

## **Mycoflore naturelle des olives dans les Maâsra et pouvoir toxigène des souches *d'Aspergillus* sur céréales**

Sevastianos ROUSSOS<sup>2</sup>, Nabila ZAOUIA<sup>1</sup>, Ghislane SALIH<sup>1</sup>,  
Abdelghafour TANTAOUI-ELARAKI<sup>1</sup>, Khadija LAMRANI<sup>1</sup>,  
Mostafa CHEHEB<sup>1</sup>, Hicham HASSOUNI<sup>1</sup>, Frédéric VERHÉ<sup>2</sup>,  
Isabelle GAIME-PERRAUD<sup>2</sup>, Christopher AUGUR<sup>2</sup>  
& Mustapha ISMAILI-ALAOUI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IAV Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

<sup>2</sup> IRD, Biotrans R-185, IMEP, Boite 441; FST Saint Jérôme; Université Paul Cézanne; F-13397 - Marseille cedex 20, France  
Auteur correspondant, courriel: s.roussos@univ-cezanne.fr

### **1. INTRODUCTION**

La superficie oléicole mondiale est estimée à 8 600 000 hectares, dont 95% se situent dans le bassin méditerranéen. La production moyenne en olives est de 10 millions de tonnes par an dont 92% sont utilisés pour l'extraction d'huile, le reste étant consommé en tant qu'olives de table.

Au Maroc, le profil variétal de l'olivier est constitué essentiellement d'une « variété population » dénommée Picholine marocaine. C'est une variété à double fin (conserverie et extraction d'huile d'olive), adaptée aux conditions pédo-climatiques locales. La picholine constitue à elle seule 96% des plantations d'olivier. Le reste est représenté par des variétés introduites de différents pays (France, Italie, Espagne, Grèce, États-Unis).

L'olivier représente plus de 50% de la surface occupée par l'arboriculture au Maroc. Sa culture mobilise une activité agricole intense que l'on chiffre à plus de 11 millions de journées de travail par an (soit 55.000 emplois), sans oublier toute l'activité industrielle qu'elle génère en aval, à savoir 16.000 moulins traditionnels (Maâsra) qui subsistent encore, 260 unités modernes de trituration et une cinquantaine de conserveries d'olive. Cependant, le secteur de l'olivier au Maroc ne bénéficie pas de techniques culturales appropriées et le processus d'extraction d'huile est pour la plupart encore traditionnel (Rahmani, 1996). Les méthodes de récolte des olives sont elles aussi encore traditionnelles. La majorité des régions de production des olives utilisent, en effet, le gaulage. En outre, le stockage inadéquat des olives et leur séjour prolongé au niveau des unités de trituration traditionnelles portent atteinte à la qualité de l'huile d'olive (PNTTA, 2001). Ces conditions particulières de récolte et de stockage des olives laissent supposer que l'huile d'olive produite pourrait présenter un risque de contamination par les mycotoxines et que les grignons d'olive issus de telles olives pourraient présenter un danger pour le bétail du fait de la concentration préférentielle

des mycotoxines dans les tourteaux plutôt que dans l'huile de pression (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983).

Des études antérieures ont montré la présence sur les olives de spores de moisissures réputées toxigènes notamment des *Aspergillus*. Certaines espèces appartenant à ce genre, en particulier *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* se sont montrées capables d'élaborer l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A (OTA) sur les olives. L'huile de pression issue de telles olives peut renfermer de faibles quantités de ces mycotoxines (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983). En effet, la présence de l'aflatoxine a déjà été mise en évidence par Gracien & Arevalo (1980) dans des huiles d'olive provenant d'Espagne. Quant à l'OTA, elle a été trouvée par Le Tutour (1983) dans des huiles d'olive marocaines (Belaiche, 2001) et très récemment dans des huiles d'olive en Grèce (Papachristou & Markaki, 2004).

En ce qui concerne les olives de tables marocaines, plusieurs travaux (Tantaoui-El Araki & Letutour, 1985) ont montré que les olives noires « façon Grèce » correspondent à la catégorie d'olives qui présentent les plus grands risques de contamination par des moisissures et leurs mycotoxines, vu leur mode de conservation et leur procédé de préparation qui ne comportent aucun traitement thermique susceptible de détruire les moisissures (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Le Bars & Le Bars, 2000). Elles peuvent être produites sur une large gamme de denrées alimentaires et sous des conditions très variées. En raison de la diversité de leurs effets toxiques et de leur bonne stabilité thermique, la présence de mycotoxines dans les aliments destinées à la consommation humaine ou animale est potentiellement dangereuse.

Les principales classes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agroalimentaire et rencontrées partout dans le monde sur les matières premières végétales (céréales, oléagineux, pailles) sont les suivantes: Aflatoxines, Ochratoxine, Patuline, Fumonisine, Deoxynivalénol et Zéaralénone (Pittet, 1998). Toutes les mycotoxines sont dangereuses pour la santé humaine et animale et causent différentes maladies, dont certaines sont mortelles comme le cancer.

Ces éléments ont poussé l'équipe franco-marocaine à réaliser ce travail qui s'inscrit dans le cadre du projet PRAD (04/15) sous le thème: Biodiversité des moisissures dans les Maâsra au Maroc: amélioration des conditions d'hygiène pour une huile d'olive de qualité. Plus particulièrement, le travail qui sera exposé ici, porte sur:

- la distribution des moisissures mésophiles et thermophiles sur les olives et les grignons d'olives des Maâsra,
- l'étude du pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* isolées en 2003 et 2004.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Origine des échantillons

171 échantillons d'olives, de grignons d'olives et d'huile d'olives ont été analysés. Les 136 échantillons d'olives et de grignons d'olives ont été prélevés directement dans les Maâsra dans plusieurs régions marocaines pour l'isolement des souches de moisissures. Les 35 échantillons d'huile d'olives ont été utilisées uniquement pour la recherche de mycotoxines. Les Maâsra ont été choisies d'une manière aléatoire et les échantillons ont été prélevés au hasard (Tableau 1).

**Tableau 1. Répartition des échantillons d'olives et de grignons d'olives collectés au cours des campagnes oléicoles de 2003 et 2004 en fonction de leur nature et de leur provenance**

Provenance	Olives	Grignon d'olives	Total par région
Taounate	6	3	9
Méknès	7	5	12
Fès	3	3	6
Sidi Kacem	18	4	22
Sefrou	14	6	20
Khnifra	2	0	2
Rabat	7	0	7
Khémisset	9	4	13
Marrekech	17	1	18
Goulmima	5	0	5
Errachidia	12	10	22
Total	100	36	136

### 2.2. Milieu de culture pour l'isolement des souches

Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) de Sigma a été utilisé pour l'isolement des moisissures ainsi que pour leur repiquage, la purification et la conservation des souches (Botton *et al.*, 1990).

### 2.3. Milieux de culture pour l'identification des souches

Trois milieux de culture provenant de Sigma ont été utilisés: le milieu malt extract agar (MEA), le milieu de Czapek Dox Agar et le milieu PDA. Ces milieux ont été stérilisés à 120°C et répartis en boîtes de Pétri.

### 2.4. Technique d'inoculation et d'isolement des souches

La technique d'isolement par contact direct avec la gélose a été utilisée. À partir de chaque échantillon, une olive a été prélevée au hasard, puis à l'aide d'un scalpel six

fragments ont été séparés. Trois fragments ont été déposés à trois endroits différents à la surface d'une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu PDA puis incubés (Salih, 2004). Chaque échantillon a été analysé en duplicata.

### 2.5. Conditions d'incubation

Afin d'isoler le maximum de souches mésophiles et thermophiles ou thermotolérantes présentes dans les échantillons d'olives et de grignon d'olives, les boîtes de Pétri destinées à l'isolement des souches mésophiles ont été incubées à 25°C pendant 72 h et celles qui sont destinées à l'isolement des souches thermophiles et/ou thermotolérantes à 50°C pendant 48h (Cordova *et al.*, 2003).

### 2.6. Purification et conservation des souches

Le milieu utilisé pour la purification des souches est le PDA qui est un milieu non sélectif. Dans le cas d'une contamination bactérienne, un ou plusieurs repiquages sur PDA avec addition d'un antibiotique notamment le chloramphénicol (50-100 mg/l) permet, le plus souvent, une bonne purification de la souche (Botton *et al.*, 1990). Les souches obtenues en culture pure ont été conservées sur PDA et repiquées une fois par an.

### 2.7. Identification des souches

L'identification des moisissures fait appel aux caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Elle nécessite d'abord l'utilisation de trois milieux d'identification et ensuite le montage de préparations microscopiques des fragments de mycélium avec une coloration au Bleu Cotton du matériel à examiner. Pour chaque groupe de champignons, la stratégie d'identification a été la suivante:

- Pour les *Penicillium*, la description microscopique standard et l'identification font référence à Pitt (1979) et à Samson *et al.* (1996). Les techniques utilisées par ces auteurs consistent à inoculer les souches en trois points sur boîte de Pétri contenant soit le Czapek Dox Agar (CzA) ou le Malt Extract Agar (MEA) à 2%. Puis, les cultures sont incubées à une température de 25°C.
- Pour les *Aspergillus*, les clés d'identification utilisées sont celles qui ont été proposées par Rapper & Fennell (1977) et par Samson *et al.* (1996). La culture des *Aspergillus* a été réalisée sur des CzA à 25°C.
- Pour les *Rhizopus* classés dans l'ordre des Mucorales, ils se caractérisent par un mycélium non cloisonné ou cloisonné uniquement au niveau des appareils reproducteurs. Les spores asexuées sont endogènes (sporangiospores) et contenues dans un sac (sporocyste) porté par un sporangiophore. Les clefs de détermination du genre *Rhizopus* à partir des Mucorales suivent celle de Schipper (1978).

### 2.8. Cas des autres genres

Pour l'identification des autres genres, on a utilisé les différentes clefs citées auparavant. Pour les champignons thermophiles, on a adopté les clés d'identification de Cooney

& Emerson (1964) et de Domsch *et al.* (1980). Des souches de la collection LMI-IRD ont été utilisées comme souches de référence.

## 2.9. Pouvoir toxigène des souches isolées

Le pouvoir toxigène des souches d'*A. niger* et d'*A. flavus* isolées, pendant les campagnes oléicoles 2003 et 2004, a été mis en évidence grâce à des tests de production de l'OTA et d'Af par les moisissures cultivées sur des grains de céréales et des olives noires. Tout d'abord, des grains de céréales ou des olives noires ont été inoculées avec ces souches et avec des souches de référence. Ensuite, ces préparations ont été incubées à 25°C pendant 15 jours pour les céréales et pendant 6 mois pour les olives noires. L'extraction des mycotoxines a été réalisée en utilisant du méthanol. Pour la purification de ces molécules, des kits d'immunoaffinité Aflaprep ou Ochraprep ont été utilisés. L'analyse quantitative des mycotoxines purifiées a été faite par HPLC.

### 2.9.1. Culture de certaines souches sur des substrats amylicés (riz et blé)

Les deux types de céréales utilisés comme substrat sont:

- les grains de blé précuits (marque EBLY Casino) pour la production de l'ochratoxine A par les souches d'*A. niger*,
- le riz de Camargues (marque Perliz) comme substrat pour la production d'aflatoxines par les souches d'*A. flavus*.

### 2.9.2. Conditions de production de l'aflatoxine sur grains de riz

Dans une fiole de 250 ml, 21 ml d'eau distillée ont été additionnées à 25 g de riz (humidité finale 50%). L'ensemble a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Le riz a été ensuiteensemencé avec 2 ml d'une suspension de spores ( $2 \times 10^8$  spores/ml) de la souche à tester (Roussos, 1987). Les cultures ont été incubées à 25°C pendant 7 jours. Après incubation, les fioles ont été d'abord pasteurisées à 70°C pendant 24 heures (afin de détruire les spores des champignons) et ensuite séchées à 80°C pendant la même durée (Salih, 2004). Après pasteurisation et séchage, l'aflatoxine a été extraite et quantifiée selon la méthode décrite plus loin.

### 2.9.3. Conditions de production de l'ochratoxine A sur grains blé

Dans une fiole de 250 ml, 6 ml d'eau distillée ont été ajoutées à 10 g de grains de blé (Ebly). L'ensemble a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Le blé a été ensuiteensemencé avec 2 ml d'une suspension de spores ( $2 \times 10^8$  spores/ml) de la souche à tester préparée selon la méthode décrite auparavant. Les cultures ont été incubées à 25°C pendant 12 à 15 jours. Après cela, les fioles ont été pasteurisées puis séchées comme indiqué précédemment (Salih, 2004).

### 2.9.4. Extraction et purification des mycotoxines (Af et OTA)

À partir des cultures sur céréales 10 g du substrat (riz ou blé pasteurisé et séché) ont été finement broyés puis mélangés à grande vitesse pendant 2 minutes avec 40 ml

d'une solution (acétonitrile/eau, 60/40, v/v). Ensuite, le mélange a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. Le surnageant obtenu a été stocké à -20°C pour une durée de 24h (Leontopoulos *et al.*, 2003). À partir du surnageant clarifié, 4 ml ont été prélevés et dilués avec 44 ml d'une solution tampon PBS. L'extrait a été filtré à travers un filtre papier Whatman n°4 avant d'être passé à travers une colonne d'immunoaffinité (Papachristou & Markaki, 2004).

### 2.10. Préparation de la solution tampon Phosphate Buffered Saline (PBS)

La solution PBS est utilisée pendant l'étape d'extraction des mycotoxines (Daradimos *et al.*, 2000). Elle est préparée par dissolution dans un litre d'eau distillée des composés suivants: KCl 0,2g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,16g; NaCl 8 g. Son pH est ajusté à 7,4, en utilisant, si nécessaire, une solution d'HCl (0.1M) ou de NaOH (0.1M).

### 2.11. Purification des mycotoxines sur colonne d'immunoaffinité

Les kits Ochraprep (spécifiques à l'ochratoxine A) et les kits Aflaprep (spécifiques aux aflatoxines B1, B2, G1 et G2) sont fournis par la société R-Biopharm. Chaque kit est composé de 50 colonnes d'immunoaffinité pour la réalisation de 50 tests. Ces colonnes contiennent des anticorps monoclonaux fixés par covalence à un support solide (gel), chaque type d'anticorps reconnaissant spécifiquement une des mycotoxines. L'extrait dilué est passé à travers la colonne (à un débit de 2-3 ml/min). La colonne est alors lavée avec 20 ml d'eau tamponnée (PBS) (à un débit de 5 ml/min) afin d'éliminer les composés non fixés sur la colonne. La dernière étape consiste à libérer la toxine par l'ajout de 2 ml de méthanol à un débit d'une goutte par seconde. Pour récupérer le maximum de molécules de mycotoxines fixées sur la colonne à l'aide d'une seringue en plastique, on inverse 3 fois le sens d'écoulement (Bachflaching) en aspirant l'éluant dans la colonne. L'éluat est récupéré dans un flacon pour l'analyse par HPLC.

#### 2.11.1. Concentration de l'extrait

L'éluat récupéré précédemment est évaporé à sec, sous azote. Le résidu contenant l'Af est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de la dérivation. De son côté, le résidu contenant l'OTA est resuspendu dans 200 µl de méthanol et conservé à -20°C jusqu'à son injection sur la colonne de l'HPLC.

### 2.12. Dérivation des aflatoxines

Pour détecter les aflatoxines B1 et G1 via l'analyse par HPLC, il fallait renforcer leur fluorescence en les transformant en leur dérivé fluorescent (Daradimos *et al.*, 2000). La méthode de dérivation des aflatoxines B1 et G1 choisie est celle utilisant l'acide trifluoro-acétique (T.F.A) qui les transforme en dérivés hémi-acétal B<sub>2a</sub> et G<sub>2a</sub> très fluorescents. Elle consiste à ajouter à l'extrait sec, 200 µl de T.F.A et 200 µl d'hexane.

Les flacons sont bouchés puis chauffés dans un bain-marie à 40°C pendant 10 minutes. L'extrait dérivé est évaporé à sec, sous azote, puis re-dissout dans 200 µl de méthanol (Daradimos *et al.*, 2000). 20 µl de cette solution ont été injectés sur la colonne d'HPLC.

La concentration de l'OTA ou de l'Af dans l'échantillon analysé est obtenue selon la formule:

$$(1) \quad \text{OTA ou Af (g/kg)} = \frac{(Q \cdot V_{\text{ext}} \cdot V_f) \cdot 1000}{(V_s \cdot V_i \cdot m)}$$

où:

Q: quantité (g) d'OTA ou d'Af estimée à partir de la courbe d'étalonnage.

$V_f$ : volume de méthanol utilisé pour dissoudre l'extrait sec (200 µl).

$V_i$ : volume de l'extrait final injecté (20 µl).

$V_{\text{ext}}$ : volume de la solution utilisée pour l'extraction de l'échantillon (40 ml).

$V_s$ : volume du surnageant utilisé après centrifugation pour la purification (1 ml).

m: masse de l'échantillon (10 g).

### 2.13. Analyse des mycotoxines par HPLC

#### 2.13.1. Caractéristiques de l'HPLC

L'appareil HPLC utilisé pour la détection et le dosage des mycotoxines est une unité Waters équipée des accessoires suivants:

- une pompe Waters 600<sup>E</sup> avec un débit maximal de 10ml/min;
- un injecteur Rheodyne 7725i manuel avec un volume injecté de 20 µl;
- une colonne Waters de phase inverse type C<sub>18</sub> d'une longueur de 150 mm et d'un diamètre de 4.6 mm;
- une phase mobile pour le dosage de l'OTA contenant un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (50/50/2; v/v/v) et pour le dosage des aflatoxines le mélange eau/méthanol/acétonitrile (60/20/20; v/v/v);
- un détecteur ultra-visible du type Waters 490E (programmable Multiwavelength detector) avec un intervalle de détection et de sensibilité permettant la détection de composés qui absorbent entre 190 et 600 nm. La longueur d'onde utile pour la détection des Ochratoxines est à 335 nm et des Aflatoxines à 362 nm;
- un injecteur Waters 746 pour compléter la chaîne analytique.

Pour les deux types de mycotoxines, la constitution de la phase mobile et les longueurs d'ondes correspondant à leur détection font référence à Markaki *et al.* (2000) et Daradimos *et al.* (2000).

Pour établir la gamme étalon, des produits Sigma ont été utilisés pour la préparation des solutions standards de l'ochratoxine A et des aflatoxines.

En ce qui concerne l'injection des échantillons sur la colonne d'HPLC, 20 l des différents extraits (extrait des céréales, d'huile d'olives et des olives contaminées)

purifiés et concentrés ont été utilisés pour la détection et la quantification de l'ochratoxine A et des aflatoxines probablement présentes.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Origine des échantillons

Durant les campagnes oléicoles 2003-2004 et 2004-2005 respectivement 64 et 107 soit, au total, 171 échantillons d'olives, de grignons d'olives et d'huile d'olives ont été prélevés directement à partir des Maâsra, petites unités de trituration d'olives, localisées dans plusieurs régions du Maroc. L'analyse mycologique de 136 échantillons nous a permis d'isoler 311 souches dont 193 souches mésophiles et 118 souches thermophiles et thermotolérantes (Tableau 2).

**Tableau 2. Bilan comparé de l'origine des échantillons et de la distribution des moisissures pour les deux campagnes oléicoles de 2003 et de 2004 au Maroc**

Échantillons et souches	2003/2004 Quantité	2004/2005 Quantité	Totaux sur deux ans
Échantillons olives	50	70	120
Échantillons huile	14	21	35
Échantillons grignons	0	16	16
Total des échantillons	64	87	171
Souches mésophiles	84	109	193
Souches thermophiles	38	80	118
Total des souches isolées	122	189	311

#### 3.2. Répartition des souches de moisissures mésophiles dans les Maâsra

L'identification des souches mésophiles isolées au cours de deux campagnes oléicoles (2003-2004 et 2004-2005) a montré une dominance des genres *Penicillium* (28%), *Aspergillus* (26%) et *Geotrichum* (17%). Le reste concerne les genres suivants: *Mucor* (7%), *Rhizopus* (7%), *Trichoderma* (2%), *Alternaria* (1%) et *Humicola* (1%). Le tableau 3 présente la répartition des souches mésophiles selon leur genre.

#### 3.3. Répartitions des souches thermophiles isolées dans les Maâsra

L'identification des souches thermophiles ou thermotolérantes a montré que la majorité des souches appartiennent aux espèces *Thermoascus aurantiacus* (28%), *Aspergillus fumigatus* (24%) et *Paecilomyces variotii* (21). Parmi les zygomycètes, les *Mucor pusillus* (14%) sont assez souvent rencontrés sur les olives (Tableau 4).

**Tableau 3. Répartition des souches mésophiles isolées selon leur genre**

Genres	2003-2004		2004-2005		TG*	RG*
	NS*	%	NS*	%		
<i>Penicillium</i>	26	31	28	32	54	28
<i>Aspergillus</i>	27	32	23	26	50	26
<i>Geotrichum</i>	10	12	22	25	32	17
<i>Mucor</i>	9	11	5	6	14	7
<i>Rhizopus</i>	6	7	7	8	13	7
<i>Trichoderma</i>	3	3	0	0	3	2
<i>Alternaria</i>	1	1	1	1	2	1
<i>Acremonium</i>	1	1	0	0	1	1
<i>Humicola</i>	0	0	1	1	1	1
<i>Ulocladium</i>	1	1	0	0	1	1

\* NS: Nombre de souches; TG: Total général; RG: Répartition générale (%)

**Tableau 4. Répartition des genres des moisissures thermophiles identifiées au sein de la mycoflore thermophile totale isolée en 2004-2005**

Nom du genre	Nombre de souches isolées	Répartition au sein de la mycoflore thermophile (%)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	23	28%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19	24%
<i>Paecilomyces variotii</i>	17	21%
<i>Mucor pusillus</i>	11	14%
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	3	4%
<i>Humicola grisea</i>	3	4%
Autres genres	4	5%
Total	80	100%

### 3.4. Répartition des *Aspergillus* isolés à partir des échantillons d'olives et de grignons d'olives

Pour l'identification des espèces d'*Aspergillus* isolées à partir des Maâsra au Maroc, des souches d'*A. flavus*, d'*A. niger* et d'*A. fumigatus* de la collection de IAV/IRD ont été également utilisées comme souches de référence pour la confirmation. Le tableau 5 regroupe l'ensemble des souches appartenant à ces espèces. Les *Aspergillus niger* (51%) sont de loin les espèces les plus fréquemment rencontrées dans ces biotopes.

**Tableau 5. Répartition des 65 souches d'*Aspergillus* isolées au cours des campagnes oléicoles de 2003/2004 et 2004/2005 au Maroc**

Espèces	2003/2004		2004/2005		Total 2003 et 2004	
	Nombre	Distribution	Nombre	Distribution	Nombre	Distribution
<i>A. fumigatus</i>	5	19%	18	47%	23	35%
<i>A. flavus</i>	6	22%	3	8%	9	14%
<i>A. niger</i>	16	59%	17	45%	33	51%

### 3.5. Toxinogénèse des souches d'*Aspergillus* cultivées sur des céréales

Les travaux rapportant la contamination des huiles d'olive du commerce par les aflatoxines ou par l'ochratoxine A constituent une preuve indirecte que les moisissures correspondantes sont capables de se développer et de sécréter leurs toxines dans les olives. De plus, l'aptitude de ce substrat à favoriser la toxinogénèse a été vérifiée. En effet, Tantaoui-Elaraki *et al.* (1983) ont démontré que les olives noires entières, ou ayant subi des endommagements mécaniques superficiels, et ensemencées respectivement avec des conidiospores d'*A. flavus* et d'*A. ochraceus* étaient le siège d'une certaine sécrétion d'aflatoxine B1 ou d'ochratoxine A.

### 3.6. Production d'Aflatoxines par les souches d'*Aspergillus flavus* cultivées sur riz

L'ensemble des souches isolées d'*A. flavus* (9 souches) et d'*A. niger* (33 souches) provenant d'échantillons différents ont été étudiées pour mettre en évidence leur pouvoir à produire respectivement les aflatoxines et l'ochratoxine A sur milieux amylicés. Toutes les souches d'*A. flavus* sont productrices d'aflatoxine B1 à des quantités allant de 60 à 95 µg/kg de poids sec de riz (Tableau 6).

**Tableau 6. Production d'Aflatoxines par les souches d'*Aspergillus flavus* cultivées sur riz à 25°C pendant 7 jours**

Souches	Code Souche	Échantillon	Localité / (Maâsra)*	Origine	Afl* B1 sur riz
<i>A. flavus</i>	GS2	E6	Errachidia/B	Grignons	82
<i>A. flavus</i>	GS5	E5	Errachidia/B	Grignons	60
<i>A. flavus</i>	GS30	E3	Errachidia/B	Olives	0
<i>A. flavus</i>	GS36	E11	Errachidia/B	Grignons	48
<i>A. flavus</i>	GS38	E13	Errachidia/B	Grignons	92
<i>A. flavus</i>	GS 43	E7	Errachidia/B	Olives	0
<i>A. flavus</i>	ZNM1	EO-67	Goulmima/B	Olives	95
<i>A. flavus</i>	ZNM102	EO-65	Errachidia/B	Olives	60
<i>A. flavus</i>	ZNM108	EO-69	Goulmima/C	Olives	71
<i>A. flavus</i>	18903	MUCL	Mexique	Café	110
Témoin	-	-	-	-	0

\* Nature des unités de trituration: A= Moderne; B: sémi-moderne; C: Unité traditionnelle; D: olives provenant du marché; Afl B1: Aflatoxines B1 sur riz ((g/kg)

### 3.7. Production de l'ochratoxine A sur grains de blé

Afin de démontrer le pouvoir toxigène des *A. niger*, 27 souches de cette espèce isolées à partir de 25 échantillons d'olives et de grignons d'olives ont été cultivées sur grains de céréales, en milieu solide. Deux souches toxigènes de référence (*A. niger* MUCL 44639 et *A. ochraceus* MUCL 44640) ont été également testées pour valider la technique de recherche de toxigenèse. Un échantillon témoin non inoculé et exempt de toute trace d'OTA a été également testé (Tableau 7).

Parmi les souches d'*A. niger* testées sur grains de blé pour leur pouvoir toxigène, 20 souches se sont avérées plus ou moins productrices d'ochratoxine A sur milieu à base de blé. Les quantités produites varient de traces jusqu'à 360 µg/kg (Tableau 7). Ces teneurs ont dépassé parfois celles qui sont produites par les souches de référence (190 µg/kg pour MUCL 44639 et 250 µg/kg pour MUCL 44640) déposées dans des collections internationales pour leur pouvoir toxigène.

Ce travail confirme, par conséquent, que les souches d'*A. niger*, qui correspondent à la mycoflore mésophile dominante sur les olives et les grignons d'olives, sont capables de sécréter sur milieu favorable des quantités relativement élevées d'OTA. Signalons que les souches de l'espèce *A. niger* constituent la flore fongique mésophile dominante du genre *Aspergillus* (22.5%).

### 3.6. Toxigenèse des souches d'*Aspergillus* cultivées sur des olives noires salées

Au cours d'une expérience préliminaire, la capacité des souches toxigènes à produire des mycotoxines sur les olives a été testée en réalisant une contamination artificielle d'olives noires préparées « Façon Grèce » avec un taux de sel de 25%. La contamination a été faite avec *A. flavus*, *A. niger* et *Geotrichum* sp. Le but de la contamination par *Geotrichum* sp était d'étudier l'effet de l'antagonisme. Au bout de 6 mois d'incubation de cette préparation à la température ambiante, il n'y a pas eu de prolifération des moisissures à la surface des olives, ce qui montre que l'effet antifongique du sel à une concentration de 25% s'est avéré efficace jusqu'à la fin du 4<sup>ème</sup> mois de stockage. Pour les échantillons incubés à une température contrôlée de 25°C, le salage à 25% a été efficace pendant les 6 mois de stockage. La recherche des mycotoxines dans les olives salées et contaminées artificiellement après extraction au méthanol, purification par immunoaffinité et analyse des extraits par HPLC a montré l'absence de toute trace d'OTA et d'Aflatoxines.

### 3.7. Analyse de mycotoxines dans les échantillons d'huile d'olive

Les 35 échantillons d'huile d'olive provenant d'une Maâsra mobile (Ismaili-Alaoui *et al.*, 2004) ont été utilisés uniquement pour la recherche de mycotoxines. La recherche des Aflatoxines et de l'Ochratoxine a été réalisée à partir de 10 ml d'huile d'olive de chaque échantillon, suivant le même protocole expérimental décrit dans Matériel et Méthodes, selon la méthode de Papachristou & Markaki (2004). Aucun échantillon ne contenait d'Aflatoxines ou d'Ochratoxine.

**Tableau 7. Origines des souches d'*Aspergillus niger* isolées au cours de la campagne oléicole 2004/2005 et leur production d'OTA dans les cultures sur grains de blé**

Souches	Code Souche	Échantillon	Localité / (maâsra)*	Origine	OTA sur blé (g/kg)
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>9</sub>	EO-6	Marrakech/B	Olives	170
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>10</sub>	EG-3	Sidi Kacem/B	Grignons	31
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>12</sub>	EO-13	Marrakech/B	Olives	200
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>13</sub>	EO-10	Marrakech/B	Olives	140
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>16</sub>	EO-12	Marrakech/B	Olives	220
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>17</sub>	EO-11	Marrakech/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>20</sub>	EO-3	Marrakech/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>22</sub>	EO-11	Marrakech/B	Olives	171
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>23</sub>	EG-5	Sidi Kacem/B	Grignons	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>28</sub>	EG-9	Sefrou/B	Grignons	215
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>29</sub>	EG-3	Sidi Kacem/B	Grignons	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>32</sub>	EO-45	Sefrou/B	Olives	280
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>47</sub>	EO-14	Marrakech/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>57</sub>	Ech-42	Rabat/D	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>83</sub>	EO-30	Sidi Kacem/B	Olives	155
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>84</sub>	EO-32	Sidi Kacem/B	Olives	trace
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>85</sub>	EG-13	Meknès/A	Grignons	126
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>90</sub>	EO-39	SidiKacem/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM <sub>91</sub>	EO-40	Sidi Kacem/B	Olives	195
<i>Aspergillus</i> sp	ZNM <sub>101</sub>	EO-38	Sidi Kacem/B	Olives	360
<i>A. niger</i>	GS33	E25	Fès/B	Grignons	158
<i>A. niger</i>	GS34	E1	Errachidia/B	Olives	210
<i>A. niger</i>	GS39	E5	Errachidia/B	Grignons	198
<i>A. niger</i>	GS74	E36	Méknès/C	Olives	113
<i>A. niger</i>	GS76	E46	Errachidia/E	Grignons	126
<i>A. niger</i>	GS92	E27	Fès/B	Grignons	276
<i>A. niger</i>	GS101	E42	Méknès/C	Olives	52
<i>A. niger</i>	44639	MUCL	Mexique	Café	190
<i>A. ochraceus</i>	44640	MUCL	Mexique	Café	250

\* Nature des unités de trituration: A= Moderne; B:sémi-moderne; C: Unité traditionnelle; D: olives provenant du marché; E= Maâsra mobile.

#### 4. DISCUSSION

Au Maroc les moulins de trituration d'olives s'appellent Maâsra. Il y en a plus de 30.000 Maâsra traditionnelles. Ces petites unités de trituration ont une capacité maximum de 700 kg d'olives/jour. À côté d'elles, il existe également de plus en plus d'unités modernes d'une capacité beaucoup plus grande. Cependant, le stockage des olives avant la trituration est une pratique courante, en particulier pour les petites unités et la durée de conservation est fonction de l'abondance de la récolte d'olives. Souvent l'addition de sel est pratiquée. Cependant, les olives stockées en tas peuvent se détériorer (Rahmani, 1996).

La plus grande partie des échantillons a été prélevée au niveau des Maâsra semi-modernes, ayant une capacité de trituration de plusieurs tonnes d'olives par jour. La collecte d'échantillons d'olives a été réalisée préférentiellement à partir des olives stockées plusieurs jours, devant la Maâsra. Les olives ou les grignons d'olives prélevées étaient déjà envahies par du mycélium. De ce fait, au moins une souche de moisissures a été isolée à partir du même échantillon d'olive avariée. Cependant, cette technique d'échantillonnage ne permet pas de faire une analyse quantitative. Par contre, elle contribue à étudier la distribution écologique des populations de moisissures dominantes sur les olives et les grignons d'olives. Pour les échantillons qui ont été prélevés en 2003 et en 2004 dans la même région, on retrouve une distribution similaire des principaux genres de moisissures.

La température d'incubation des cultures a été maintenue soit à 25°C pour isoler essentiellement des champignons filamenteux mésophiles, soit à 50°C pour isoler exclusivement les champignons filamenteux thermophiles ou thermotolérants. Parmi les champignons thermotolérants, les *A. fumigatus*, réputés toxigènes, représentent une population importante. Ces souches sont ubiquistes et ont été fréquemment isolées en 2003 et en 2004.

Parmi les *Aspergillus* mésophiles, les espèces suivantes sont des producteurs majeurs de mycotoxines: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. clavus*, *A. versicolor*, *A. nidulans* (Le Bars & Le Bars 2000). Dans ce travail, les souches isolées appartiennent majoritairement à *A. niger*. Toutes ces souches isolées, lorsqu'elles sont cultivées sur des céréales, sont capables de produire des Ochratoxines. Certaines produisent même des quantités très élevées d'OTA (360 mg/kg). Ces résultats sont très originaux et, pour la première fois, concernent des souches d'*A. niger* isolées à partir d'olives. Par ailleurs l'utilisation de kits d'immunoaffinité (R-Ochraprep) ont permis, d'une part, de purifier les OTA et, d'autre part, de faciliter les analyses spécifiques pour confirmer que la plupart des souches d'*A. niger* isolées en 2003 et en 2004 sont toxigènes sur céréales. La méthode de purification des mycotoxines par immunoaffinité est très performante, simple et rapide par comparaison aux méthodes de purification traditionnelles. Par sa grande spécificité, elle a permis de mettre en évidence la production des ochratoxines par les souches d'*A. niger* cultivés sur céréales. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être coûteuse pour la détection systématique des mycotoxines pour les analyses en série.

L'ochratoxine A est une mycotoxine produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*. L'OTA est néphrotoxique, elle serait le principal agent responsable de la Néphropathie Endémique des Balkans (BEN). Cette mycotoxine a été identifiée en Tunisie depuis 1983 et elle est systématiquement détectée dans diverses denrées alimentaires (Maaroufi, 1998). L'OTA a été détectée dans le sang des populations surtout rurales en Tunisie (néphropathie). L'ochratoxine A est fortement cancérigène (I.A.R.C., 1993).

Les aflatoxines sont essentiellement produites par quelques souches d'*Aspergillus flavus* et par d'autres souches d'*Aspergillus* comme *A. parasiticus*, et *A. nomius*. Il y a quatre sortes d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) selon la fluorescence bleue ou verte en UV lorsqu'elles sont adsorbées sur des substrats solides. Dans les produits d'origine végétale, on rencontre essentiellement les aflatoxines B1 et G1 (Pittet, 1998). Les 7 souches d'*A. flavus* isolées sur olives et grignons d'olives sont productrices d'aflatoxines B1 sur riz. Ce résultat confirme les études précédentes obtenues sur olives (Tantaoui-Elaraki & Letutour, 1985; Belaiche, 2001).

Au cours de cette étude, le pouvoir toxigène des souches de *Penicillium* n'a pas été recherché. Cependant, parmi les *Penicillium*, les souches suivantes produisent des mycotoxines: *Penicillium cyclopium*, *P. verrucosum* ou *viridicatum*, *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. granulatum* (Le Bars & Le Bars, 2000). Cette étude sera poursuivie, en particulier, pour la recherche de souches productrices de patuline, d'ochratoxine et de citrinine. Elle a permis de montrer l'absence de *Fusarium*, champignon qui contamine les produits végétaux et produit des fumonisines et la zéaralénone, deux mycotoxines, cancérogènes et génotoxiques (Riley *et al.*, 1998; Bacha *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'absence de mycotoxines dans les échantillons d'huile, provenant de la trituration des olives à l'aide de la Maâsra mobile, s'explique par le fait que les olives noires ont été traitées (lavées, triturées) immédiatement, juste après la récolte.

## 5. CONCLUSIONS

Dans cette étude, il y avait un triple objectif à atteindre. Tout d'abord connaître la nature de la mycoflore naturelle présente, dans les Maâsra, sur les olives et les grignons d'olive. Ensuite, mettre en évidence le pouvoir toxigène des souches sauvages isolées à partir de ces biotopes particuliers. Les résultats obtenus sur la diversité de moisissures nuisibles sur les olives contribuent à évaluer et à empêcher leur prolifération afin d'obtenir une huile d'olives saine et de qualité pour un développement durable du secteur oléicole au Maroc.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la mycoflore mésophile dominante des olives et grignons d'olives provenant des Maâsra appartient aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui renferment tous deux de nombreuses espèces toxigènes. La capacité des souches d'*A. niger* et d'*A. flavus* à produire respectivement de l'ochratoxine et de l'Aflatoxine sur céréales a été confirmée. Par contre, cette capacité ne semble pas pouvoir s'exprimer lorsque les mêmes souches sont cultivées sur les olives après salage à 25%. Le même biotope s'est également avéré riche en *Geotrichum*, *Mucor* et *Rhizopus*. Les espèces appartenant à ces genres ne semblent pas toxigènes, mais elles peuvent produire des enzymes comme les lipases et aussi causer une dégradation des olives et une altération de la qualité de l'huile d'olives, en particulier en augmentant son acidité. En ce qui concerne la diversité des souches thermophiles, celle-ci s'est limitée à 6 espèces appartenant chacune à un genre différent.

Au vu de ces résultats et afin d'améliorer sensiblement la qualité des olives et de l'huile d'olive, on recommande fortement le respect des 5 points suivants afin d'éviter les effets négatifs dus à une contamination par les moisissures:

1. Éviter les sources de contamination et les pratiques qui la favorisent comme la récolte par gaulage ou par ratissage à terre, les blessures, l'ensoleillement des olives, les modes de stockage en tas ou dans des sacs en plastique.
2. Écarter toutes les olives présentant un aspect moisi car elles contamineront très vite les autres.
3. Stocker les olives dans des caisses perforées, dans des locaux couverts, aérés, propres et désinfectés périodiquement.
4. Minimiser le temps de stockage autant que possible, moins de 48 heures, pour les olives destinées à la trituration.
5. Laver les olives avec de l'eau propre avant trituration.

Concernant les problèmes de la contamination des olives par des moisissures, on se propose de poursuivre les recherches sur la toxigenèse des souches de *Penicillium* qui se développent sur les olives plus fréquemment que les *Aspergillus*, et dont certaines espèces produisent l'ochratoxine A et les patulines.

De manière accessoire, ce travail a aussi permis de confirmer que la méthode de purification des mycotoxines par immunoaffinité est très performante, simple et rapide comparée aux méthodes traditionnelles. Son seul inconvénient étant d'être coûteuse.

## 6. REMERCIEMENTS

Projet financé par la coopération bilatérale Franco-Marocaine (Réf. PRAD 04/15) et par l'IRD-DSF (bourses de formation continue de KL et de MC). Les auteurs remercient Hervé Macarie pour la relecture attentive du manuscrit.

## 7. RÉFÉRENCES CITÉES

- Bacha H., Ghedira-Chekir L., Maaroufi K., Abid S., Zakhama A., Creppy E.E. (1998) Induction du système de réparation SOS de *E.coli* lysogène comme marqueur de la génotoxicité de la zéaralénone: Prévention par la vitamine E. *Méd. Vét.* 149 (6): 654.
- Belaïche T. (2001) Effet de la contamination par *A. flavus* et *A. ochraceus* sur la qualité des olives. *Industries alimentaires et agricoles* 118(12): 27-29.
- Botton B., Breton A., Févre M., Gauthier S. Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier JJ., Vayssier Y., Veau P. (1990) Les moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. Masson-Paris. 512 p.
- Cooney G.D, Emerson R.(1964) Thermophilic fungi. W.H. Freeman and Company, San Fransisco pp.3-28.
- Cordova J., Roussos S., Baratti J., Nungaray J., Loera O. (2003) Identification of Mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micologia Aplicada Internacional* 15 (2): 37-44.

- Daradimos E, Markaki P & Koupparis M. (2000) Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B1 in olive oil. *Food additives and contaminants* 17(1): 65-73.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T-H. (1980) Compendium of soil fungi. Academic P., London, 859 tome 1, 405 Tome 2
- Fremy J.M & Dragacci S. (1999) Mycotoxines et produits laitiers. in A.P. Leszkowicz Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Ed. TEC & DOC, 1999. p145.
- Gourama H, Le Tutour B, Tantaoui-Elaraki A. (1989) Effets of oleuropein, tyrosol and caffeic acid on the growth of mold isolated from olives. *Journal of food protection* 52: 264-266.
- I.A.R.C (1993) Ochratoxin A. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Lyon: Internat. Agency Research Cancer), pp. 489-521.
- Le Bars J. (1984) Développement des moisissures dans les denrées alimentaires et mycotoxinogénèse. In J.L. Multon. Les mycotoxines: connaissances actuelles et risques pour la santé publique dans la chaîne alimentaire. Ed. Apria. pp.3-18. 277p.
- Le Bars J., Le Bars P. (2000) Mycotoxigenesis in grains application to mycotoxic prevention in coffee. In T.Sera, C.R. Soccol, A. Pandey and S. Roussos (eds). *Coffee Biotechnology and Quality*. Kluwer, Dordrecht; 33: 355-368.
- Leontopoulos D, Siafaka A & Markaki P. (2003) Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiol.* 20: 119-126.
- Leszkowicz A.P. (1999) Définition et origine des mycotoxines. Chap.1, Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Ed. TEC & DOC, 1999. pp. 2-13. 145p.
- Maaroufi K., Abid S., Cherif A., Zakhama A., Achour A., Creppy E., Bacha H. (1998) Caryomégalie des cellules tubulaires rénales comme marqueur précoce de la néphrotoxicité induite par l'ochratoxine A chez le rat. *Rev. Méd. Vét.* 149 (6): 645.
- Nielsen K.F., Holm G., Utrup L.P, Nielsen P.A. (2004) Mould growth on building materials under low water activities: influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration & biodegradation* 54: 325-336
- Papachristou A & Markaki P. (2004) Determination of ochratoxine A in virgin olives oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants.* 21: 85-92
- Pitt J.I. (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states: *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 p.
- Pittet A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- an updated review. *Rev. Méd. Vét.* 149 (6): 479-492.

- PNTTA (2001) Qualité des huiles d'olives au Maroc: enquête nationale et analyse au laboratoire. 2001. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA (programme national de transfert de technologie en agriculture)* n°79, avril 2001.
- PNTTA (2003) L'amandier, l'olivier, le figuier et le grenadier. 2003. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA (programme national de transfert de technologie en agriculture)* n°105, juin 2003.
- Rahmani M. (1996) Guide des bonnes pratiques de production de l'huile d'olive: unités traditionnelles et industrielles. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat; p. 36
- Rapper K.B., Fennell D.I. (1977) The Genus *Aspergillus*. Krieger Publishing company, New York, 686 p.
- Roussos S. (1987) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie de sporulation et production de cellulases. Thèse de doctorat ès-sciences, Université de Provence, Marseille, IRD éditions TD Paris 193 p
- Salih (2004) Mycoflore des maâsra marocaines: Toxinogénèse des souches isolées d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*, détection et analyse des mycotxines dans l'huile d'olive. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. 153 p.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (1996) Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor schimmelcultures, Baarn, 322 p.
- Schipper M.A.A. (1978). The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. A revision of the genus *Rhizopus*. In Studies in Mycology N°25, Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, CBS, Baarn.
- Tantaoui-Elaraki A & Le Tutour B. 1985. Contamination éventuelle des olives et dérivés par les mycotoxines: Le point. *Oléagineux* 40(8-9): 451-454.
- Tantaoui-Elaraki A, Le Tutour B & Aboussalim A. (1983) Conséquence de la contamination des olives par des *Aspergillus* toxigènes sur la qualité et la quantité de l'huile de pression. *Revue française des corps gras* 11(12) 473-476.
- Toussaint G., Lafaverge G. & Walker E.A. (1977) The use of high pressure liquid chromatography for determination of aflatoxin in olive oil. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis* 3-4: 325-334.
- Wilson D.M & Math E.H. (1981) Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. *Mycopathologia* 73: 49-56
- Zaouia N. (2005) Mycoflore naturelle des olives et comparaison du pouvoir toxigène des souches sur olives et céréales. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. 161 p.

**Mycoflore naturelle des olives dans les Maâsra et pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* sur céréales**

Durant les campagnes oléicoles 2003-2004 et 2004-2005, 171 échantillons d'olives, d'huile d'olive et de grignons d'olives ont été analysés pour la recherche de moisissures et des mycotoxines. 311 souches de moisissures ont été isolées en culture pure dont 193 souches mésophiles appartenant à 10 genres: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Ulocladium* et 118 souches thermophiles appartenant à 6 espèces: *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola grisea* et *Thermoascus aurantiacus*. Aucune souche de *Fusarium* n'a, par contre, pu être isolée sur les échantillons analysés. Les *Penicillium* et les *Aspergillus* isolés représentent la majorité des souches (54%). Pour cette raison, notre étude de toxinogénèse a été orientée essentiellement sur la recherche des Aflatoxines (Af) et de l'Ochratoxine A (OTA), en laissant de côté la recherche des fumonisines et de la zéaralénone. L'ensemble des souches isolées d'*A. flavus* (9 souches) et d'*A. niger* (34 souches) ont été étudiés pour mettre en évidence leur pouvoir à produire respectivement les aflatoxines et l'ochratoxine A sur milieux amylicés. Toutes les souches d'*A. flavus* se sont avérées productrices d'aflatoxine B1 à des quantités allant de 60 à 95 µg/kg de poids sec de riz. Pour les souches d'*A. niger* 70% ont produit de l'ochratoxine A à des quantités allant de traces jusqu'à 360 µg/kg de poids sec de blé. Une étude préliminaire réalisée sur des olives noires à la grecque salées et contaminées artificiellement avec des spores d'*A. flavus* et de *Geotrichum* sp., a montré que les souches d'*A. flavus* et de *Geotrichum* sp. n'étaient pas capables de se développer sur ce substrat en présence de sel à 25%. De ce fait, il n'y a pas eu de mycotoxines sur des olives salées et contaminées artificiellement. Les analyses des 35 échantillons d'huile d'olive provenant de la Maâsra mobile ont montré qu'aucun échantillon ne contenait des Aflatoxines ou de l'Ochratoxine A.

**Mots-clés:** Mycoflore - Mésophile - Thermophile - Maâsra - Olives noires « Façon Grèce» - Contamination artificielle - Huile d'olive - Mycotoxines - Ochratoxine A - Aflatoxines - Pouvoir toxigène - Immuno-affinité - HPLC