites secondaires, notamment des mycotoxines nocives. Bien que les champignons se développent généralement en milieu humide, certaines espèces sont adaptées à la sécheresse et y résistent. On les appelle espèces xérophiles. Des études confirment que les espèces les plus fréquemment rencontrées dans le thé vert sont *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Leur pouvoir pathogène réside dans la production d'aflatoxines ou d'ochratoxines. Dans des conditions de stockage inadéquates, le thé absorbe l'humidité de l'air et, dès que le taux d'humidité des feuilles atteint 10 à 12%, ces champignons deviennent actifs et commencent à se multiplier (Bouakline et al., 2018).

I.12.3 Impact de la transformation

En conclusion, la méthode de transformation du thé est le facteur le plus important pour garantir sa sécurité et l'absence de contaminants. Contrairement au thé noir, le thé vert subit une inhibition enzymatique afin de préserver ses propriétés antioxydantes. Comme mentionné précédemment, cette inhibition est obtenue par exposition à la chaleur, ce qui entraîne une réduction significative de la microflore endogène du thé. Cependant, une recontamination est possible lors du roulage si les normes d'hygiène ne sont pas respectées. De même, dans des conditions d'emballage inadéquates, le thé absorbe l'humidité ambiante, ce qui favorise le développement de champignons. Par conséquent, la charge microbienne totale (FMAT) dépend

du processus de transformation du thé et se situe entre 10^2 et 10^5 UFC/g. Cette valeur ne doit pas être dépassée pour garantir une consommation sans risque (**Ziyani et al., 2020**).

Chapitre II

Etude mycologique

II.1 Définition de la mycologie

La mycologie est la branche des sciences biologiques qui étudie les champignons sous différents aspects, tels que leur classification, leur morphologie, leur physiologie, leur reproduction et leur mode de vie (**Alexopoulos et al., 1996**).

II.2 Définition de champignon

Ce sont des micro-organisme appartenant au règne des fungi "champignon" (**Lemoine & Claustre, 2002**). Il s'agit d'un groupe riche et multi-espèces, puisque son nombre est estimé, sachant que ces chiffres sont approximatifs, à environ un million d'espèces. (**Bouchet et al., 2005**). Elles se présentent microscopiquement sous forme d'amas filamenteux et adoptent un mode de vie hétérotrophe (non autotrophe) car elles sont dépourvues de pigments chlorophylliens nécessaires à la photosynthèse. Par conséquent. Elle se nourrissent de débris de matière organique qu'elles contribuent à décomposer (**Botton et al., 1990**).

II.3 Classification des champignons

Les champignons font l'objet de multiples systèmes de classification qui évoluent constamment en fonction des développements scientifiques dans le domaine des études fongiques (**Barry et Barry, 1972 ; Botton et al., 1990 ; Bouchet et al., 1999**).

La plupart des champignons supérieurs appartiennent au sous-règne Dikarya. Ce qui distingue les membres de ce groupe est qu'ils passent par une étape « dicaryotique » pendant une partie de leur cycle de vie, où chaque cellule contient deux noyaux distincts (**Hibbett et al., 2007**).

II.3.1 Ascomycètes

Cette branche est considérée comme l'une des plus riches en espèces, car elle comprend 15 000 espèces, caractérisées par la formation de spores sexuelles appelées ascospores, qui sont produites à l'intérieur de sacs microscopiques appelés ascos (**wijayawardene et al., 2018**).

II.3.2 Basidiomycètes

Ce sont les champignons les plus évolués et il existe environ 14 000 espèces décrites. Leurs hyphes sont divisés ou unicellulaires et comprennent de grandes espèces et des champignons comestibles (**Bouchet et al., 2004**). La reproduction sexuée se produit par la production de

spores aquatiques (basidiospores) et sur les basides après le stade caryogamie et la méiose, tandis que la reproduction asexuée se produit par l'intermédiaire de conidies (**Strillu, 1991 ; Davet, 1996 ; Raven, 2017**).

II.3.3 Zygomycètes

Ce groupe est considéré comme l'un des phylums les plus anciens, contenant 1 600 espèces. Ils vivent dans le sol ou dans des matériaux en décomposition. Ils sont caractérisés par des filaments non cloisonnés (coénocytaires) dépourvus de septa et par la présence de plusieurs noyaux au sein du cytoplasme. Leur paroi cellulaire est constituée de chitine et de chitosane. Ils ont généralement deux types de reproduction : la reproduction sexuée par des zygospores et la reproduction asexuée par des spores à l'intérieur de structures appelées sporanges (**Spatafora, J.W., et al. (2016)**).

II.3.4 Gloméromycètes

Ce sont des champignons terrestres caractérisés par des hyphes fongiques siphonnés (non cloisonnés), et leur mode de reproduction n'est pas encore connu (**Selosse, 2013**). Ils forment des symbioses racinaires (mycorhizes à arbuscules) avec les racines des plantes, qui échangent des bénéfices en transférant du phosphore à la plante (**Spatafora et al., 2016**).

II.3.5 Chytridiomycètes

C'est un champignon primitif qui se propage dans le sol humide et l'eau douce. Il se caractérise par des spores nageuses (zoospores) à un seul flagelle postérieur, possède une structure corporelle simple (unicellulaire ou à hyphes non cloisonnés), et joue le rôle de décomposeurs de matière organique (saprophytes) ou parasites (**Bouchet et al., 2005**).

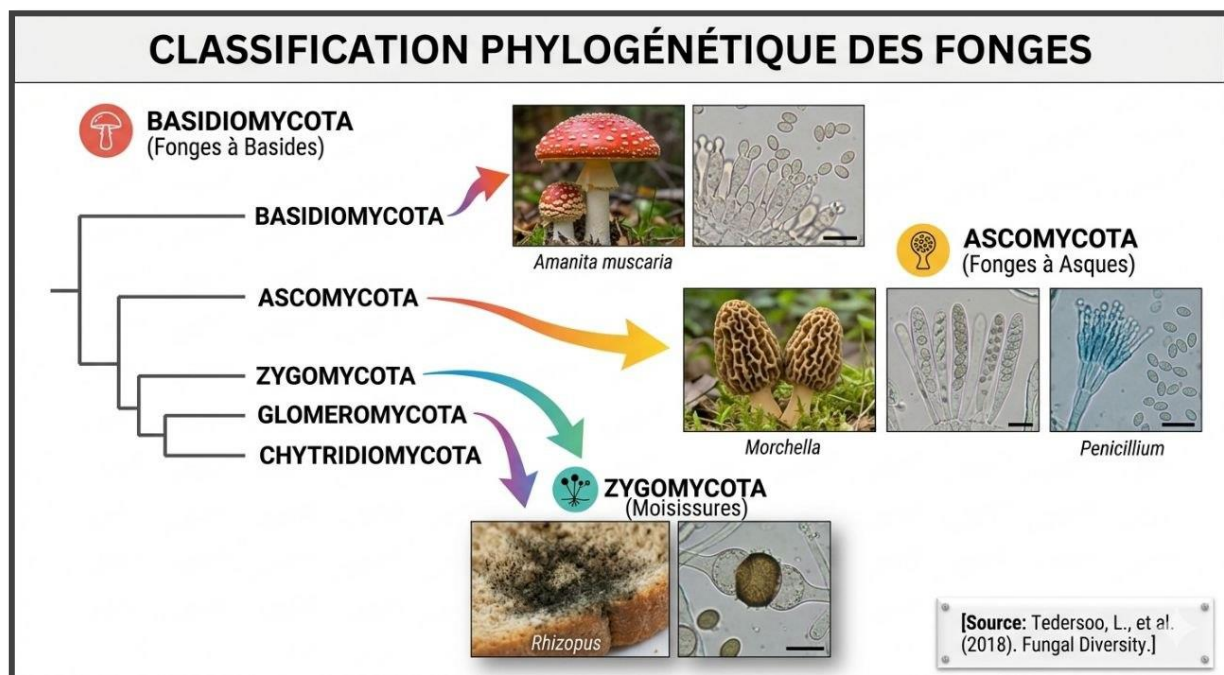


Figure 5 : Classification phylogénétique des champignons (Tedersoo, L., et al., 2018)

II.4 Caractères Génériques des champignons

- Les champignons sont des organismes unicellulaires ou multicellulaires possédant un noyau (Eucaryotes) (Dufresne et al., 2021).
- Les champignons sont des organismes qui ne réalisent pas de photosynthèse car ils ne possèdent pas de chlorophylle (Bouchet et al., 2005).
- Les champignons sont des organismes hétérotrophes qui se nourrissent par absorption, ils utilisant le carbone comme source de nourriture, et leur mode de nutrition n'est donc pas autotrophe (Dufresne et al., 2021).
- La paroi cellulaire des champignons se compose de plusieurs couches : une couche interne riche en chitine, une couche intermédiaire contenant du glucane et une couche externe contenant des protéines et des sucres complexes. Il joue un rôle dans la protection du champignon contre les facteurs externes et la pression osmotique (Deacon, 2006). Une des caractéristiques

distinctives des champignons est l'absence de cellulose et la présence de chitine par rapport aux plantes (Bouchet et *al.*, 2005).

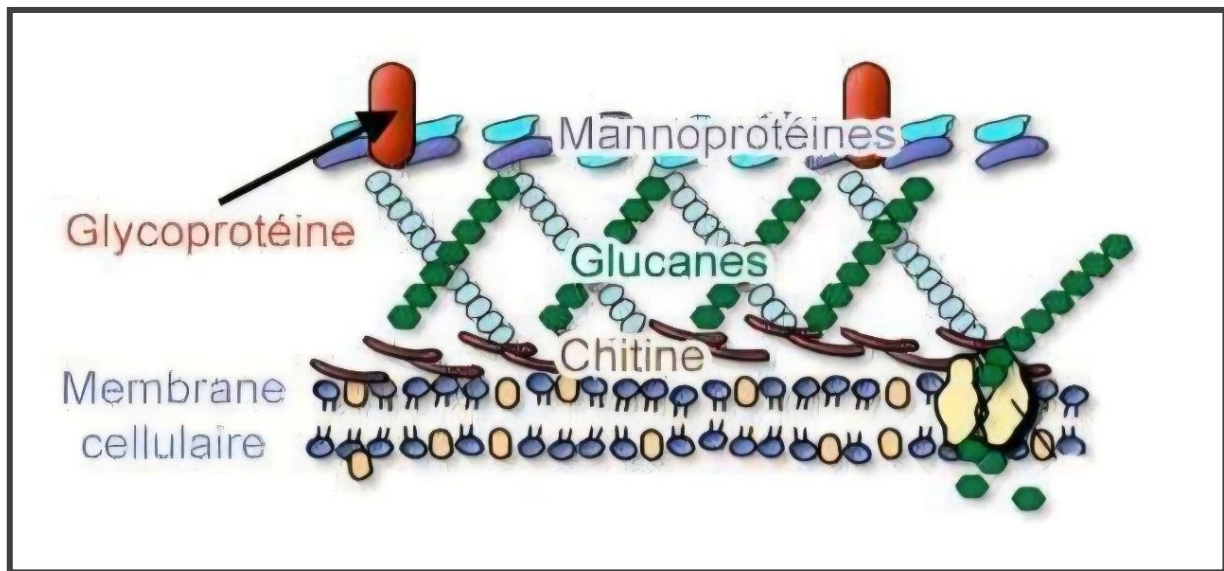


Figure 6 : Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe & Stevens, 2008).

II.5 Structure des champignons

II.5.1 Morphologie du système végétal (thalle)

Il s'agit de longs fils fins, généralement d'environ 2 à 10 micromètres de diamètre (Pitt, J.I. & Hocking 2022), et d'un groupe d'hyphes appelés mycélium, qui sont de deux types : Mycélium non divisé : ce sont des filaments non divisés qui contiennent plusieurs noyaux. Mycélium divisé : filaments divisés par des cassures transversales appelées cytotomes (Deacon, 2013).

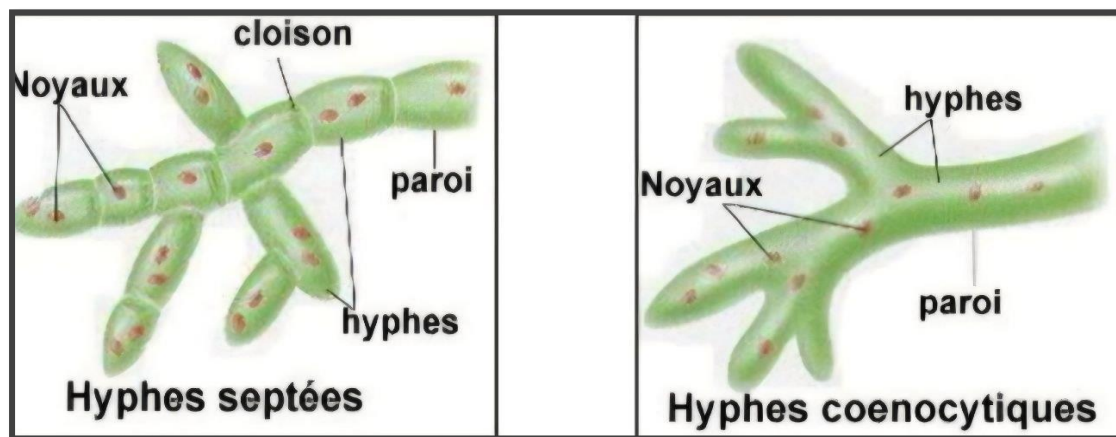


Figure 7 : Représentation schématique de l'hyphe (Decocq, 2011)

II.5.2 Spores

Ce sont les unités de propagation et de survie des champignons et sont classées selon leur origine biologique (**Botton et al., 1990 ; Deacon, 2013**).

Spores sexuelles : produites par le processus de reproduction sexuée (plasmogamie, caryogamie, méiose) : (**Bouchet et al., 2005**).

- Ascospore : Elle se forme à l'intérieur d'un long sac appelé ascospore.
- Zygosporés : grosses spores à parois épaisses produites à partir de l'union de deux cellules sexuelles morphologiquement similaires.

Spores asexuées : produites par le processus de mitose : (**Pitt & Hocking, 2009**)

- Chlamydospores : grosses spores terminales ou interstitielles à parois épaisses. Il peut être seul ou sous forme de chaînes.
- Sporangepores : ils se forment à l'intérieur d'un sporange (sac) à l'extrémité de l'hyphe.
- Conidies : formées à l'intérieur d'une conidie (sans sporange).
- Blastospores : formées par bourgeonnement à partir d'une cellule mère végétative.

II.6 Modes de vie des champignons

II.6.1 Le Saprophytisme

Les champignons décomposent la matière organique morte par sécrétion d'enzymes extracellulaires pour absorber les nutriments (**Deacon, 2013**).

II.6.2 Le Parasitisme

Le champignon se développe aux dépens d'un hôte vivant (plante ou animal), provoquant souvent des pathologies (**Webster & Weber, 2007**).

II.6.3 La Symbiose

Une association à bénéfice mutuel avec d'autres organismes, comme les mycorhizes (racines) ou les lichens (algues) (**Alexopoulos et al., 1996**).

II.7 Besoins nutritionnels des champignons contaminés par le thé

Ce sont des champignons non autotrophes dont la croissance dépend entièrement des aliments importés. Parmi les besoins courants des champignons pour pousser et se reproduire sur le thé sont :

II.7.1 Source de Carbone

Les champignons dépendent des sucres présents dans les feuilles de thé comme source de thé. Ils sécrètent donc des enzymes pour les décomposer en sucres simples faciles à absorber. Pour générer de l'énergie (**Misra, A, K. 2012**).

II.7.2 Source d'azote

Le thé est riche en acides aminés, dont la théanine, qui est utilisée par les champignons pour fabriquer des protéines, des enzymes et des toxines (**Valero, A et al 2007**).

II.7.3 Éléments minéraux

Les champignons ont besoin de minéraux présents dans les feuilles de thé, tels que le potassium, le phosphore et le magnésium, qui agissent comme des stimulants du processus métabolique (**Saha, A et al 2017**).

II.7.4 Vitamines

Les champignons ont besoin de vitamines qu'ils utilisent comme agents stimulant les enzymes pour les processus métaboliques (Carlile *et al.*, 2001).

II.8 Conditions de croissance des moisissures

Cela nécessite cinq facteurs environnementaux de base :

II.8.1 Humidité (activité de l'eau - aw)

C'est un facteur essentiel car il faut une activité de l'eau supérieure à 0,80. Lorsqu'elle diminue, la plupart des espèces arrêtent de croître (Pitt & Hocking, 2009).

II.8.2 Température

Il pousse mieux entre 20 et 30 degrés Celsius, et certaines espèces ont la capacité de s'adapter et de croître même à 0 degré Celsius (Pitt & Hocking, 2009).

II.8.3 Oxygène

Ce sont des organismes aérobies qui ont besoin d'air, c'est pourquoi on les trouve souvent à la surface des aliments (Pitt & Hocking, 2009).

II.8.4 pH (acidité moyenne)

Il préfère les environnements acides mais peut en tolérer entre 2 et 9 (Pitt & Hocking, 2009).

II.9 Modèles de reproduction des champignons

Les champignons ont deux modes de reproduction : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée (Larousse Agricole, 1981).

II.9.1 Reproduction sexuée

Elle permet la diversité génétique des champignons et comporte 3 étapes :

- Plasmogamie : rencontre de deux cellules compatibles et formation de cytoplasme sans fusion de noyaux (Raven *et al.*, 2014, p. 282).

- Caryogami : Deux noyaux fusionnent ensuite pour former le zygote diploïde (2n) (Webster & Weber, 2007).

- Méiose : Le zygote diploïde commence à se diviser et produit des spores sexuelles haploïdes (2n) (Campbell & Reece, 2011).

II.9.2 Reproduction asexuée

Permet la production de nouveaux individus génétiquement identiques au champignon d'origine (Campbell & Reece, 2011).

- Sporulation : C'est le moyen de reproduction asexuée le plus courant. Il s'appuie sur la division mitotique pour produire un grand nombre de spores génétiquement identiques (Campbell & Reece 2011).

- Bourgeonnage : dépend d'une division inégale, où une saillie apparaît dans la paroi cellulaire, et ceci est spécifique aux levures (Alexopoulos et *al.*, 1996).

- Fragmentation du mycélium : Le mycélium est divisé en petites parties, et chaque partie a la capacité de croître et de se développer pour former un nouvel individu (Moore et *al.*, 2011).

II.10 Développement de champignons filamenteux

Le développement des champignons filamenteux passe par plusieurs étapes :

II.10.1 Germination des germes (spores)

Lorsque des facteurs externes propices à la croissance sont disponibles, le germe passe d'un état de repos à une activité cellulaire complète, en commençant par le gonflement du germe puis l'apparition du tube germinatif, qui se forme à la suite de la réorganisation des filaments d'actine à l'intérieur d'une cellule (Dijksterhuis, 2019).

II.10.2 Croissance apicale

Le champignon se développe uniquement à partir de la pointe (le trait d'union) dans laquelle se trouve le noyau schipigen, qui dirige les vésicules qui transportent les matériaux de construction des murs et assure ainsi une croissance droite du champignon. (Riquelm et Sanchez, M- Leon, E.2014).

II.10.3 Formation de mycélium

Au fur et à mesure que les hyphes continuent de croître, un réseau de mycélium se forme qui permet au champignon d'exister au milieu de la périphérie (**Riquelme et al., 2018**).

Ces mycéliums sont affectés par la disponibilité des nutriments dans le milieu, comme : Dans un environnement pauvre (nutriments limités) : les hyphes s'allongent pour rechercher de nouvelles sources de nourriture (stratégie d'expansion). En milieu riche (abondance en nutriments) : les branches latérales augmentent pour élargir la surface d'absorption et exploiter les ressources disponibles (stratégie d'investissement) (**Stephen D. Harris, 2011**).

II.10.4 Sporulation

Lorsque les conditions environnementales se détériorent, comme un manque de ressources alimentaires, notamment (carbone et azote), ou des changements physiques dans l'environnement, la croissance végétative du champignon s'arrête et il change sa stratégie de survie par la formation de spores (**Riquelme et al., 2018**).

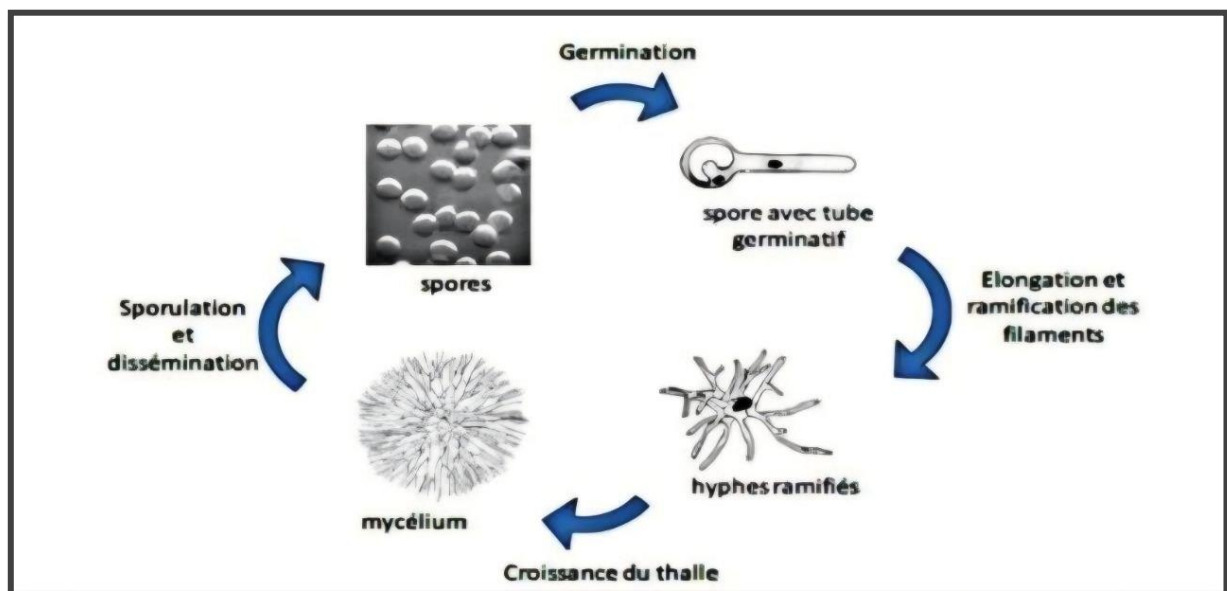


Figure 8 : Cycle de vie des moisissures (Deffontaine, 2015).

II.11 Culture et identification des champignons

II.11.1 La mise en culture

La culture est réalisée par l'ensemencement de l'échantillon sur un milieu de Sabouraud (avec ou sans chloramphénicol) afin d'isoler des colonies pures (**Chabasse et al., 2002**).

II.11.2 Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet une première orientation diagnostique par l'observation des colonies à l'œil nu (**Botterel & Bretagne, 2014**).

- La Taille : La croissance est évaluée par la mesure du diamètre radial de la colonie au cours du temps, on a : petite, étendue ou envahissante. (**Guarro et al., 1999**).

- La Couleur : On note la pigmentation du recto (surface) et du verso (revers de la gélose) ainsi que la diffusion de pigments (**Larone, 2011**). On a : blanc crème ou coloré (vert, brune, orange, violet, gris...) (**Larone et al., 2020**; **Walsh et al., 2018**).

- L'Aspect : La texture (duveteux, laineux, cotonneux, velouté, granuleux ou poudré lisse.) et le relief (plat, ridé ou de forme cérébrale) sont des caractères morphologiques clés (**Badillet, 2000**).

II.11.3 Technique de Microculture (Culture sur lame)

La technique de microculture est employée pour observer l'arrangement naturel des structures sporifères (conidies et conidiophores) sans altérer leur architecture fragile (**Chabasse et al., 2002**).

II.11.4 Examen microscopique au Bleu de Méthylène

L'identification de certitude repose sur l'observation microscopique des filaments et des spores après coloration au bleu de méthylène pour accentuer les contrastes. Note : Bien que le bleu de coton soit le standard, le bleu de méthylène est validé pour l'étude morphologique simple (**Bouree, 2004**).

II.12 Principaux genres fongiques contaminant de thé

Le thé est contaminé par divers types de moisissures qui produisent des mycotoxines, en raison de sa nature végétale et de ses conditions de stockage. On peut les classer en deux catégories : les toxines de champ et les toxines de stockage (Afssa, 2006). Parmi les principaux genres fongiques responsables de la contamination du thé figurent : *Aspergillus* et *Pénicillium*.

II.12.1 *Aspergillus*

Aspergillus est un genre de moisissures filamenteuses, classé au sein du phylum des Deutéromycètes, qui comprend environ 180 espèces réparties en 18 groupes (Gams et al., 1986). Les colonies d'*Aspergillus* présentent un aspect duveteux ou poudreux et se caractérisent par une structure filamenteuse constituée d'un mycélium divisé (septé), celui-ci portant des sporophores (conidiophores) qui se terminent par une tête sphérique contenant des cellules génératrices de spores (phialides) qui produisent des conidies (Dominique et al, 2002). Parmi les types d'*Aspergillus* les plus dangereux figurent : *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Flavus*.

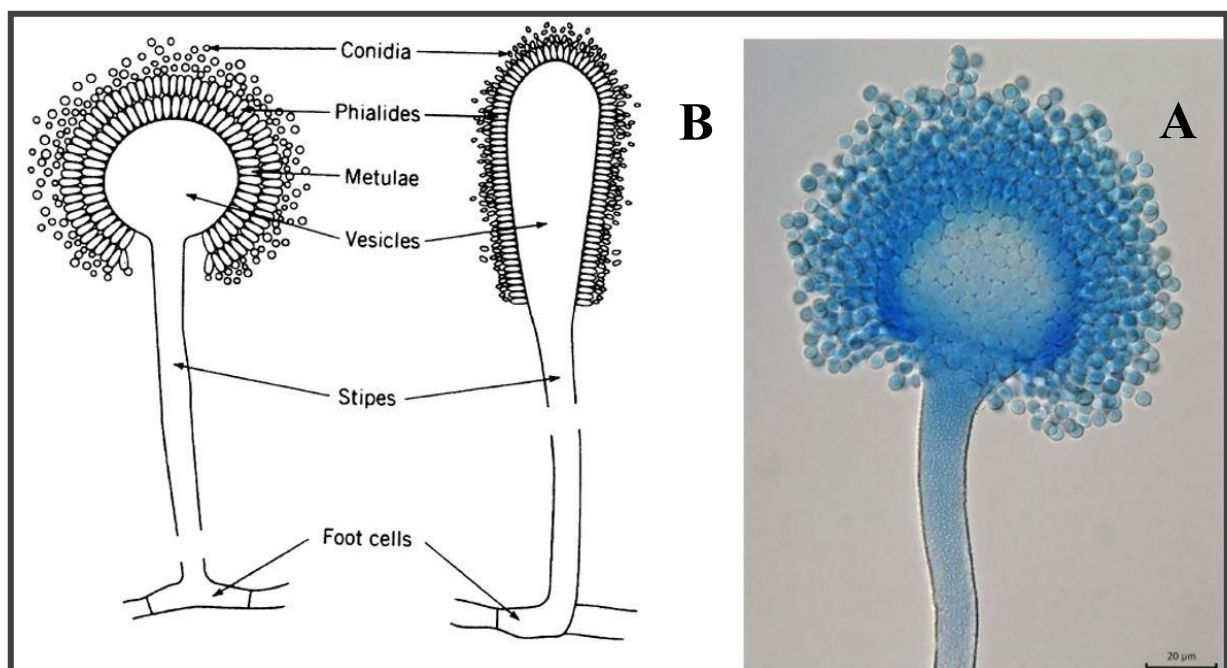


Figure 9 : (A) Microscope image d'*Aspergillus* (Pickova et al., 2021). **(B)** Morphologie d'*Aspergillus* (Klich, 2009).

Tableau 2 : Principales espèces d'*Aspergillus* et leurs mycotoxines associées.

Espèces fongique	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorgène, gliotoxine etc.
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxine B1 et B2, citrine
<i>Aspergillus niger</i>	Malformine, Naftoquinone
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acide cyclopiazonique, Acide kojique
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine
<i>Aspergillus clavatus</i>	Acide kojique, Patuline, Xanthocilline
<i>Aspergillus terreus</i>	Citrinine, Patuline, Territrem, Terréine, Terrétonine

II.12.2 *Penicillium*

C'est un genre de champignons filamenteux appartenant au phylum des Deutéromycètes, qui comprend environ 150 à 300 espèces réparties en quatre sous-genres (**Pitt, 1987**). La colonie de *Penicillium* présent un aspect duveteux ou poudreux, avec une couleur vert grisâtre et plus rarement une couleur blanche. Elle est constituée d'un mycélium ramifié et cloisonné (septé), et porte des conidiophores caractéristiques, terminent par des structures en forme de brosse, ce qui est une caractéristique distinctive d'identification microscopique. Ces ramifications se terminent par des cellules spécialisées appelées phialides, qui produisent des chaînes de spores asexuées (conidies) de forme sphérique ou ovale (**Botton et al., 1990**). Parmi les types de *Penicillium* les plus dangereux : *Pénicillium chrysogenum*.

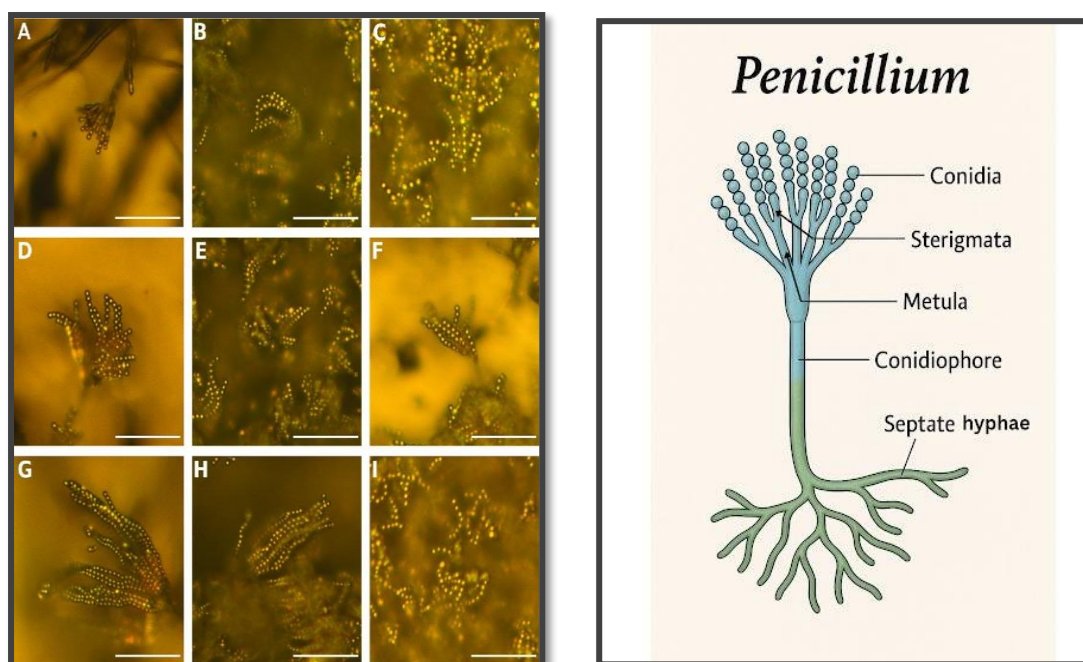


Figure 10 : Microscope images de *Penicillium* (Samson et al., 2004) et Morphologie de *Penicillium* (Samson et al., 2010)

Tableau 3 : Principales espèces de *Penicillium* et leurs mycotoxines associées

Espèces fongique	Mycotoxines produites
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinine, patuline
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Acide cyclopiazonique, Roquefortine C
<i>Penicillium roqueforti</i>	Acide pénicillique, Roquefortine C
<i>Penicillium crustosum</i>	Pénitrem A, Roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Acide cyclopiazonique, Patuline, Roquefortine C, Griseofulvine
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxine A
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium oxalicum</i>	Roquefortine C, Acide sécalonique D

Aspergillus et *Penicillium* font partie des contaminants fongiques les plus dangereux qui affectent le thé au cours de sa fabrication (étapes de culture, de récolte, de post-récolte, de séchage et de stockage), lorsque l'humidité est élevée et que la ventilation est insuffisante, Cela entraîne une modification des propriétés sensorielles des feuilles, de leur couleur et de leur odeur, et le plus grand danger réside dans leur capacité à produire des mycotoxines telles que les aflatoxines et les ochratoxines (**Zhang et al ,2022**).

Chapitre III

Etude

mycotoxicologique

III.1 Définition et origine de mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires aux propriétés toxiques, produits par certains types de champignons microscopiques (**Zinedine, 2004**) lorsque des conditions environnementales appropriées sont disponibles, notamment pendant la « phase stationnaire » qui suit la phase de croissance et de reproduction actives (**Reboux, 2006**).

Malgré la grande diversité de de mycotoxines qui dépasse les milliers, il existe un groupe spécifique qui représente la plus grande menace et est le plus étroitement lié à la sécurité alimentaire, à savoir les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, la zéaralénone, la patuline et le déoxynivalénol (**Patricia et al., 2006 ; Huybrechts et al., 2013**).

Les mycotoxines sont des composés chimiques complexes caractérisés par un faible poids moléculaire. Elles sont non volatiles, très stables d'un point de vue thermique et peu solubles dans l'eau, ces propriétés leur confèrent une grande capacité de résistance à divers environnements, car elles restent présentes dans les aliments même après transformation (**Bullerman & Bianchini, 2007 ; Freire & Sant'Ana, 2018**).

L'exposition de l'homme aux mycotoxines se fait soit par ingestion directe d'aliments contaminés, soit par la chaîne alimentaire à travers des produits animaux dont les sources ont été exposées à ces toxines (**Lahouar, 2016**).

III.2 Principale mycotoxine associée au thé

III.2.1 Les Aflatoxines

- Les aflatoxines sont des composés d'origine métabolique secondaire et des mycotoxines, principalement produites par *Aspergillus* de la section Flavi. Elles possèdent une structure chimique complexe de type furanocoumarine et sont polycycliques. Il en existe de nombreux types différents, dont les plus importants sont les formes B1, B2, G1 et G2. Sur le plan physico-chimique, les molécules de ces toxines ont une forme cristalline solide et sont incolores ; parfois, on les trouve d'un jaune pâle. Les aflatoxines se distinguent de nombreux autres composés chimiques par leur grande stabilité thermique, leur permettant de résister à des températures allant jusqu'à 237-299 °C. De ce fait, leur élimination par traitement thermique est difficile dans le cas des produits alimentaires, les techniques courantes telles que la torréfaction et l'infusion étant inefficaces (**Pickova et al., 2021**).

- La découverte des aflatoxines remonte à un incident majeur survenu en Angleterre en 1960, au cours duquel environ 100 000 dindes périrent, un événement connu sous le nom de « Turkey X Disease ». L'enquête révéla que les dindes avaient consommé des arachides importées du Brésil, fortement contaminées par des moisissures. Les chercheurs parvinrent à isoler *Aspergillus flavus* de ces arachides et à identifier la toxine responsable de ce massacre. Cet incident marqua le début d'une nouvelle ère en matière de sécurité alimentaire, conduisant à un meilleur contrôle de la qualité et à des recherches plus approfondies sur les champignons (**Riba et al., 2018**).

- La croissance et la biosynthèse des moisissures productrices d'aflatoxines dépendent de l'interaction de plusieurs facteurs environnementaux. Une température de 33 à 35 °C est considérée comme optimale pour la croissance des *Aspergillus Flavus*, tandis que la production maximale de toxines se situe généralement entre 24 et 30 °C. L'activité de l'eau (aw) est le paramètre le plus important, car elle est essentielle à la croissance. Celle-ci requiert une aw supérieure à 0,85, et la production de toxines nécessite souvent une humidité relative plus élevée (environ 0,90 à 0,99) (**Krifaton et al., 2023**).

- Les aflatoxines sont classées en deux groupes selon leur structure chimique : le groupe des difurocoumarocyclopenténones (qui comprend les aflatoxines de type B) et le groupe des difurocoumarolactones (qui comprend les aflatoxines de type G). Cette distinction repose sur leur fluorescence sous lumière UV : les aflatoxines de type B émettent une fluorescence bleue, tandis que celles de type G émettent une fluorescence verte. Cette propriété est largement exploitée dans les méthodes de détection chromatographiques (**Zinedine & Moumni, 2021**).

III.2.2 Les maladies causées par les aflatoxines

- Carcinogénèse et cancer du foie : Le foie est le principal organe cible des aflatoxines, où ces toxines subissent une activation métabolique. Les aflatoxines, en particulier l'aflatoxine B1, sont de puissants carcinogènes pour les cellules hépatiques, et une exposition chronique à ces toxines constitue un facteur de risque majeur de carcinome hépatocellulaire, notamment dans les régions où le virus de l'hépatite B (VHB) est endémique. L'exposition concomitante aux aflatoxines et à une infection par le VHB augmente le risque de développer un cancer du foie (**Marchese et al., 2018**).

- Intoxication aiguë (intoxication à l'aflatoxine) : Bien que l'exposition continue aux aflatoxines soit plus fréquente, l'ingestion de fortes doses sur une courte période peut entraîner

une intoxication aiguë. Des cas d'intoxication aiguë à l'aflatoxine ont été documentés lors de crises alimentaires liées à un stockage inadéquat des céréales. Cette intoxication se manifeste par une insuffisance hépatique aiguë, accompagnée d'ictère, d'œdème, de douleurs abdominales et, dans les cas les plus graves, d'hémorragies gastro-intestinales, pouvant conduire au décès **(Rushing & Selim, 2019)**.

- Immunotoxicité et retard de croissance : Un lien a été établi entre l'exposition des nouveau-nés ou des nourrissons aux aflatoxines par l'allaitement maternel ou l'alimentation complémentaire et le retard de croissance chez l'enfant (retard de croissance staturo-pondérale). Cette toxine perturbe l'absorption des nutriments et la synthèse protéique, affectant ainsi le développement physique et cognitif. Des études récentes ont également démontré que les aflatoxines ont un impact négatif sur le système immunitaire (immunotoxicité), entraînant une diminution de la résistance aux infections virales et parasitaires **(Sherif et al., 2021)**.

III.2.3 L'ochratoxine A (OTA)

- L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite comme métabolite secondaire. Comme toutes les mycotoxines, elle est thermorésistante et produite par divers champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Cette toxine est connue pour sa néphrotoxicité sévère et a été classée par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) comme cancérogène possible pour l'homme (groupe 2B). Chimiquement, il s'agit d'une substance composée d'une unité isocoumarine liée à une molécule de L-phénylalanine par une liaison amide **(Bui-Klimke & Wu, 2015)**.

- L'ochratoxine A a été isolée pour la première fois en 1965. Sa découverte a révélé son importance en santé publique en expliquant la néphropathie endémique des Balkans, une maladie rénale chronique observée chez les populations consommant des céréales contaminées. Cette découverte a été réalisée par des chercheurs sud-africains à partir d'une souche du champignon *Aspergillus ochraceus*. Depuis, l'ochratoxine A est devenue l'une des mycotoxines les plus étudiées au monde en raison de sa présence généralisée dans la chaîne alimentaire humaine **(Malir et al., 2016)**.

- La production d'ochratoxine A est étroitement liée aux conditions environnementales, notamment à la température et à l'activité de l'eau (aw). Cette toxine présente une remarquable capacité d'adaptation, lui permettant de contaminer les aliments aussi bien en régions tropicales que tempérées. Par exemple, chez les espèces d'*Aspergillus* (comme *Aspergillus ochraceus*), la

production a lieu entre 25 et 30 °C avec une aw supérieure à 0,95. A l'inverse, les espèces de *Penicillium* (comme *Penicillium verrucosum*) peuvent produire la toxine à des températures basses, comprises entre 4 et 31 °C, avec une température optimale d'environ 20 °C (**Heussner & Bingle, 2015**).

- L'ochratoxine A (OTA) est la forme la plus répandue et la plus toxique, et représente un risque majeur pour la sécurité alimentaire en raison de sa grande stabilité thermique et de sa néphrotoxicité importante. Cependant, elle n'est pas la seule forme ; d'autres formes structurales produites par les champignons sont moins fréquentes et moins toxiques. Il s'agit notamment de l'ochratoxine B (OTB), un dérivé non chloré de l'ochratoxine A, et de l'ochratoxine C (OTC), son ester éthylique (**Koszegi & Poór, 2016**).

III.2.4 Les maladies causées par l'ochratoxines

- Toxicité rénale et risque de cancer : L'ochratoxine A est hautement néphrotoxique, comme l'ont démontré toutes les études animales. Elle est considérée comme la principale cause de la néphropathie endémique des Balkans chez l'homme, une maladie rénale grave et évolutive. Cette maladie provoque un rétrécissement des petits tubules rénaux et la formation de tissu cicatriciel (fibrose). De plus, une exposition continue à cette toxine augmente le risque de développer un type de cancer de la vessie et des voies urinaires : les tumeurs urothéliales. En raison de ces risques, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) classe l'ochratoxine A comme cancérogène possible pour l'homme. Son principal mécanisme d'action implique une altération directe de l'ADN des cellules rénales et un stress oxydatif, un trouble qui endommage les cellules (**Koszegi & Poór, 2016**).

- Toxicité pour le foie et le système immunitaire : Bien que l'ochratoxine A s'attaque principalement aux reins, elle endommage également le foie. Des études indiquent qu'elle peut perturber le métabolisme hépatique des graisses, en augmentant la peroxydation lipidique (une forme de dégradation des graisses dans les cellules) et en provoquant des lésions cellulaires. Concernant l'immunité, l'ochratoxine A affaiblit les défenses naturelles de l'organisme, en réduisant la prolifération des lymphocytes et en perturbant la production de cytokines, ce qui compromet la réponse immunitaire aux infections. Par conséquent, les personnes exposées à cette toxine présentent une immunité affaiblie face aux infections bactériennes ou virales, ce qui rend son impact global sur la santé significatif (**Hibi et al., 2011**).

- Neurotoxicité et Tératogénicité (malformations congénitales chez le fœtus) : Des études récentes indiquent que l'ochratoxine A est toxique pour le cerveau et le système nerveux. Elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique et, une fois à l'intérieur, elle provoque la mort des cellules neuronales par un mécanisme appelé apoptose (mort cellulaire programmée). Ce phénomène pourrait être lié à certaines maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. De plus, l'ochratoxine A est toxique pour le fœtus, car elle traverse le placenta et peut entraîner des malformations congénitales et des retards de développement. Par conséquent, cette mycotoxine fait l'objet d'une surveillance très étroite pendant la grossesse, car elle est considérée comme l'une des toxines les plus dangereuses pour le fœtus (Malir et *al.*, 2016).

III.2.5 La patuline

- La patuline est une mycotoxine de faible poids moléculaire, chimiquement classée comme une lactone insaturée (4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one). Elle se présente naturellement sous forme de cristaux blancs et est soluble dans l'eau et de nombreux solvants organiques. Malgré sa stabilité thermique reconnue en milieu acide, sa concentration diminue lors de la fermentation. Elle est produite comme métabolite secondaire par diverses moisissures, notamment des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Byssosclamyces* ; *Penicillium expansum* est le producteur le plus connu (Puel et *al.*, 2010).

- La patuline a été découverte dans les années 1940. Initialement, les scientifiques s'y sont intéressés et l'ont étudiée en raison de ses propriétés antibactériennes contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, ce qui a mis en évidence son potentiel en tant qu'antibiotique. À cette époque, elle était répertoriée sous différents noms tels que expansine, clavacine et patuline. Cependant, au cours des années 1950 et 1960, des études toxicologiques ont révélé sa toxicité sévère et chronique chez les plantes et les animaux, entraînant son abandon comme traitement. Depuis, la patuline est devenue un contaminant alimentaire majeur, notamment dans les fruits, et fait l'objet d'une surveillance stricte (Saleh & Goktepe, 2019).

- Les champignons produisent de la patuline sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la température, l'activité de l'eau (aw) et le pH. Comme mentionné précédemment, les fruits sont les principales victimes de cette toxine. Par exemple, le champignon *Penicillium expansum*, principal responsable de la contamination des pommes, est capable de produire la toxine à des températures comprises entre 0 et 25 °C, avec une température optimale entre 15

et 20 °C. Une forte humidité favorise la propagation de la toxine en endommageant mécaniquement le fruit et en fragilisant sa peau, ce qui facilite la pénétration des champignons et la production de la toxine. De même, le faible pH de la plupart des jus de fruits (généralement entre 3 et 4) assure des niveaux stables de patuline après production (**Zhong et al., 2018**).

- La patuline se présente principalement dans la nature sous la forme d'une molécule unique et stable, contrairement à certaines toxines comme les aflatoxines, qui existent sous de multiples formes, toutes puissantes et toxiques. Cependant, la molécule de patuline peut réagir avec des composés soufrés (comme la cystéine ou le glutathion), produisant de nouvelles molécules nettement moins toxiques, voire inactives. Ceci explique la dégradation naturelle de la patuline dans diverses conditions et différents milieux de vie. La prudence est toutefois de mise, car la forme lactone libre (la molécule active) présente le plus grand risque pour la sécurité alimentaire (**Ioi et al., 2017**).

III.2.6 Les maladies causées par la patuline

- La patuline provoque une toxicité gastro-intestinale aiguë, même en cas d'exposition de courte durée, entraînant une congestion (rougeur), des saignements et des ulcérations de la muqueuse gastrique et intestinale. De plus, elle endommage les protéines des jonctions serrées, qui assurent l'intégrité des cellules intestinales, augmentant ainsi la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. Ceci permet le passage de substances non destinées à la traverser, provoquant une inflammation localisée (**Puel et al., 2010**).

- La patuline a un effet négatif sur le système immunitaire, l'affaiblissant par inhibition de l'activité des macrophages, notamment de leur capacité à phagocyter et à produire des cytokines, ce qui rend l'organisme plus vulnérable aux infections. De plus, des études récentes ont montré que la patuline est toxique pour les cellules nerveuses, affectant leur production d'énergie et perturbant leur équilibre ionique, ce qui peut entraîner des lésions du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) (**Zhong et al., 2018**).

- Au niveau cellulaire, la patuline produit des radicaux libres, causant un stress oxydatif qui endommage l'ADN, les protéines et les lipides. Bien qu'elle soit classée dans le groupe 3 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), ce qui signifie qu'elle n'est pas encore considérée comme cancérogène pour l'homme, elle présente une génotoxicité *in vitro*, caractérisée par des cassures et des dommages chromosomiques (**Saleh et Goktepe, 2019**).

III.2.7 La trichothécine

- Les trichothécines sont un groupe de mycotoxines produites principalement par des champignons du genre *Fusarium*, ainsi que par d'autres genres comme *Myrothecium* et *Stachybotrys*. Ces toxines agissent principalement en perturbant la synthèse protéique chez les eucaryotes, altérant ainsi la plupart des fonctions cellulaires et les rendant très toxiques pour l'homme et les animaux. Leur toxicité provient de leur structure chimique, et plus précisément de la présence d'un cycle tétracyclique 12,13-époxy-trichothéc-9-ène, qui en est responsable (McCormick et al., 2011).

- L'histoire des trichothécines est similaire à celle d'autres toxines. L'intérêt qu'elles ont suscité s'est considérablement accru après une nouvelle catastrophe sanitaire liée à l'alimentation, survenue après la Seconde Guerre mondiale, suite à une épidémie d'intoxication alimentaire en Union soviétique. Cette intoxication était due à la consommation de céréales stockées contaminées par le champignon *Fusarium*. Plus tard, dans les années 1970 et 1980, ces toxines ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques (Desjardins, 2006).

- La production de trichothécines dépend des variations des facteurs du milieu. Les champignons *Fusarium* se développent de préférence dans un environnement très humide (au-dessus de 70 %) et à des températures fraîches à moyennes, conditions qui coïncident souvent avec la floraison des céréales. Des facteurs de stress environnementaux tels que des variations de température soudaines et fréquentes, des périodes de sécheresse et de fortes pluies peuvent cependant stimuler la biosynthèse de ces toxines au champ (Foroud & Eudes, 2009).

- Il existe quatre types de trichothécines, classés selon leur structure chimique. Les types A et B sont les plus fréquents dans les aliments :

Type A : Les exemples les plus connus sont les toxines T-2 et HT-2. Ce type se caractérise par l'absence d'un groupe carbonyle (céto) en position C-8 (Sudakin, 2003).

Type B : La toxine la plus connue de ce type est le déoxynivalénol (DON), également appelé toxine émétique. Ce type se caractérise par la présence d'un groupe céto en position C-8 (Sudakin, 2003).

Types C et D : Ces types contiennent des structures plus complexes, comme des composés macrocycliques (tels que la satratoxine), principalement produits par le champignon *Stachybotrys chartarum* (Sudakin, 2003).

III.2.8 Les maladies causées par les trichothécines

- L'ingestion des trichothécines inhibe l'assimilation des nutriments et provoque dès les premières heures de consommation des troubles du fonctionnement digestif et des irritations de la muqueuse gastrique. Ces toxines, et plus particulièrement les déoxynivalénols (DON), ingérées induisent des vomissements, des nausées ainsi que des douleurs abdominales (**Pestka, 2010**).

- L'Aleucie Toxique Alimentaire (ATA) est une maladie grave provoquée surtout par la toxine T-2. Elle se traduit par une destruction rapide de la moelle osseuse, ce qui entraîne une chute brutale des globules blancs (leucopénie), des hémorragies et un affaiblissement extrême de tout l'organisme (**Joffe, 1974**).

- Les trichothécines sont de puissants immunosuppresseurs. Elles inhibent la prolifération des lymphocytes et la sécrétion de cytokines, rendant ainsi l'individu vulnérable aux infections bactériennes et virales (**Bondy & Pestka, 2000**).

- Contrairement aux autres mycotoxines, les trichothécines du type A sont nocives pour la peau ; le contact direct avec ces composés provoque une irritation sévère, des rougeurs et une nécrose cutanée. Ce phénomène est fréquent chez les travailleurs manipulant des céréales contaminées (**Wannemacher & Wiener, 1997**).

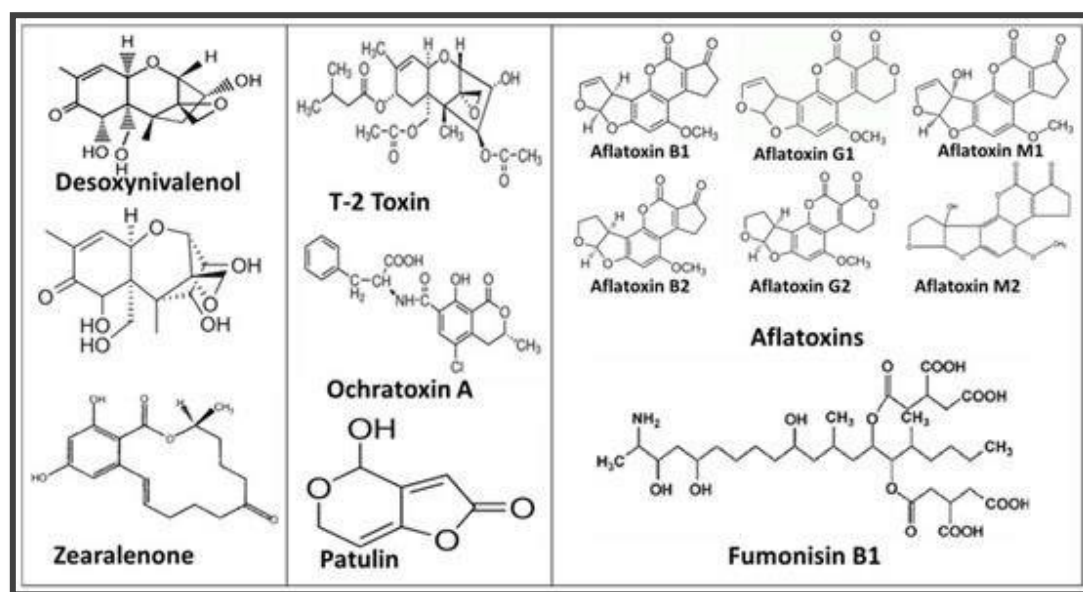


Figure 11 : Structures chimiques des principales mycotoxines : Aflatoxines, Patuline, Ochratoxine A et Trichothécènes (**Bennett & Klich, 2003**).

III.3 Les voies de contamination chez l'homme

Les mycotoxines sont absorbées par trois voies principales : l'inhalation, l'ingestion et la peau. Ces voies sont bien connues en toxicologie alimentaire (CNESST, 2018).

III.3.1 Voie respiratoire

Dans le milieu professionnel, elle est considérée comme la principale voie d'entrée des mycotoxines dans les poumons. Dans le cas de particules telles que les spores, celles-ci peuvent se déposer dans les voies respiratoires ou se dissoudre dans le liquide alvéolaire, puis passer dans la circulation sanguine et provoquer des effets sur la santé qui varient en fonction de leur concentration et de la durée d'exposition. Comme l'inhalation de fines particules de poussière de thé contaminé contenant des spores et des mycotoxines lors de son traitement ou de son stockage (CNESST, 2018).

III.3.2 Voie cutanée

La peau constitue la première ligne de défense contre les agents extérieurs. En cas de brûlures ou de fissures cutanées, les toxines fongiques peuvent pénétrer dans l'organisme par la peau lorsqu'elles entrent en contact avec celle-ci, quelles que soient leurs propriétés physiques. L'absorption cutanée dépend de plusieurs facteurs : le degré de pureté de la substance, sa solubilité et la nature de la zone exposée, l'absorption étant d'autant plus importante que la peau est fine. (CNESST, 2018).

III.3.3 La voie digestive (ingestion)

Bien qu'elle ne soit pas considérée comme une voie d'exposition courante, elle représente un danger réel qu'il ne faut pas négliger. Ce risque découle de mauvaises habitudes dangereuses, telles que le manque d'hygiène des mains avant de manger ou la consommation d'aliments dans des lieux contaminés (CNESST, 2018).

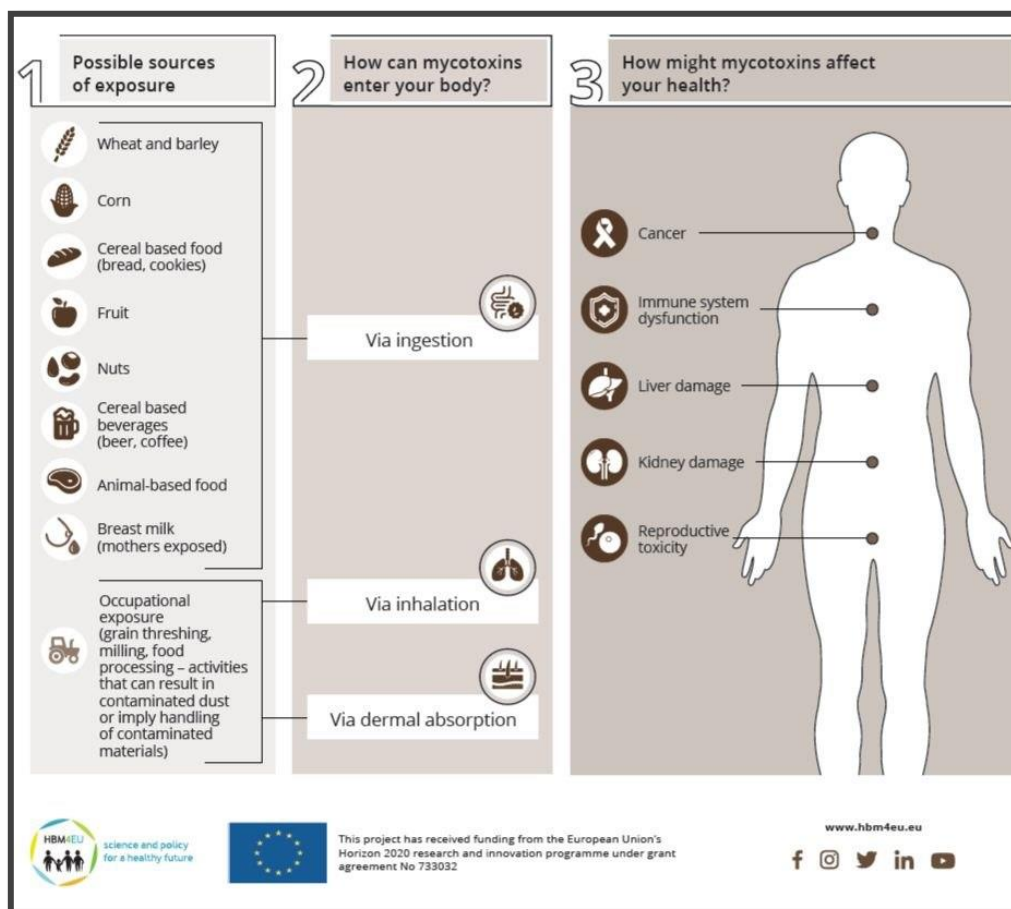


Figure 12 : Distribution systémique des mycotoxines et impacts sur les organes cibles (Adaptée de Sudakin, 2003).

III.4 Prévention les mycotoxines

III.4.1 Prévention primaire

La mise en œuvre de mesures de prévention préventives est essentielle pour éviter toute contamination fongique. Parmi les plus importantes, on peut citer : **(Suttajit, 1990)**

- La réduction des infections fongiques dans les champs agricoles grâce à l'application de pratiques agricoles appropriées, Le séchage des récoltes.
- La conservation des produits à des températures aussi basses que possible.
- Organiser les opérations de culture et les étapes post-récolte selon un calendrier bien pensé.
- Utiliser des fongicides pour limiter la croissance des organismes fongiques.

III.4.2 Prévention secondaire

En cas de contamination fongique des produits à un stade précoce, il devient important de recourir à des mesures préventives pour éliminer les champignons et limiter les dégâts, notamment : **(Suttajit, 1990)**

- Le séchage des produits afin d'empêcher le développement des champignons.
- Éliminer les matières contaminées, telles que les feuilles de thé. Placer le produit dans des conditions de stockage appropriées empêchant la poursuite de la croissance fongique.

III.4.3 Prévention tertiaire

Lorsque les champignons ont envahi les produits, les mesures de prévention précoces sont inutiles. Dans ce cas, l'objectif n'est plus d'arrêter la croissance, mais de limiter ses répercussions graves sur la santé humaine et l'environnement, et d'empêcher leur pénétration dans la chaîne alimentaire. Et de s'en débarrasser définitivement et en toute sécurité **(Suttajit, 1990)**.

III.5 Les méthodes pour contrôle les mycotoxines

III.5.1 Méthodes physiques

Il existe de nombreuses méthodes, parmi lesquelles le tri manuel ou l'utilisation de détecteurs photoélectriques pour éliminer les graines contaminées par des champignons.

III.5.2 Méthodes chimiques

Elles comptent parmi les méthodes efficaces pour éliminer les toxines, à condition de ne pas altérer le produit. On utilise pour cela un ensemble d'agents chimiques acides, basiques et oxydants : l'acide CH_3COOH , l'ammoniac NH_3 , l'hydroxyde de sodium NH_4OH ou l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$, l'ozone O_3 **(Yiannikouris et Jouany, 2002)**.

III.5.3 Méthodes biologiques

Celles-ci sont plus efficaces et comprennent la lutte biologique utilisant des bactéries bénéfiques pour éliminer les toxines. À titre d'exemple, il a été démontré que la bactérie *Flavobacterium aurantiacum* est capable d'éliminer définitivement l'aflatoxine des cultures **(Wioletta et Jadoda, 2021)**.

III.6 Les méthodes de détection des mycotoxines

III.6.1 Détection des mycotoxines par chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est la première technique de détection des mycotoxines dès le début des années 1970, car elle permet la séparation de leurs composés et leur identification précise (détection qualitative et semi-quantitative). Elle est simple et rapide à utiliser, et permet l'examen de plusieurs échantillons en même temps (**Houissa, 2020**). Elle se compose de deux phases :

La phase stationnaire est une fine couche de gel de silice absorbant (Silica gel 60 F254) dans laquelle sont déposés des taches de 20 à 40 microlitres de chaque extrait. Ensuite, la plaque est placée dans une chambre de chromatographie contenant la phase mobile, qui est un mélange de solvants jouant un rôle dans la séparation des molécules sur la phase stationnaire, comme un mélange de toluène, d'acétate d'éthyle et d'acide formique, dans des rapports volumiques (40/32/8), respectivement, qui dépendent des différences d'affinité des composés envers les deux phases (**Gauthier, 2016**).

III.6.2 Chromatographie haute performance

Il s'agit d'une technique plus avancée que la chromatographie sur couche mince, car elle permet une analyse quantitative, et elle est largement utilisée et revêt une grande importance dans la détermination quantitative des mycotoxines (**Heit, 2015**). Il se compose de :

Une pompe (système de pompage) qui propulse la phase mobile sous une pression de 20 et 150. un injecteur (injecteur) pour l'introduction de l'échantillon, une colonne remplie d'une phase stationnaire (généralement silice) de différentes tailles de particules, et un détecteur tel que le rayonnement ultraviolet-visible. Un appareil d'enregistrement et un programme d'information pour traiter les résultats (**Caude et Jardy, 1995**). La phase mobile traverse une colonne (phase stationnaire) à l'instant initial. Le mélange à analyser est injecté à l'entrée de la colonne. Les composants se déplacent à des vitesses différentes du fait de la différence de leur affinité avec les deux phases, ce qui conduit à leur séparation au sein d'une colonne, et ils traversent un détecteur pour les traduire en donnant un signal sous forme de pics dans un diagramme appelé chromatogramme (**Caude et Jardy, 1995**).

III.6.3 ELISA

ELISA est l'acronyme de « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay » (test d'immunosorbance enzymatique), une méthode immuno-enzymatique qui se caractérise par une sensibilité et une spécificité élevée pour la détection des toxines fongiques. Elle fournit des résultats en un délai très court (24 heures) et est actuellement une technique reconnue pour sa facilité d'application et son faible coût (**Turner et al., 2009**). Cette technique repose sur l'interaction spécifique entre l'antigène (mycotoxine) et l'anticorps, l'un des deux étant fixé à la surface d'une plaque microtitrée composée de 96 puits. Puis un composant conjugué à une enzyme est ajouté, suivi d'un substrat avec lequel l'enzyme réagit pour produire un signal coloré dont l'intensité est mesurée par un lecteur. La réaction peut être compétitive (méthode indirecte) ou non compétitive (méthode directe), le choix dépendant de la nature de la substance à analyser (**Heit, 2015**).

Chapitre IV

Matériel et Méthodes

Notre recherche a été menée au niveau du laboratoire des sciences naturelles de l'Université Dr Moulay Taher de Saïda, sur une période de quatre mois (janvier - avril). Les objectifs de cette étude étaient axés sur :

- La réalisation d'une étude de terrain à travers un questionnaire destiné aux consommateurs et aux commerçants pour collecter des informations sur le type de thé le plus consommé.
- La collecte d'échantillons de thé.
- L'isolement des champignons contaminant de thé et déterminer leur classification précise.
- L'évaluation de la capacité des isolats fongiques à produire des toxines, par leur culture dans des milieux de culture spécifiques et sélectifs.
- La détection des mycotoxines présentes dans les échantillons grâce à la technologie de chromatographie sur couche mince (CCM).

IV. 1. Présentation du questionnaire de consommation (enquête)

Une enquête par questionnaire a été réalisée dans le cadre de cette étude dans le but d'identifier les marques les plus consommées dans l'état de Saïda et de sélectionner les échantillons à étudier ; le questionnaire a été soumis à 633 consommateurs, a été créé sur le site Google Forms et a été distribué :

- En ligne via les sites de réseaux sociaux.
- Grâce à des entretiens directs avec certains consommateurs.

Le questionnaire comprenait plusieurs types de thé disponibles sur le marché local (Al-Barad, Al-Raqim, Diyaf, Al-Marwan, Al-Sahm, Al-Zaim, Timimoun).

a. Échantillons utilisés

Cette étude s'est appuyée sur des échantillons du thé vert le plus couramment consommé, et quatre échantillons ont été sélectionnés sur la base des résultats du questionnaire. Les échantillons ont été achetés et transportés au laboratoire dans des sacs stériles et conservés à température ambiante.



Photo 1 : (A) les types de thé les plus consommés dans la wilaya de Saïda. **(B)** le lieu d'achat de ces thés (la supérette ADEM shop).

b. Milieux de culture

- Milieu Potato, Dextrose, Agar (PDA) (**Raper et Fennell, 1965**).
 - Milieu Czapek, Yeast, Agar (CYA) (**Pitt et Hocking, 1997**).
 - Milieu extract Malt Agar (MEA) (**Riddish 1919**).
 - Milieu 25ar% Glycerol Nitrat Agar (G25N).
 - Milieu Czapek Dox Agar (CDA).
- La composition chimique de ces milieux est donnée en annexe1.

Pour garantir que les milieux de culture étaient exempts de contaminants, ils ont été stérilisés dans un autoclave à vapeur sous pression à 121 degrés Celsius pendant 20 minutes (**Botton et al., 1990**).

IV.2 Analyses physico-chimiques

IV.2.1 Déterminez le niveau d'humidité

Cela dépend du séchage thermique des échantillons, où 50 g de chaque échantillon sont placés dans une étuve à une température de 105 degrés Celsius pendant 24 heures jusqu'à ce que le poids soit stable. Ensuite, la teneur en humidité de chaque échantillon est calculée à l'aide de l'équation suivante (Multin, 1982 ; Gacem et *al.*, 2011) :

$$\% \text{ d'humidité} = (\text{poids avant séchage} - \text{poids après séchage}) / \text{poids avant séchage} \times 100$$



Photo 2 : Différents échantillons de thé en cours de séchage dans un four Pasteur.

IV.2.2 Déterminez le pH

Pour mesurer le pH, une solution est préparée composée de 5 grammes de chaque échantillon broyé avec 45 ml d'eau distillée. Le mélange est bien agité puis laissé reposer une heure pour assurer l'équilibre ionique avant de mesurer avec un pH-mètre. Les mesures sont effectuées en trois répétitions pour chaque échantillon, et la moyenne arithmétique des valeurs obtenues est calculée (Rashdi, 2004).

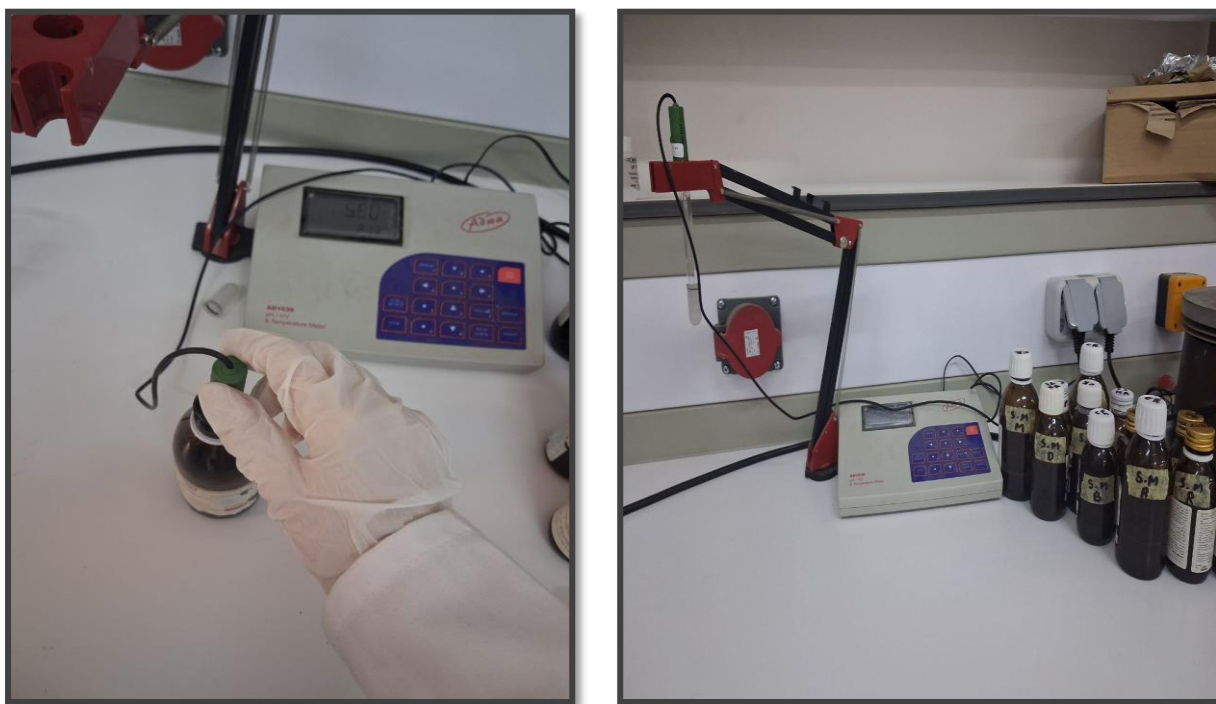


Photo 3 : Mesure de pH d'un échantillon par le pH mètre.

IV.3 Analyses mycologique

IV.3.1 Méthode de dilution

La méthode de dilution est utilisée dans l'étude fongique des échantillons de thé. Après avoir mis en suspension 1 g de chaque échantillon dans 9 ml de solution physiologique stérile. Ensuite la suspension est agitée pendant 10 minutes afin d'obtenir la suspension mère. Puis une série de dilutions décimales successives sont préparées jusqu'à 10^{-6} à partir de la suspension mère. L'importance de cette méthode réside dans le fait qu'elle permet un comptage précis des spores fongiques à partir de la suspension mère (Larpent, 1997).

IV.3.2 Isolement et dénombrement de la flore fongique sur milieux PDA et CDA

Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode suspension-dilution pour isoler la flore fongique. Une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} ont été préparées. Pour chaque dilution, un volume de 0,1 ml estensemencé à la surface des milieux PDA et CDA (ANNEX) en 3 répétitions de chaque dilution. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C pendant 5 à 7 jours.

Nb : Pour garantir la sélectivité du milieu et éviter la croissance bactérienne, 1 ml d'acide lactique à 25 % est ajouté à chaque litre de milieu PDA. Le rose de Bengale est également utilisé comme agent à double fonction, il est inhibiteur de bactéries et limite la propagation accidentelle des moisissures dans les boîtes de Pétri pour faciliter leur comptage (Larpent, 1990).



Photo 4 : Ensemencement des dilutions sur milieux PDA et CDA.

IV.3.3 Identification des isolats

Les isolats sont identifiés sur la base de clés taxonomiques binaires (clés dichotomiques) et de références, incluent un ensemble de caractéristiques telles que la forme, la pigmentation et le diamètre, ainsi que des caractéristiques morphologiques microscopiques (mycélium et spores conidiennes) (Botton *et al.*, 1990).

IV.3.4 Identification macroscopique

Après ensemencement des souches sur deux milieux de culture, PDA et CDA, leurs caractéristiques morphologiques sont évaluées visuellement en termes de : Vitesse de croissance, Couleur des colonies, Structure coloniales, Couleur du bas et du haut du colonies.

IV.3.5 Repiquage et purification des souches

Après la période d'incubation, les colonies en croissance sont examinées et pour purifier la souche, elles sont repiquées sur milieu PDA (Annex). On obtient ainsi des souches pures. Un fin échantillon de spores ou un fragment de mycélium est prélevé en bordure de la colonie à l'aide d'une anse, puis transféré dans du milieu PDA frais, inoculé en un seul point au centre de la boîte de Pétri pour assurer une croissance typique et régulière du champignon (**Botton et al., 1990**). Ensuite, les boîtes sont placées dans l'incubateur à une température de 25 degrés Celsius pendant une 5 ou 7 jours.

IV.3.6 Conservation des isolats fongiques

Pour assurer la viabilité et la conservation des cultures fongiques purifiées, elles sont repiquées sur un milieu PDA incliné (gélose inclinée), puis incubées à une température de 25°C pendant 5 à 7 jours pour la croissance, puis transférées au réfrigérateur à une température de 4°C pour la conservation.



Photo 5 : Conservation des isolats dans des tubes incliné

IV.3.7 Identification des moisissures

L'identification des champignons dépendent principalement du suivi des caractéristiques de croissance et de la description de l'aspect des cultures dans les conditions environnementales.

L'accent est mis sur des critères tels que la vitesse de croissance, la texture des colonies et la variation de couleur de surface et Revers de colonie (**Larpen, 1997**).

IV.3.8 Identification des genres

Afin de parvenir à une identification précise des genres, la technique de microculture a été réalisée selon la méthodologie **Harris 1989**, en suivant les étapes suivantes :

Des spores fongiques sont inoculées à la périphérie de petits cubes de milieu gélose dextrose de pomme de terre acidifié montés sur des lames de verre pour assurer l'aération, puis recouverts de lamelles. Le système complet est placé dans boîte de pétri stérile et humide, puis incubé à une température de 25 degrés Celsius pendant 3 à 5 jours.

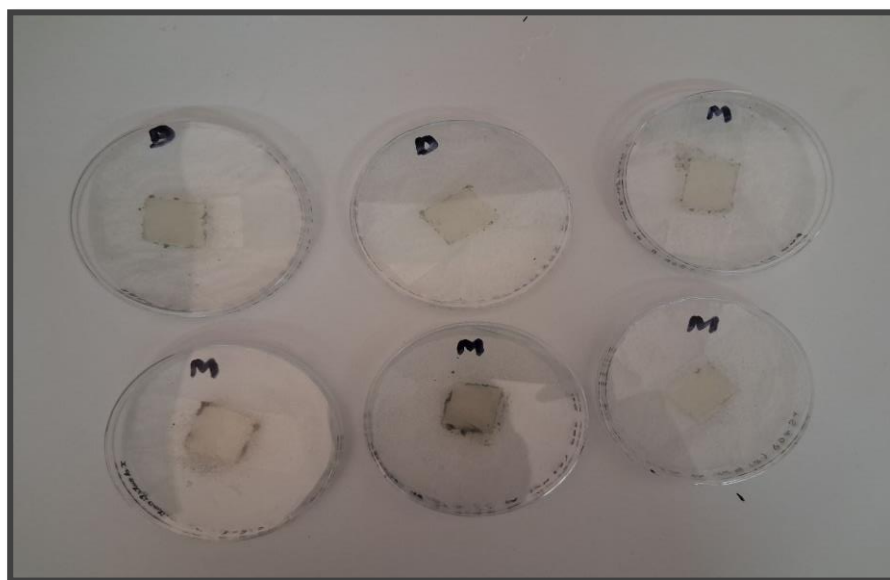


Photo 6 : Identification des genres par la méthode HARIS.

Après incubation, les lamelles sur lesquelles le mycélium s'est développé sont délicatement prélevées et montées sur de nouvelles lames, auxquelles sont ajoutées quelques gouttes de lactophénol ou de bleu de coton.

Les microstructures sont observées en utilisant différentes puissances de grossissement ($\times 10$, $\times 40$, $\times 100$). L'identification des genres fongiques est déterminée en faisant correspondre les caractères culturels et microscopiques observés avec les clés de l'identification de champignon filamenteux (**Dufresne & St-Germain, 2021**).

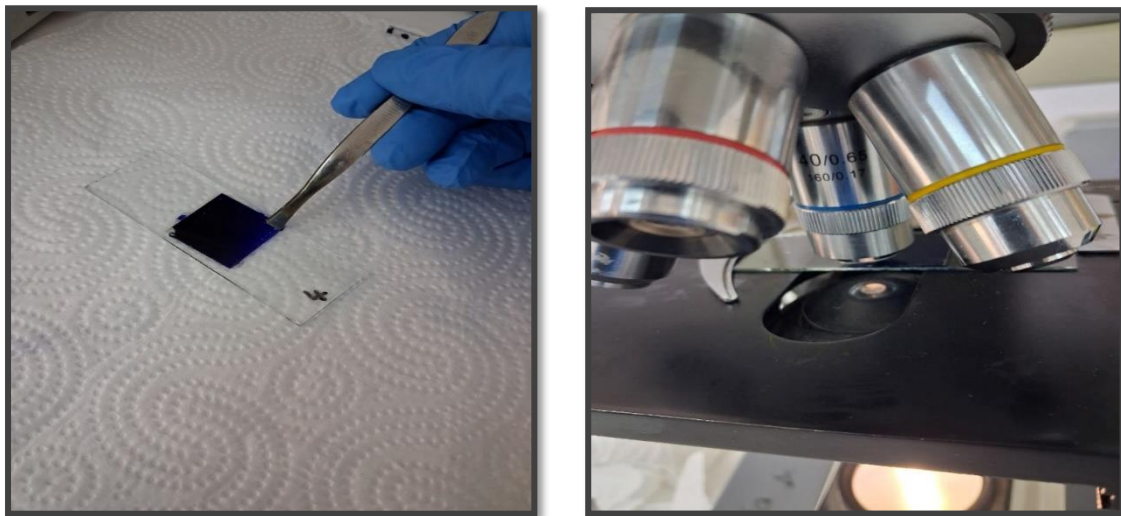


Photo 7 : coloration et observation microscopique des isolats.

IV. 3.9 l'identification des espèces *Penicillium* et *Aspergillus*

L'identification des champignons repose principalement sur des schémas taxonomiques qui étudient les caractéristiques morphologiques. Nous nous appuyons sur la méthodologie de (**Pitt et Ramirez,1973**) qui utilise la méthode de la spore unique, qui se concentre sur l'étude de l'étendue de la réponse du champignon aux variations d'activité de l'eau (aw) et des températures d'incubation.

Cette méthode consiste à préparer une suspension de spores en prélevant un échantillon d'une culture fongique jeune, et en le plaçant dans des tubes contenant une solution semi-solide de 0,2 %agar et 0,05 Tween 80.

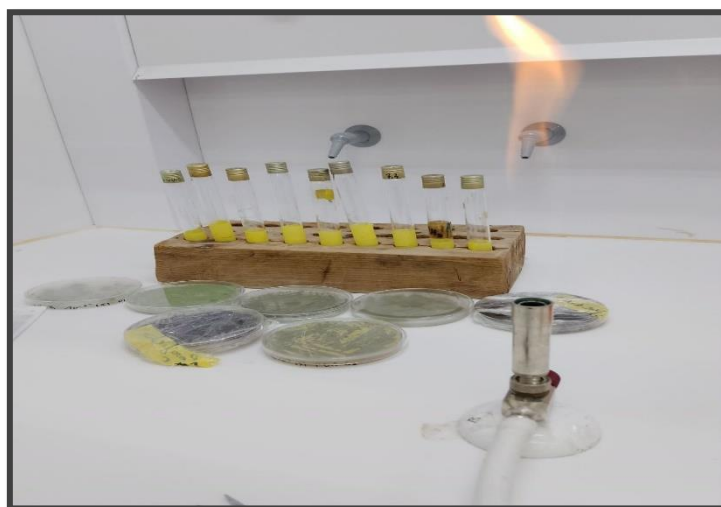


Photo 8 : la méthode de la spore unique (single spore) sur milieu semi-solide.

IV. 3.9.1 Identifier les types d'*Aspergillus*

Les échantillons sont cultivés sur trois milieux de culture différents pour observer les différences biologiques :

- Milieu MEA (Malt Extract Agar) : incubé à 25 degrés Celsius, et afin de déterminer la couleur de la colonie et la densité des spores.
- Milieu CYA (Czapek Yeast Extract Agar) : Il est utilisé à deux températures différentes, 5°C et 37°C, pour suivre l'effet de la température sur la croissance.
- Milieu G25N (Glycerol Nitrate Agar) : à 25 degrés Celsius, et se caractérise par l'ajout de 25 % de glycérol pour réduire l'activité aqueuse (aw) et tester la capacité du champignon à se développer dans des conditions de sécheresse.

IV. 3.9.2 Identifier les types de *Penicillium*

Les échantillons sont cultivés sur les milieux suivants :

- Milieu MEA (Malt Extract Agar) : à une température de 25 degrés Celsius.
- Milieu CYA (Czapek Yeast Extract Agar) : utilisé à 37 degrés Celsius.
- Milieu G25N (Gélose au nitrate de glycérol) : à 25 degrés Celsius.
- Milieu CDA (Czapek Dextrose Agar) : à une température de 25 degrés Celsius.

Les différents isolats d'*Aspergillus* et *Penicillium* sont inoculés comme le montre la figure suivante :

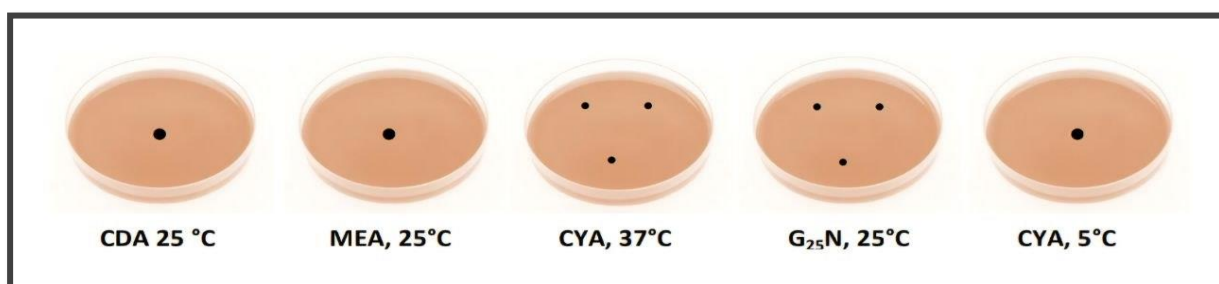


Figure 13 : Types d'inoculation dans les différents milieux de culture. Les boîtes incubées à 37°C doivent être enfermées dans des sacs en polyéthylène pour empêcher l'évaporation, donc l'assèchement du milieu. À moins que l'humidité soit très basse, les boîtes à 25°C ne subissent pas d'évaporation excessive en 7 jours. Examen des cultures Pour toutes les cultures obtenues après 7 jours, l'identification est fondée sur la technique de Pitt selon les caractéristiques suivantes (Pitt, 1973).

Remarque : À 37 degrés Celsius, les boîtes de Pétri doivent être placées dans des sacs en polyéthylène afin de protéger le milieu nutritif de l'évaporation, ce qui entraîne le dessèchement de la boîte et des nuire à la culture.



Photo 9 : Ensemble de boîtes de Pétri contenant quatre milieux différents pour l'identification des espèces fongiques.

Pour les cultures dont la période de croissance est complète au bout de 7 jours, la technique (Pitt, 1973) est principalement utilisée pour identifier et diagnostiquer selon les critères suivants :

- Le diamètre de la colonie visible à l'œil nu est mesuré en millimètres à partir du fond de la boîte.
- En cas de germination à des températures de 5 degrés Celsius, l'observation est réalisée à microscope à faible grossissement. Cela se fait en plaçant une boîte directement sous un microscope et en l'examinant à l'aide d'une lumière transmise pour observer les premiers stades de croissance (Bolton et al. 1990).
- La colonie est généralement examinée soit à l'œil nu, soit à l'aide d'une loupe, et les couleurs des colonies sont déterminées par observation en lumière du jour.

IV.4 Analyse mycotoxique

Dans cette étude, tous les isolats fongiques appartenant au genre *Aspergillus* et au genre *Penicillium* ont été sélectionnés afin d'évaluer leur capacité à produire des mycotoxines dans des conditions de laboratoire appropriées.

IV.4.1 Ensemencement sur milieu YES

Toutes les souches d'*Aspergillus* et *Penicillium* obtenues sont ensemencées sur milieu YES (Annex), qui est un milieu riche en vitamines B, dans le but de stimuler le métabolisme secondaire et d'activer les réactions les mécanismes de production de métabolites fongiques. Ensuite, les cultures sont incubées à 30 degrés Celsius pendant 14 jours pour assurer leur croissance.



Photo 10 : Ensemencement des souches d'*Aspergillus* et *Pénicillium* sur milieu YES.

IV.4.2 Filtration

Après la fin de la période d'incubation, le contenu du milieu YES est filtré à l'aide de papier filtre (papier Whatman) afin de séparer le filtrat de la biomasse représentée par le mycélium.



Photo 11 : Filtration de biomasse formée sur le milieu YES.

- Les mycotoxines sont extraites du filtrat selon la méthodologie suivante :

L'extraction des aflatoxines à partir du filtrat de culture (milieu YES) a été réalisée par une partition liquide-liquide en utilisant le chloroforme comme solvant d'extraction. Le processus commence par l'ajout de 100 ml de chloroforme à 50 ml du filtrat, suivi d'une agitation vigoureuse pendant 10 minutes pour favoriser le transfert des toxines vers la phase organique. Après une séparation complète dans une ampoule à décanter, la première phase chloroformique est récupérée. Ce processus est répété deux fois sur la phase aqueuse restante : une seconde fois avec 50 ml de chloroforme (agitation de 10 min), puis une troisième fois avec 30 ml, afin d'optimiser le rendement de récupération. Les trois phases chloroformiques obtenues sont ensuite rassemblées pour constituer l'extrait brut final contenant les aflatoxines (**Pitt & Hocking, 2009**).

Les trois phases chloroformiques sont mélangées et placées dans un appareil Rotavapeur pour évaporer le solvant. L'extrait restant est ensuite traité par séparation chromatographique.



Photo 12 : Extraction et concentration de l'extrait qui contient des métabolites secondaires.

IV.4.3 Séparation chromatographique (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est considérée comme la technologie de base utilisée dans le procédé de séparation, car elle permet la séparation des composés et leur estimation quantitative avec une grande précision (**Fravssinet et Cahagnier, 1982**).

Elle est réalisée sur une plaque de gel de silice, sur laquelle sont déposés deux spots de 40 microlitres de chaque extrait d'*Aspergillus* et de *Pénicillium*, puis la plaque est placée dans une cuve chromatographique et immergée dans un solvant constitué respectivement de toluène, d'acétaldéhyde et d'acide formique (5, 4, 1).

Après migration, la plaque est observée sous rayonnement ultraviolet à une longueur d'onde de 365 nanomètres.



Photo 13 : la chromatographie sur couche mince (CCM) des mycotoxines.

Chapitre V

Résultat

V.1 Les résultats relatifs aux variétés de thé les plus consommées

Les résultats ont été représentés sous forme de diagramme circulaire afin de faciliter leur analyse et leur interprétation.

Notre enquête a recueilli 633 réponses. Le thé Al-Barad arrive en tête des thés les plus consommés, avec 540 réponses. Il est suivi par le thé Al-Marwan (30 réponses), puis le thé Al-Raqim (19 réponses) et enfin le thé Al-Diyaf (14 réponses).

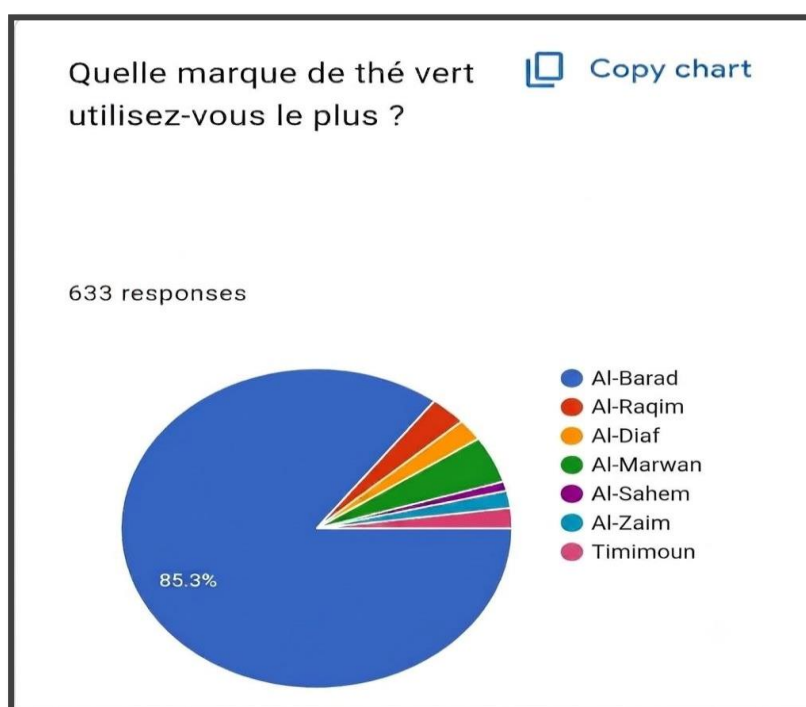


Figure 14 : Diagramme circulaire montrant les résultats relatifs aux variétés de thé les plus consommées.

V.2 Les résultats physico-chimiques

Afin d'évaluer la qualité et la quantité des différentes variétés de thé vert, des analyses physiques, chimiques et mycologiques ont été réalisées, puis la contamination par des mycotoxines a été évaluée dans les échantillons de thé

V.2.1 Humidité

La température est l'un des facteurs essentiels à la croissance et au développement des champignons, en raison de son influence sur leur activité et leur capacité à produire des mycotoxines.

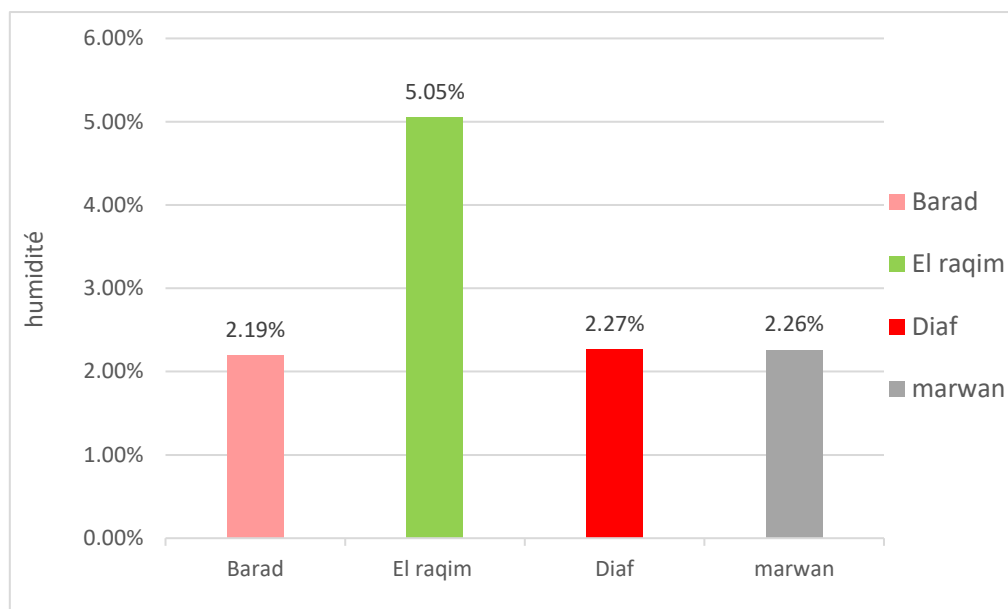


Figure 15 : Taux d'humidité des différents échantillons de thé vert analysés.

V.2.2 pH

Les résultats des mesures du pH des échantillons de thé vert étudiés montrent que tous les échantillons présentent une faible acidité (graphique). Cela s'explique par la composition chimique du thé, notamment les acides organiques et les polyphénols, ainsi que par l'effet tampon de certains composants tels que les protéines, qui maintiennent le pH proche de la neutralité.

De légères différences ont été observées entre les échantillons : El-Brad (5,30-5,31-5,30), El-Raqim (5,52- 5,53-5,50), Diaf (5,38-5,49-5,50), El-Marwan (5,45-5,48-5,52).

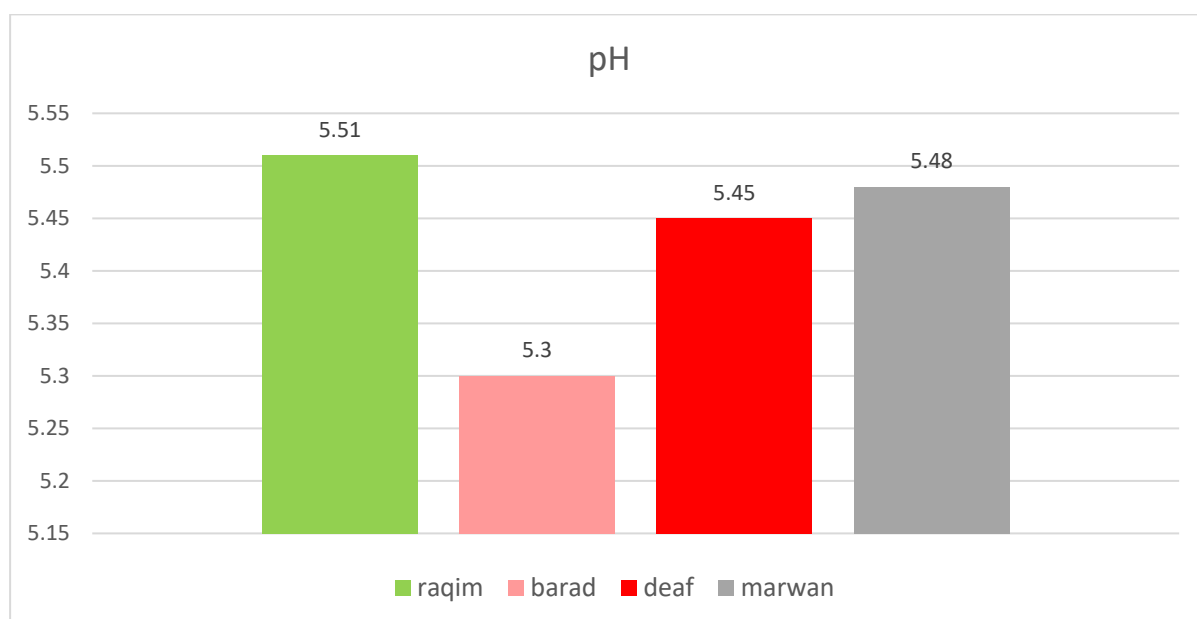
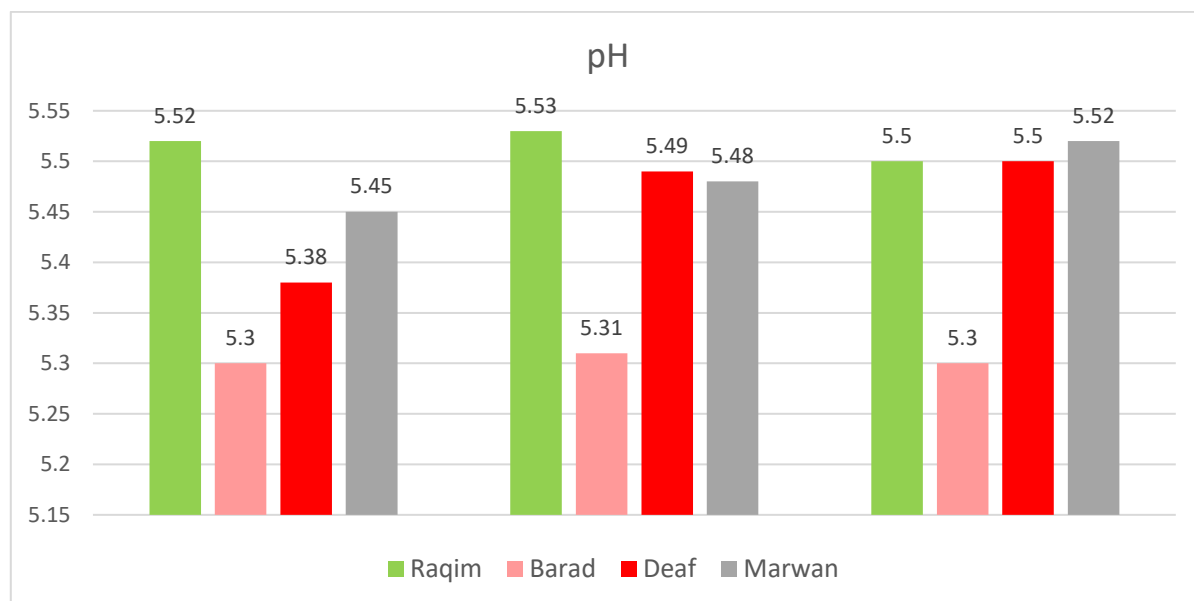


Figure 16 : Diagrammes à barres des valeurs de pH pour les quatre types de thé les plus Consommés.

V.3 Les résultats mycologiques du thé vert

V.3.1 Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de thé vert

À l'issue de l'isolement des champignons à partir des quatre échantillons de thé vert (Brad, Al-Diyaf, Al-Raqim, Al-Marwan), 17 souches fongiques ont été sélectionnées comme suit : Les échantillons de Al-Raqim ont enregistré le plus grand nombre d'isolats avec 8 (47,05 %), suivis des échantillons de Al-Marwan avec 4 (23,53 %), puis des échantillons de Al-Bard avec 3 (17,65 %) et enfin des échantillons de Al-Diyaf avec 2 (11,76 %). Les isolats obtenus ont été classés en pourcentage réparti entre les différents types de thé vert.

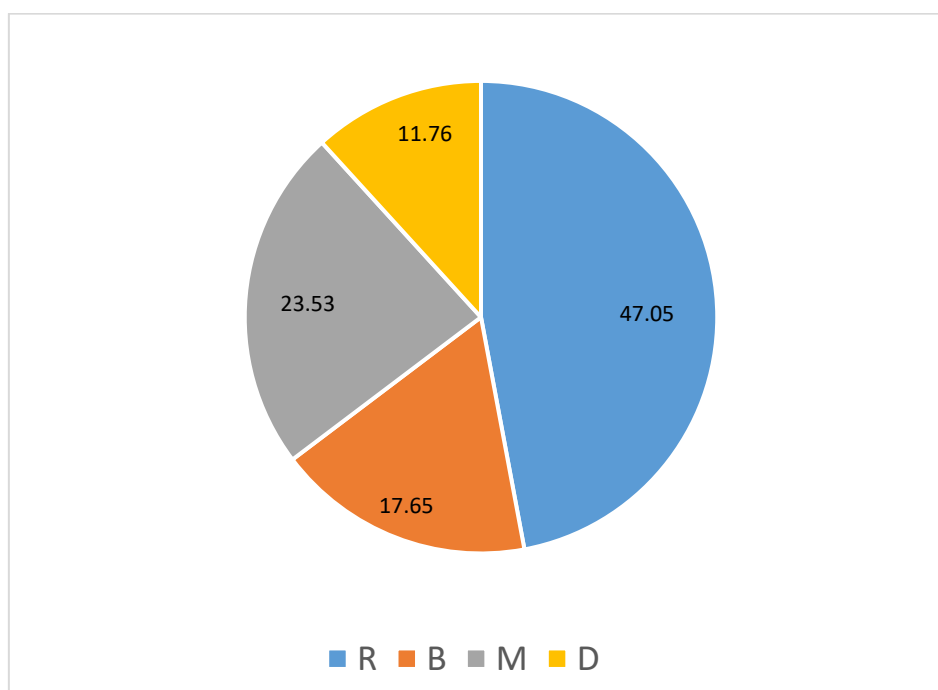


Figure 17 : Diagramme circulaire de la flore fongique contaminant le thé le plus consommé.

V.3.2 Identification des souches fongiques isolées

V.3.2.1 Dénombrement

Tableau 4 : Dénombrement des souches fongiques isolées

Milieu	CDA						PDA					
Dilution	10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵		
Nombre de répétition	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
R	/	/	2	/	/	/	/	/	2	1	1	4
B	/	/	1	/	/	/	/	/	/	/	1	1
M	/	/	/	/	/	/	1	2	/	/	3	/
D	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2

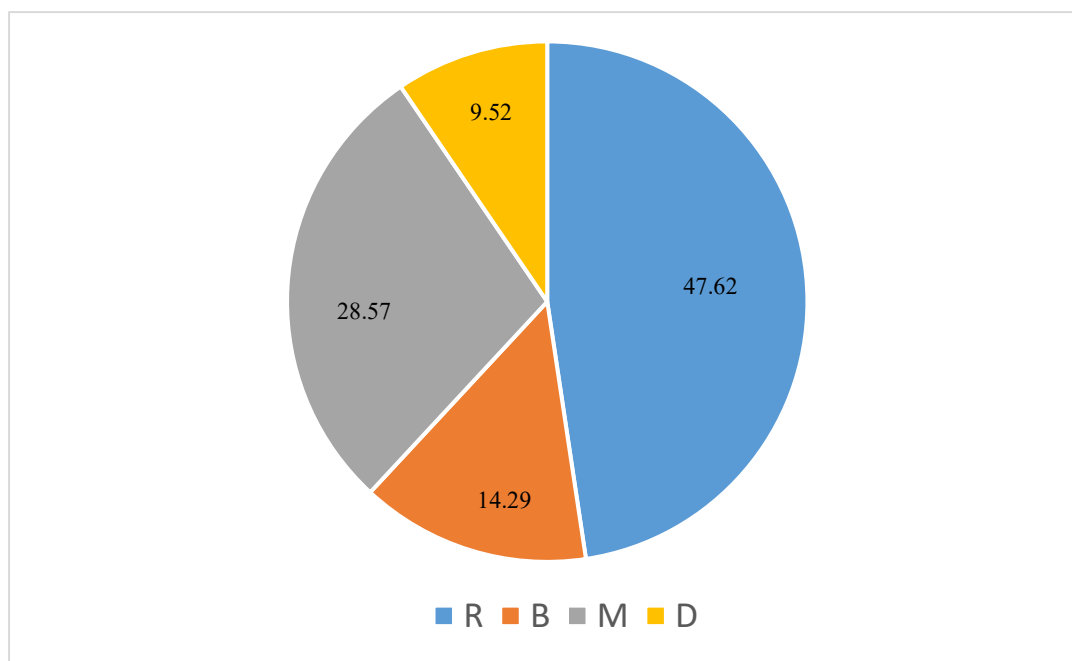


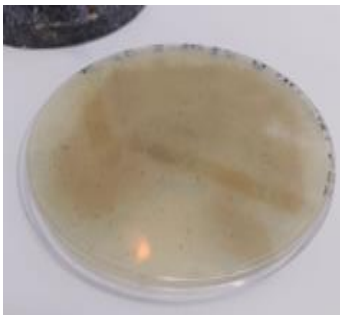
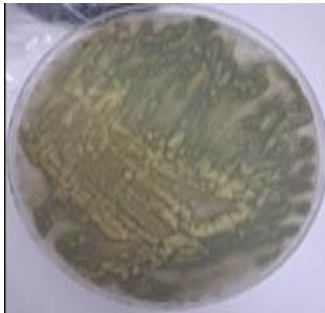
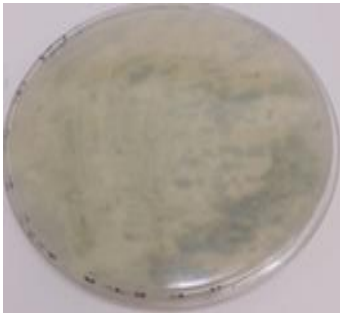
Figure 18 : Distribution relative du nombre de colonies fongiques selon les échantillons de thé vert

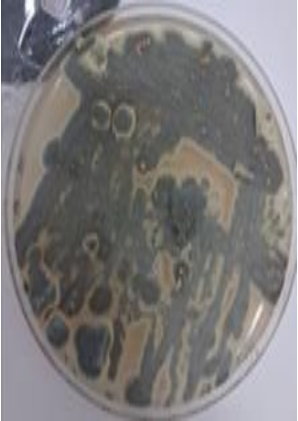
V. 3.2.2 Identification macroscopique

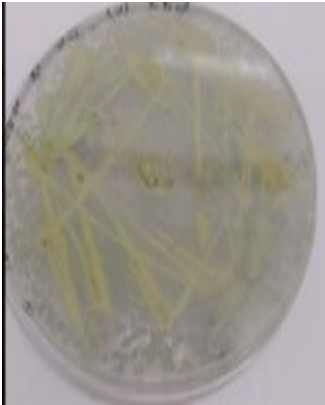
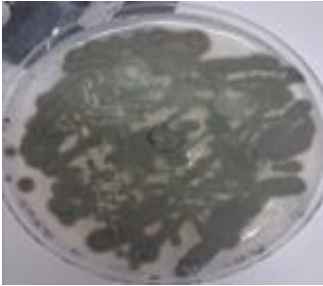
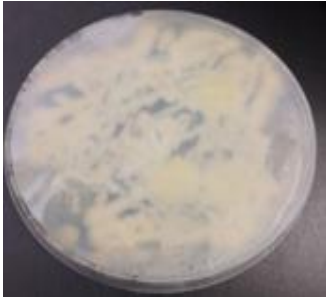
L'étude macroscopique consiste en une observation à l'œil nu des caractéristiques macroscopiques (aspect, apparence, forme et couleur des colonies). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Aspects macroscopique et les caractéristiques des souches

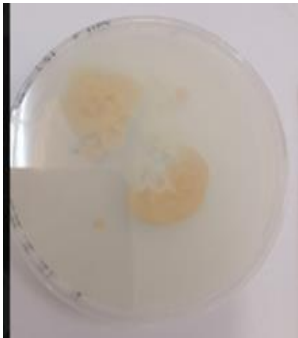
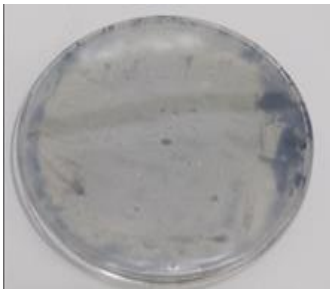
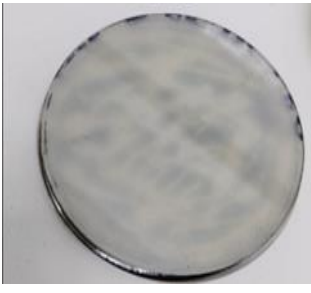
❖ Dans le thé El Raqim

Souche	Aspect macroscopique isolas		Aspect macroscopique
	Surface	Reverse	
R 10⁻⁵ (2)			Recto : Colonie Vert-grisâtre, texture veloutée et dense avec des zones granuleuses. Verso : couleur Crème à beige jaunâtre, avec une croissance rapide.
R 10⁻⁴(2)			Recto : colonie Vert-olive à vert-jaunâtre, texture veloutée et très dense. Verso : couleur Crème avec des reflets vert pâle, avec une croissance très rapide.

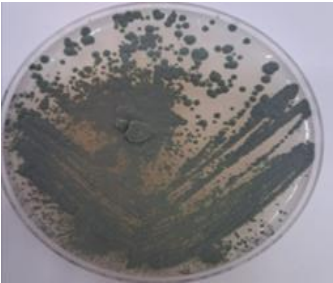
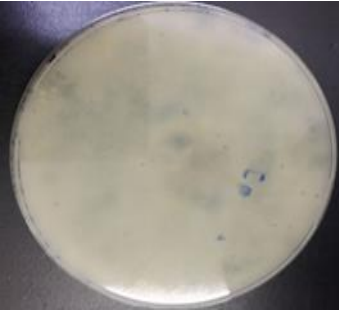
R 10 ⁻⁴ (3)			Recto : colonie Vert-grisâtre à vert foncé, texture veloutée et dense, avec la présence de nombreuses petites granulations de couleur orange. Verso : couleur Crème avec des taches brun-rougeâtre, et la croissance est très rapide.
R 10 ⁻⁵ (3)			Recto : colonie blanche à crème, texture cotonneuse à rase et diffuse, avec quelques points plus denses de couleur brunâtre au centre. Verso : couleur Blanche à translucide, avec une croissance lente.
R 10 ⁻⁵ (3) s1			Recto : colonie vert olive avec une texture veloutée et uniforme. Verso : couleur crème à jaunâtre pâle avec une croissance moyenne à rapide.

R 10 ⁻⁵ (1)			Recto : colonie Vert olive foncé, avec une texture dense et membraneuse. Verso : couleur vert pâle ou crème verdâtre, avec une croissance rapide.
R 10 ⁻⁴ (3) s2			Recto : colonie vert-olive grisâtre dense, avec une texture granuleuse à veloutée. Elle se superpose à un mycélium basal de couleur jaune vif. Verso : couleur Jaune intense à orange, avec une croissance moyenne à rapide.
R 10 ⁻⁵ (3) s2			Recto : colonie vert grisâtre pâle avec une texture veloutée. Verso : couleur crème à beige, avec une croissance rapide.

❖ Dans le thé EL Barad

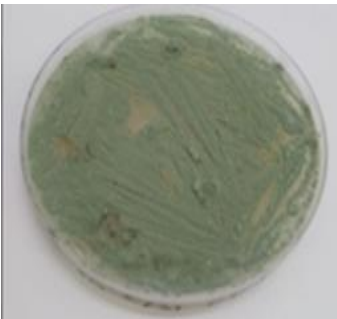
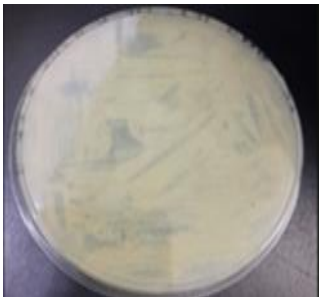
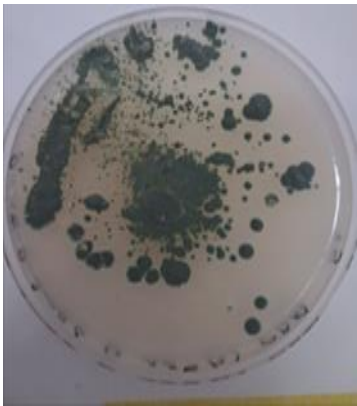
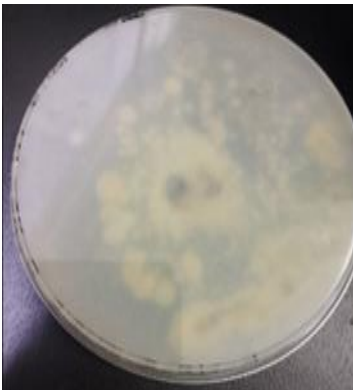
souche	Aspect macroscopique isolas		Aspect macroscopique
	Surface	Reverce	
B 10⁻⁵ (3)			Recto : colonie blanche dominante avec des zones éparses de vert-grisâtre, texture veloutée. Verso : couleur crème à beige jaunâtre, avec une croissance lente.
B 10⁻⁵ (2)			Recto : colonie noire intense, avec une texture granuleuse. Verso : couleur Jaune pâle, avec une croissance rapide.
B 10⁻⁴ (3)			Recto : colonie noire intense, avec une texture granuleuse. Verso : couleur Jaune pâle, avec une croissance rapide.

❖ Dans le thé EL Marwan

M 10⁻⁵ (2)			Recto : colonie Vert-olive foncé, avec une texture veloutée. Verso : couleur crème à beige jaunâtre pâle, avec une croissance moyenne.
M 10⁻⁴ (2) s2			Recto : colonie vert-grisâtre, avec une texture veloutée, et aspect moussu. Verso : couleur crème à jaunâtre pâle, avec une croissance rapide.
M 10⁻⁴ (2) s1			Recto : colonie vert-sombre, avec une texture veloutée et compacte, avec une bordure blanche fine. Verso : couleur crème à jaunâtre, avec une zone plus sombre. La croissance est lente.

M 10⁻⁴ (1)			Recto : colonie noire, avec une texture granuleuse, aspect punctiforme. Les colonies sont très petites et isolées. Verso : couleur blanchâtre à crème, avec une croissance très lente.
------------------------------	---	--	--

❖ Dans le thé EL Diaf

souche	Aspect macroscopique isolas		Aspect macroscopique
	Surface	Reverce	
D 10⁻⁵ (3) s 1			Recto : colonie vert olive pale, avec une texture veloutée. Verso : couleur Jaune crème, avec une croissance rapide.
D 10⁻⁵ (3) s 2			Recto : colonie vert foncé, avec une texture veloutée et compacte. Verso : couleur Jaune crème à beige, avec des zones centrales légèrement plus foncées. La croissance est moyenne.

V.3.3 Identification microscopique des champignons

Tous les isolats fongiques ont été observés au microscope à un grossissement de $\times 40$ afin d'étudier les caractéristiques morphologiques des filaments fongiques en observant leur structure microscopique et en déterminant la présence ou l'absence de cloisons, ainsi que la forme, la couleur et la nature des parois des spores.

Nous avons obtenu 8 échantillons présentant les caractéristiques suivantes :

- Thalle constitué d'un mycélium septé.
- Conidiophores dressés et ramifiés, ressemblant à des brosses.
- Les conidiophores se ramifient en branches primaires et secondaires se terminant par des cellules appelées phialides.
- Les spores (conidies) sont sphériques.
- Les têtes conidiennes peuvent être unisériées ou bisériées.

❖ Cette description s'applique au genre *Penicillium*.

Nous avons obtenu 6 échantillons présentant les caractéristiques suivantes :

- Thalle constitué d'un mycélium cloisonné (septé).
- Conidiophores dressés et non ramifiés, se terminant par un renflement appelé vésicule.
- Les têtes conidiennes sont uni-ou bisériées, selon la disposition des phialides et des métules.
- Les conidies sont sphériques et disposées en chaînes formant une masse rayonnante.

❖ Cette description correspond au genre *Aspergillus*.

Nous avons obtenu un échantillon présentant les caractéristiques suivantes :

- Thalle constitué d'un mycélium non cloisonné.
- Sporangiophores généralement très grands.
- Spores contenant des spores sphériques.
- Columelles de couleur brune.

❖ Cette description correspond au genre *Rhizopus*.

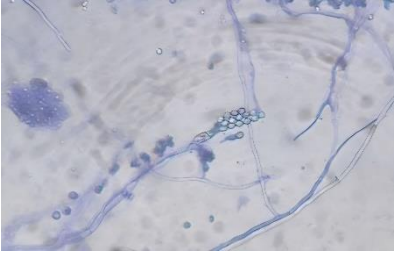
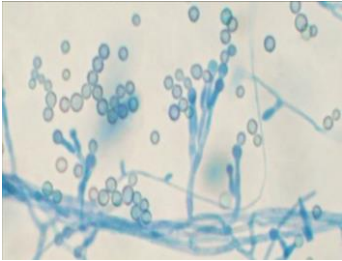
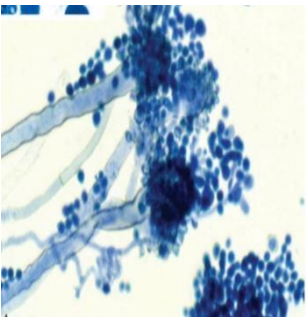
Nous avons obtenu un échantillon présentant les caractéristiques suivantes :

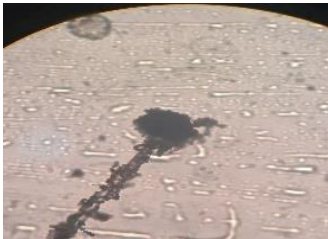
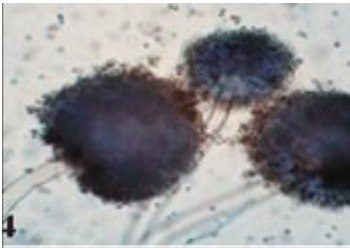
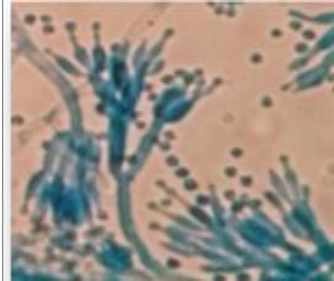
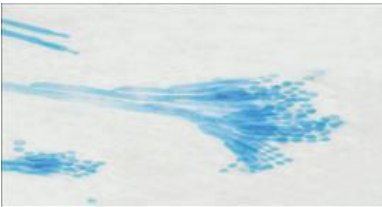
- Il est constitué d'un mycélium large et non cloisonné.
- Sporangiophores longs et droits et d'un sporange de forme sphérique contenant de nombreuses spores sphériques.

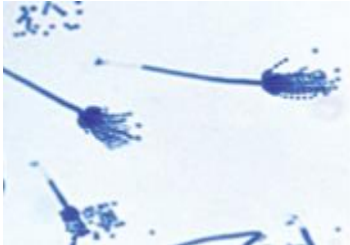
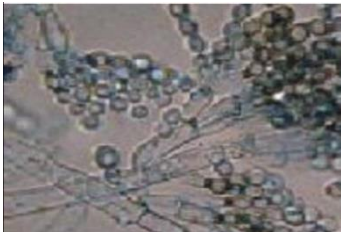
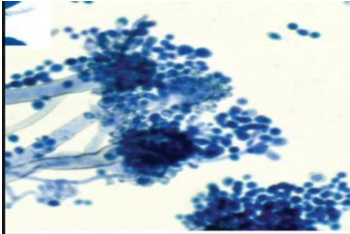
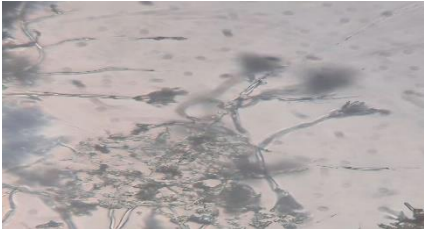
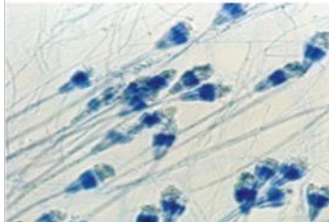
❖ Cette description correspond au genre *Mucor*.

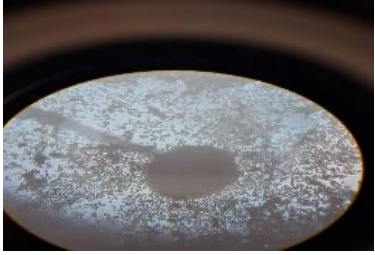
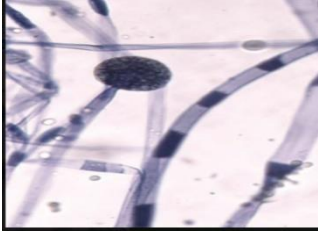
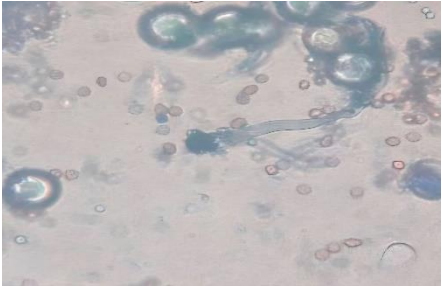
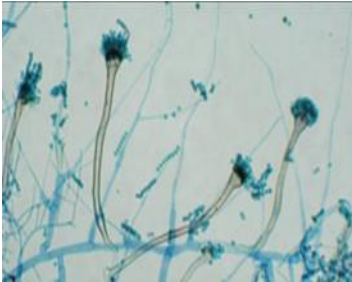
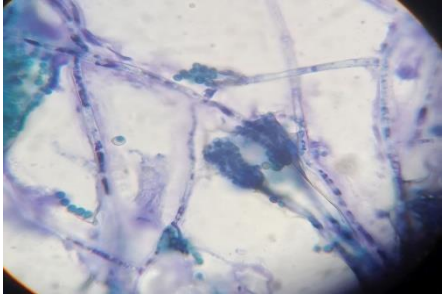
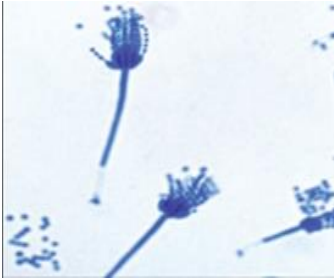
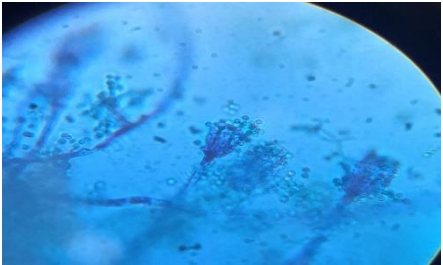
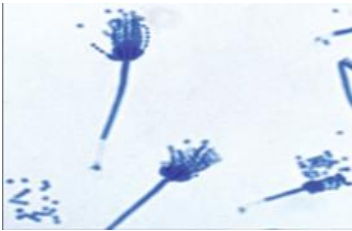
Les genres fongiques ont été identifiés à l'aide des clés de classification approuvées pour chacun des genres (**LSPQ, 2012**).

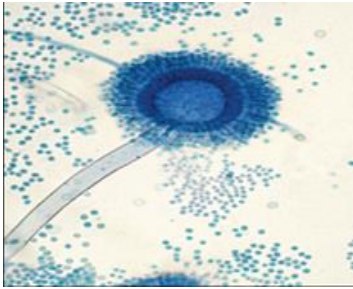
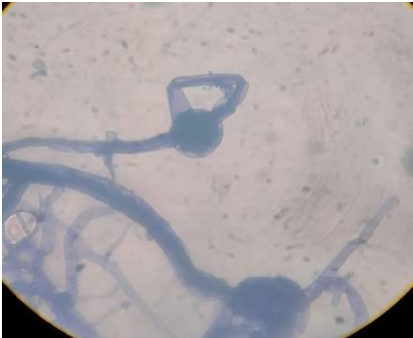
Tableau 6 : Caractères microscopiques des souches isolées des échantillons du thé

Photo microscopique	Photo microscopique de référence (Chabasse et al., 2002)	Genre
 R 10⁻⁵ (1)		<i>Penicillium</i>
 R 10⁻⁵ (3) souche 2		<i>Aspergillus</i>
 B 10⁻⁵ (3)		<i>Penicillium</i>

 R 10⁻⁴ (3) souche 2		<i>Aspergillus</i>
 B 10⁻⁵ (2)		<i>Aspergillus</i>
 M 10⁻⁵ (2)		<i>Penicillium</i>
 M 10⁻⁴ (2) souche 2		<i>Penicillium</i>

 M 10⁻⁴ (2) souche 1		<i>Penicillium</i>
 R 10⁻⁵ (3) souche 1		<i>Penicillium</i>
 R 10⁻⁴ (2)		<i>Aspergillus</i>
 R 10⁻⁴ (3) souche 1		<i>Penicillium</i>

 B 10⁻⁴ (3)		<i>Mucor</i>
 R 10⁻⁵ (3)		<i>Aspergillus</i>
 D 10⁻⁵ (3) souche 2		<i>Penicillium</i>
 D 10⁻⁵ (3) souche 1		<i>Aspergillus</i>

 R 10⁻⁵ (2)		<i>Aspergillus</i>
 M 10⁻⁴ (1)		<i>Rizopus</i>

V.4 Résultat mycotoxicologique

V.4.1 Ensemencement sur milieu liquide YES

Après 14 jours d'inoculation des genres *Aspergillus* et de *Penicillium* dans le milieu liquide YES, on a observé une croissance abondante des isolats fongiques chez les différentes souches étudiées, indiquant une bonne adaptation au milieu de culture favorable à la production des métabolismes secondaires.



Photo 14 : Production de biomasse fongique sur milieu YES en vue de l'analyse toxinoène.

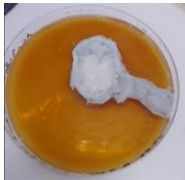
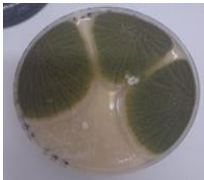
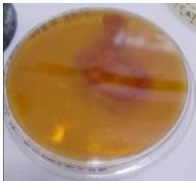
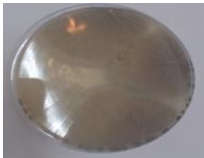
V.4.2 Identification des espèces

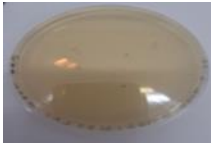
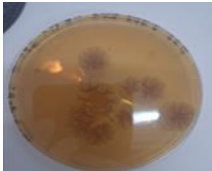
Les espèces fongiques ont été identifiées à l'aide des clés de classification approuvées :

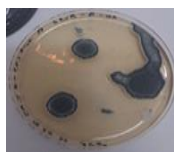
(Bounouar, 2014), (Kusumaningtyas et *al.*, 2016), (Gbadamosi & Obafemi, 2019), (INSPQ, 2016), (Varga et *al.*, 2011), (Bora et *al.*, 2019), (Nurtjahja et *al.*, 2019).

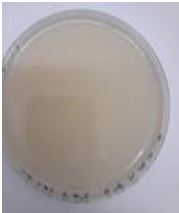
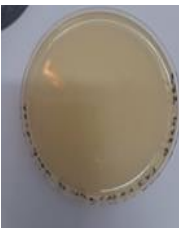
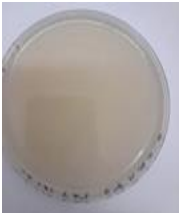
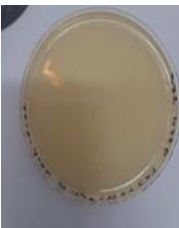
Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

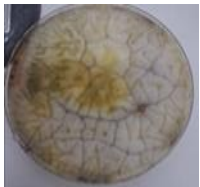
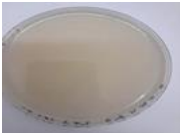
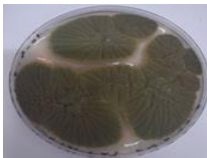
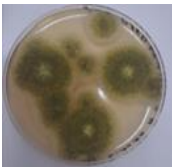
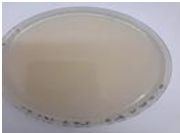
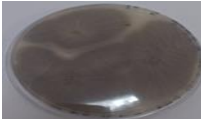
Tableau 7 : Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* par la méthode de « Single spore »

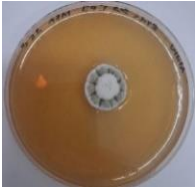
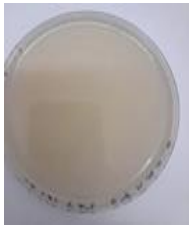
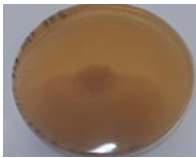
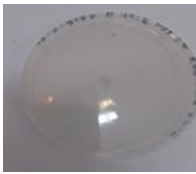
R 10 ⁻⁵ (2)		MEA25	CYA5	CYA37	G25N25
espèce: <i>Aspergillus</i> <i>Funigatus</i>	Recto		Aucune croissance		Aucune croissance
	Verso				

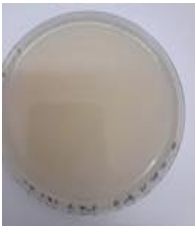
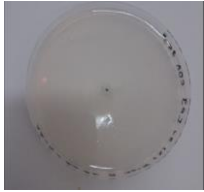
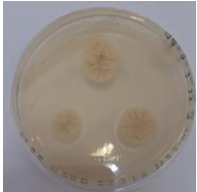
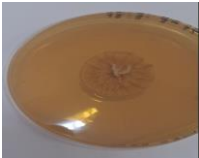
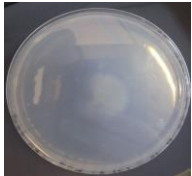
D 10 ⁻⁵ (3)		MEA25	CYA5	CYA37	G25N25
espèce: <i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i>	Recto		Aucune croissance	Aucune croissance	
	Verso				

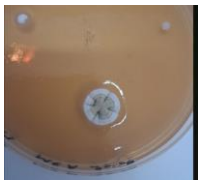
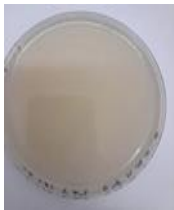
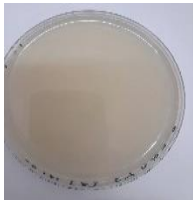
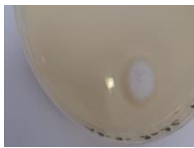
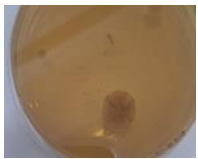
R 10 ⁻⁴ (3)		MEA25	CYA5	CYA37	G25N25
espèce: <i>Aspergillus restrictus</i>	Recto	Aucune croissance 	Aucune croissance 	Aucune croissance 	
	Verso				

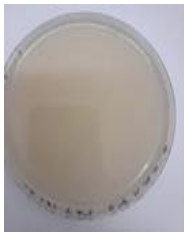
R 10 ⁻⁵ (1)		MEA25	CYA5	CYA37	G25N25
espèce: <i>Penicillium expansum</i>	Recto		Aucune croissance 	Aucune croissance 	Aucune croissance 
	Verso				

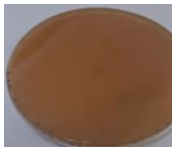
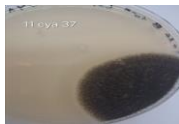
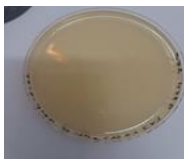
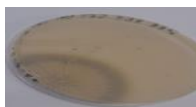
R 10 ⁻⁴ (2)		MEA25	CYA5	CYA37	G25N25
espèce: <i>Aspergillus flavus</i>	Recto		Aucune croissance 		
	Verso				

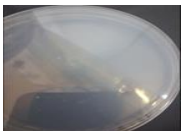
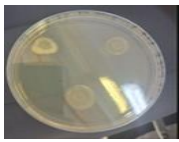
D 10 ⁻⁵ (3)		MEA25	CYA5	CDA25	G25N25
espèce: <i>Penicillium brevicompactum</i>	Recto		Aucune croissance 		
	Verso				

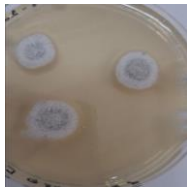
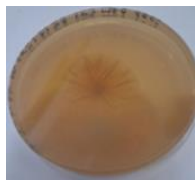
R 10 ⁻⁵ (3)		MEA25	CYA5	CDA25	G25N25
espèce: <i>Penicillium chrysogenum</i>	Recto		Aucune croissance 		
	Verso				

R 10 ⁻⁵ (3)		MEA25	CYA5	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Aspergillus penicillioides</i>	Recto		Aucune croissance 	Aucune croissance 	
	Verso				

B 10 ⁻⁵ (2)		MEA25	CYA5	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Aspergillus niger</i>	Recto		Aucune croissance 		Aucune croissance 
	Verso				

B 10 ⁻⁵ (3)		MEA25	CYA5	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Penicillium zacinthae</i>	Recto	Aucune croissance 	Aucune croissance 		Aucune croissance 
	Verso				

M 10 ⁻⁵ (2)		MEA25	CDA25	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Penicillium sclerotiorum</i>	Recto	Aucune croissance 			
	Verso				

M 10 ⁻⁴ (2)		MEA25	CDA25	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Penicillium corylophilum</i>	Recto			Aucune croissance 	
	Verso				

M 10 ⁻⁴ (2)		MEA25	CDA25	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Penicillium thomii</i>	Recto				Aucune croissance 
	Verso				

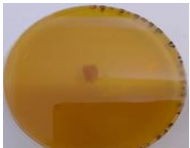
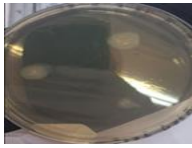
R 10 ⁻⁴ (3)		MEA25	CDA25	CYA37C	G25N25
espèce: <i>Penicillium citreonigrum</i>	Recto			Aucune croissance 	
	Verso				

Tableau 8 : Identification des 15 souches fongiques sur différents milieux de culture.

Souche	Milieu	N colonies	Couleur	Diamètre	Aspect
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CYA 5°C	0	/	/	/
	MEA 25°C	01	Face : Gris-vert "Pâle" Revers : jaune brun	5,7 cm	veloutée et sulquée
	G25N 25°C	0	/	/	/
	CYA 37°C	03	Face : vert olive foncé Revers : jaune Pâle à crème	4 cm / 6 cm / 5 cm	Veloutée avec des crevasses
<i>Aspergillus oryzae</i>	CYA 5°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	01	Face : gris bleuâtre avec une bordure blanche Revers : Brun-orangé	6,4 cm	Très cérébriforme (fortement plissée) et veloutée
	G25N 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/

<i>Aspergillus ochraceus</i>	CYA 5°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	06	Face : Gris-vert avec une large bordure blanche Revers : aune orangéâtre	3,8 / 2 / 1,4 / 1,3 / 1,5 / 1,7 cm	Veloutée et radiée (présence de sillons)
	G25N 25°C	02	Face : incolore à blanchâtre Revers : Blanc	0,2 cm / 0,1 cm	cotonneuse
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/
<i>Aspergillus restrictus</i>	CYA 5°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	G25N 25°C	03	Face : vert grisâtre avec une bordure blanche Revers : Jaune pâle à ambré	1,8 / 1,4 / 3,2 cm	veloutée et radialement sulquée
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/

<i>Penicillium expansum</i>	CDA 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	01	Face : Gris vert foncé "Pâle" Revers : Brun jaunâtre	2,4 cm	Veloutée et plissée au centre
	G25N 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/
<i>Aspergillus flavus</i>	CYA 5°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	01	Face : vert grisâtre avec une large bordure blanche Revers : jaune brun	3,5 cm	veloutée, étalée et irrégulière
	G25N 25°C	03	Face : vert grisâtre avec un halo blanc Revers : jaune pâle	2,5 / 3 / 4 cm	Veloutée et plane (sans plis marqués)
	CYA 37°C	03	Face : vert olive avec un centre plus clair Revers : crème à jaunâtre	6,4 / 5,3 / 6 cm	veloutée et compacte

<i>Penicillium brevicompactum</i>	CDA 25°C	01	Face : translucide à hyaline presque invisible Revers: pas de pigment	1,3 cm	Filamenteuse lâche ou membraneuse (très fine)
	MEA 25°C	01	Face: Gris vert "olive" Revers: Jaune- orangéâtre	2,2 cm	Veloutée et plissée avec un centre cotonneux
	G25N 25°C	03	Face : Blanchâtre à grisâtre pâle Revers : incolore à jaunâtre pâle	2,1 / 1,5 / 1,4 cm	Membraneuse, diffuse et rase (peu de mycélium aérien)
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CDA 25°C	01	Face : translucide à hyaline Revers : pas de pigment	3 cm	Membraneuse et rase, circulaire à bordure irrégulière, profil plat
	MEA 25°C	01	Face : centre blanc pourtour gris-bleu bordure blanche net Revers : crème à beige jaunâtre	2,9 cm	Veloutée, compacte et fortement sillonnée (plis radiculaires profonds)

	G25N 25°C	03	Face : Blanc à grisâtre pâle Revers : crème à jaunâtre	2,5 / 1,9 / 1,8 cm	Cotonneuse, épaisse et fortement sillonnée (présence de plis radiculaires)
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/
<i>Aspergillus penicillioides</i>	CYA 5°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	01	Face : centre gris-olive et bordure nettement blanche Revers: jaunâtre à crème	1,3 cm	Membraneuse, rase et plissée (présence de plis cérébriformes)
	G25N 25°C	01	Face : Jaune pâle avec centre plus foncé visible Revers : blanc	1,8 cm	Cotonneuse, rase et diffuse (aspect de duvet)
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/

<i>Aspergillus niger</i>	CYA 5°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	01	Face : centre gris-olivâtre entouré d'une zone blanche à beige clair Revers : beige à brunâtre	5,5 cm	Fortement plissée (sillons radiaires profonds) et veloutée
	G25N 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	CYA 37°C	03	Face : Brun- noir "sombre" avec des points centraux Revers: Somme	5 cm	Granuleuse et poudreuse avec des plis radiaires visibles au revers
<i>Penicillium zancintheae</i>	CDA 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	MEA 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	G25N 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/
	CYA 37°C	01	Face : Noir intense "charbonneuse" Revers : crème au centre avec des bordures noires marquées	5,4 cm	Granuleuse, épaisse et plissée au revers

<i>Penicillium sclerotiorum</i>	CDA 25°C	01	Face : translucide à blanchâtre Revers : incolore	1,7 cm	Très rare, croissance pauvre et diffuse
	MEA 25°C	01	Face : Blanc pur "centre et bordure" Revers : crème à beige très pâle	1 cm	cotonneuse, surélevée et dense
	G25N 25°C	03	Face : blanchâtre à translucide "colonies peu denses" Revers : incolore à crème très pâle	1,7 / 1,5 / 1,4 cm	Membraneuse, rase et diffuse
	CYA 37°C	01	Face : centre noir entouré d'une bordure blanche Revers : crème à beige clair	1,8 cm	Cotonneuse et dense au centre (en relief)
<i>Penicillium corylophilum</i>	CDA 25°C	01	Face : centre gris-olive bordure par un halo translucide Revers : Beige à ocre pâle	3 cm	Lisse, rase et sans sillons

	MEA 25°C	01	Face : Blanc cassé "légèrement jaunâtre" Revers: crème à beige	3,4 cm	Cotonneuse et dense avec des plis radiculaires visibles sous le mycélium
	G25N 25°C	03	Face : centre grisâtre entouré d'une zone blanche Revers : crème avec des centres brunâtres	2 / 2,1 / 1,9 cm	Cotonneuse, surélevée et dense au centre
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/
<i>Penicillium citreonigrum</i>	CDA 25°C	01	Face : centre gris-verdâtre entouré d'une bordure translucide Revers : crème à beige jaunâtre	1,4 cm	Veloutée au centre, devant lisse et rase vers la périphérie
	MEA 25°C	01	Face : jaune à orangée Revers : orangé à rouge	1,3 cm	Membraneuse et rase

	G25N 25°C	03	Face : entre brun-noir entouré d'une bordure translucide étroite Revers : Beige à brun clair au centre	1,3 / 1 / 1 cm	Veloutée au centre, rase en périphérie
	CYA 37°C	0	Face: / Revers: /	/	/
<i>Penicillium thomii</i>	CDA 25°C	01	Face : point noir central entouré d'un halo translucide Revers : point grisâtre entouré d'un halo	3,5 cm	punctiform, rase et diffuse
	MEA 25°C	01	Face : dominante blanche avec des nuances parsemées de noir et de jaune Revers : crème avec des sillons blancs	3,8 cm	cotonneuse et plissée
	G25N 25°C	0	Face: / Revers: /	/	/

	CYA 37°C	01	Face : Noire Revers : Noirâtre à gris foncé	0,2 cm	Granuleuse, rase et compacte (forme punctiforme)
--	----------	----	--	--------	--

V.4.3 La chromatographie sur couche mince (CCM)

Est une technique permettant de séparer et d'identifier les mycotoxines produites par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, qui se manifestent par une fluorescence lorsqu'elles sont exposées aux rayons ultraviolets. Après la migration des colorants et l'évaporation du solvant, la plaque est examinée sous rayonnement ultraviolet à une longueur d'onde de 365 nm. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :

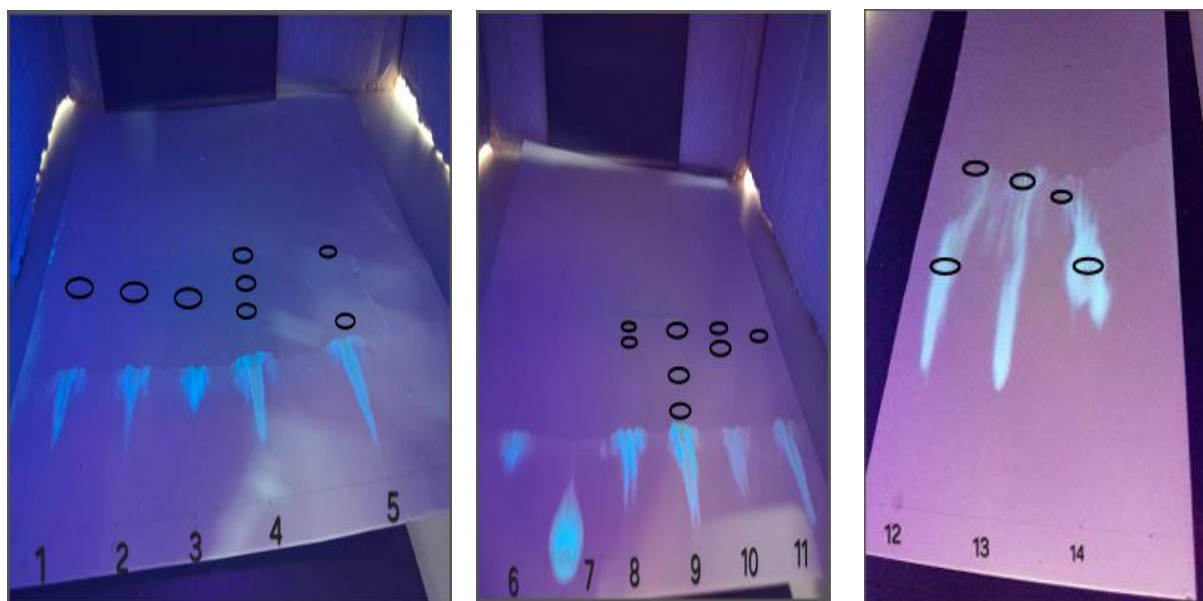


Photo 15 : détection des souches productrices de mycotoxine sous UV

V.4.3.1 Résultats de l'analyse par CCM des métabolites secondaires : (Samson et *al.*, 2010) ; (Frisvad & Thrane, 1987)

Tableau 9 : Les résultats de CCM et le Rapport frontal Rf

Les souches	Numéro des tâches	Couleur des tâches sous Longueur d'onde 365 nm	Rapport frontal Rf
1 - <i>Aspergillus Fumigatus</i>	1	Blue	0,86
2 - <i>Aspergillus restrictus</i>	1	Blue	0,83
3 - <i>Aspergillus Oryzae</i>	1	Blue	0,84
4 - <i>Aspergillus Flavus</i>	1	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,74
	2	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,83
	3	Bleue avec une légère nuance verte interne	1
5 - <i>Aspergillus penicillioides</i>	1	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,6
	2	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,96
6 - <i>Pénicillium Citreonigrum</i>	/	/	/
7 - <i>Pénicillium Thomii</i>	/	/	/
8 - <i>Pénicillium Expansum</i>	1	Blue	0,83
	2	Blue	0,97

9 - <i>Pénicillium Chrysogenum</i>	1	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,48
	2	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,51
	3	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,98
10 - <i>Pénicillium Zacinthae</i>	1	Blue	0,85
	2	Blue	0,95
11 - <i>Pénicillium Corylophilum</i>	1	Blue	0,91
12- <i>Aspergillus Niger</i>	1	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,54
	2	Bleue avec une légère nuance verte interne	0,73
13 - <i>Pénicillium Sclerotiorum</i>	1	Blue	0,69
14 - <i>Pénicillium Brevicompactum</i>	1	Blue	0,49
	2	Blue	0,66

Discussion

Le thé fait partie des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminées par des micro-organismes fongiques au cours d'une des étapes de sa fabrication. De plus, un mauvais stockage peut favoriser la prolifération de ces micro-organismes. De nombreuses études ont montré que la contamination fongique est le principal facteur de dégradation de la qualité du produit, la prolifération des champignons entraînant une altération des propriétés technologiques des feuilles de thé (**Sedova, L., Kiseleva, M., & Tutelyan, V., 2018 ; Chen, Y., et al., 2022 ; Puel et al., 2010**).

Les résultats des mesures d'humidité ont révélé des différences entre les échantillons étudiés. Le taux d'humidité le plus élevé a été enregistré dans l'échantillon Al-Raqim (5,05 %), suivi des échantillons Al-Diyaf (2,27 %), Al-Marwan (2,26 %) et enfin de l'échantillon Al-Barad (2,19 %). L'humidité étant un factor essentiel pour stimuler la croissance et le développement des champignons, ces résultats concordent avec les observations de **Benmansour-Brixi (2005)**, qui a démontré que les champignons peuvent se développer dans les denrées alimentaires lorsque l'humidité est suffisante, ce qui entraîne une détérioration de la qualité du produit et un risque de contamination fongique. Les mesures ont également montré que tous les échantillons de thé étudiés présentaient des valeurs de pH affichant de légères variations, comprises entre 5,30 et 5,53. La valeur la plus élevée a été enregistré dans l'échantillon Al-Raqim (5,53), suivie des échantillons Al-Marwan (5,52) et Al-Diyaf (5,50), tandis que la valeur la plus basse a été enregistrée dans l'échantillon Al-Barad (5,30). Ces valeurs font du thé un milieu favorable à la croissance et à la prolifération des champignons, ce qui correspond à ce qu'a mentionné **Duron (1999)** concernant la capacité des champignons à se développer dans une large gamme de pH (3-8), avec des conditions de croissance optimales comprises entre 5 et 6.

Une analyse mycologique a été réalisée sur différents échantillons de thé, et les résultats ont montré la présence d'une contamination dans tous les échantillons. Les résultats de l'isolement et du dénombrement ont révélé la présence de 17 isolats fongiques répartis dans les échantillons de thé. L'échantillon Al-Raqim présentait la charge fongique la plus élevée avec $6,4 \times 10^5$ UFC/ml, suivi de l'échantillon Al-Marwan avec $3,3 \times 10^5$ UFC/ml, puis de l'échantillon Al-Barad avec $2,1 \times 10^5$ UFC/ml. En contrepartie, l'échantillon Al-Diyaf a enregistré la charge fongique la plus faible avec 2×10^5 UFC/ml. Cette variation s'explique par les conditions de culture, de séchage et de stockage, notamment le taux d'humidité et la température, ainsi que par la durée de conservation, la qualité des emballages utilisés et le manque d'hygiène (**Le Bars et al., 1987 ; Miller, 2002**).

Deux milieux de culture ont été utilisés dans cette étude, à savoir le PDA et le CDA, qui sont des milieux de référence pour l'isolement des champignons alimentaires selon **Azzoun (2012) et Gacem (2011)**. La variation observée dans la croissance fongique s'explique par la différence des éléments nutritifs disponibles dans chaque milieu et par la capacité des champignons à les assimiler, le milieu PDA reposant sur des substances organiques, tandis que le milieu CDA repose sur des substances minérales et chimiques, comme l'a indiqué l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (**OEPP, 2003**).

L'examen microscopique de ces 17 souches fongiques prélevées sur les 4 échantillons de thé vert différents a révélé la présence de divers genres fongiques. Nous avons identifié 7 souches d'*Aspergillus*, 8 de *Penicillium*, 1 de *Mucor* et 1 de *Rhizopus*. Bien que le taux d'humidité global de la majorité des échantillons de thé vert se situât dans la fourchette basse et protectrice de 2 % à 3 %, l'échantillon Al-Raqim s'est distingué par une humidité atteignant 5,05 %. Selon **Pitt et Hocking (2009)**, l'humidité est le principal facteur déclenchant la germination des spores. Cela explique parfaitement pourquoi l'échantillon Al-Raqim, doté de l'humidité et du pH les plus élevés, présentait le taux de contamination le plus élevé (10 colonies fongiques).

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* étaient les plus fréquents dans nos résultats. Ces champignons sont classés comme champignons de stockage, et la présence de leurs spores dans les espaces de stockage clos est courante, comme l'ont confirmé **Carrillo et al. (2018)**. Ceci est dû à leur grande tolérance à la sécheresse et aux variations climatiques. Par ailleurs, les genres fongiques *Mucor* et *Rhizopus* se caractérisent par leur croissance extrêmement rapide. Comme l'ont noté **Kazi et al. (2019)**, même une légère et temporaire augmentation de l'humidité relative suffit à activer ces espèces, entraînant leur reproduction rapide et une large dispersion de leurs spores. Ceci explique également l'apparition de ces contaminants lors des premières étapes du séchage ou pendant le transport.

On passe maintenant à la deuxième partie de notre travail, à savoir l'identification des 15 souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* obtenues. Pour cela, on a réalisé une identification morphologique sur quatre milieux de culture différents (MEA, CYA, G25N et CDA), combinée à une incubation à trois températures différentes (5 °C, 25 °C et 37 °C). Ce protocole multimilieux est indispensable, car l'aspect macroscopique des champignons (leur couleur, leur diamètre et leur texture) varie considérablement selon la composition nutritionnelle du milieu et les conditions physiques (**Samson et al., 2010 ; Visagie et al., 2014**).

D'abord, le milieu MEA (gélose à l'extrait de malt) est très riche en glucides, ce qui stimule fortement la production de spores. Par conséquent, c'est le milieu optimal pour observer leurs teintes réelles et leur texture de surface, qu'elle soit veloutée ou cotonneuse (**Frisvad & Samson, 2004**). Ensuite, le milieu CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar) contient une quantité importante d'azote et de minéraux. On l'utilise principalement pour observer la vitesse de croissance des colonies et évaluer la capacité des champignons à sécréter des pigments diffusibles sur le reverse de la boîte de Petri, notamment en réponse aux variations de température (**Klich, 2002**). Le milieu G25N (gélose au nitrate avec 25 % de glycérol) présente une faible disponibilité en eau en raison de la forte concentration en glycérol. Ce milieu permet de repérer les espèces xérotolérantes : ces dernières parviennent à se développer malgré ce manque d'eau, alors que d'autres espèces se trouvent inhibées par ce stress osmotique (**Pitt & Hocking, 2009**). Le milieu CDA (gélose Czapek Dox) sert à évaluer comment les champignons (surtout ceux du genre *Penicillium*) assimilent des sources simples de carbone et d'azote. Cela permet de comparer leur croissance sur ce milieu synthétique par rapport à un milieu plus riche et complexe tel que le MEA (**Houbraken et al., 2020**).

Côté température, trois niveaux ont été testés. La température de 25 °C constitue la condition standard et optimale où la plupart des champignons microscopiques se développent le mieux (**Dijksterhuis & Samson, 2007**). À 5 °C, l'objectif était d'observer la croissance des espèces psychrotrophes ; toutefois, dans notre recherche, aucune colonie n'a manifesté de croissance à cette température. Enfin, l'incubation à 37 °C a permis d'identifier les espèces thermotolérantes ou opportunistes (comme *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*), lesquelles se distinguent nettement des espèces sensibles aux températures élevées (**Hubka et al., 2018**).

Pour étudier les propriétés toxicologiques de nos 15 souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, nous avons choisi d'utiliser le milieu YES (Yeast Extract Sucrose). Ce milieu a été choisi en raison de sa forte capacité à stimuler la biosynthèse des métabolites secondaires, notamment des mycotoxines (**Frisvad & Thrane, 1987**). Sa richesse en saccharose (une source de carbone facilement assimilable) combinée à l'extrait de levure (qui apporte azote et cofacteurs vitaminiques), crée un environnement nutritionnel particulièrement favorable. Cet environnement stimule les voies métaboliques secondaires des micromycètes. Par ailleurs, une durée d'incubation prolongée de 14 jours à 25 °C est essentielle pour ce type d'analyse. Pendant les premiers jours de culture (la trophophase), le champignon se concentre sur sa croissance hyphale et la production de biomasse. Ce n'est qu'avec le passage à l'idiophase (la phase

stationnaire) que le métabolisme secondaire est pleinement activé, ce qui déclenche l'excrétion des mycotoxines dans le milieu (**Calvo et al., 2002**). Ainsi, une période de deux semaines permet une accumulation maximale de ces molécules cibles dans la gélose. Cela améliore ensuite leur rendement d'extraction par les solvants organiques et facilite leur détection par chromatographie sur couche mince (CCM).

Enfin, nous arrivons à la dernière étape de notre recherche : la détermination des propriétés toxicologiques des souches isolées par chromatographie sur couche mince (CCM). Pour séparer les métabolites secondaires et leurs toxines, nous avons utilisé un système de solvants composé de chloroforme, de toluène et d'acide formique. Après migration, l'observation des plaques sous illumination ultraviolette ($\lambda = 365$ nm) a révélé des taches distinctes. Celles-ci présentaient majoritairement une fluorescence bleue, tandis que quelques souches donnaient des taches bleues avec une légère nuance verte au centre. Aucune fluorescence verte isolée n'a été détectée.

Aspergillus fumigatus (souche n° 1) : une seule tache a été détectée sous UV à 365 nm. Sa valeur Rf est de 0,86 ; elle a été identifiée comme étant de la glioxine et se caractérise par une fluorescence bleu azur. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude de **Mohamed et al. (2023)**, ce qui confirme que cette souche produit un composé immunotoxique dans les conditions expérimentales utilisées.

Aspergillus restrictus (souche n°2) : Une seule tache a été détectée sous UV à 365 nm, avec une valeur de Rf de 0,83. Cette tache suggère la présence de gliotoxine ou d'aspergillines, caractérisée par une fluorescence bleue azure, par comparaison aux études de **Betina, V. (1985)**.

Aspergillus oryzae (souche n° 3) : Une seule tache a été détectée sous UV à 365 nm, avec une valeur Rf de 0,84. Cette tache correspond à l'acide cyclopiazonic (CPA) et se caractérise par une fluorescence bleue azure. C'est ce qu'ont également observé **Kim et al. (2014)**.

Aspergillus flavus (souche n° 4) : trois taches distinctes ont été détectées sous UV à 365 nm. La première tache, avec un Rf = 0,74, a été identifiée comme étant l'aflatoxine B1. La deuxième tache, avec un Rf = 0,83, correspond à l'acide cyclopiazonic (CPA). Le troisième spot, avec un Rf = 1, a été identifié comme des alcaloïdes (de type aflatrim) ou des précurseurs lipidiques, et se caractérise par une fluorescence bleue avec une légère teinte verte interne. Ceci en comparaison avec l'étude de **Reddy et Reddy (2010)**.

Aspergillus penicillioides (souche n° 5) : Deux taches ont été détectées sous UV à 365 nm. La première, avec un $R_f = 0,6$, indique la production d'ochratoxine A. La seconde, avec un $R_f = 0,96$, correspond à la stigmatoxystine ou à certains triterpènes spécifiques, et se caractérise par une fluorescence bleue avec une légère teinte verte interne. C'est ce qui est rapporté dans l'étude de **Pitt et Hocking (2009)**, qui a indiqué que ce genre est capable de produire de l'ochratoxine A et de la stigmatosistine dans des conditions favorables. La présence de ces deux toxines rend cette souche extrêmement dangereuse.

Penicillium citrinum (souche n° 6) : aucune tache ni bande distincte n'a été détectée sous UV à 365 nm.

Penicillium thomii (souche n° 7) : aucune tache visible n'a été détectée sur la plaque de gel de silice sous UV à 365 nm. Les résultats sont donc négatifs, ce qui peut s'expliquer de plusieurs façons : soit les conditions (milieu et température) n'étaient pas favorables à la production de citrinine, bien que les gènes nécessaires soient présents, soit les concentrations étaient inférieures au seuil de détection. Cela correspond aux résultats de **Sherma et Fried (2003)**.

Penicillium expansum (souche n° 8) : deux tâches principales ont été observées sous UV à 365 nm. La première, avec un $R_f = 0,83$, correspond à la patoline. La seconde, avec un $R_f = 0,97$, correspond à la citrénine ou à la roquefortine C, et se caractérise par une fluorescence bleu azur. En comparaison avec les résultats (5-8) obtenus par **Beattie et Hooking (2009)**, il s'agit de l'une des espèces les plus connues associées à la production de patoline dans les aliments, et celle-ci présente une toxicité élevée.

Penicillium chrysogenum (souche n°9) : Le profil chromatographique montre trois taches distinctes sous UV à 365 nm. La première tâche, avec un R_f de 0,48, correspond à la roquefortine C. La deuxième, avec un R_f de 0,51, correspond à la méleagrène. La troisième, avec un R_f de 0,98, correspond à la chrysogène ou à d'autres métabolites secondaires, caractérisée par une fluorescence bleue azure avec une légère nuance verte interne. C'est à ce même résultat qu'aboutissent les travaux de **Vinokurova et al., en (2001)**.

Penicillium zacintha (souche n° 10) : Deux taches distinctes ont été détectées sous UV à 365 nm. La première, avec un $R_f = 0,85$, correspond à la production d'acide cyclopiazonique (CPA). La seconde, avec un $R_f = 0,95$, correspond au cyclopénol ou au cyclopénine, et se caractérise par une faible fluorescence bleue. La présence d'acide cyclopiazonique dans trois souches différentes précédentes indique que la capacité de production de cet acide n'est pas limitée à un

seul genre, mais qu'elle existe dans de nombreux genres. De plus, *A. flavus* a révélé la présence d'aflatoxine B1, des alcaloïdes de type aflatrim et de l'acide cyclopiazonique, c'est-à-dire une capacité à produire simultanément différents types de toxines, ce qui la rend plus dangereuse. Ces résultats concordent avec ceux de **Reddy, C. S., & Reddy, K. (2010)**.

Penicillium corylophilum (souche n°11) : Une seule tache a été détectée sous UV à 365 nm, avec une valeur de Rf calculée à 0,91, caractérisant la présence de citrinine, caractérisée par une fluorescence bleu pâle.

Aspergillus niger (souche n°12) : Deux taches distinctes ont été détectées sous UV à 365 nm. La première tache, avec un Rf de 0,54, a été identifiée comme étant l'ochratoxine A (OTA). La deuxième tache, avec un Rf de 0,73, correspond à la fumonisine B2 ou aux malformines, caractérisée par une fluorescence bleue avec une légère nuance verte interne. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Scott et al (1970)** qui ont souligné sa capacité à produire plusieurs métabolites secondaires toxiques, dont l'ochratoxine A, ainsi que la présence de plusieurs toxines fongiques dans cette souche, ce qui accroît la gravité de la contamination.

Penicillium sclerotiorum (souche n°13) : Une seule tâche principale a été détectée sous UV à 365 nm, migrant avec une valeur de Rf de 0,69, ce qui confirme l'excrétion de sclérotiorine, caractérisée par une fluorescence bleue azure. Cela correspond aux résultats de **Siqueira, V M., et al (2019)**.

Penicillium brevicompactum (souche n°14) : Deux taches ont été détectées sous UV à 365 nm. La première, avec un Rf de 0,49, a été identifiée comme étant l'acide mycophénolique (MPA). La seconde, avec un Rf de 0,68, correspond à la brévianamide A ou à la raistrickine, caractérisée par une fluorescence bleue azure. Cela concorde avec les travaux de **Bird B.A. & Campbell I.M. (1982)**, qui ont montré que ces deux récepteurs secondaires sont produits par cette espèce au cours de la croissance du filament fongique aérien.

La concordance de la majorité de nos valeurs Rf expérimentales avec les données publiées renforce la fiabilité de notre détermination. Selon **Betina (1985)**, la reproductibilité des valeurs Rf dans un système de solvants acides (tel qu'un mélange toluène/chloroforme/acide formique) est un excellent indicateur pour le dépistage des mycotoxines. Ainsi, nos résultats confirment que, malgré la faible teneur en eau totale des échantillons de thé vert étudiés, ceux-ci contiennent des souches fongiques vivantes capables de produire des toxines, lesquelles

peuvent synthétiser des molécules dangereuses si les conditions de stockage deviennent favorables (Amézqueta *et al.*, 2012 ; Samson *et al.*, 2002).

Les mycotoxines identifiées constituent une menace importante pour la santé humaine et animale. Les aflatoxines sont considérées comme parmi les mycotoxines les plus dangereuses en raison de leur capacité à provoquer une intoxication hépatique, à affaiblir le système immunitaire et à causer des cancers. L'ochratoxine A est particulièrement connue pour sa néphrotoxicité et son lien avec diverses lésions rénales. La patuline est associée à des troubles digestifs et à une altération du système immunitaire. Quant aux trichothènes, elles provoquent divers effets toxiques tels que nausées, vomissements, irritation des tissus et inhibition de la synthèse des protéines. L'exposition des animaux à ces mycotoxines peut entraîner un ralentissement de la croissance, des problèmes de reproduction, une diminution de l'immunité et une sensibilité accrue aux maladies. Par conséquent, un examen mycologique est indispensable pour détecter les mycotoxines qui constituent un danger majeur pour la santé humaine et animale. Dans le cadre de mon travail, leur détection précoce permet de protéger la santé publique et de garantir la conformité des produits aux normes de qualité et de sécurité

Conclusion générale

Dans le cadre de notre étude consacrée à l'analyse mycologique et mycotoxicologique du thé vert dans la wilaya de Saïda, dont l'objectif était de mettre en évidence la contamination fongique des échantillons de thé et d'évaluer leur capacité à produire des mycotoxines. Pour répondre à cet objectif, quatre échantillons de thé vert (El-Barad, El-Diaf, El-Marwan, El-Raqim) ont été analysés. Après isolation et purification des souches fongiques, 17 souches ont été obtenues, dont 8 provenant de la souche El-Raqim, 4 de la souche El-Marwan, 3 de la souche El-Barad et 2 de la souche El-Diaf. Les résultats de l'identification macroscopique et microscopique ont également révélé la présence de plusieurs genres fongiques, à savoir *Aspergillus* et *Penicillium*, *Mucor* et *Rhizopus*. Une prédominance des genres *Aspergillus* et *Penicillium* a été observée dans tous les échantillons. L'utilisation de plusieurs milieux spécifiques pour *Penicillium* et *Aspergillus* a également permis d'identifier leurs espèces, qui se présentaient comme suit : *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus restructus*, *Aspergillus Oryzue*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Niger*, *Pénicillium Citreonigrum*, *Pénicillium Thomii*, *Pénicillium Expansum*, *Pénicillium Chrysogenum*, *Pénicillium Corylophilum*, *Pénicillium Zacinthae*, *Pénicillium Brevicompactum*, *Pénicillium Sclerotiorum*.

Les résultats de la chromatographie sur couche CCM ont également montré que la plupart des souches fongiques étaient capables de produire des mycotoxines, 12 souches ayant donné des résultats positifs avec l'apparition de taches présentant différentes valeurs Rf, tandis que deux souches ont donné des résultats négatifs, car elles ne produisaient pas de mycotoxines dans le cadre de cette étude.

En conclusion de cette étude, nous proposons quelques solutions pour éviter cette contamination :

- Utilisation de la technique PCR pour la détection rapide et précise des champignons contaminants, grâce à l'amplification de l'ADN dans la région ITS, ce qui permet d'identifier l'espèce de champignon contaminant, même en quantités infimes. Recours à la technique HPLC pour la mesure précise et quantitative des mycotoxines et le contrôle continu de la qualité.
- Effectuer un contrôle mycotoxicologique continu à l'aide de méthodes précises telles que la CCM.
- Utilisation du séquençage de l'ADN pour identifier avec précision des espèces proches en analysant la séquence nucléotidique de régions caractéristiques telles que les ITS.

- Utilisation de la technique Elisa pour l'identification rapide et le dépistage à grande échelle des champignons pathogènes grâce à la détection de leurs protéines ou de leurs antigènes
- Appliquer les normes d'hygiène à toutes les étapes de la fabrication (BPF et HACCP).
- Respecter les conditions de bonne conservation (basse température et faible humidité) pour éviter la prolifération fongique.
- Adopter un conditionnement hermétique pour protéger le thé de toute contamination extérieure.
- Développer des études sur des méthodes naturelles ou biologiques, telles que les huiles essentielles et les agents antifongiques, afin de limiter la contamination.

Référence

Bibliographique

A

- AFSSA, (2006), "Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique"
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., & López de Cerain, A. (2012). TLC methods for mycotoxins in foods and feeds. In *Thin layer chromatography in drug analysis* (pp. 423-447). CRC Press.
- Azzoun, B. (2012). Contamination des aliments par les mycotoxines et moyens de lutte. Mémoire de Magister, Université de Blida.

B

- Badillet, G. (2000). *Précis de mycologie médicale*. Paris: Vigot.
- Bancirova, M. (2020). "Comparison of the antioxidant capacity and the total polyphenol content of black and green tea". *Food Research International*. 131
- Baranauskaite, J., et al. (2022) "Chemical Composition and Antioxidant Activities of Tea (*Camellia sinensis*)" *Molecules*, 27(1).
- Barry et Barry (1972) : Recherche non trouvée dans les sources disponibles.
- Benn, J. A. (2015). "Tea in China: A Religious and Cultural History". University of Hawaii Press.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
- Betina, V. (1985). Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 334(3), 211-276.
- Benmansour-Brixi, N. (2005). Les mycotoxines dans l'alimentation animale. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université de Constantine.
- Bird B.A. & Campbell I.M. (1982). Disposition of Mycophenolic Acid, Brevianamide A, Asperphenamate, and Ergosterol in Solid Cultures of *Penicillium brevicompactum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2):345–348.

- Bolton, A. T., Sadasivaiah, R. S., & Busch, L. V. (1990). Role of nutrients in the formation of conidia by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(2), 173-176.
- Bondy, G. S., & Pestka, J. J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Tox. and Env. Health*.
- Bora, S. S., Keot, J., Das, S., Sarma, K., & Barman, S. (2019). Diversity of Filamentous Fungi Isolated from Some Amylase and Alcohol-Producing Starters of India. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1312.
- Botterel, F., & Bretagne, S. (2014). *Diagnostic biologique en mycologie médicale*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.
- Botton, B., Buton A., Fèvre M., (1990). *Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle*. Paris : Masson 2ème édition. 442 P.
- Bouakline, H., et al. (2018). "Evaluation de la qualité mycologique et recherche de mycotoxines dans des échantillons de thé commercialisés". *Journal de Mycologie Médicale*.
- Bouchet et al. (1999) : Bouchet P., Guignard J.L., Villard J. (1999). *Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés de pharmacie*. Paris: Masson. IX-194 p.
- Bouchet et al. (2004) : Bouchet P. (2004). *Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. 2e éd. Abrégés de pharmacie*. Paris: Masson.
- Bouchet et al. (2005) : Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F., et al. (2005). *Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. 2e éd. Paris: Masson. IX-191 p.*
- Bouchet, P., et al. (2005). *Biodiversity of Fungi: estimates and perspectives*. Paris: Éditions CNRS.
- Bounouar, S. (2014). *Contribution à l'étude de la contamination fongique des aliments pour bétail et recherche des mycotoxines*. Mémoire de Master, Université de Blida 1, Algérie.
- Bouree, P. (2004). *Aide-mémoire de mycologie médicale*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences.
- Bui-Klimke. T. R., & Wu, F. (2015) "Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13).

C

- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2021). "Beneficial Effects of Green Tea -A Review". *Journal of the American. College of Nutrition*, 25(2), 79-99.

- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2011). *Biology* (9th edition). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi* (2nd edition). London: Academic Press.
- Carrillo, G., Rodríguez, A., & Córdoba, J. J. (2018). Mycobiota and mycotoxin contamination in black and green tea samples. *Food Control*, 85, 412-420.
- Caude, M., and Jardy, A., 1995. *Chromatographie en phase liquide - Appareillage et Champignons opportunistes: Atlas clinique et biologique vol II*. Paris : Varia.
- Chabasse, D., Guelfi, M. C., & Pihet, M. (2002). *Mycologie médicale*. Paris: Éditions Masson.
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). "Beneficial effects of green tea: A literature review" *Chinese Medicine*, 5(1), 13.
- Chaturvedula, V. S., & Prakash, I. (2011). "The aroma, taste, and antioxidant capacity of green tea". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.
- Chen, L., Yu, F. L., & Tong, Q. Q. (2012). "Genetic Resources and Breeding of Tea". In *Global Tea Breeding: Achievements and Perspectives* (pp. 51- 118). Springer Berlin Heidelberg.
- Chen, Y., et al. (2022). Fungal flora and mycotoxin contamination in tea: Current status, detection methods and dietary risk assessment -- A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- CNESST (2018). *Notions de toxicologie*. Québec, Canada.
- Cole, R. J., Schweikert, M. A., & Jarvis, B. B. (2003). *Handbook of secondary fungal metabolites* (Vols. 1-3). Academic Press.

D

- Davet (1996) : Recherche non trouvée dans les sources disponibles.
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology*. 4th Edition, Blackwell Publishing.
- Deacon, J. W. (2013). *Fungal Biology* (6th ed.). Malden: Blackwell Publishing.
- Decocq, G (2011). *Le monde fongique. L'homme et son environnement UE 7.<Santé, Société, Humanité>*. 1-20 P.

- Deffontaine, M. (2015). Caractérisation et analyse de la contamination fongique de l'habitat en Picardie .Thèse de doctorat : Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie. 15 P.
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology*. APS Press, St. Paul, MN.
- Diby L., Kahia J., Kouamé C., Aynekulu E. Tea, Coffee, and Cocoa. *Encycl. Appl. Plant Sci.* 2017;3:420--425. doi: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00179-9.
- Dijksterhuis, J., & Samson, R. A. (Eds.). (2007). *Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food* (Vol. 1). CRC Press.
- Diksterhuis, J. (2019). *Fungal aermination and growth: Molecular and cellular mechanisms*. Cham: Springer Nature.
- Dominique C., Jean P. B., Sophie B., Pascal P., (2002): Les moisissures d'intérêt médical, BIOFORMA.
- Dufresne, P., & St-Germain, G. (2021). Identification des champignons d'importance médicale : Stage de laboratoire. Institut national de santé publique du Québec (NSPQ), Laboratoire de santé publique du Québec.
- Duron, M. (1999). Les mycotoxines : dangers pour l'homme et l'animal. *Le Point Vétérinaire*, 30(202), 73-78.

F

- Foroud, N. A., & Eudes, F. (2009). Trichothecenes: Structure, Outbreaks, and Biosynthesis. *Toxins*, 1(1), 6-46.
- Frayssinet, C., & Cahagnier, B. (1982). Les aflatoxines : présence dans les aliments, toxicité et détoxication. *Bull. Inst. Pasteur*, 80, 271-304.
- Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1983). Classification of *Penicillium* subgenus *Penicillium* by profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(6), 1301-1310.
- Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1987). Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *Journal of Chromatography A*, 404, 195-214.
- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49, 1-174.

G

- Gacem M.A. (2011.) Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de Citrullus.
- Gacem, M. A., Ould El Hadj-Khelil, A., Boudjemaa, B., & Gacem, H. (2011). Étude de la contamination fongique et de la présence des aflatoxines dans quelques produits alimentaires d'origine végétale consommés à Ouargla (Algérie). *Nature & Technologie*, (05), 45-53.
- Gams W, Christensen M, Onions A.H.S, et al.1986 Infrageneric taxo of *Aspergillus*, in: Samson.
- GAUTHIER, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. 132 pages. Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie, Sciences pharmaceutiques, université de Bordeaux, France.
- Gbadamosi, I. T., & Obafemi, O. T. (2019). Molecular characterization and mycotoxin-producing potential of fungi isolated from stored tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) in Nigeria. *Scientific Reports*, 9, 5323
- Graham, H. N. (1992). "Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry". *Preventive Medicine*, 21(3).
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 454--500.

H

- Hala, B. et al. (2021). "Analyse microbiologique et phvsico-chimique des olantes médicinales et aromatiques : Cas du thé vert". *Revue des Bio-Ressources*.
- Han, W. Y., et al. (2016). "Tea Processing: Steps and Techniques" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Harris, S. D. (1989). The effect of environmental factors on the growth and morphology of various fungi. University of London.
- Harris, S. D. (2011). Hyphal branching in filamentous fungi. *Developmental Biology*, 353(2), 155-167
- Heiss, M. L., & Heiss, R. J. (2007). "The Story of Tea: A Cultural History". Ten Speed Press.

- Heit, S., 2015. Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse doctorat : Faculté de pharmacie. Nancy : Université de Lorraine, 114 P.
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. (2015). "Comparative ochratoxin toxicity: a review of relevant in vitro and in vivo studies". *Toxins*, 7(6).
- Hibbett et al. (2007) : Hibbett D.S., James T.Y., Vilgalys R. (2007). *Dikarya*. In: *Phylonyms: A Companion to the PhyloCode*. CRC Press. p. 518.
- Hibi, D., Iwai, K., Ishii, Y., Jin, M., Sugita-Konishi, Y. Yanai, T. ... & Umemura, T. (2011). "Mechanism of ochratoxin A-induced nephrocarcinogenicity". *Toxins*, 3(9) 1164-1173.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., ... & Samson, R. A. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and genera of *Aspergillaceae*. *Studies in Mycology*, 95, 5-169.
- HOUISSA, H. (2020). Les Mycotoxines du mil: occurrence et flore fongique. 259 pages. Thèse pour obtenir le grade de docteur, Sciences Biologiques Mycologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier, université de Tunis El-Manar, Tunisie.
- Hubka, V., Nováková, A., & Frisvad, J. C. (2018). Thermotolerance and physiological biodiversity in *Aspergillus* species. *Mycologia*, 110(4), 652-671.
- Hursel, R., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2013). "Catechin- and caffeine-rich teas for control of body weight in humans". *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(6).
- Huybrechts, B., Tangni, E K., Debongnie, P. Geys, J., Callebaut, A. (2013). Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles: une revue. *Cahiers Agricultures*, 22(3), 202-215 p.

I

- INSPQ. (2016). *Pénicillium spp.* : Fiche technique. Institut national de santé publique du Québec.
- International trade Centre (ITC),2002.An introduction to HACCP. UNCTAD/Who,Genève.
- loi, J. D., Zhou, T., Tsao, R., & Marcone, M. F. (2017). "Mitigation of patulin in fresh apple juice using L-cysteine". *Journal of Food Protection*, 80(5), 815- 821.

J

- Jagoda, K.P et Wioletta, B., 2021. Mycotoxines --- Prévention, détection, impact sur la santé animale. *Processus*, 9, 2-17.
- Joffe, A. Z. (1974). *Aleukia toxica alimentaris*. In *Mycotoxins*.

K

- Kazi, S., Shah, A., & Hasan, F. (2019). Evaluation of fungal contamination and moisture content in commercially available loose and packed tea leaves. *Journal of Food Safety*, 39(4), e12641.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2018). "Tea Polyphenols in Promotion of Human Health". *Nutrients*, 11(1).
- Kim, N. Y., et al. (2014). An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Protection*, 77(6), 1010-1016. Disponible sur PubMed.
- Klich, M. A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and widely distributed habitats. *Mycologia*, 94(1), 21-27.
- Klich, M. A. (2009). "Health effects of *Aspergillus* in food and air". *Toxicology and Industrial Health*, 25(9-10). 657-667.
- Koszegi, T., & Poór, M. (2016). "Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Cellular Level". *Toxins*, 8(4), 111.
- Krifaton, C., & Szabó, A. (2023) "Environmental factors and mycotoxin biosynthesis: A review on *Aspergillus* section *Flavi*". *World Mycotoxin Journal*.
- Kusumaningtyas, E., Widiastuti, R., & Maryam, R. (2016). Reduction of aflatoxin B1 and ochratoxin A by *Rhizopus oligosporus* and *Rhizopus oryzae*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(2), 75-80.

L

- La mise en œuvre du système HACCP en tant que nouveau mécanisme de lutte (Quilien, 2002).
- Lahouar. A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotox inogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie Incidence et profils écophysologiques. Thèse de doctorat : Sciences biologique et technologie. Université de Licida, 85 p.
- Larone, D. H. (2011). Medically Important Fungi: A Guide to Identification (5th ed.). Washington, D.C.: ASM Press.
- Larone, D. H., Walsh, T. J., & Hayden, R. T. (2020). Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification. Wiley-Blackwell.
- Larpent, J. P. (1990). Moisissures des aliments : caractéristiques, développement, moyens de lutte. Technique et Documentation-Lavoisier.
- Larpent, J. P. (1997). Microbiologie alimentaire : Techniques d'analyse, contrôle de qualité. Technique et Documentation-Lavoisier.
- Larousse Agricole (1981). Encyclopédie Larousse de l'Agriculture. Paris : Larousse.
- Le Bars, J., Le Bars, P., & Bousquet, J. (1987). Mycotoxines et santé animale. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 60(1), 105-114.
- Lemoine, M., & Claustre, H. (2002). Les champignons : biologie et écologie. Paris : Dunod.
- Li, N., et al. (2020). "Impact of storage conditions on the dearadation of tea polyphenols". Journal of Food Quality.
- Li X., Zhang Z., Li P., Zhang Q., Zhang W., Ding X. Determination for major chemical contaminants in tea (*Camellia sinensis*) matrices: A review. Food Res. Intern. 2013;53:649-658. doi: 10.1016/j.foodres.2012.12.048.
- LSPQ. (2012). Identification des champignons filamenteux d'importance médicale. Laboratoire de santé publique du Québec, Institut national de santé publique du Québec (INSPQ).
- Lu, H., et al. (2016). Earliest tea as evidence for one branch of the Silk Road across the Tibetan Plateau. Scientific Reports, 6, 18955.

M

- Mahmood, T., Akhtar, N., & Khan, B.A. (2010). The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*' tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(19): 2028-2033.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). "Ochratoxin A: 50 Years of Research". *Toxins*, 8(7).
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). "Aflatoxin B1 and Hepatocellular Carcinoma: A Review on the Mechanism of Action". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10).
- McCormick, S. P., et al. (2011). Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802-814.
- Meegahakumbura, M. K., Wambulwa, M. C., Li, M. M., Thapa, K. K., Sun, Y. S., Möller, M., ... & Gao, L. M. (2018). Domestication origin and breeding history of the tea plant (*Camellia sinensis*) in China and India based on nuclear microsatellites and cpDNA sequence data. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2270.
- Misra, A. K. (2012). *Fungal physiology and metabolism: Carbon utilization in fungi*. New Delhi: Springer India.
- Miller, J. D. (2002). Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504, 19-27.
- Mohamed, H. M. A., et al. (2023). Molecular characterization of gliotoxin-producing *Aspergillus fumigatus* in dairy cattle feed. *Veterinary World*, 16(8), 1636-1646. Disponible sur PubMed Central (PMC).
- Mondal, T. K. (2020). "Tea: *Camellia sinensis*". In *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI.
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011). *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Multon, J. L. (1982). *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés: céréales, oléagineux, légumineuses, aliments pour animaux (Vols. 1 & 2). Technique et Documentation-Lavoisier.*

N

- Nobre. A. C., Rao, A., & Owen, G. N. 2008). "L-theanine, a natural constituent in tea, and its effect on mental state". *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(S1), 167-168.
- Nurtjahja, K., Dharmaputra, O. S., Jansen, W. P., & Syarief, R. (2019). Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *HAYATI Journal of Biosciences*, 26(4), 161-171.
- Nwe Nwe Oo & David A. Stevens (2008). Fungal cell wall: structure and composition. *Journal: Clinical Microbiology Reviews*.

O

- OEPP/EPPO Standards -- Diagnostic protocols for regulated pests (PM 7 series). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, Vol. 33, 2003. Paris, France.

P

- Patricia, A. M., Suzanne, H., Cindy, L, Cory, M. B. (2006). Food Mycotoxins: An Update. Institute of Food Technologists. *J Food Sci*, 71(5), 51-65 p.
- Pestka, J. J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action and toxicological relevance. *Toxins*.
- Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., & Malir, F. (2021). "Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation". *Toxins*, 13(6) 399.
- Pitt, J. I. (1973). An appraisal of *Fusarium oxysporum* forms and species. *Mycologia*, 65(5), 1050-1064.
- Pitt, J. I., & Ramírez, C. (1973). Notes on Segregates of *Penicillium chrysogenum* Series. *Mycologia*, 65(6), 1257-1280.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3rd ed.) Dordrecht, Netherlands: Springer Science & Business Media.
- Prince, S. J., et al. (2022). "Genome-wide identification and expression profiling of the *Camellia sinensis* gene families". *Scientific Reports*, 12(1).

- Puel, O., Galtier, P., & Oswald, I. P. (2010). "Biosynthesis and toxicological effects of patulin". *Toxins*, 2(4), 613-631.

R

- Raper K.B, Fennel D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. New-York, USA, William er Wilkinson, 209 P.
- Rashdi, H. (2004). Etude de la mycoflore des aliments et des risques mycotoxiques. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Rabat, Maroc.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2014). *Biology of Plants* (8th edition). New York: W. H. Freeman and Company.
- Reddish, G. F. (1919). The determination of the germicidal efficiency of certain disinfectants. *American Journal of Public Health*, 9(12), 946-952.
- Reddy, K. R. N., & Reddy, C. S. (2010). Mycotoxin contamination in food and feed: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(1), 1-12.
- Riba, A., Bouras, N., & Mokrane, S. (2018). "Histoire et impact des mycotoxines dans les pays méditerranéens". *Revue de Recherche Scientifique*.
- Riquelme, M., & Sánchez-León, E. (2014). The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 20, 27--33.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., & Fischer, R. (2018). Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2), e00068-17.
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019) "Aflatoxin: A review on its metabolism toxicity, occurrence in food, and analytical methods". *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100.

S

- Saha, A., Ghosh, S., & Chatterjee, S. (2017). Role of minerals in fungal growth and secondary metabolism. *Mycological Research*, 121(8), 715-729.
- Saleh, A. S., & Goktepe, I. (2019). Patulin: Properties, toxicity, and control measures. In *Mycotoxins in Food and Beverage* (pp. 135-156). CRC Press.

- Samson, R. A., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (2002). Common media and methods for purification and detection of mycotoxins in food mycology. *Studies in Mycology*, 47, 121-129.
- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraken, J., & Frisvad, J. C. (2004). "Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial B-tubulin sequences". *Studies in Mycology*, 49, 175-200.
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Frisvad, B. (2010). Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Schmidt, A., et al. (2014). "Green tea extract enhances parieto-frontal connectivity during working memory processing". *Psychopharmacology*, 231(19), 3879-3888.
- Scott, P. M., Lawrence, J. W., & van Walbeek, W. (1970). Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*, 20(5), 839-842.
- Sedova I., Kiseleva M., & Tutelyan V. (2018). Mycotoxins in tea: Occurrence, methods of determination and risk evaluation. *Toxins*, 10(11), 444.
- Selosse (2013): Selosse M.A. (2013). Evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. 23: 515-531.
- Sherif. W., Al-Zuhair, S., & Mohamed A. (2021). "Chronic exposure to aflatoxins and its impact on child growth and immune system: A systematic review". *Journal of Toxicology and Environmental Health*.
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography* (3rd ed.). CRC Press.
- Shi, Y., et al. (2021). Targeted metabolomics reveals dynamic changes during the manufacturing process of Yuhua tea, a stir-fried green tea. *Food Chemistry*.
- Siqueira, V. M., Oliveira, R. B., & Santos, R. C. (2019). Mycotoxins in food and their effects on health. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, e2019054.
- Spatafora et al. (2016) : Spatafora J.W., Chang Y., Benny G.L., et al. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 108(5):1028-1046.
- Sudakin, D. L. (2003). *Trichothecenes in the Environment: Relevance to Human Health*. Toxicology Letters.
- Suttajit, 1990). *Prévention and control of mycotoxins*. In: R.L.Semple, A. S. Frio, P.A.Hicks & J.V. Lozare(Eds.), *Mycotoxin prévention and control in foodgrains*. Rome: Food and Agriculture organization.

T

- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., & Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary phylogenetic inventory. *Fungal Diversity*, 90(1), 135-159.
- Tiwari, R. P. (2005). Antibacterial activity of tea catechins and their role in food preservation. *Food Science and Technology Research*, 11(3), 241-247.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632 (2), 168-180.

V

- Valero, A., & Marcos, J. F. (2007). Nitrogen metabolism and amino acid utilization by fungi: Focus on theanine metabolism. *Fungal Biology Reviews*, 21(3), 157-172.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 69, 57-80.
- Vinokurova, N.G., Zelenkova, F. Baskunov, P. (2001). Determination of diketopiperazine alkaloids of roquefortine group. *Journal of analytical chemistry*. Vol (56). N°3, p. 258-259.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371.
- Vitaux, J. (2015). Le thé. In *La mondialisation à table* (pp. 141- 146). Paris: Cairn.info / Presses Universitaires de France.

W

- Walsh, T. J., Hayden, R. T., & Larone, D. H. (2018). *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (6th ed.). ASM Press.
- Wambulwa, M. C., Meegahakumbura, M. K., Kamunya, S., & Wachira, F. N. (2021). From the wild to the cup: tracking footprints of the tea species in time and space. *Frontiers in Nutrition*, 8, 706770.

- Wannemacher, R. W., & Wiener, S. L. (1997). Trichothecene mycotoxins. Medical Aspects of Warfare.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). Introduction to Fungi (3rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Wheeler, K. (2019). Tea Leaf [Photographie]. Science Photo Library.
- Wijayawardene et al. (2018) : Wijayawardene N.N., Hyde K.D., Lumbsch H.T., et al. (2018). Outline of Ascomycota: 2017. Fungal Diversity. 88(1):167-26.

X

- Xia, E. H. Li, F. D., Tong, W., et al. (2020). "The Tea Tree Genome Atlas: A Database of the Tea Tree Genome and Transcriptome". Molecular Plant, 13(10) 1335-1338.

Y

- Yang, C. S., Maliakal, P., & Meng, X. (2002). "Inhibition of carcinogenesis by tea". Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 42(1).
- Yao, L., et al. (2023). "Theanine and Caffeine Content in Tea: Health Benefits and Mechanisms". Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Yashin. A., Yashin, Y., Xia, X., & Nemzer, B. (2017). "Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review". Antioxidants, 6(3)
- Yiannikouris, A., Jouany, J.P., 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores, 15 (1), 3-16.

Z

- Zhang, L., et al. (2019). "A Comprehensive Review of the Chemical Constituents and Functional Properties of Tea". Foods.
- Zhang, Q. J., et al. (2021). "The Chromosome-level Reference Genome of *Camellia sinensis* var. *sinensis*" Molecular Plant, 14(3).
- Zhong, L., Carere, J., Lu, Z., Lu, F., & Zhou, T. (2018). Patulin in apples and apple-based food products: The world status, animal toxicity and control strategies. Toxins, 10(6), 214.

- Zinedine, A., & Moumni, M. (2021) "Les mycotoxines dans les produits de arge consommation : Méthodes de détection et réglementation". Science Technologie Alimentaire.
- Zivani, M., et al. (2020). "Qualité microbiologique des thés et infusions : Risques et normes sanitaires". Bulletin de l'Institut National d'Hygiène.

Annexe

Composition des milieux de culture

Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu Czapek Dox + Extrait de levure (CYA)

Sucrose.....	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
NaNO ₃	3 g
Extrait de levure	2,5 g
Eau distillée	1000 ml

Extract de Malt Agar (MEA)

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20g
Eau distillée	1000 ml
PH final	5,6 ± 0,2

Milieu 25ar% Glycerol Nitrat Agar (G25N)

K ₂ HPO ₄	0.75g
CZAPEK Concentré	7.5ml
Glycérol pour analyse	250g

Extrait de levure.....	3.5g
Agar	12g
Eau distillé	750ml

Milieu Czapek Dox Agar (CDA)

Poid de chich.....	200g
Agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml
Sucrose.....	30g