

FACULTE DES
SCIENCES DEPARTEMENT
MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE

N°/2021



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE
ET LA VIE

FILIERE : SCIENCES
BIOLOGIQUE OPTION :
MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par :

BENNIA Nada

HAMADI Chaima

Intitulé

Evaluation de l'activité antifongique, anti-aflatoxine B₁
et antioxydante de quelques extraits de *Chamaerops*
humilis L. contre *Aspergillus flavus* isolé d'arachides
cultivées à El-Oued.

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. Mourad GUETOUACHE	Université de M'sila	Président
Dr. Yamina BEN MIRI	Université de M'sila	Promotrice
Dr. Hafsa BOUBEKEUR	Université de M'sila	Examinatrice

Année universitaire :2020-2021

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie et Microbiologie (FSNV, Université Mohamed Boudiaf- M'sila), au laboratoire des molécules bioactives et valorisation de la biomasse (LPBVB), et au laboratoire de chimie organique à Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

Nous remercions tout d'abord **Dr. BEN MIRI YAMINA**, Maître de conférences à l'université de M'sila, pour nous avoir fait bénéficier de son expérience et ses compétences qui ont largement contribué à la concrétisation de ce travail.

Nous remercions également les membres du jury d'avoir consacré leur temps à la lecture de ce manuscrit, et d'accepter de juger et d'évaluer ce travail.

Un grand merci à Madame le **Pr. Tigrine Chafia**, (E.N.S de Kouba), pour ses conseils, sa rigueur et ses qualités scientifiques.

Nous ne remercierons jamais assez **Dr. Bouazza Fatma**, Maître de Conférences (Université de Médéa) pour les nombreux services qu'elle nous a rendus durant la réalisation de ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de nos remerciements les plus amicaux.

Nous remercions Monsieur **Mahdi Nouredine** (E.N.S de Kouba) de mettre à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de nos expériences.

Une pensée particulière pour nos ingénieurs de laboratoire (université de M'sila), **Monsieur Kamel Seghiri, Madame Mariam Benyattou, Madame Safia Merah, et Monsieur Mounir Lalaloui**. Nous vous remercions chaleureusement.

En fin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici l'expression de nos profondes gratitude et nos remerciements.

Dédicaces

A ma mère SOURIA

Ta prière a été un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez expressif de tes efforts faits pour moi et pour mon éducation. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon Père Yazid

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Oui PAPA ce travail est le fruit de tes sacrifices pour mon éducation et ma formation. Puisse Dieu, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A ma seule sœur MAROUA

Ma chère petite et seule sœur, présente dans tous mes moments d'examens, de bonheur et de malheur par son soutien moral et ses belles surprises sucrées. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite. Je t'exprime mes sentiments et mon amour à travers ce travail

A mes chers collègues **Promo 2020/2021** de Master 2 Microbiologie appliquée.

Nada

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes parents Hassan et Salima hamadi

A mes sœurs Hanine, Israa, Tasnim et Rafif , à mon frère Mouhamed

Mon binôme Nada

A tous mes amis de promo 2020/2021 de la Microbiologie appliquée

Chaima

Résumé

La présente étude a rapporté l'étendue de la contamination fongique des arachides et évalué l'activité antifongique, antiaflatoxine et antioxydante des extraits bruts de *Chamaerops humilis* L. *Aspergillus*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. et *Alternaria* sp. ont été isolés à partir d'arachides cultivées à El-Oued, *Aspergillus flavus* BBH (6) était la souche la plus aflatoxogène. La concentration minimale inhibitrice contre *A. flavus* BBH (6) était comprise entre 3,00 mg/ml et 3,50 mg/ml. Les extraits ont inhibé la croissance mycélienne jusqu'à 87,94 %, et la réduction de 94,88 % d'AFB₁. Les extraits ont montré une forte activité antioxydante. Les résultats indiquent que les extraits de *Chamaerops humilis* L. seraient une solution appropriée pour la formulation d'additifs alimentaires à base de plantes/conservateurs contre la biodégradation des aliments provenant des moisissures de stockage et la peroxydation lipidique et leur contamination par AFB₁.

Mots clés : *C. humilis* L, extraits, *Aspergillus flavus* BBH (6), activité antifongique, AFB₁, activité antioxydante.

Abstract

The present investigation reported the extent of fungi contamination to peanuts and evaluated antifungal, antiaflatoxin, and antioxidant activity of crude extracts from *Chamaerops humilis* L. *Aspergillus*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., and *Alternaria* sp. were isolated from peanuts with *Aspergillus flavus* BBH (6) found as the most aflatoxogenic strain. The minimum inhibitory concentration against *A. flavus* BBH (6) ranged between 3.00 mg/ml and 3.50 mg/ml. Extracts inhibited mycelial growth up to 87.94 % and 94.88 % reduction of AFB₁. Extracts exhibited strong antioxidant activity. The results indicate that the extracts of *C. humilis* L. would be an appropriate solution for the formulation of plant-based / preservative food additives against the biodeterioration of food from storage molds and lipid peroxidation and their contamination by AFB₁.

Key words: *Chamaerops humilis* L., extracts, *Aspergillus flavus* BBH (6), antifungal activity, AFB₁, antioxidant activity.

الملخص

اشارت الدراسات الحديثة الى مدى تلوث الفول السوداني بالفطريات وتم تقييم نشاطات المضادات الفطرية ومضادات الاكسدة ومضادات الافلاتوكسين للمستخلصات الخام من *Chamaerops humilis L* وتم عزل *Aspergillus*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp* و *Penisilium sp* من الفول السوداني ووجد ان السلالة الأكثر سمية فيه هي: (6) *Aspergillus flavus* و تراوح الحد الأدنى للتركيز المثبط للمستخلص ضد *A.flavus*(BBH(6) بين 3.00 مغ /مل و 3.50 مغ/مل. تمنع المستخلصات نمو الفطريات بنسبة تصل الى 87.94% وتخفض في.انتاج الابواغ AFB بنسبة 94.88% كما أظهرت هذه المستخلصات نشاطا قويا كمضاد للأكسدة. تشير دراسات الى ان المستخلصات *C.humilis L* ستكون حلا مناسباً لتركيب مكملات غذائية او مواد حافظة ذات اصل نباتي من اجل حمايتها من التحلل البيولوجي والدهني و من التلوث بالافلاتوكسين الناتجة عن الفطريات التي تتواجد خلال فترة التخزين.

الكلمات المفتاحية: *Chamaerops humilisL*, مستخلص , AFB1 , *Aspergillus flavus* BBH(6) .
نشاط مضاد الاكسدة, نشاط مضاد للفطريات .

Liste des abréviations

AF-ALB : Aflatoxine-albumine.

AFB₁: Aflatoxine B₁.

ATP: Adénosine Tri Phosphate.

BHT : Butyl-hydroxytoluène.

CAM: Coconut Agar Medium.

CCM : Chromatographie sur couche mince

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer.

CMF : Concentration minimale fongicide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CYA: Czapek Yeast Agar.

CYP: Cytochromes P.

DO: Densité optique.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

DRBC: Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar.

FAO: Food and Agriculture Organization.

G25N : Glycerol Nitrate Agar.

HR : Humidité relative.

I% : Pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration à 50% de DPPH perdu.

PDA : Potato Dextrose Agar.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

SMKY: Sucrose Magnesium sulphate potassium nitrate Yeast extract.

UV : Ultraviolet.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

Liste des tableaux

Tableau I : Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments.....	09
Tableau II: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement.....	10
Tableau III: Principales réglementations européennes concernant les teneurs limites en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale	11
Tableau IV: Composés inhibiteurs de la production de l'AF montrant une inhibition accrue de la croissance	12
Tableau V: Identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	40
Tableau VI: Potentiel de production d'AFB ₁ de différents isolats d' <i>A.flavus</i> dans le milieu SMKY	42
Tableau VII: Rendement des divers extraits à partir des feuilles <i>C.humilis</i>	42
Tableau VIII: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des extraits.....	47
Tableau IX: Effet des extraits sur la biomasse et la production de l'AFB ₁	47
Tableau X: Activité antioxydante et contenu phénolique total.....	52

Liste des figures

Figure 1: <i>A.flavus</i> (A:culture de 7 jour sur gélose au malt à 25C°; B: aspect microscopique)..	12
Figure 2: Structure chimiques des AFB ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂ ,M ₁ et M ₂	14
Figure 3: Bioconversion de l'AFB ₁ exo-8,9-époxyde.....	16
Figure 4: Vue d'ensemble du <i>C. hululis</i> L.....	23
Figure 5: Localisation de la Wilaya d'El Oued.....	26
Figure 6: Méthode de Single spore.....	30
Figure 7: Carte géographique de la zone de prélèvement.	45
Figure 8: Répartition du mycobiote sur l'arachide. A: échantillon avec enveloppe ;B: échantillon sans enveloppe.....	39
Figure 9: Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V(365nm)de la production d'AFB ₁ par <i>A.flavus</i> sur milieu CAM.....	41
Figure 10: Tache bleues d'AFB ₁ produitr par <i>A.flavus</i> sur molieu SMKY	41
Figure 11: Effet de l'EHx aux différentes concentration sur la croissance de l' <i>A.flavus</i> BBH (6) pendant 7 jours d'incubation.....	43
Figure 12: Effetde l'EEth aux différentes concentration sur la croissance de l' <i>A.flavus</i> BBH (6) pendant 7 jours d'incubation.....	44
Figure 13: Effet de l'ECh aux différentes concentrations sur la croissance de l' <i>A.flavus</i> BBH (6) pendant 7 jours d'incubation.....	44
Figure 14: Effet de l'EMth aux différents concentrations sur la croissance de l' <i>A.flavus</i> BBH (6) pendant 7 jours d'incubation	45
Figure 15: Les pourcentages d'incubation de la croissance du mycélium de l' <i>A.flavus</i> BBH (6) après 7 jours d'incubation.....	45
Figure 16: Effet des extraits sur la biomasse mycélienne	48
Figure 17: Effet des extraits sur la production d'AFB ₁	48

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Généralité sur les arachides.....03

I.1.1 Description et présentation générale03

I.1.2 Utilisation de l'arachide.....05

I.1.3 Importance économique de l'arachide dans le monde.....06

I.2 Généralité sur les moisissures et les mycotoxines.....06

I.2.1 Moisissures.....06

I.2.2 Mycotoxine.....07

I.2.3 Genre *Aspergillus*11

I.2.4 Aflatoxine.....13

I.3 Lutte contre *Aspergillus* et la production des aflatoxines.....18

I.3.1 Procédé physique.....18

I.3.2 Procédé chimique.....18

I.3.3 Procédé biologique.....18

I.4 Les extraits naturels de plante : une stratégie alternative de lutte contre la contamination par les aflatoxines.....19

I.4.1 Métabolites secondaires des plantes.....19

I.4.2 Méthode d'extraction des métabolites secondaires.....20

I.4.3 Les extraits comme agent afla-toxinogène.....21

I.5 *Chamaerops humilis* L23

I.5.1 Nom vernaculaires23

I.5.2 Présentation et description botanique.....23

I.5.3 Systématique24

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1 Lieux d'étude.....	26
II.2 Etude mycologique des arachides.....	26
II.2.1 Echantillonnage.....	26
II.2.2 Appariement et produits chimiques.....	27
II.2.3 Milieux de culture.....	27
II.2.4 Analyses physico-chimiques.....	27
II.2.5 Analyses mycologiques.....	28
II.2.6 Détection d'isolats aflatoxinogènes d' <i>A.flavus</i>	30
II.2.7 Essais d'activité des extraits organiques.....	31
II.2.8 Analyses statistiques.....	37

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Analyse physico-chimiques.....	39
III.2 Distribution et identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicilium</i>	39
III.3 Etude du pouvoir producteur d'aflatoxine AFB ₁ par des souches d' <i>A.flavus</i>	41
III.4 Rendement des extraits.....	41
III.5 Activité antifongique.....	41
III.6 Activité antiaflatoxinogène.....	47
III.7 Le contenu phénolique.....	50
III.8 Activité antioxydante.....	51
III.8.1 Effet scavenger du radical DPPH.....	51
III.8.2 Effet du blanchissement du β -carotène.....	52
III.8.3 Activité antioxydante et production d'aflatoxines.....	52
Conclusion	54
Références bibliographiques	56

Annexes

***INTRODUCTION
GENERALE***

L'arachide est la troisième culture, la quatrième source d'huile comestible et la troisième source importante de protéines végétales au plan mondial. Il est cultivé sur 26,4 millions d'hectare dans le monde pour une production totale de 36,1 millions de tonnes et une productivité moyenne de 1,4 tonne par hectare (**Faostat, 2011**).

En Algérie, la wilaya d'El Oued se positionne en tête des wilayas productrices d'arachides à l'échelle nationale, avec une contribution qui atteint 80 % de la production nationale, selon les statistiques de la production. Cependant, Les aflatoxines sont des métabolites secondaires qui sont principalement produits par les champignons d'origine alimentaire *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* présentent le plus grand facteur de risque en raison de leur fréquence de contamination (**Girayet *et al.*, 2007 ; Karami-Osboo *et al.*, 2012**).

Les aflatoxines, en particulier l'AFB₁, sont les mycotoxines les plus puissantes, qui entraînent des effets cancérigènes, tératogènes, hépatotoxiques et immunosuppresseurs (**Liu et Wu, 2010**). Cependant, les flambées de toxicité aiguë des aflatoxines sont un problème de santé publique et de nombreux efforts ont été faits pour éliminer ou réduire la teneur en aflatoxine dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (**Amiri *et al.*, 2008**). Les produits chimiques purs (**Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006**), les plantes et les microbes inhibent la croissance fongique et/ou la biosynthèse des aflatoxines par des souches aflatoxigènes d'*Aspergillus* (**Rasooli et Abyaneh, 2004 ; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2005 ; Alberts *et al.*, 2006 ; Atanda *et al.*, 2007; Yoshinari *et al.*, 2007 ; Reddy *et al.*, 2009**), certaines méthodes physiques, biologiques et chimiques ont également été proposées pour inactiver et détoxifier les aflatoxines (**García-Cela *et al.*, 2012**). Cependant, les méthodes physiques et chimiques (l'Entérosorption et la Chimio-protection) sont coûteuses et leur efficacité, leur innocuité et leur acceptabilité nécessitent une étude plus approfondie (**Strosnider *et al.*, 2006**).

Parmi les sources biologiques et naturelles, les plantes médicinales et les herbes ont reçu une plus grande considération en ce qui concerne leur statut relativement sûr et leur enrichissement par une large gamme de constituants utiles structurellement divers (**Prakash *et al.*, 2012**).

Certaines plantes appartiennent à Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Myrtaceae, Lauraceae ont été trouvés pour être actif dans la réduction de l'AFB₁, principalement par l'inhibition de la croissance d'*A. flavus* et la biosynthèse d'AFB₁(**Deabes *et al.*, 2011 ; Mishra *et al.*, 2012 ; da Cruz Cabral *et al.*, 2013; Kedia *et al.*, 2014; Stevic *et al.*, 2014**).

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité antifongique de quelques extraits organiques de *Chamaerops humilis* L. contre la souche aflatoxinogène *Aspergillus flavus* isolée des arachides cultivées à Oued-Souf et de caractériser leur potentiel anti-aflatoxinogène.

Le travail est scindé en trois chapitres. Le premier chapitre consacré à l'étude bibliographique est divisé en trois parties :

- La première partie donne un aperçu général sur les arachides.
- La deuxième partie présente des généralités sur les moisissures et les mycotoxines.
- La troisième partie est dédiée à une description botanique générale de l'espèce étudiée *C. humilis* L.

Dans le deuxième chapitre, nous avons axé notre travail sur l'isolement et l'identification des moisissures isolées des arachides et détection d'isolats aflatoxigènes d'*A. flavus*.

La mise en évidence du potentiel antifongique et anti-aflatoxinogène des extraits et évaluation de leur activité antioxydante.

Les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail, sont exposés dans le troisième chapitre. Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude ainsi que les perspectives ont été dégagées.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Généralité sur les arachides

L'arachide ou cacahuète (Peanut ou Groundnut en anglais) est une plante herbacée annuelle très appréciée pour sa valeur alimentaire et industrielle. Elle est cultivée partout dans le monde entre 40 °N et 40 °S (Smartt, 1994). Selon les statistiques de la FAO, la culture de l'arachide est répandue actuellement dans plus de 100 pays.

I.1.1Description et présentation botanique

L'arachide appartient au genre *Arachis* de la famille des légumineuses (*Fabaceae*). Son nom scientifique, donné par Linné en 1753, est *Arachis hypogea*. Cette plante de 20 à 90cm de haut à port droit ou rampant admet des caractéristiques particulières rapportées par Gillier et Sylvestre (1969) :

- Une **racine** pivotante avec beaucoup de ramifications latérales, la racine principale pouvant atteindre une profondeur de plus de 1,30m.
- Plusieurs **tiges** dont une principale et des ramifications. Les tiges sont aériennes de couleur verte claire, sombre ou pourpre et d'une longueur allant de 0.20 à 0.70m dépendamment de la variété et des conditions du milieu.
- Des **feuilles** de couleur verte plus ou moins foncée, composées et pennées. Elles sont constituées d'un pétiole d'une longueur de 4 à 9 cm portant deux ou trois paires de folioles membraneuses, ovales munies à leur base de deux stipules larges, longues et lancéolées.
- Des épis de 3 à 5 **fleurs** complètes et sessiles de forme papilionacées et de couleur jaune. Chaque fleur a un calice formé de 5 sépales, un androcée ayant 10 étamines soudées entre elles et un pistil formé d'un carpelle simple, sessile, de 0,5 à 1,5mm de long. L'ovaire est inséré sur un support (le gynophore) qui l'enfouit sous la terre après la fécondation.
- Un **fruit** se développant dans le sol à une profondeur de 3 à 5 cm. Cette gousse d'une dimension variant entre 1 x 0,5cm et 8 x 2cm est composée d'une coque contenant 1 à 4 graines riche en huile (45-53%). Elles ont deux cotylédons entourés d'un tégument sec et rouge et leur dimension, forme et couleur varie selon les variétés.

a) Classification systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Genre : *Arachis*

Espèce : *Arachis hypogaea*

b) Croissance et développement

L'arachide est une plante à croissance déterminée. La période végétative est marquée en particulier par l'augmentation de la taille des rameaux cotylédonaire qui représentent à eux seuls près de la moitié de l'ensemble de la plante. La croissance de la plante peut être plus ou moins rapide selon la température (**Hekimian Le thève *et al.*, 2009**).

Les durées des intervalles à chaque stade de végétation varient en fonction de la variété et du milieu. Au début de la floraison, les fleurs croissent rapidement si les conditions climatiques sont favorables. Elles peuvent atteindre un maximum de 600 à 700 chez les Spanish et 1000 chez les virginia. Dans les conditions idéales de température, le cycle de l'arachide est moyennement 85 jours pour les Spanish et Valencia et 115 jours pour les Virginia (**Hekimian Le thève *et al.*, 2009**).

c) Ecologie

La plante exige un climat tropical et croît bien en plein soleil. L'intervalle de température idéale est de 25°C à 35°C et la croissance de la plante est bloquée si la température est inférieure à 15°C ou supérieure à 45°C. L'arachide ne tolère pas les grands écarts de température entre le jour et la nuit et voit son rendement sérieusement affecté quand ces écarts atteignent 20°C. L'arachide est une plante assez résistante à la sécheresse (**Hekimian Le thève *et al.*, 2009**).

I.1.2 Utilisation de l'arachide

a) Alimentation humaine

- Huile d'arachide, utilisée comme huile de table ou comme matière première pour la fabrication de margarine, résiste bien aux hautes températures (friture)
- Beurre de cacahuète (appelé beurre d'arachide au Canada).
- Farine d'arachide, aliment de complément employé en biscuiterie (désolé, riche en acides aminés essentiels)
- Arachides en coque (aliment de base dans certains pays d'Afrique)
- Arachides décortiquées, arachides grillées pour apéritif (mélangées à d'autres ingrédients tels que : sel, amidon modifié de pomme de terre, exhausteur de goût E621, gélifiant E414, dextrose, farine de blé, levure en poudre, protéines végétales hydrolysées (soja, maïs), épices (paprika, macis), poudre d'oignon, arôme, graines de céleri), arachides pour confiserie
- L'arachide est également consommée en sauce en Afrique de l'Ouest. La sauce à la pâte d'arachides (obtenue en écrasant des arachides rôties) appelée maffé est une sauce aux légumes et à la viande. Elle accompagne le riz ou le couscous de petit mil, de sorgho ou de maïs. Les arachides crues écrasées sont par contre cuites en sauce avec des feuilles et de la viande. Cette sauce accompagne exclusivement le couscous local.

b) Alimentation animale

- Tourteau d'arachide, résidu de pression après extraction de l'huile.
- fanes utilisées comme fourrage (équivalent aux fanes de pois). En foin, le séchage dure plusieurs semaines.

c) Industrie

- huile d'arachides de deuxième extraction pour savonnerie coques utilisées comme combustible
- Engrais vert : La culture de l'arachide, comme celle des autres légumineuses, enrichit le sol en azote.
- Plante médicinale : l'huile d'arachide est inscrite à la pharmacopée française comme solvant médicamenteux.

I.1.3 Importance économique de l'arachide dans le monde

L'arachide occupe le 4^{ème} rang mondial des produits oléagineux après le soja, le coton, et le colza.

La Chine et l'Inde sont les premiers producteurs (**Mazoyer, 2002**) La production mondiale de l'arachide en 2003 était d'environ 36 millions de tonnes dont les deux pays, la Chine et l'Inde représentent 59 %.

I.1.3.1 Situation de l'arachide en Algérie

En Algérie, la culture d'arachide n'a pas connu d'évolution significative depuis 1998 à 2005 tant sur le plan des superficies cultivées que des productions.

La wilaya d'El Oued se positionne en tête des wilayas productrices d'arachides à l'échelle nationale avec une capacité de production annuelle dépassant les 120.000 QX, avec une contribution qui atteint 80 % de la production nationale, selon les statistiques de la production de la saison précédente.

I.2 Généralités sur les moisissures et les mycotoxines

I.2.1 Moisissures

Les moisissures sont constituées par des filaments ramifiés, les hyphes, dont l'ensemble est connu sous le nom de mycélium (**Pinton, 2012**).

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification, tout comme celle des autres champignons, est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée. Ce critère définit quatre des cinq classes des mycètes, soit les *Chytridiomycètes*, les *Zygomycètes*, les *Basidiomycètes* et les *Ascomycètes*. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée Deuteromycètes ou *Fungi imperfecti* (**Leveau et Bouix, 1993; Heritage et al., 1996**).

Les moisissures produisent une grande variété de métabolites secondaires. L'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est sans doute celui lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines (**Meyeret al., 2004**).

I.2.2 Mycotoxines

Le terme mycotoxine est une combinaison du mot Grec *mykos* (champignon) et du Latin *toxicum* (poison) (Jouany *et al.*, 2009). C'est à l'occasion d'accidents toxiques survenus chez les animaux, en particulier celui ayant entraîné la mort de dindons d'élevage en Angleterre (Turkey X disease) que les mycotoxines ont été initialement identifiées. La découverte de ces molécules sur les productions végétales aux champs ou ensuite au cours du stockage, est devenue le sujet d'une interaction scientifique multidisciplinaire. Cela a permis la découverte de nombreuses mycotoxines potentiellement dangereuses pour l'homme et l'animal (Richard, 2007).

Les mycotoxines sont secrétées par des moisissures appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* et *Claviceps* (Marin *et al.*, 2013). Parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agroalimentaire et sanitaire, les aflatoxines (AFs), l'ochratoxine A (OTA), la patuline (PAT), les fumonisines (FUM, surtout FB₁), la zéaralénone (ZEN), les trichothécènes (HT-2, Toxin-T2 et deoxynivalénol DON) (Galtier *et al.*, 2006 ; Paterson, 2006).

Les mycotoxines ne sont pas des protéines et ne sont pas directement codées par des gènes. Elles sont les produits terminaux de voies de biosynthèses longues et complexes constituées de séries de réactions enzymatiques successives. L'origine chimique des mycotoxines est très variée. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, gliotoxine, roquefortine). D'autres dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, zéaralénone). D'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, déoxynivalénol, toxine T2, verrucarine) (Pinton, 2012).

I.2.2.1 Conditions de synthèse

Les champignons toxigènes sont classés en deux groupes majeurs : les contaminants du champ pouvant infecter les plantes vivantes et ceux du stockage capable de se développer après la récolte, au cours du séchage, du stockage, du transport et de la distribution (Jouany *et al.*, 2009). Parmi les contaminants du champ, *Fusariumgraminearum* produisant le deoxynivalénol et le nivalenol et *F. verticillioïdes* produisant les fumonisines sont des phytopathogènes opportunistes des plantes sénescents ou stressées. *A. flavus*, produisant les aflatoxines, est également considéré comme un contaminant pouvant coloniser les plantes au

champ. Toutefois, ce dernier est aussi capable de produire des mycotoxines pendant le stockage (Alonso *et al.*, 2013).

La production des mycotoxines dépend directement de la croissance fongique. Par conséquent, la production de ces contaminants dépend des conditions environnementales survenant avant et après la récolte, les facteurs les plus importants étant la température et l'humidité. Cependant la contamination par les mycotoxines peut aussi être favorisée par d'autres facteurs tels la disponibilité des micronutriments et les blessures des grains dues aux insectes (Milani, 2013). Cette production varie également selon les particularités physiologiques des espèces productrices. Certaines mycotoxines, telles les tricothécènes et la zéaralénone, produites par des espèces du genre *Fusarium* sont souvent associées aux céréales produites dans les pays tempérés alors que celles produites par les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont des contaminants plus fréquents des climats chauds (Magan *et al.*, 2011).

I.2.2.2 Les mycotoxines en alimentation humaine et animale

La production des mycotoxines peut avoir lieu dans les champs avant, au moment ou bien après récolte (stockage). Les espèces du genre *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. roseus*, *F. tricinctum* et *F. nivale*) constituent les principales moisissures productrices de toxines avant la récolte (Jouany *et al.*, 2009). Tandis que les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* telles que *A. flavus* et *A. parasiticus* sont des contaminants au moment du stockage. Alors que les espèces d'*A. clavatus* et d'*A. fumigatus* sont deux espèces qui n'attaquent que les graines endommagées et nécessitent une grande rétention des graines en humidité.

Une fois produites, les mycotoxines peuvent être retrouvées dans toutes les parties de la colonie fongique: les hyphes, le mycélium, les spores mais aussi dans le substrat sur lequel le développement a eu lieu (Bhat *et al.*, 2010). L'exposition aux mycotoxines se fait essentiellement par voie orale suite à l'ingestion de denrées contaminées mais elle peut également avoir lieu par inhalation voire par contact (Jarvis et Miller, 2005; Klich, 2009; Zain, 2011).

Il convient également de souligner que, dans la majorité des cas, les consommateurs humains et animaux sont exposés à plusieurs mycotoxines. Ce constat est lié à trois raisons principales : une mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes, inversement, une même espèce est parfois capable de produire simultanément plusieurs

mycotoxines, les repas (ou rations chez les animaux) sont généralement constitués de plusieurs aliments ou d'aliments préparés à partir de plusieurs matières premières, chacune pouvant être une source d'une toxine différente (Alassane-Kpembi *et al.*, 2016).

Les mycotoxines peuvent contaminer de nombreux produits alimentaires comme les céréales (maïs, blé, riz, orge, etc.), les graines oléagineuses (arachides, coton), les fruits secs (pistaches, noix, figues séchées, etc.), les épices, etc (Marin *et al.*, 2013). Le **tableau I** regroupe les mycotoxines moisissures, mycotoxines et les denrées les plus souvent contaminées.

Tableau I : Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments (Tozlovanu, 2008).

Champignons	Mycotoxines	Denrées
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ochratoxines A	Maïs, cacahuète, graine de coton, riz, tissus d'animaux (jambon, lard, saucisse), lait et dérivés
<i>Fusarium</i>	Zéaralénone, Fumonisines, Trichothécènes	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine
<i>Penicillium</i>	Patuline, Ochratoxine A, Citrinine	Fruits et jus de fruits, blé, riz, fromage, noix
<i>Alternaria</i>	Alternariol	Fruits, légumes et produits dérivés de pommes et tomates
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle

I.2.2.3 Effets des mycotoxines sur la santé

Les différentes mycotoxines induisent des effets différents : certaines exerçant un pouvoir hépatotoxique voire cancérigène, d'autres se révélant oestrogéniques, immunotoxiques, néphrotoxiques ou neurotoxiques (Liu et Wu, 2010). Le **tableau II** résume les effets et les mécanismes d'action des principales mycotoxines.

Tableau II: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (A.F.S.S.A, 2009).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire
Aflatoxines B₁+ M₁	Hépatotoxicité. Génotoxicité. Cancérogénicité. Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN. Péroxydation lipidique. Bioactivation par le cytochrome P450. Conjugaison aux GS-transférases.
Ochratoxine A	Néphrotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP. Détoxification par les peptidases.
Patuline	Neurotoxicité. Mutagenèse <i>in vitro</i> .	Inhibition indirecte d'enzymes.
Trichothécènes (toxine T-2, déoxynivalénol, etc.)	Hématotoxicité. Immunomodulation. Toxicité cutanée.	Induction de l'apoptose sur progéniteur. Tissu hématopoïétique et cellules immunitaires. Impact sur la synthèse des protéines. Altération des immunoglobulines.
Zéaralénone	Fertilité et reproduction.	Liaison aux récepteurs oestrogéniques. Bioactivation par des réductases. Conjugaison aux glucuronyltransférases.
Fumonisine B₁	Lésion du système nerveux central. Hépatotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Inhibition de la synthèse de céramide. Altération du rapport sphinganine/sphingosine. Altération du cycle cellulaire

I.2.2.4 Impact économique des mycotoxines

Malgré les nombreuses recherches qui ont été faites sur l'aspect toxicologique et pathologique des mycotoxines chez les populations humaines et animales, sur leur implication directe ou indirecte dans l'apparition de certaines maladies telles les cirrhoses, les cancers ou certaines maladies nutritionnelles comme le kwashiorkor ou la maladie du kashin-Beck au Tibet en Inde (Jiambo *et al.*, 1995), peu de travaux ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact financier et économique des mycotoxines sur des populations spécifiques aussi bien dans les pays industrialisés que les pays développés.

I.2.2.5 Réglementations relatives aux mycotoxines

L'Union Européenne (UE) a adopté une législation qui établit les teneurs maximales de certains contaminants dans les denrées alimentaires afin de garantir un niveau élevé de la santé publique (**recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006 du 19 décembre 2006**) (**Tableau III**).

Tableau III: Principales réglementation européennes concernant les teneurs limites en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale (**Galtier et al., 2006**).

Toxine	Règlement européen	Aliment	Teneurs limites
Alimentation humaine	CE 466/2001 et CE 257/2002	Céréales et dérivés	4 µg/kg
aflatoxine B ₁	472/2002	arachides, fruits	2 à 15 µg/kg
	257/2002	épices	5 à 10 µg/kg
	472/2002	lait	0,05 µg/kg
aflatoxine M ₁	1425/2003	céréales, fruits, vin	5 à 10 µg/kg
ochratoxine A	856/2005	pommes et dérivés	10 à 50 µg/kg
patuline	856/2005	céréales et dérivés	200 à 1750 µg/kg
déoxynivalénol	856/2005	céréales et dérivés	200 à 2000 µg/kg
fumonisines	856/2005	céréales et dérivés	20 à 200 µg/kg
zéaralénol	nd	céréales et dérivés	en attente
toxine T-2			
Alimentation animale	32/2002	céréales, autres	5 à 50 µg/kg
aflatoxines		céréales	1000 mg/kg
ergot de seigle			

nd : n'est pas déterminé.

I.2.3 Genre *Aspergillus*

I.2.3.1 Définition

Le genre *Aspergillus* regroupe environ 250 espèces (**Klich, 2007**). Il est caractérisé par une structure particulière ressemblant à l'aspergillum, un instrument utilisé pour asperger l'eau bénite, et qui a inspiré à Micheli, un prêtre catholique, ce nom en 1729 (**Klich, 2009**).

Les *Aspergillus* spp. sont très répandus dans la nature et tout particulièrement dans le sol où ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (Scheidegger et Payne, 2003). Ils sont par ailleurs utilisés dans plusieurs domaines (agriculture, biotechnologie et santé) en exerçant des rôles bénéfiques comme la production de métabolites utiles (enzymes, protéines et acides).

Etant donné son importance économique extrême liée à ses effets utiles et nuisibles, plusieurs ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus* en général et à sa taxonomie et sa phylogénie en particulier (Samson et Pitt, 2000; Varga *et al.*, 2003; Frisvad et Samson, 2004; Samson *et al.*, 2006).

I.2.3.2 *Aspergillus flavus*

A. flavus, moisissure de couleur vert jaune à vert olive, caractérisée par des têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. La vésicule est globuleuse ou subglobuleuse (10 à 65 µm de diamètre). Les têtes sont radiées et majoritairement bisériées (2 rangées de stérigmates). Les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses (Hedayati, 2007; Samson, 2010) (Figure 2). C'est une espèce à prédominance tropicale et subtropicale, peut coloniser de nombreux substrats, fréquemment rencontrée dans le sol, les produits végétaux en décomposition, les fourrages, les grains et semences en stockage, les aliments pour animaux, les dérivés de céréales...,etc (Hedayati, 2007). *A. flavus* présente également un important pouvoir pathogène. Il attaque principalement les voies respiratoires de l'homme et des animaux. C'est l'un des principaux responsables des aspergilloses bronchiques allergiques. Il élabore divers métabolites toxiques, mais surtout des aflatoxines, notamment l'aflatoxine B₁ (AFB₁) qui est l'un des plus puissants hépato-carcinogènes connus à l'heure actuelle. L'aflatoxinogénèse peut avoir lieu de 12°C à 42°C, avec un optimum situé entre 25°C et 30° .

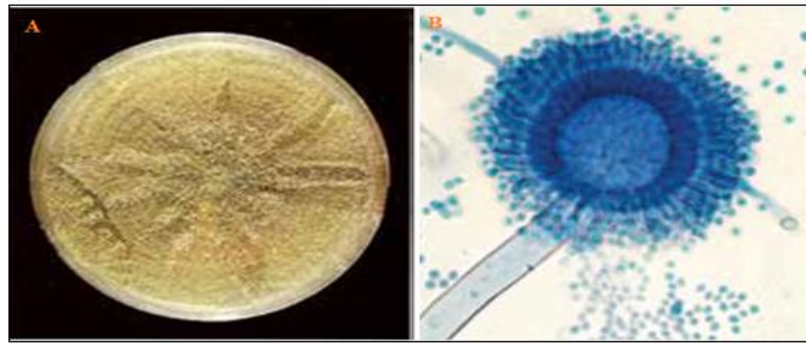


Figure 1: *A. flavus* (A: culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C; B: aspect microscopique) (Tabuc, 2007).

I.2.4 Aflatoxines

I.2.4.1 Origine et structure

Parmi les métabolites secondaires des champignons, une place particulière est occupée par les aflatoxines, responsables de toxicités aiguës ou chroniques chez de très nombreux animaux.

C'est en 1960 que survient, en Grande Bretagne, une catastrophe sans précédent dans les annales de l'agriculture : en une saison, plus de 100 000 dindons à l'engraissement meurent des lésions hépatiques graves. D'autres accidents présentant des manifestations pathologiques identiques sont signalés à la même époque en Angleterre parmi les animaux de laboratoire, les dindonneaux, les canetons, les faisandeaux, les porcs et le gros bétail. D'étiologie inconnue, cette intoxication est dénommée « Turkey X disease ». Un lien existe cependant entre tous les cas signalés, une farine à base de tourteaux d'arachides et importée du Brésil, intervient dans l'alimentation de tous ces animaux. Les farines à haute toxicité se révélèrent être contaminées par des moisissures, *A. flavus* responsables de la production de la toxine dénommée « aflatoxine » (Abdellah, 2004; Nguyen, 2007).

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires d'origine fongique produits par deux souches d'*Aspergillus*. *A. flavus* synthétise les aflatoxines B₁ (AFB₁) et B₂ (AFB₂) tandis que *A. parasiticus* excrète, en plus, les aflatoxines G₁ (AFG₁) et G₂ (AFG₂) (Ruppel *et al.*, 2004 ; Maraqa *et al.*, 2007). Une troisième souche appelée *A. nomius*, rare mais proche de *A. flavus* est capable de produire des aflatoxines (Bhatnagar et Garcia, 2001 ; Varga *et al.*, 2015). Les dérivés des AFB₁ et B₂ sont communément appelés aflatoxine M₁ (AFM₁) et M₂ (AFM₂). *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton, tandis qu'*A.*

parasiticus est présent surtout dans les graines d'arachide (Rojas *et al.*, 2005; Saleemullah *et al.*, 2006).

Les aflatoxines regroupent 18 composés structurellement proches, caractérisées au niveau chimique par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactones hexatomiques (AFG). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structures (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau (Firmin, 2011). Les structures chimiques de ces différents composés sont représentées dans la **figure 2**.

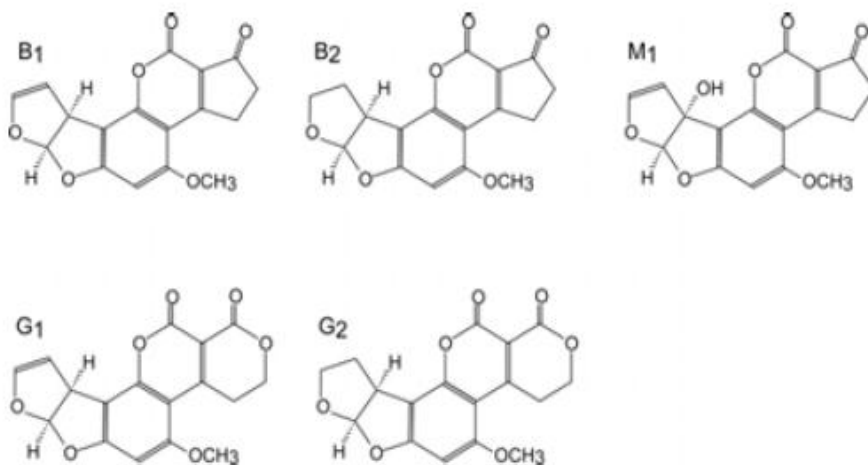


Figure 2: Structure chimiques des AFB₁, B₂, G₁, G₂, M₁ et M₂ (Santini et Ritieni, 2013).

I.2.4.2 Propriétés physico-chimiques

Les aflatoxines sont des composés organiques de nature non protéique, de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), se présentent sous forme de cristaux à point de fusion élevé (240°C-289°C), elles sont très peu solubles dans l'eau (10-20 mg/litre), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et l'alcool méthylique), tout particulièrement le diméthyl-sulfoxyde. En milieu alcalin (pH >10), les AFs sont solubilisées avec ouverture de l'un des noyaux lactoniques. L'hydrolyse prolongée dans l'eau bouillante, peut également provoquer l'ouverture de noyau lactonique avec, dans certaines conditions, formation de dérivés non toxiques. Toutes les aflatoxines sont lévogyres. La fluorescence intense des aflatoxines, une fois exposées à des longueurs d'ondes ($\lambda = 365 \text{ nm}$) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de

détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'AF de type B (AFB = AF « blue ») donne une fluorescence bleue et l'AF de type G (AFG = AF « Green »), donne une fluorescence verte. L'AFM₁ donne une fluorescence bleu-mauve (A.F.S.S.A, 2009).

I.2.4.3 Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires

La présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale est le résultat d'une contamination par des espèces fongiques aflatoxinogènes. Le taux et le degré de contamination dépendent étroitement de la température, de l'humidité et des conditions de stockage. Les aflatoxines sont couramment rencontrées sur les cultures dans les champs avant la récolte dans les pays chauds et humides. La contamination après la récolte et/ou pendant le stockage est également possible, si le séchage des cultures est retardé. L'AFB₁ contamine les arachides, les pistaches, les amandes, mais aussi les graines de coton (Klich, 2007), ainsi que certaines céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. L'AFB₁ peut également être retrouvée dans les épices (El Mahgubi *et al.*, 2013), les fruits secs (Juan *et al.*, 2008). Des traces d'AFB₁ peuvent être détectées dans les produits animaux seulement si les quantités initiales ingérées sont suffisamment importantes (Bailly et Guerre, 2009; Herzallah, 2009; Hymery *et al.*, 2014). Des quantités plus importantes peuvent être détectées dans la viande et les oeufs de volailles qui semblent être plus sensibles à une contamination par l'AFB₁ (Herzallah, 2013). De plus, des quantités d'AFM₁ peuvent aussi être transférées aux nourrisson par le lait des mères consommant des aliments contaminés par l'AFB₁ (Nemati *et al.*, 2010 ; Elzupir *et al.*, 2012).

Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines dépendent essentiellement la nature de la flore fongique et ses particularités physiologiques, la nature et la composition du substrat (type et aw), les conditions climatiques (latitude, température, humidité) et environnementales (autres microorganismes, inhibiteurs chimiques, présence de lésions sur le substrat, etc.) (Bhat *et al.*, 2010).

I.2.4.4 Métabolisme de l'aflatoxine B₁ dans l'organisme

Après ingestion, l'AFB₁ est absorbée au niveau de l'intestin. Ensuite va subir de nombreuses réactions de métabolisation hépatique c'est une étape essentielle à son activité toxique xénobiotiques (Wild et Montesano, 2009 ; Wu et Khlangwiset, 2010).

La biotransformation des groupements fonctionnels de l'AFB₁ soit lors d'une hydroxylation qui est élaborée à la formation de l'Aflatoxine de type Q₁ ou lors d'une O-déméthylation en formant l'Aflatoxine de type P₁ (AFP₁), tout ça entraîne une réduction de la toxicité (Prakash *et al.*, 2012). Cependant, certains métabolites de l'AFB₁ conservent une certaine toxicité résiduelle plus faible que la molécule mère : l'aflatoxicol, un autre métabolite, l'AFB₁ 8,9-époxyde est plus toxique que la molécule mère et est responsable de la toxicité cellulaire. L'élimination des aflatoxines et de leurs métabolites se fait par excrétion urinaire (AFM₁, AFP₁, AFQ₁), biliaire et lactée sous forme d'AFM₁ qui conserve une toxicité importante chez les femelles des mammifères et cette voie d'élimination constitue une source possible d'exposition des nouveaux nés (Guengerich, 2001) (Figure 3).

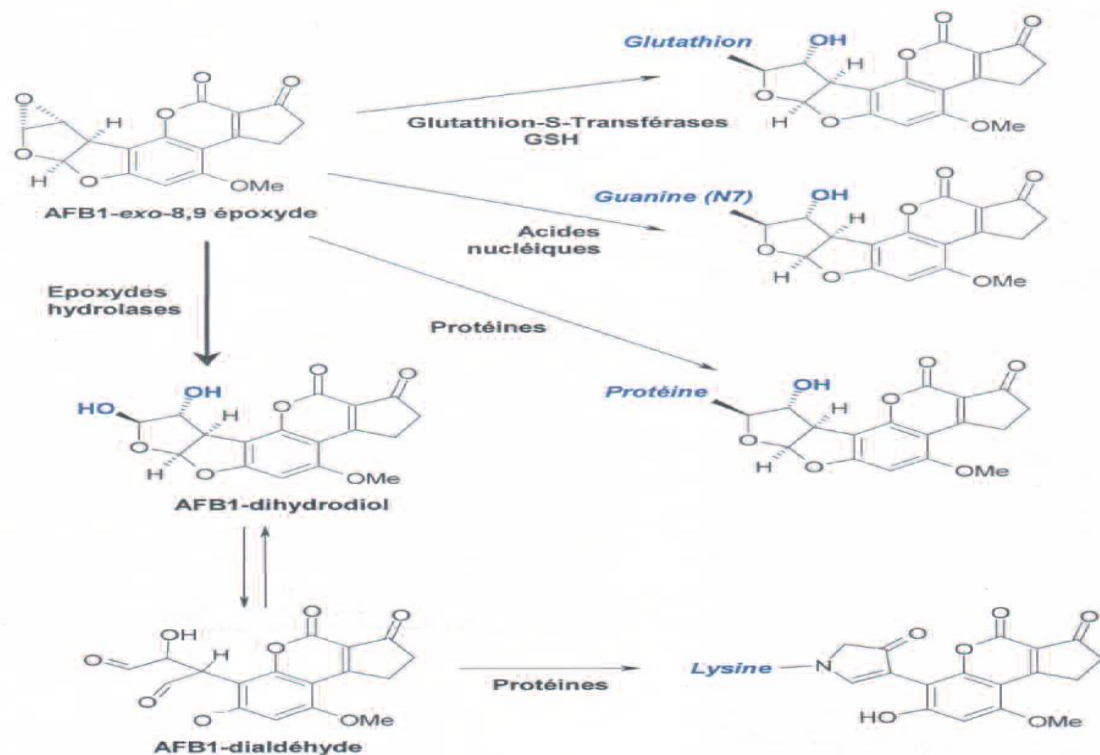


Figure 3: Bioconversion de l'AFB₁-exo-8,9-époxyde (Galtier *et al.*, 2006).

I.2.4.5 Toxicité des aflatoxines

En 2002, le Centre International de Recherche sur le Cancer (C.I.R.C) de l'OMS classe l'aflatoxine dans le groupe I, car il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de ses molécules chez l'homme et l'animal, l'AFM₁ dans le groupe II B et l'AFG₁ dans le groupe III (A.F.S.S. A, 2009). Quant à l'AFG₂, les données actuellement disponibles sont

insuffisantes pour la classer dans cette catégorie. La plus toxique des quatre aflatoxines naturelles est l'AFB₁, viennent ensuite par ordre décroissant de toxicité l'AFG₁ puis les AFG₂ et AFB₂ (Meissonnier, 2005).

a) Hépatotoxicité

Les études épidémiologiques réalisées dans le monde ont montré que les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (Henry et Bosch, 2001). Cette situation est souvent rencontrée dans les pays en voie de développement, pour lesquels il n'existe pas de législation régulant les concentrations de l'AFB₁ dans l'alimentation, et dans lesquels la vaccination contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et /ou politique.

b) Immunotoxicité

L'AFB₁ exerce des propriétés immunosuppressives affectant en particulier l'immunité à médiation cellulaire par inhibition de la phagocytose, diminution de la production de radicaux oxygénés et altération de la production de cytokines (Bondy et Pestka, 2000 ; Oswald et Marin, 2005). Cela contribue à favoriser des infections chroniques (Marin *et al.*, 2013; Meissonnier *et al.*, 2008) et constitue un vrai risque pour les personnes immunodéficientes. Ainsi, les adduits formés par les aflatoxines (AF-ALB) accentuent les dommages au système immunitaire chez les personnes séropositives au virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) (Jiang *et al.*, 2008).

c) Hématotoxicité

L'AFB₁ exerce des effets hématotoxiques secondaires se caractérisant par des altérations dans les fonctions de la moelle osseuse (une myélotoxicité qui affecte les lignées des granulocytes et monocytes) et l'anémie consécutive à une aflatoxicose serait due à une aplasie médullaire et une hémolyse mais aussi à une diminution de l'absorption de fer. L'altération des fonctions hépatiques conduit à la diminution de la synthèse des facteurs de coagulation et des troubles de l'hémostase (Parent-Massin et Pachment, 1998).

d) Mutagénicité

L'AFB₁ n'est pas réactive ou mutagène par elle-même, mais elle peut être activée en un époxyde très électrophile qui peut former des adduits à l'ADN. Ces adduits génèrent une mutation qui se situe sur le codon 249 et qui pourra être le point de départ d'un processus de

cancérogène hépatique. Des résultats *in vivo* ont montré que l'AFB₁ provoque très fréquemment cette mutation (Aguilar *et al.*, 1993).

I.3 Lutte contre *Aspergillus* et la production des aflatoxines

Il n'existe pas de procédés de décontamination qui pourraient convenir à l'ensemble des mycotoxines. De plus, ces procédés actuels concernent essentiellement les grains de céréales oléagineux. Ils doivent être efficaces sans rendre les denrées traitées impropres à la consommation et, ils doivent également être faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses. Ils sont classés selon qu'ils reposent sur des procédés chimiques, physiques ou biologiques.

I.3.1 Procédés physiques

- **Élimination des mycotoxines sur les aliments contaminés :** des méthodes telles que le lavage par de l'eau ou du carbonate de sodium afin de réduire la concentration des toxines. Le séchage, le broyage, les tris manuels ou mécanisés des gousses ou des amandes sont aussi un moyen d'élimination. (Yiannikouris et Jouany, 2002; Ruppel *et al.*, 2004).
- **Utilisation de substances adsorbants afin de réduire l'adsorption digestive des toxines digérées :** L'ajout à la ration des adsorbants capables de fixer les mycotoxines permet de réduire leur biodisponibilité dans l'organisme animal et de limiter les risques liés à la présence de ces résidus dans les produits animaux destinés à la contamination humaine. Les aluminosilicates de sodium calcium hydratés (HSCAC) ainsi que les phyllosilicates dérivés de zéolites naturelles possèdent une grande affinité *in vitro* et *in vivo* pour l'AFB₁ (Diaz *et al.*, 1999).

I.3.2 Procédés chimiques

Une variété d'agents chimiques tels que les acides, les bases (ammoniaque, soude), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, ozone), des agents réducteurs (bisulfites), des agents chlorés, du formaldéhyde sont utilisés pour dégrader ou biotransformer les mycotoxines et plus particulièrement les aflatoxines (Yiannikouris et Jouany, 2002; Ruppel *et al.*, 2004).

I.3.3 Procédés biologiques

Certaines souches de bactéries lactiques, de propiobactéries et de bifidobactéries possèdent des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines. *Flavobacterium*

aurantiacum peut fixer l'AFB₁ et la rendre inactive. Des microorganismes peuvent également métaboliser les mycotoxines (*Corynebacterium rubrum*) ou les bioconvertir (*Rhizopus*, *Aspergillus*) (Shams-ghahfarokhi *et al.*, 2013). Une autre approche consiste à isoler des souches d'*A. flavus* et *A. parasiticus* non aflatoxinogènes en vue d'une biocompétition. Ces souches occupent la même niche écologique que les souches toxigènes et diminuent la contamination des plantes par les moisissures aflatoxinogènes. Ainsi les glucomannanes issus de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines (Ahlberg *et al.*, 2015).

I.4 Les extraits naturels de plantes : une stratégie alternative de lutte contre la contamination par les aflatoxines

La fréquence de contamination des récoltes mondiales par les aflatoxines montre que les stratégies utilisées actuellement sont insuffisantes pour garantir la sécurité des aliments et qu'il convient d'en développer d'autres, en complément ou substitution de celles existant déjà. Dans ce contexte, des stratégies basées sur l'usage de composés naturels, généralement reconnus comme non nocifs à l'environnement ainsi qu'à la santé, semblent intéressantes. En effet, les plantes produisent différents métabolites secondaires (terpénoïdes, composés phénoliques, alcaloïdes, etc.) pour leur protection contre les agressions de toute sorte (mécanique, biologique ou climatique). Ces composés pourraient éventuellement être utilisés comme moyen de lutte contre une contamination fongique et/ou mycotoxique (Isman et Machial, 2006).

I.4.1 Métabolites secondaires des plantes

Les réactions chimiques qui ont lieu dans le protoplasme des cellules végétales donnent naissance à deux types de produits : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (N'Guessan *et al.*, 2009 ; 2017 ; Bouras, 2019).

On appelle métabolites secondaires des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux, mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal. De nombreux métabolites secondaires possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisés en médecine humaine (Guillaume, 2005).

Le métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire (Drago, 2015). Les métabolites secondaires sont historiquement plus

spécifiques aux plantes, bactéries et champignons, mais on découvre également des métabolites spécifiques dans certains groupes d'animaux.

Contrairement aux métabolites primaires, ils ne participent pas directement au développement de l'organisme (la plante, typiquement). Cependant, ces composés ne sont pas totalement différents des métabolites primaires. En effet, ils proviennent parfois des mêmes voies de biosynthèse et certains, comme la chlorophylle et la lignine, ont des fonctions indispensables pour la croissance de la plante, et pourraient donc faire partie des métabolites primaires (Berdy, 2005).

À ce jour, plus de 100 000 métabolites secondaires ont été identifiés et on estime que chaque plante produit une centaine de molécules différentes (Drago, 2015).

Les métabolites secondaires participent à la vie de la plante, et ils ont des rôles très variés. Ils peuvent servir de défense (secrétions amères ou toxiques pour les prédateurs), ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (pollinisateurs). Ils peuvent également permettre la communication entre les plantes, par des messages d'alerte par exemple, ou faire partie de la structure de la plante (tannins et lignine) (Alain *et al.*, 2018).

Les métabolites secondaires seront discutés dans le cadre de leurs classes chimiques plutôt que leurs rôles comme la phytoanticipine ou phytoalexines, car plusieurs composés appartiennent aux espèces différentes. Les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois groupes distincts : les terpènes, les composés phénoliques et les composés azotés, y compris les alcaloïdes (Macheix *et al.*, 2005 ; Mazid *et al.*, 2011).

I.4.2 Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

Les progrès récents dans l'extraction de composés bioactifs à partir de matériel végétal ont fait l'objet d'un examen approfondi, probablement en raison de la sensibilisation accrue du public aux soins de santé préventifs qui pourraient être favorisés par la consommation d'extrait de matériel végétal (Azmir *et al.*, 2013 ; Wang et Weller, 2006).

I.4.2.1 Techniques conventionnelles d'extraction

Diverses techniques conventionnelles d'extraction peuvent être utilisées pour extraire des composés bioactifs à partir de plantes. La plupart de ces technologies sont basées sur les capacités d'extraction des différents solvants utilisés et l'application de

chaleur et/ou de mélange. Afin d'obtenir des composés bioactifs à partir de plantes, les techniques classiques existantes sont : (1) l'extraction au Soxhlet, (2) la macération et (3) l'hydrodistillation (Azmir *et al.*, 2013). Ces méthodes d'extraction utilisent des solvants organiques tels que l'hexane, l'acétone, le méthanol, l'éthanol, etc. ou de l'eau, et sont généralement réalisées sous pression atmosphérique. L'utilisation de solvants organiques et le long processus d'extraction sont les principaux inconvénients des méthodes conventionnelles.

I.4.2.2 Techniques non conventionnelles d'extraction

Afin d'atténuer les limites des méthodes conventionnelles d'extraction, des méthodes alternatives aux méthodes conventionnelles d'extraction ont vu le jour. Ces nouvelles méthodes comprennent l'extraction accélérée par solvant (ASE), l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (EAU), l'extraction à l'eau sous-critique (SWE), l'extraction par champ électrique pulsé (PEF), l'extraction assistée par enzyme (EAE), l'extraction liquide sous pression (PLE) et l'extraction dynamique solide-liquide rapide (RSLDE). À cet égard, l'accent est mis sur ASE, SFE, MAE, UAE et SWE, car ce sont les méthodes les plus largement utilisées pour extraire des molécules bioactives à partir de plantes.

I.4.3 Les extraits comme agents anti-aflatoxinogènes

Les substances naturelles des plantes ont été utilisées traditionnellement dans la conservation des aliments, *in vitro*, les extraits et la poudre de certains végétaux ont montré leur capacité d'inhiber les moisissures toxigènes et la production des toxines (da Cruz Cabral *et al.*, 2013). Dans cette lutte, les produits végétaux ont pris une part considérable dans les travaux de recherche et plus précisément les huiles essentielles, cependant, très peu d'études ont été réalisés jusqu'à ce jour concernant les extraits naturels (Tableau IV).

Les inhibiteurs de la biosynthèse de l'AF agissent à trois niveaux : (1) modulent les facteurs physiologique et environnementales affectant la biosynthèse de l'aflatoxine, (2) inhibent les circuits de signalisation des voies biosynthétiques, ou (3) inhibe directement l'expression des gènes ou l'activité des enzymes (da Cruz Cabral *et al.*, 2013).

Tableau IV: Composés inhibiteurs de la production de l'AF montrant une inhibition accrue de la croissance (Mohammedi, 2013).

Nature de l'inhibiteur	Composés
Alcaloïdes	Caféines Pipérine Berbérine Pipemonaline
Biflavonoides	Amentoflavone 6,6''-Bigenkwanine Tétradiméthoxybigenkwanine Amenthoflavone 7,7'-diméthoxyagastisflavone
Coumarines	Acide p-Coumarique
Flavonoides	Cyanidin Cyanidin-3-glucoside Cyanidin-3-galactoside Kaempferol Luteolin
Acides phénols	Acide gallique Acide ferulique Acide vanillique
Terpénoides	Camphène α -Carotène β -Carotène Limonène Salicylaldehyde

I.5 *Chamaerops humilis* L.

I.5.1 Noms vernaculaires

Nom français : palmier nain, palmier doum, doum ou faux palmier.

Nom arabe : al-dūm

I.5.2 Présentation et description botanique

C. humilis est un palmier dioïque (fleurs mâles et fleurs femelles sur des plantes différentes) ; Ce palmier est de petite taille ; il fait généralement 2 mètres de haut (**Figure 4**) et se caractérise, notamment, par son stipe (tronc) drageonnant, considéré comme un bioindicateur thermoméditerranéen. Généralement, il n'est pas présent au-delà de 1000 m au-dessus du niveau de la mer, étant plus commun dans les zones côtières (**Jácome-Flores et al., 2016**).

En raison de sa germination vigoureuse, *C. humilis* est, selon **Herrera (1989)**, très tolérant aux perturbations (feu, herbivorie, etc.). Il fleurit en mars-mai, montrant un système mixte de pollinisation par les insectes et le vent (**Anstett, 1999 ; Herrera, 1989**). Les feuilles, disposées en rosette terminale, sont palmées en forme d'éventail de 90 cm de diamètre. Le pétiole, long et grêle (jusqu'à un mètre de long), est très épineux. Le limbe est disséqué en 10 à 20 pseudo-folioles allongées et aiguës, raides et coriaces. Les feuilles sont vertes sur la face supérieure et presque blanche en dessous. L'inflorescence est un spadice, entouré d'une spathe courte (30 cm de long), comprenant de nombreuses petites fleurs jaunâtres, mâles ou femelles (**Jácome-Flores et al., 2016**).



Figure 4: Vue d'ensemble du *C. humilis* L.

Les fruits sont des drupes oblongues de 2 à 5 cm de longueur et de couleur brun rougeâtre à maturité (septembre-novembre) ; Leur pulpe est très fibreuse et légèrement sucrée. Les fruits sont attachés aux inflorescences (ou branches) jusqu'à 30 cm de long (37-91 fruits par branche). Enfin, les semis émergent au printemps et au début de l'été, subissant une mortalité importante due aux sécheresses estivales et aux herbivores (**Jácome-Flores et al., 2016**).

Les informations concernant les constituants chimiques de *C. humilis* sont rares, et les travaux existants sont préliminaires. Les travaux de **Benhamadi (2012)** ; **Coelho (2017)** ont montré que les extraits des feuilles et des fruits étudiés contiennent plusieurs composés chimiques, notamment, tannins galliques, dérivées alcaloïdiques, flavonoïques, composées réducteurs, saponines, stéroïdes et terpénoïdes. Dans une étude récente portant sur l'analyse chimique de l'huile extraite de la graine d'une variété tunisienne de *C. humilis*, **Nehdi et al. (2014)** ont démontré la présence de composés bénéfiques pour la santé tels que les acides gras et les tocotriénols (forme rare de vitamine E).

Des extraits réalisés avec différentes parties de *C. humilis* ont montré des propriétés pharmacologiques significatives. Par exemple, les expériences faites sur les rats ont prouvé que l'extrait aqueux (décoction) des feuilles, possède une activité antidiabétique (**Gaamoussi et al., 2010**). Les extraits obtenus à partir de différents solvants organiques (hexane, chloroforme) et aqueux des feuilles et fruits de *C. humilis* ont présenté une activité antibactérienne sur les *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes* (**Hasnaoui et al., 2013**). Des activités antioxydante et antispasmodique ont aussi été mises en évidence (**Benmehdi et al., 2012** ; **Coelho et al., 2017**).

I.5.3 Systématique

Ce genre monospécifique doit son nom au grec chamai, bas ; rops, buisson. Cette espèce de palmier (famille des Arécacées) appartient à la sous-famille des Coryphoideae et à la tribu des Corypheeae. C'est la seule espèce du genre *Chamaerops* (**Dransfield et al., 2008**).

Famille : *Arecaceae*

Sous-famille : *Coryphoideae*

Genre : *Chamaerops*

Espèce : *humilis* L.

MATERIELS
ET
METHODES

II.1 Lieux d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie et Microbiologie (FSNV, Université Mohamed Boudiaf - M'sila), au laboratoire des molécules bioactives et valorisation de la biomasse (LPBVB), et au laboratoire de chimie organique à Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

II.2 Etude mycologique des arachides

II.2.1 Echantillonnage

L'échantillon a été prélevé de différents grossistes de la wilaya d'Oued Souf ($33^{\circ} 22' 06''$ N, $6^{\circ} 52' 03''$ E. Altitude, 75 m) (**Figure 5**) qui se composent de deux échantillons d'arachide (avec enveloppe, sans enveloppe à peux blanche) a été réalisée durant la période allant du début du mois de Mars de l'année 2021.

Les échantillons en vrac ont été bien mélangés à raison de 200 g d'échantillon. Tous les échantillons sont conservés dans endroit sec et frais et dans des sacs en plastique, et étiquetés puis acheminés au laboratoire de Microbiologie de l'université de Mohamed Boudiaf M'sila.

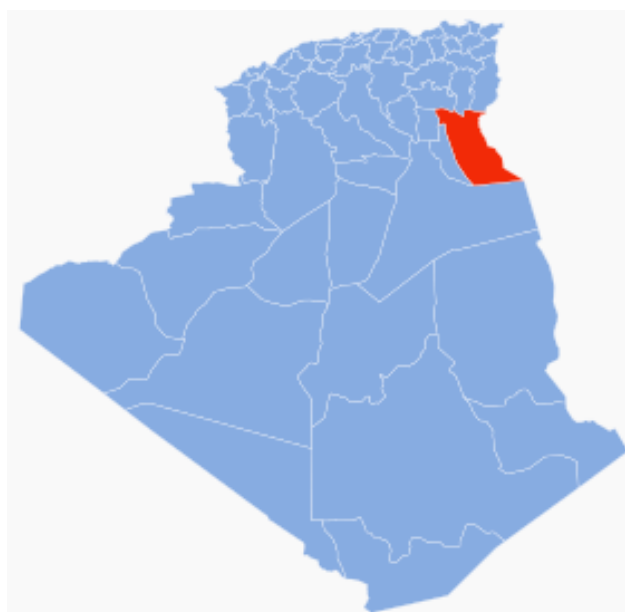


Figure 5: Localisation de la Wilaya d'El Oued (Google maps, 2021).

II.2.2 Appareillage et produits chimiques

Tous les appareils et les produits chimiques utilisés au cours de ce travail sont cités dans l'annexe I.

a) Standard analytique

Le standard analytique AFB₁ produit par *Aspergillus parasiticus* utilisé dans cette étude nous a été fourni aimablement par le laboratoire de la recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'École Nationale Supérieure de Kouba, Alger.

II.2.3 Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour les isollements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques ainsi que pour la production de l'AFB₁ et les activités biologiques sont les suivants :

- Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (Pitt et Hocking, 2009).
- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar (Pitt et Hocking, 2009).
- Milieu MEA (Malt Extract Agar) (Pitt et Hocking, 2009).
- Milieu (G25N) (Glycerol Nitrate Agar) (Pitt et Hocking, 2009).
- Milieu CYA (Czapek, Yeast, Agar) (Pitt et Hocking, 2009).
- Milieu AFPA (*Aspergillus flavus* et *parasiticus* Agar) (Pitt et Hocking, 2009).
- Milieu SMKY (Sucrose - Magnesium sulphate - potassium nitrate - Yeast extract) (Mishra *et al.*, 2013).
- Milieu DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar) (King *et al.*, 1979)

La composition chimique de ces milieux est donnée en annexe II.

II.2.4 Analyses physico-chimiques

II.2.4.1 Détermination du taux d'humidité relative

Le taux d'humidité relative (HR) de l'échantillon a été déterminé par la méthode de **Mandeel (2005)**, en introduisant 30 g d'échantillon (P_{éch.}) broyés dans une coupelle tarée (t), elle-même positionnée dans une étuve réglée à 100 °C. L'échantillon a été ensuite pesé avec précision toutes les vingt-quatre heures, après avoir été refroidi à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant (P_f). L'humidité relative a été calculée selon la relation suivante :

$$\text{HR}\% = (\text{P}_{\text{éch.}} - \text{P}_f) / (\text{P}_{\text{éch.}} - t) \times 100$$

Où: **HR%**: humidité relative en pourcentage;
P_{éch.}: poids de la prise d'essai avant l'étuvage;
P_f: poids de la prise d'essai après l'étuvage;
t: poids taré de boîte de Pétri.

La mesure de l'HR% est le résultat de la moyenne de trois essais de chaque échantillon.

II.2.4.2 Détermination du pH

La détermination de la valeur du pH a été effectuée à l'aide d'un pH mètre.

II.2.5 Analyse mycologique

II.2.5.1 Isolements et dénombrement de la flore fongique

L'isolement et le dénombrement de la flore fongique associé aux arachides a été réalisé en appliquant deux techniques de détection :

a) Méthode des grains (Direct Plating)

Elle consiste à ensemercer les grains d'arachides directement sur milieux d'isolement (DRBC) à raison de 5 grains par boîte après désinfection superficielle, en utilisant l'eau de javel à 2 % afin d'éviter la contamination éventuelle par le milieu extérieur, ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile trois fois de suite. Après, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.

b) Méthode indirecte de dilution

Dix (10) g de l'échantillon à analyser sont mis dans un erlenmeyer stérile de 250 ml contenant 90 ml d'eau additionnée à tween 80 à raison de 50 µl de tween par 5 ml d'eau. Après agitation de 10 min, des dilutions décimales sont réalisées à partir de la solution mère. Un volume de 100 µl estensemencé dans chaque boîte de pétri contenant le milieu DRBC. Ce milieu permet d'inhiber la croissance des champignons envahissant tel que les mucors et les *Rhizopus*, et de réduire la taille de mycélium de façon à mettre en évidence la plupart des champignons contaminant le produit analyse. L'incubation a lieu à 28°C pendant 5 à 7 jours.

II.2.5.2 Repiquage et purification des souches

Les moisissures retrouvées ont été repiquées et purifiées sur les boîtes de Pétri contenant PDA jusqu'à l'obtention des isolats purs conservée à 4°C pour une éventuelle utilisation.

II.2.5.2.1 Identification morphologique des isolats fongiques

a) Identification des genres

– Identification macroscopique

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait à l'œil nue, dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction des caractères morphologiques du mycélium (texture, couleur de thalle, couleurs du reverse...). Parmi les champignons en croissance, les moisissures de genre *Aspergillus* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques.

– Identification microscopique

Une aiguille lancéolée a été utilisée pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon a été prélevé sur la bordure de la colonie et déposé sur une lame avec une goutte de bleu de méthyle ou lactophénol une lamelle a été posée. L'observation microscopique se fait au grossissement ($\times 10$), ($\times 40$) et ($\times 100$) avec quelques gouttes d'huile à immersion (**Annexe III**).

b) Identification des espèces

Les espèces appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont identifiées par la Méthode de **Single spore (Pitt et Hocking, 2009)**, qui consiste à inoculer un tube à hémolyse remplie 2/3 de son volume d'agar et tween 80 (0,3 à 0,4%) et qui a pour but la dilution des spores pour l'ensemencement des milieux de culture. Après agitation du tube au vortex, des gouttes de cette suspension sont déposées sur les milieux : CYA, MEA et G25N selon la figure ci-dessous (**Figure 6**) et l'incubation se fait à différentes températures pendant 5 à 14 jours.

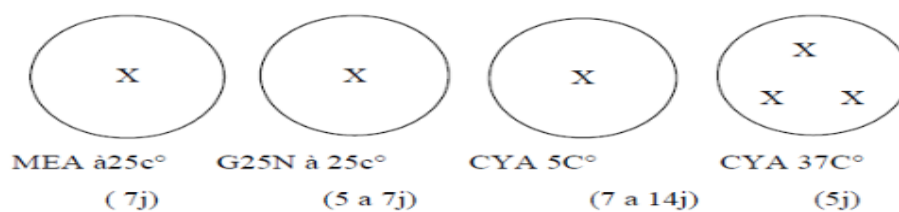


Figure 6: Méthode de Single spore (Galtier *et al.*, 2006).

Les diamètres des colonies et leurs couleurs sont rapportés après une et deux semaines de croissance. L'identification des espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* est réalisée d'après le livre de **Pitt et Hocking, (2009)**.

– Confirmation sur milieu AFPA

Ce milieu confirme l'appartenance au groupe *Aspergillus flavus, parasiticus*. Dans ce milieu, la couleur du revers de la colonie est jaune-orange après une incubation de 5 à 7 jours à 25 °C et cela veut dire que la souche est toxigène (**Pitt et Hocking, 2009**).

II.2.6. Détection d'isolats aflatoxigènes d'*A. flavus*

La méthode consiste à cultiver séparément les souches *A. flavus* (rondelles) dans 25 ml du milieu liquide SMKY dans des erlenmeyers de 100 ml, pendant une période d'incubation de 10 jours à 28 ± 2 °C. L'extrait a été filtré sur papier filtre Whatman N° 1. Le contenu de chaque erlenmeyer a été filtré et extrait avec 20 ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. Après agitation, puis une décantation, la phase chloroformique a été récupérée et évaporée à sec à la température de 50 °C dans un évaporateur rotatif. Le résidu a été solubilisé dans 1 ml de chloroforme (**Mishra et al., 2013**). Par la suite, la production d'aflatoxine a été confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM), où un volume de 50 µl d'échantillon est spoté sur plaque CCM, espacée de 2 cm. Le développement des chromatogrammes a été effectué dans une cuve standard (20 × 20 cm) préalablement saturée avec le système de solvant de développement Toluène/Alcool iso-amylque/Méthanol (90:32:2; v/v/v) . Après migration, les plaques ont été retirées et séchées. Les aflatoxines ont été détectées en plaçant les plaques sous lumière UV (365 nm). L'AFB₁ apparaît sous forme de tache bleue. L'intensité de la fluorescence des taches a permis de confirmer la présence d'aflatoxine.

II.2.7 Essais d'activité des extraits organiques

II.2.7.1 Matériel végétal

a) Collecte et identification

La plante (*Chamaerops humilis* L.) a été collectée dans la région de hammam Boughrara, Wilaya de Tlemcen (34° 53' 37" N, 1° 38' 22" E, Altitude 253 m) (Figure 7). La récolte a été effectuée au mois de Mars et avril 2021. L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au Département de botanique (Ecole Nationale d'Agronomie, d'Alger).



Figure 7: Carte géographique de la zone de prélèvement (Google maps, 2021).

b) Préparation des échantillons

Les parties utilisées dans cette étude de *C. humilis* L. sont les feuilles. Elles ont été préparées et mises à sécher à l'ombre pendant 2 semaines, elles ont été ensuite broyées dans un mixeur pour les transformer en poudre.

c) Préparation de l'extrait brut

L'extraction a été réalisée par macération en variant la polarité du solvant. Quatre systèmes ont été choisis séparément hexane, éthanol, chloroforme et méthanol. Les extraits sont préparés en ajoutant 10 ml du solvant d'extraction à 1 g de poudre végétale de *C. humilis* L. Après une agitation pendant 30 minutes, le mélange est gardé au repos pendant 24 heures à

4°C. Les extraits ont été filtrés en utilisant un papier filtre Wattman N°1 et les filtrats ont été évaporés à sec sous pression réduite à 45 ° C par un évaporateur rotatif. Les résidus secs ont été pesés pour déterminer les rendements.

II.2.7.2 Préparation de l'inoculum

Les spores des jeunes cultures (cultures de 7 jours) de la souche test (*A. flavus*) ont été récupérées par un lavage des boîtes de Pétri, avec un volume de 10 ml d'une solution stérile de Tween-80 à 0,1% (v/v). La suspension a été ensuite filtrée à travers un tissu mousseline stérile entreposé sur un entonnoir stérile et, le filtrat récupéré représente l'inoculum. À 1 ml de la suspension de spores préalablement agitée, 9 ml d'eau tweenée ont été ajoutés, la solution mère ainsi obtenue permet de préparer la gamme étalon. Le nombre de spores dans chaque dilution a été déterminé grâce à un comptage à l'aide de la cellule de Mallassez. La courbe d'étalonnage a été établie par la mesure de la densité optique (DO) de chaque dilution à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule (**Annexe IV**).

Avant chaque inoculation, le nombre de spores a été estimé par référence à la courbe d'étalonnage. La suspension a été diluée de manière à obtenir un nombre de spores de 1×10^6 /ml.

II.2.7.3 Activité antifongique *in vitro* des extraits

L'évaluation de l'activité des extraits sur la croissance mycélienne de la souche test a été réalisée en utilisant la technique de contact direct. La méthode utilisée pour tester la sensibilité de la souche fongique vis-à-vis des différents extraits est celle de **José Velázquez-Nuñez *et al.* (2013)**.

Les extraits ont été incorporée au milieu gélosé de manière à obtenir les concentrations suivantes : 0,5 ; 1,00 ; 1,50 ; 2,00 ; 2,50 ; 3,00, 3,50 ; 4,00 mg/ml de milieu PDA. Le milieu ainsi supplémenté a été coulé dans des boîtes de Pétri (9 × 1.5 cm) à raison de 10 ml par boîte. Après solidification, 10 µl de la suspension fongique (1×10^6 spores/ml) ont été déposés au centre du milieu de culture. Le témoin a été préparé sans extrait. L'ensemble a été incubé dans une étuve à la température de 28 ± 2 °C.

La croissance mycélienne a été suivie en mesurant le diamètre suivant deux droites perpendiculaires au centre. Les mesures ont été faites quotidiennement pendant 7 jours. La

comparaison des dimensions obtenues avec celles des témoins a permis de calculer le pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante (Shukla *et al.*, 2012):

$$I\% = (D_{\text{témoin}} - D_{\text{essai}} / D_{\text{témoin}}) \times 100$$

Dont : **D_{essai}**: le diamètre de la zone de la croissance de l'essai en cm;
D_{témoin}: le diamètre de la zone de la croissance du témoin.

II.2.7.3.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF) de chaque extrait a été déterminée suivant la méthode de dilution en milieu liquide rapportée par Prakash *et al.* (2012) (Annexe IV). Dix (10) µl de la suspension fongique (1×10^6 spores/ml) à tester ont été inoculés dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu liquide SMKY à différentes concentrations de l'extrait (0,5 ; 1,00 ; 1,50 ; 2,00 ; 2,50 ; 3,00, 3,50 ; 4,00 mg/ml). Des tubes témoins contenant le milieu de SMKY, ont été inoculés seulement avec la suspension fongique. L'ensemble a été homogénéisé et incubé à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. Après incubation, l'observation de la gamme a permis d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance du microorganisme (Tian *et al.*, 2011 ; Prakash *et al.*, 2012).

Les tubes qui ont montré une inhibition totale ont été réensemencés dans des boîtes qui contiennent 10 ml du milieu de culture PDA. Lorsqu'il y a une reprise de la croissance mycélienne, la concentration est dite fongistatique (CMFs) (Bajpai *et al.*, 2010). En revanche, s'il n'y en a plus, elle est appelée fongicide (CMFc) (Shukla *et al.*, 2012).

II.2.7.3.2 Test d'inhibition de la production des aflatoxines B₁

La quantité des AFB₁ produite en milieu SMKY par la souche toxigène a été mesurée par la méthode chromatographique sur couche mince, sur gel de silice et dosage du pouvoir absorbant à la longueur d'onde de 360 nm, suivant la méthode rapportée par Mishra *et al.* (2013) (Annexe IV).

a) Activité anti-aflatoxinogène

Des erlenmeyers de 100 ml contenant chacun 25 ml de milieu liquide SMKY, additionné de différentes concentrations de l'extrait (0,5 ; 1,00 ; 1,50 ; 2,00 ; 2,50 ; 3,00, 3,50 ; 4,00 mg/ml), ont été ensemencés chacun avec 50 µl de suspension fongique (1×10^6 spores/ml). Le milieu SMKY sans extrait a été utilisé comme contrôle négatif. Les cultures ont été incubées à 28 ± 2 °C dans un shaker pendant 10 jours. Après incubation, les mycéliums produits dans les cultures liquides ont été retirés par filtration et lavage sur un papier filtre Whatman N°1. Le poids du mycélium (mg) a été déterminé après étuvage à 60 °C pendant 6 h puis à 40 °C pendant la nuit en utilisant la formule d'**Imtiaj et Lee (2007)** :

$$P = P_1 - P_0$$

Dont : **P₀**: poids du papier filtre en mg;

P₁: papier filtre et le matériel fongique après étuvage en mg.

L'AFB₁ a été extraite deux fois à partir du filtrat avec 25 ml dans une ampoule à décanter. Après agitation, le mélange a été laissé reposer pendant toute la nuit. La phase chloroformique a été récupérée et évaporée à sec à la température de 50 °C dans un évaporateur rotatif. Le résidu a été solubilisé dans 1 ml de chloroforme.

À l'aide d'une microseringue, des aliquotes de 50 µl de l'extrait aflatoxine ont été déposés sur la plaque CCM sous forme de spots par petites fractions. Le standard d'AFB₁ a été spoté au même temps que les échantillons. Les plaques ont été ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système solvant d'élution Toluène/Alcool iso-amylque/Méthanol (90:32:2; v/v/v).

Après développement, les plaques ont été séchées sous hotte aérée toute la nuit, afin d'éliminer toute trace du solvant. Les chromatogrammes ont été ensuite observés sous lumière ultra-violette (UV) pour localiser les taches présentant une absorbance à 365 nm. Les taches fluorescentes ont été grattées, dissous dans 5 ml de méthanol ; la solution obtenue a été centrifugée à 3000 g pendant 5 min. L'absorbance du surnageant a été effectuée dans un spectrophotomètre UV-Visible à 360 nm. La concentration de l'AFB₁ a été calculée par la formule selon **Singh et al. (2008)** :

$$[\text{AFB}_1] \text{ en } \mu\text{g/ml} = [(\text{D} \times \text{M})/(\text{E} \times \text{L})] \times 1000$$

Dont: **D**: absorbance;
M: poids moléculaire de l'aflatoxine (312 g/mol);
E: coefficient d'extinction molaire (21, 800 l/mole/ cm);
L: longueur du trajet optique (cellule de 1 cm)

En outre, l'inhibition de l'AFB₁ a été calculée comme suite (Tian *et al.*, 2012):

$$\text{I}\% = (1 - \text{X}/\text{Y}) \times 100$$

Où: **X (μg/ml)**: concentration de l'AFB₁ avec le traitement;
Y (μg/ml) : concentration moyenne de l'AFB₁ sans témoin.

II.2.7.4 Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par Dewanto *et al.* (2002). 125 μl de chaque extrait dissous dans 500 μl d'eau distillée et 125 μl de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 3 minutes. Après l'incubation 1,25 mL de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de chaque mélange a été mesurée par un spectrophotomètre à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (25-200 μg/ml) et exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par mg d'extrait (Annexe V).

II.2.7.5 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

II.2.7.5.1 Evaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH

Le protocole suivi est celui décrit par Dung *et al.* (2008) et Nikhat *et al.* (2009). Dans des tubes à essai secs, une quantité de 2,9 ml de chaque dilution d'extrait (6,25 μg/ml ; 12,50 μg/ml ; 25 μg/ml ; 50 μg/ml ; 100 μg/ml ; 200 μg/ml) a été mélangée avec 100 μl de la solution méthanolique au DPPH° de 0,004% (p/v). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Dans le contrôle négatif, les différentes dilutions d'extrait ont été remplacées par 100µl de méthanol et dans le contrôle positif par des dilutions du Butyl-hydroxytoluène (BHT) (6,25 µg/ml ; 12,50 µg/ml ; 25 µg/ml ; 50 µg/ml ; 100 µg/ml ; 200 µg/ml).

Les résultats ont été exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres (DPPH°) en pourcentages (I %) a été calculée par la formule suivante (**Shukla et al., 2012**) :

$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Où:

A_{blanc}: absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'extrait;

A_{échantillon}: absorption de l'échantillon contenant une dose d'extrait testé.

La valeur de la concentration inhibitrice IC₅₀ représente la dose de l'extrait qui cause la neutralisation de 50% des radicaux de DPPH. L'IC₅₀, utilisée comme une estimation de l'activité antioxydant, a été estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations (**Tian et al., 2012**).

II.2.7.5.2 Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode β-carotène/acide linoléique

La méthode utilisée est celle décrite par **Miraliakbari and Shahidi (2008)**. Une solution stock de mélange émulsion β-carotène/acide linoléique a été préparée comme suit : 0,5 mg de cristaux de β-carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme et 1 ml de cette solution a été transféré dans un ballon contenant 25 µl d'acide linoléique et 200 µl de Tween-40. Après l'élimination complète de chloroforme par évaporation, 100 ml d'eau distillée enrichie en oxygène a été ajoutée sous agitation vigoureuse. Des aliquotes de 2,5 ml de ce mélange ont été transférés dans une série de tubes à essai contenant 350 µl d'extrait dilué dans le Diméthyl sulfoxyde (DMSO). Après une agitation vigoureuse, les tubes ont été incubés à 50 °C pendant 2 h. Un tube témoin négatif a été construit en remplaçant l'extrait par DMSO. L'absorbance a été finalement mesurée à 470 nm contre un blanc (émulsion sans β-carotène).

Les activités antioxydantes (I %) ont été calculés en utilisant la formule suivante (**Shukla et al., 2012**) :

$$I\% = (A_t/A_0) \times 100$$

Où : A_0 : absorbance respective de l'échantillon et du contrôle à $t = 0$ min ;

A_t : absorbance respective de l'échantillon et du contrôle à $t = 2$ h.

II.2.8 Analyse statistique

Chaque expérience a été répétée trois fois, les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart type. Les résultats ont été analysés par le test ANOVA avec le logiciel STATISTICA version 6.1 (Stat Soft, Inc, France). Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

III.1 Analyse physico-chimique

La teneur en eau de l'échantillon d'arachide avec enveloppe était de l'ordre de 36,5% alors que celle de l'échantillon sans enveloppe était de l'ordre de 41,17 %. Pour les deux échantillons, le pH a été de l'ordre 6,13 et 6,26, respectivement.

La contamination par les moisissures dépend de diverses conditions telles que la source, la période de récolte, les pratiques de stockage et la nature chimique du substrat (**Prakash et al., 2010**). La teneur en eau et, dans une moindre mesure, le pH sont deux autres facteurs abiotiques importants qui gouvernent la croissance et la prolifération des moisissures dans les denrées alimentaires stockées (**Ozkan et al., 2003**). Dans la présente étude, la teneur en eau et le pH des arachides ont été trouvés dans un intervalle propice à la prolifération fongique (**FAO, 1980**).

III.2 Distribution et Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*

Les moisissures isolées ont été du genre *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., et *Alternaria* sp. (**Figure 8**).

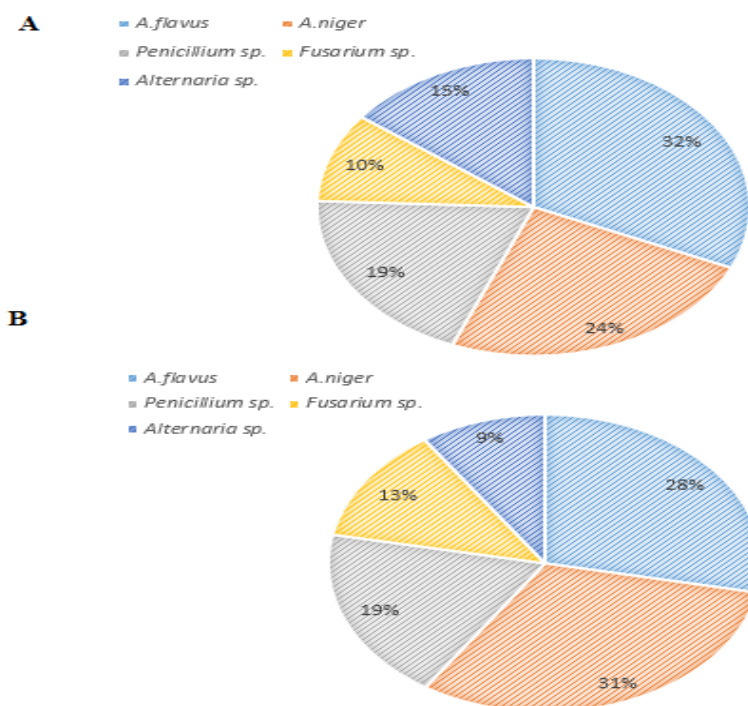


Figure 8: Répartition du mycobiote sur l'arachide. **A:** échantillon avec enveloppe ; **B:** échantillon sans enveloppe

Les résultats obtenus ont montré une dominance relative du genre *Aspergillus* surtout dans les deux échantillons prélevés dans la région d'El-Oued. *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (Tian *et al.*, 2012). Les données bibliographiques actuelles indiquent que les *Aspergillus* spp. sont très répandus dans la nature (Prakash *et al.*, 2012, Kedia *et al.*, 2014) et tout particulièrement dans les régions à climat chaud comme l'Algérie (Mantle, 2002; Hocking et Pitt, 2009). Ainsi, la plupart des enquêtes menées dans ces régions ont mis en évidence la prédominance des espèces fongiques du genre *Aspergillus* dans les fruits à coque. Nos résultats étaient en accord avec ceux rapportés sur les arachides et d'autres fruits à coque (Benmansour-Brixi, 2005 ; Passone *et al.*, 2012 ; Mishra *et al.*, 2013).

Les espèces ont été identifiées selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et de la texture de la colonie, ainsi que les structures morphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres. Les espèces identifiées ont été *A. flavus*, *A. niger*, *P. verrucosum*, *Fusarium* sp, et *Alternaria* sp. et les résultats obtenus sont regroupés dans le (tableau VI).

Tableau V: Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*

Espèce	Milieux de culture		Couleurs de colonies		Diamètres des colonies (mm)
			Surface	Reverse	
<i>A. flavus</i>	MEA	25 °C	Vert serpentine	Incolore	60
	G25N	25 °C	Jaune	Pale à orange	50
	CYA	37 °C	Jaune à vert olive	Crème chamois	54
		5 °C	/	/	Pas de croissance
AFAP	25 °C	Blanc	Orange	38	
<i>A. niger</i>	MEA	25 °C	Brunâtre olive	Crème	55
	G25N	25 °C	Noir, jaune claire	Pale	40
	CYA	37 °C	Sombres momies brun à brunâtres proximité	Jaune	45
	CYA	5 °C	/	/	Pas de croissance
<i>p. verrucosum</i>	MEA	25 °C	Bleu à verdâtre	Jaune	25
	G25N	25 °C	Vert	Jaune	27
	CYA	37 °C	Vert	Jaune	36
		5 °C	Vert	Jaune	Pas de croissance

III.3 Étude du pouvoir producteur d'aflatoxine B₁ par des souches d'*A. flavus*

Des souches d'*A. flavus* ont été étudiées pour leur potentiel à produire l'AFB₁. Le criblage était basé sur la fluorescence sous UV à 365 nm sur milieu CAM et CCM. La souche *A. flavus* BBH (6) ($774,74 \pm 2,18 \mu\text{g /ml}$), d'arachides à enveloppe s'est avérée la plus aflatoxogène (**Figure 9 et Tableau VII**).

La mise en évidence du pouvoir producteur d'aflatoxine par détection de la fluorescence sur milieu de culture à base d'extrait de noix de coco, a permis de montrer que cette technique, qui présente l'avantage d'être moins coûteuse, est aussi performante que la détection par CCM. Ainsi, on peut préconiser l'utilisation du milieu à l'extrait de noix de coco comme méthode rapide de détection des isolats producteurs d'AFB₁. Cependant, la CCM et la méthode spectrophotométrique, peuvent être utilisées pour la quantification et la confirmation des résultats obtenus sur milieu à base de noix de coco.

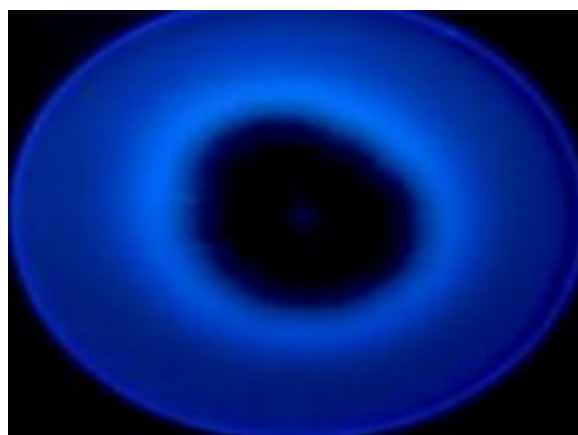


Figure 9: Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V (365nm) de la production d'AFB₁ par *A. flavus* sur milieu CAM.



Figure 10: Taches bleues d'AFB₁ produites par *A. flavus* sur milieu SMKY.

Tableau VI: Potentiel de production d'AFB₁ de différents isolats d'*A. flavus* en milieu SMKY.

Isolats fongiques	AFB ₁ (µg /ml)
<i>A. flavus</i> BBH (1)	262,38 ± 5,02
<i>A. flavus</i> BBH (2)	104,47 ± 4,29
<i>A. flavus</i> BBH (6)	774,74 ± 2,18

III .4 Rendement des extraits

Quatre différents extraits ont été obtenus, l'extrait d'hexane (EHx), l'extrait du chloroforme (ECh), l'extrait d'éthanol (EEth), l'extrait de chloroforme (ECh), l'extrait de méthanol (EMth). Le rendement de chaque extrait est représenté dans le **tableau VIII** ci-dessous.

Tableau VII: Rendement des divers extraites de feuilles *C. humilis*

Extrait	Rendement (%)
EHx	1,76 ± 0,68
EEth	5,00 ± 1,00
ECh	3,00 ± 0,50
EMth	3,50 ± 0,72

Les résultats obtenus ont montré que parmi les différentes extraits, l'EEth a représenté le rendement le plus élevé (5,00 %), suivi par l'EMth (3,50 %), l'ECh (3,00 %), puis l'EHx (1,76 %).

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des feuilles ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

En plus de ces aspects quantitatifs, quelque soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à

température ambiante permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

III.5 Activité antifongique

Des différences d'efficacité ont été notées entre les différents extraits de *C. humilis* L. sur la croissance de l'espèce fongique, *A. flavus* BBH (6), potentiellement toxigène. L'action sur la croissance, a montré une sensibilité significative de la souche à tous les extraits par rapport au témoin ($p < 0,05$) (Annexe IV).

Les effets inhibiteurs d'extraits bruts de *C. humilis* L. sur la croissance d'*A. flavus* BBH (6) pendant 7 jours d'incubation sont illustrés à la figure 11,12,13, et 14. La croissance mycélienne a été significativement réduite ($p < 0,05$) de manière proportionnelle.

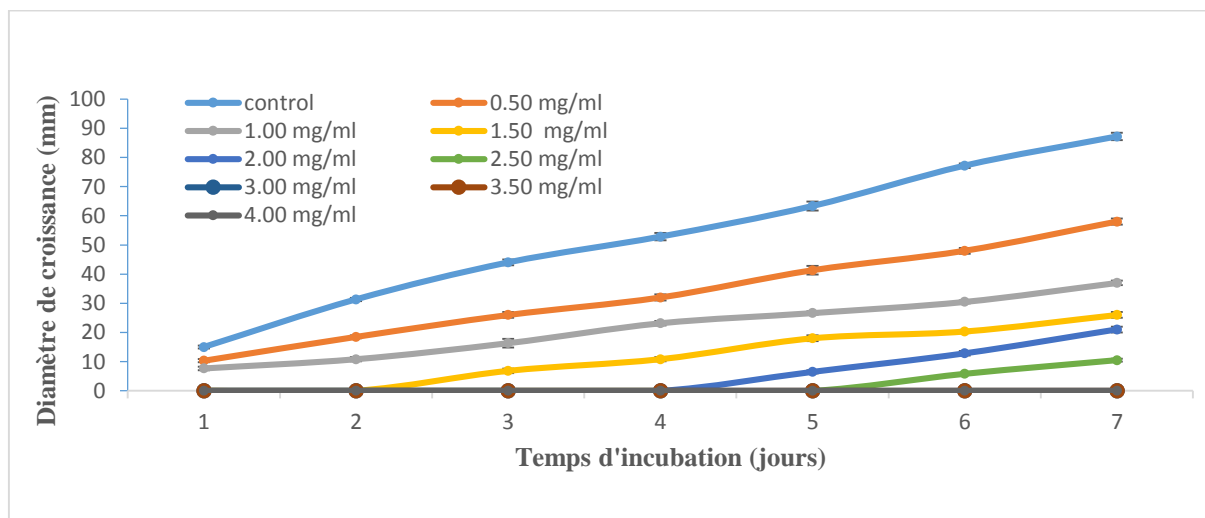


Figure 11: Effet de l'EHx aux différentes concentration sur la croissance de l'*A. flavus* BBH (6) pendant 7 jours d'incubation

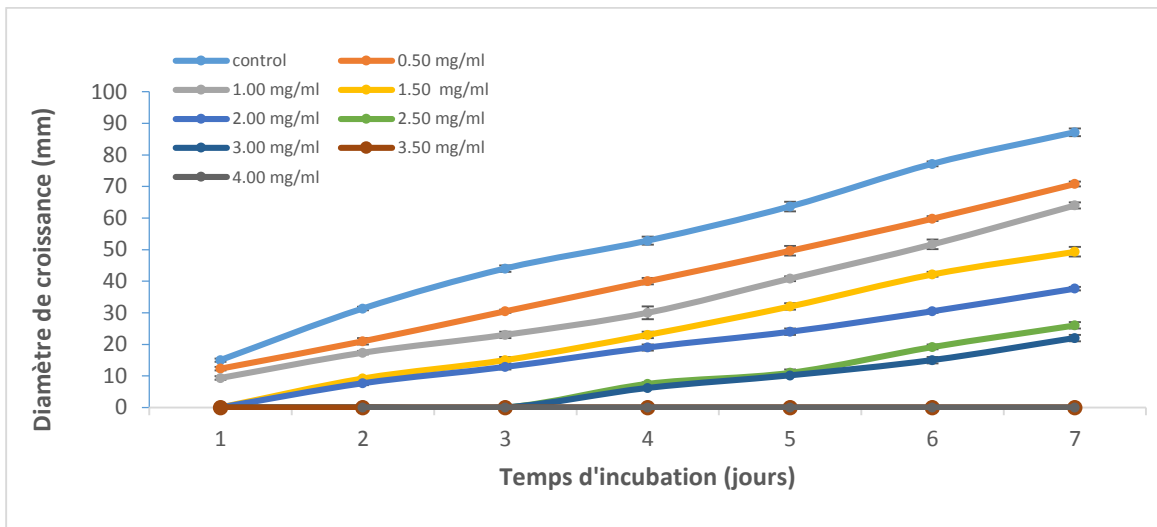


Figure 12: Effet de l'EEth aux différentes concentration sur la croissance de l'*A. flavus* BBH (6) pendant 7 jours d'incubation.

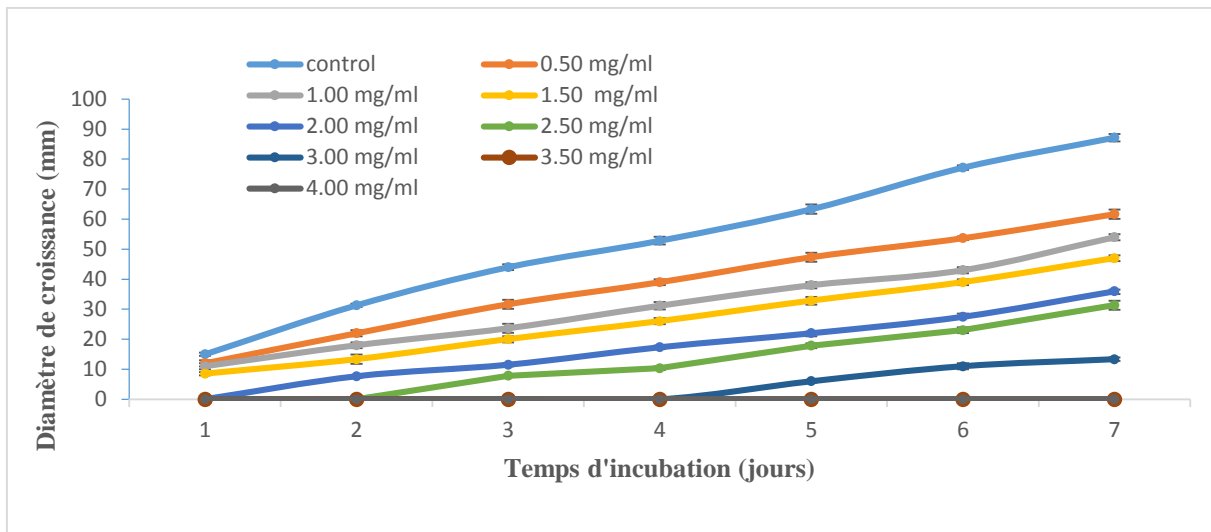


Figure 13: Effet de l'ECh aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* BBH (6) pendant 7 jours d'incubation.

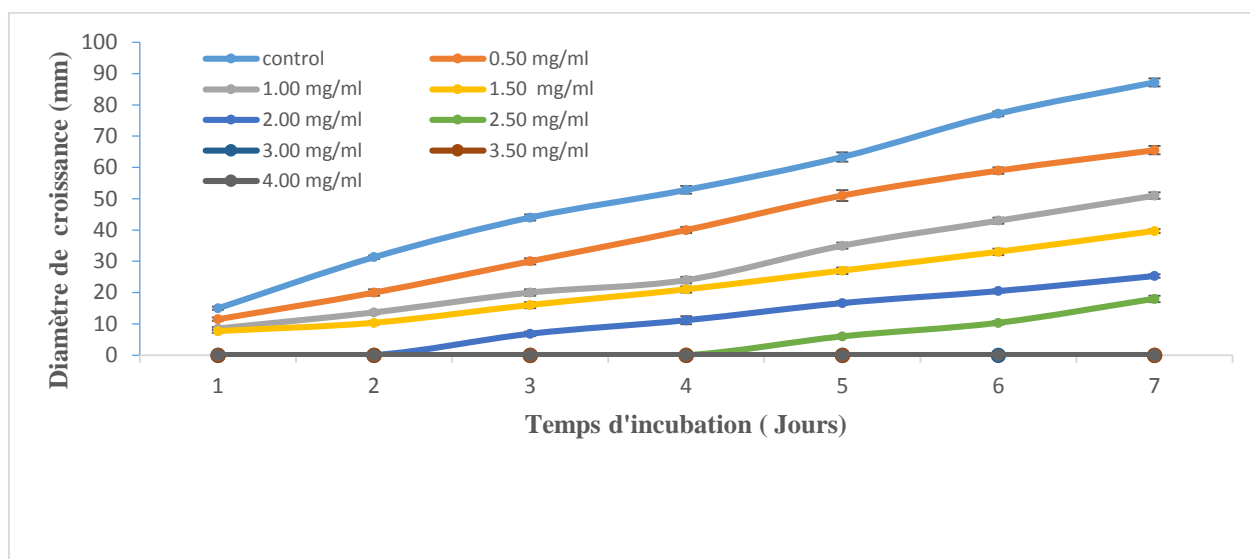


Figure 14: Effet de l'EMth aux différents concentrations sur la croissance de l'*A.flavus* BBH (6) pendant 7 jours d'incubation.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance des mycéliums a été déterminé le 7^{ème} jour comme présenté dans la **figure 15**. Les résultats ont révélé que les EHx, EEth, ECh, et EMth ont montré un pourcentage d'inhibition de 87,94 %, 74,75 %, 78,82 % et 78,95 % à une concentration de 2,50, 3,50, 3,50 et 2,50 mg/ml, respectivement, par rapport au témoin ($p < 0,05$).

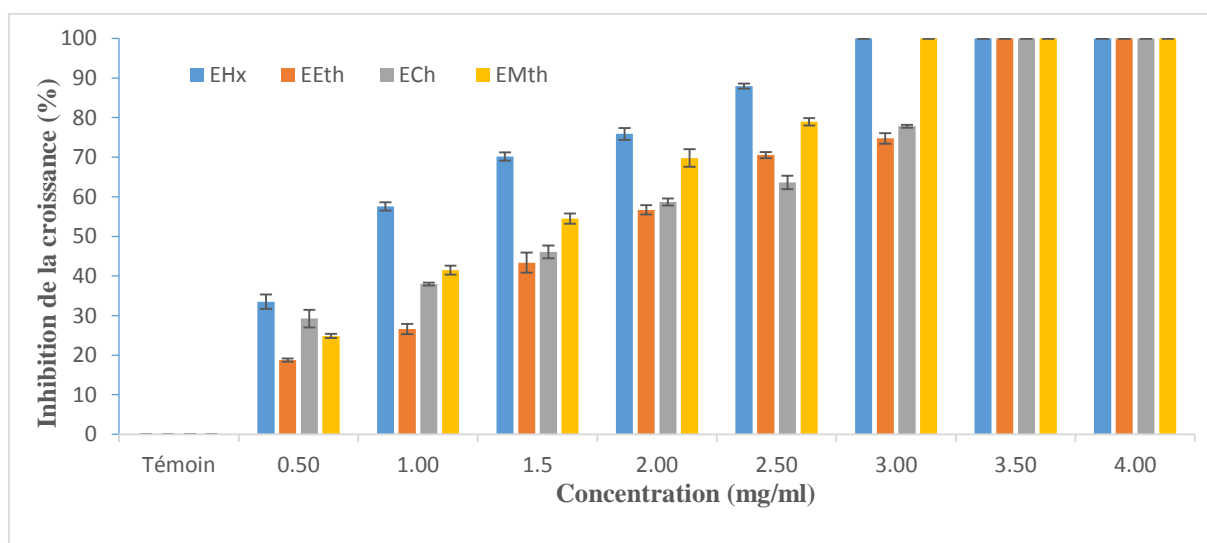


Figure 15: Les pourcentages d'incubation de la croissance du mycélium de l'*A .flavus* BBH (6) après 7 jours d'incubation.

Les CMI et CMF des extraits étudiés contre la souche toxigène *A. flavus* BBH (6) sont résumées dans le **tableau IX**. Il n'y a pas de critères validés pour les points extrêmes de CMI. Néanmoins, selon **Aligiannis et al. (2001)**, l'activité antimicrobienne est considérée comme plus forte lorsque les valeurs de CMI sont comprises entre 0,05 mg/ml et 0,50 mg/ml, modérée lorsqu'elles sont comprises entre 0,6 mg/ml et 1,5 mg/ml et faible lorsqu'elles sont supérieures à 1,50 mg/ml. Tous les extraits bruts ont été testés jusqu'à une concentration maximale de 4,00 mg/ml. Les CMI les plus faibles contre *A. flavus* BBH (6) ont été obtenues avec EHx (3,00 mg/ml) et EMth (3,00 mg/ml), suivis par EEth (3,50 mg/ml) et de ECh (3,50 mg/ml).

Les CMF se sont avérés être EMth (3,50 mg/ml), EHx (3,66 mg/ml), ECh (3,83 mg/ml), suivis par EEth (> 4,00 mg/ml) (**Annexe IV**).

Les CMI et CMF des extraits bruts ont été déterminées contre *A. flavus* BBH (6) par la méthode de dilution en milieu liquide SMKY. La méthode offre de meilleures conditions pour que les extraits soient en contact étroit avec les spores fongiques et se propagent dans le milieu (**Kalemba et Kunicka, 2003**). L'étude de CMI est importante pour déterminer la concentration minimale pour contrôler la croissance fongique (**Prakash et al., 2012**). Les quatre extraits étaient de nature fongicide car les CMF contre *A. flavus* BBH (6) étaient supérieurs aux CMI.

Les résultats ont indiqué que la croissance d'*A. flavus* BBH (6) a été affectée par tous les extraits. L'effet inhibiteur dépend d'une ou de plusieurs substances de chaque extrait. Ces substances pourraient contribuer simultanément ou différemment, suivant des voies similaires ou différentes, agir ensemble ou indépendamment sur une ou plusieurs cibles, conduisant à une activité antifongique efficace. Plusieurs chercheurs attribuent cette fonction à des composés phénoliques qui peuvent interférer avec les membranes en provoquant un dysfonctionnement ou une destruction cellulaire. C'est un mécanisme par lequel la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée (**Rasooli et Owlia, 2005 ; Vilela et al., 2008 ; Vilela et al., 2009 ; Tian et al., 2011; Coutinho de Oliveira et al., 2011; El-Mogy et Alsanius, 2012; Garcia et al., 2012**).

Tableau VIII: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des extraites.

Extrait	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)
EHx	3,00 ± 0,00	3,66 ± 0,28
EEth	3,50 ± 0,00	>4,00
ECh	3,50 ± 0,00	3,83 ± 0,28
EMth	3,00 ± 0,00	3,50 ± 0,50

III.5 Activité anti-aflatoxine B1

Les résultats enregistrés expliquent clairement la relation proportionnelle entre la biomasse mycélienne et l'AFB₁ (dose-dépendance). A chaque fois que la dose de l'extrait dans le milieu de culture SMKY était supérieure, la réduction de biomasse mycélienne a été accompagnée par une baisse dans la production de l'AFB₁ (**Tableau X**).

Tableau IX: Effet des extraits sur la biomasse et la production de l'AFB₁

Extrait	Concentration (mg/ml)	Biomasse (mg)	Teneur en AFB ₁ (µg/ml)
EHx	0,50	625,66 ± 4,04	437,94 ± 5,15
	1,00	430 ± 3,00	244,73 ± 5,15
	1,50	280,66 ± 6,02	147,40 ± 4,29
	2,00	205,33 ± 2,51	39,59 ± 2,97
	2,50	106,66 ± 3,78	0,00 ± 0,00
	3,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	3,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	4,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	EEth	0,50	772 ± 2,00
1,00		673,33 ± 2,08	462,75 ± 5,78
1,50		542 ± 2,00	345,86 ± 3,60
2,00		432,33 ± 2,51	167,44 ± 3,78
2,50		284,66 ± 1,51	109,24 ± 5,02
3,00		151 ± 2,64	0,00 ± 0,00
3,50		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
4,00		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ECh		0,50	621,33 ± 3,51
	1,00	542 ± 2,64	345,86 ± 5,02
	1,50	495 ± 2,00	211,81 ± 2,86
	2,00	394,66 ± 4,72	133,09 ± 5,16
	2,50	292,66 ± 2,51	0,00 ± 0,00
	3,00	132,66 ± 2,51	0,00 ± 0,00
	3,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	4,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	EMth	0,50	693,33 ± 2,08
1,00		463,66 ± 1,52	265,24 ± 7,05
1,50		373 ± 3,00	178,89 ± 2,86
2,00		236,33 ± 6,02	103,04 ± 5,15
2,50		157 ± 2,00	0,00 ± 0,00
3,00		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3,50		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
4,00		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Témoin		0	891,66 ± 2,08

La biomasse mycélienne a été significativement ($p < 0,05$) réduite par rapport au témoin ($891,66 \pm 2,08$ mg). Les résultats ont révélé que la biomasse mycélienne sous l'influence d'EHx et d'EEth a été significativement réduite à 0,50 mg/ml à 2,50 mg/ml ($625,66 \pm 4,04$ à $106,66 \pm 3,78$ mg) et 0,50 mg/ml et 3,00 mg/ml ($772,00 \pm 2,00$ et $151,00 \pm 2,64$ mg). Une réduction complète a été observée à 3,50 mg/ml et 3,00 mg/ml, respectivement. Les mêmes résultats ont été obtenus pour ECh et EMth, la biomasse mycélienne a été réduite à des concentrations allant de 0,50 mg/ml à 3,00 mg/ml ($621,33 \pm 3,51$ - $132,66 \pm 2,51$ mg) et de 0,50 mg/ml à 2,50 mg/ml ($693,33 \pm 2,08$ - $157,00 \pm 2,00$ mg),

respectivement, alors qu'une réduction complète a été observée à 0,50 mg/ml et 3,00 mg/ml, respectivement.

Le pourcentage de diminution de la biomasse fongique variait de 29,83 % à 88,03 % (EHx), 13,41 % à 83,06 % (EEth), 30,31 % à 85,12 % (ECh) et 22, 24 % à 82,39 % (EMth).

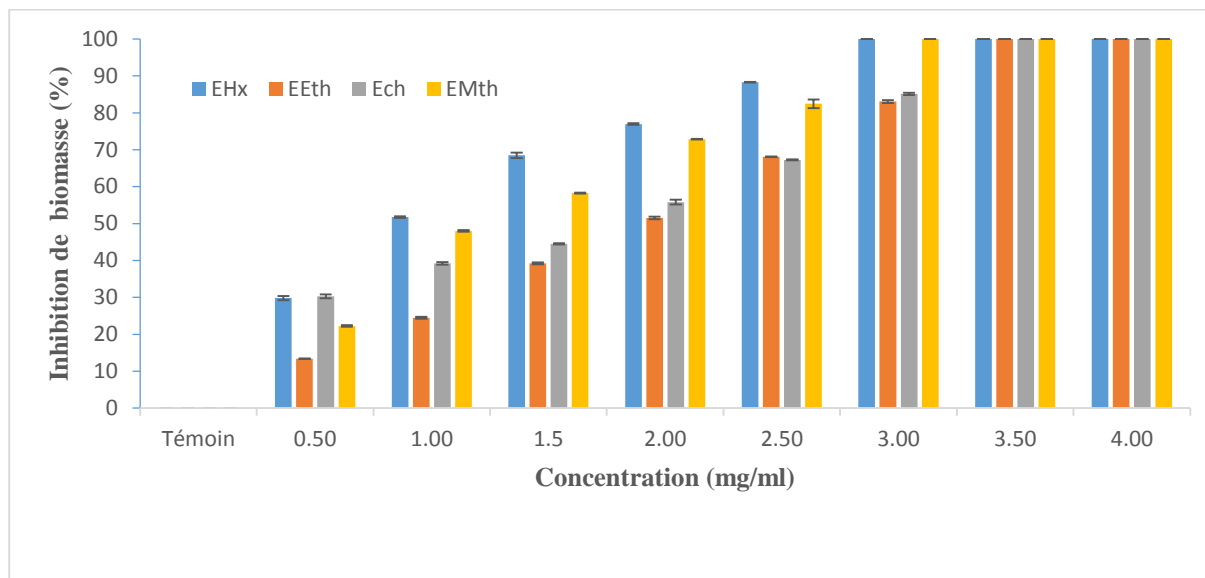


Figure 16: Effet des extraits sur la biomasse mycélienne.

Tous les extraits ont présenté une inhibition de l'AFB₁. L'EHx aux concentrations de 0,50 et 2,00 mg/ml a provoqué une inhibition significative ($p < 0,05$) de la production d'AFB₁ ($437,94 \pm 5,15$ - $39,59 \pm 2,97$ g/ml). Cependant, une inhibition complète a été enregistrée à une concentration de 2,50 mg/ml. Pour l'EEth, une concentration comprise entre 0,50 et 2,50 mg/ml a provoqué une inhibition significative de la production d'AFB₁ ($576,29 \pm 3,60$ - $109,24 \pm 5,02$ µg/ml), dont l'inhibition complète de la production a été obtenue à une concentration de 3,00 mg/ml. D'autre part, l'ECh a inhibé significativement ($p < 0,05$) la production d'AFB₁ à des concentrations comprises entre 0,50 et 2,50 mg/ml ($438,41 \pm 3,59$ - $133,09 \pm 5,16$ µg/ml). L'EMth a provoqué une inhibition de la production d'AFB₁ de 0,50 à 2,00 mg/ml ($435,55 \pm 4,37$ - $103,04 \pm 5,15$ g/ml) ($p < 0,05$). L'ECh a complètement inhibé AFB₁ à 3,00 mg/ml, tandis qu'une inhibition complète d'AFB₁ par l'EMth a été enregistrée à 2,50 mg/ml.

L'efficacité inhibitrice d'AFB₁ était comprise entre 43,47 % -94,88 % (EHx), 25,61 % -85,82 % (EEth), 43,41 % -82,82 % (ECh) et 43,78 % -86,75 % (EMth).

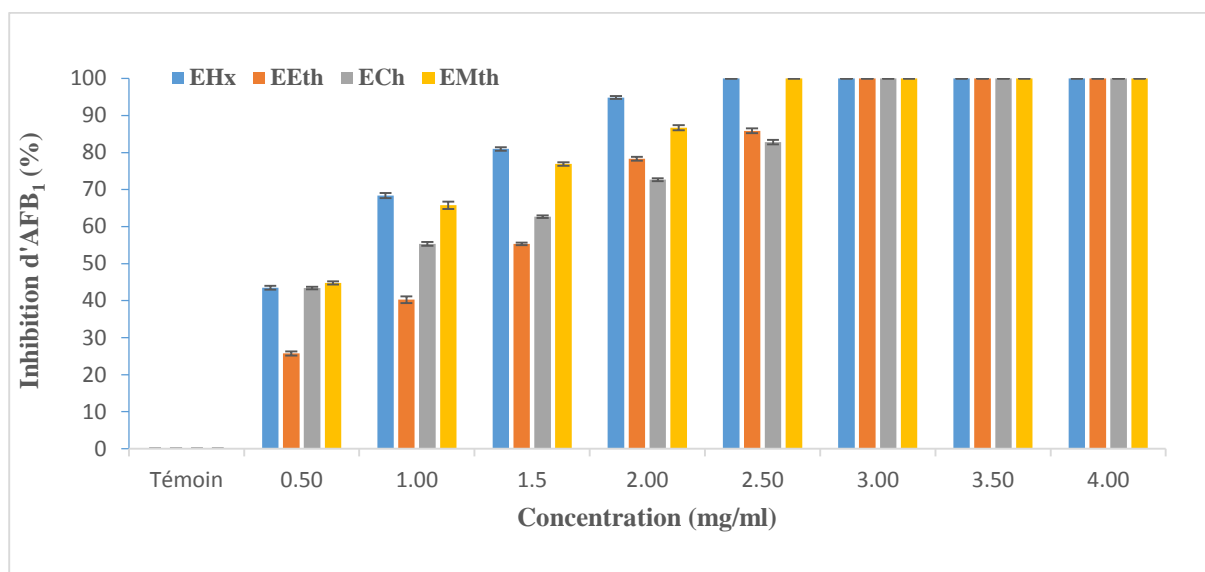


Figure 17: Effet des extraits sur la production d'AFB₁.

Ces résultats indiquent que les extraits de *C. humilis* L. sont une alternative prometteuse pour inhiber la production d'AFB₁. Divers extraits de plantes ont montré une inhibition de la production d'AFB₁. **Velazhahan et al. (2010)** ont rapporté que les graines aqueuses extraites par Ajowan ont présenté une activité anti-AFB₁ (61%). Des extraits de plantes de *Garcinia cowa* et *Garcinia pendunculata* à une concentration de 2000-4000 ppb ont complètement inhibé la production d'AFB₁ (100%) (**Joseph et al., 2005**). Des extraits à l'éthanol et à l'éthanol à 70 % de *Thymus daenensis*, *Satureja khozistanica* et *Satureja macrosiphonia* à 2000 mg/l ont inhibé la production d'AFB₁ (51-87 %) (**Gorran et al., 2013**). L'inhibition d'AFB₁ par les différentes concentrations (5, 7,5, 10 et 12,5 g/100 ml) de *H. sabdariffa* a été variée entre 91,5 et 97,9 % (**El-Nagerabi et al., 2012**).

La recherche de composés naturels d'origine végétale, capables d'inhiber la croissance des moisissures et la production d'aflatoxines est considérée comme un domaine de recherche très attractif dans la prévention de la contamination des cultures et des aliments par les aflatoxines (**Krishnamrthy et Shashikala, 2006 ; Sandoss Kumar et al., 2007 ; El-Nagerabi et al., 2012 ; Kohiyama et al., 2015**).

III.7 Le contenu phénolique total

Les phénols sont capables de donner des atomes H de groupes phénol hydroxyle en réaction avec des radicaux peroxydes qui peuvent produire des radicaux phénoxydes stabilisés, terminant ainsi les réactions en chaîne de peroxydation des lipides. L'activité antioxydante

des phénols dépend des effets électroniques et stériques du cycle, des substituants et de la force des interactions de liaison hydrogène entre le phénol et le solvant (**Lucarini *et al.*, 2002**).

La teneur en phénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en phénols, des plantes médicinales et les nourritures. Les teneurs obtenues ont été exprimées en microgramme, équivalent acide gallique par milligramme de matière végétale sèche (μg GAE/mg), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

La teneur en phénols totaux (TPC) des extraits est donnée dans le tableau XI. La teneur la plus élevée a été observée dans l'EHx (189,46 $\mu\text{g}/\text{mg}$), suivi par l'EMth (145,93 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et l'ECh (140,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$). L'EEth a montré un niveau de 119,46 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

La détermination de la teneur en phénols totaux donne une idée du potentiel antioxydant des extraits végétaux, mais elle ne peut pas être utilisée pour prédire le comportement antioxydant. En effet, il s'agit d'une méthode générale qui ne donne pas d'information concernant la nature des molécules phénoliques qui se trouvent dans les extraits végétaux. Par conséquent, nous ne pourrions pas établir une relation entre la quantité des phénols et l'effet antioxydant (**Martha, 2008**).

III .8 Activité antioxydant

Les antioxydants sont connus comme des molécules capables d'inhiber le processus d'oxydation. L'utilisation de certains antioxydants synthétiques cause des dommages hépatiques et de toxicité. En conséquence, les antioxydants naturels ont attiré plus d'attention de nos jours car ils ont une toxicité potentielle minimale et posent un risque minime.

III.8.1 Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits évalués par le test DPPH est exprimée en IC_{50} . L' IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé ou d'un extrait, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante est grande.

L'EHx et l'EMth ont été les plus actifs avec une IC_{50} de 47,80 mg/ml et 86,78 mg/ml, respectivement. L'ECh et l'EEth ont été les moins actifs avec une IC_{50} respective de 102,92

mg/ml et 115,71 mg/ml par rapport au témoin positif de BHT (28,48 mg/ml) ($p < 0,05$) (**Tableau X**).

Plusieurs études ont montré que les activités biologiques des extraits de plantes sont liées à leurs composés chimiques qui peuvent interagir directement, de manière synergique ou antagoniste.

Les résultats obtenus lors de la présente étude confirme l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire. Les mêmes résultats ont été mis en évidence dans un grand nombre des travaux similaires (**Dorman *et al.*, 2004 ; Markis *et al.*, 2007 ; Angelov *et al.*, 2008 ; Bozan *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Prakash *et al.*, 2012**). Selon **Sreenivasulu *et al.* (2000)**, les composés phénoliques sont connus pour leurs activités antioxydants et participent ainsi à la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Diverses études ont déterminé la capacité des extraits naturels à piéger les radicaux libres grâce à des expériences. Cette activité dépend de nombreux paramètres : la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule (**Uchida *et al.*, 1987 ; Kitagawa *et al.*, 1992**). Le DPPH est un radical libre stable, qui accepte des électrons ou des protons pour produire des molécules diamagnétiques stables. Il est largement utilisé pour dépister l'activité d'élimination des radicaux libres.

III.8.2 Test du blanchissement du β -carotène

En tant que test complémentaire, le test de blanchissement du β -carotène (également lié à l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique) a été utilisé. Ce test démontre des caractéristiques antioxydantes des produits naturels différentes de celles mises en lumière par le test DPPH. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique sont regroupés dans le **tableau X**

L'oxydation de l'acide linoléique a été inhibée par les extraits (53,54%-69,33 %) par rapport au témoin positif de BHT (92,00 %) ($p < 0,05$).

Le mécanisme de blanchiment du β -carotène est un phénomène médié par les radicaux libres. Le β -carotène changera rapidement de couleur en l'absence d'antioxydants, entraînant une diminution de l'absorbance de la solution d'essai avec le temps de réaction (**Khadri *et al.*, 2008**) ; cela est dû à la production d'acide linoléique pendant l'incubation à 50 ° C d'hydrogène peroxyde (**Kubola et Siviamornpun, 2008**). Ils attaquent les liaisons

insaturées du β -carotène, de sorte que la couleur caractéristique de ce dernier disparaît (Khadri *et al.*, 2008).

Tableau X: Activité antioxydante et contenu phénolique total.

extrait	IC ₅₀ (µg/ml)	β - carotène/acidelinoléique (%)	contenu phénolique total (µg /mg)
EHx	47,80 ± 1,72	69,33 ± 6,09	189,46 ± 7,62
EEth	115,71 ± 2,63	66,86 ± 2,16	119,46 ± 3,49
ECh	102,92 ± 2,32	53,54 ± 2,58	140,4 ± 2,80
EMeth	86,78 ± 2,04	61,15 ± 1,01	145,93 ± 3,18
BHT	28,48 ± 2,05	92,00 ± 0,96	Nd

Nd: non déterminé.

III.8.3 Activité antioxydant et production d'Aflatoxine

Les composés phénoliques jouent un rôle majeur dans l'activité antioxydante (Ebrahimabadi *et al.*, 2010; Prakash *et al.*, 2011). En outre, l'effet inhibiteur de l'aflatoxine des composés phénoliques via la médiation des niveaux de stress oxydatif chez les moisissures est également rapporté par Kim *et al.* (2006). Kim *et al.* (2006) ont rapporté que l'inhibition de la croissance d'*A. flavus* par les composés phénoliques se fait via le ciblage du système de défense contre le stress oxydatif mitochondrial. Étant donné que les mitochondries sont responsables de la fourniture d'acétyl-CoA, un précurseur principal de la biosynthèse de l'aflatoxines, la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale peut expliquer en partie les effets inhibiteurs de l'antifongique phénolique sur la production d'aflatoxines. Par conséquent, ces extraits sont utilisés comme marqueurs pour élucider l'inhibition à base d'antioxydants de la biosynthèse des aflatoxines.

Les quatre extraits ont montré une activité antioxydante significative. Par conséquent, la haute efficacité inhibitrice de l'AFB₁ peut être due à leurs propriétés antioxydants en se liant à l'inhibition de la peroxydation et de l'oxygénation des lipides dans le processus de biosynthèse de l'AFB₁, en raison de l'efficacité anti-aflatoxigène ainsi que antioxydante, ces extraits peuvent protéger les matières premières à base de plantes de la contamination par l'AFB₁ et peuvent également améliorer leur qualité en empêchant la conversion de leurs métabolites secondaires actifs aux composants moins efficaces en raison du stress oxydatif.

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

Les objectifs principaux de ces travaux de mémoire étaient de tester des extraits de *C. humilis* L. pour leur capacité à inhiber la production d'AFB₁. En effet, cinquante-cinq ans après sa découverte, la présence de l'AFB₁ dans la chaîne alimentaire est toujours un sujet d'actualité et ce composé reste un contaminant majeur de par sa toxicité. Outre son importance dans les zones où le climat est classiquement favorable à la croissance des espèces toxigènes, les changements climatiques en cours font aussi craindre l'apparition de ces contaminants dans des zones jusque-là indemnes. Plusieurs stratégies de lutte ont été développées pour contrer le développement des souches aflatoxinogènes et, par la suite, la production d'aflatoxines. Ces méthodes sont surtout reposées sur une lutte chimique dont l'efficacité est de plus en plus limitée. Il semble nécessaire d'élaborer des stratégies alternatives plus écologiques, et efficaces à long terme pour lutter contre la production de l'AFB₁.

Nous nous sommes attachés à caractériser l'effet d'extraits naturels de plantes pour leur capacité à inhiber la croissance fongique et limiter la synthèse de l'AFB₁. Nous avons montré que les extraits présentent des propriétés intéressantes dont l'extrait de *C. humilis* L. qui a été caractérisé en détail dans cette étude.

Les extraits sont complexes et contiennent très certainement de nombreux composés différents. À l'heure actuelle, il n'y a que très peu de données sur la composition de tels extraits, ce qui limite la formulation d'hypothèses sur la nature des molécules actives responsables de l'effet anti-aflatoxinogène décrit dans notre travail. Il semble donc maintenant nécessaire de s'attacher à caractériser la composition de ces extraits afin d'identifier et d'isoler les molécules actives et vérifier leur absence de toxicité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- A.F.S.S.A (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, pp.309.
- Abdellah, Z. (2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Thèse de doctorat, pp.162. Maroc.
- Aguillar, F., Hussain, S.P. & Cerutti, P. (1993). Aflatoxin B₁ induces the tranversion of G-T in codon 249 of the p 53 tumour suppresser in human hepatocyte. *Proceedings of The National Academy*. **90**, 8586-8590.
- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V., & Korhonen, H.J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, **207**, 87–102.
- Alassane-Kpembi, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O. & Oswald, I.P. (2016). Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2016.1140632.
- Alberts, J. F., Engelbrecht, Y., Steyn, P. S., Holzapfel, W. H., & van Zyl, W. H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, **109(1-2)**, 121-126.
- Aliγιannis N., Kalpotzakis E. et al. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 4168-4170.
- Alonso, V.A., Pereyra, C.M., Keller, L.A.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., & Cavaglieri, L.R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: An overview. *Journal of Applied Microbiology*, **115**, 637-643.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L. & Bompeix G. (2008). *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. **126**, 13-19.
- and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B₁ contamination of spices. *Food Research International*, **44**, 385–390.
- Atanda, O. O., Akpan, I., & Oluwafemi, F. (2007). The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, **18(5)**, 601-607.

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, **117(4)**, 426-436.
- Bailly, J.D. & Guerre P. (2009). Mycotoxin analysis in muscle. *Safety of Meat and Processed Meat*. Springer, New York, USA, pp.83-124.
- Bajpai, V.K. & Kang, S.C. (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **87**, 327-336.
- Batooli, H. (2010). Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, **119**, 452–458
- Benmansour, B.G. (2005). « Étude microbiologique et mycotoxicologique blés stocker dans la région de tlemcen influence les facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse ». thèse de magister, institut de biologie faculté des sciences . Université bjillali bilabiés, Algérie.
- Benmehdi, H., Hasnaoui, O., Benali, O., & Salhi, F.(2012). Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L. *Journal of Materials and Environmental Science*, **3(2)**, 320- 237
- Bhat, R., Rai, R.V. & Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*. **9**, 57-81.
- Bhatnagar, D. & Garcia, S. (2001). *Aspergillus*. In: Labbe R.G., Garcia S., Guide to Foodborne Pathogens. John Wiley and Sons, New York, pp.35- 49.
- Biodeterioration and Biodegradation*, **50**, 143–146.
- Bondy, G.S. & Pestka, J.J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*. **3**, 109-143.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igetic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, **111**, 925-929.
- Coelho, J.P., Veiga, J.G., Elvas-Leitao, R., Brigas, A.F., Dias, A.M., & Oliveira, M.C. (2017). Composition and in vitro antioxidants activity of *Chamaerops humilis* L. In: 2017 IEEE 5th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG). IEEE, **1-4**. doi:10.1109/ENBENG.2017.7889422
- Coutinho de Oliveira, T.L., de Araújo Soares, R., Mendes Ramos, E., das Graças Cardoso, M., Alves, E., Hilsdorf Piccoli, R. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages

formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, **144**,546-555.

Da Cruz Cabral, L., Pinto, F.V. & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **166**, 1-14.

Deabes, M.M., El-soud, N.H.A. & El-kassem, L.T.A. (2011). *In vitro* inhibition of growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. *Macedonian Journal of Medical Science*. <http://dx.doi.org/3889/MJMS.1857-5773.0190>.

Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3010-3014.

Diaz, D.E., Hagler, W.M., Hopkins, B.A., Eve, J.A. & Whitlow, L.W. (1999). The potential for dietary sequestery agents to reduce the transmission of dietary aflatoxin to milk of dairy cows and to bind aflatoxin *in vivo*. *Journa of Dairy Science*. **82** (1), 838.

Dorman H. J. D., Bachmayer O., Kosar M. et Hiltunen R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 762-770.

Dung N.T., Kim J.M., & Kang S.C. (2008). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3632-3639.

Ebrahimabadi, A. H., Ebrahimabadi, E. H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F. J., Mazoochi, A., & El Mahgubi, A., Bailly, S., Tadrst, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I.P. & Bailly, J.D. (2013). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control*. **32**, 143-148.

El-Mogy,M.M., & Alsanius, B.W (2012). Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control*, **28**, 157–162.

El-Nagerabi, S.A.F., Al-Bahry, S.N., Elshafie, A.E., AlHilali, S. (2012). Effect of Hibiscus sabdariffa extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. *Food Control*, **25**,59-63.

Elzupir, A.O., Abas, A.R., Fadul, M.H., Modwi, A.K., Ali, N.M.I., Jadian, A.F.F., Ahmed, N.A., Adam, S.Y., Ahmed, N.M., Khairy, A. & Khalil, E.G. (2012). Aflatoxin M₁ in breast milk of nursing Sudanese mothers. *Mycotoxin Research*. **28**, 131-4.

essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology*, **159**, 198-206.

FAO (Food and Agriculture Organisation). (1980). On-farm maize drying and storage in the humid tropics. *FAO Agricultural Services Bulletin*, **40**, 1-54.

Firmin, S. (2012). Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B₁ et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique: Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Université Blaise Pascal. Thèse de doctorat, pp.17. France.

Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2004). *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing stérigmatocystine and aflatoxin B₁, System. *Applied Microbiology*. **27**, 672-680.

Gaamoussi, F., Israili, Z.H., & Lyoussi, B. (2010). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of an aqueous extract of *Chamaerops humilis* leaves in obese, hyperglycemic and hyperlipidemic Meriones shawi rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **23(2)**, 212-219.

Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P. & Puel, O. (2006). Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*, tome, **159 - N°1**.

García-Cela, E., Ramos, A.J, Sanchis, V., Marin, S. (2012). Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard. *Food Control*, **25(2)**, 797-808.

Giray, B., Girgin, G., Engin, A. B., Aydın, S., & Sahin, G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, **18(1)**, 23-29.

Gorran, A., Farzaneh, M., & Shivazad, M. (2013). Aflatoxin B₁-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). *Food Control*, **31**, 218-223

Guengerich, F.P. (2001). Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research*. 195-209.

Hasnaoui, O., Adli, D.A., & Sennour, R. (2013). Antibacterial Activity of Essential Oils of *Chamaerops humilis* (Arecaceae) on Some Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **4(4)**, 626-633.

Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. & Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. **153**, 1677-1692.

- Henry, S.H. & Bosch, F.X. (2001). Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in Foodborne Disease Handbook. 2^{ème} édition, Hui, Y.H., Smith, R.A., Spoerke, J.R. & Marcel Dekker, D.G., New York, USA, pp. 698.
- Heritage, J., Evans, E.G.V. & Killington, R.A. (1996). Introductory microbiology. Edition : Cambridge University Press, pp. 234.
- Heritage, J., Evans, E.G.V. & Killington, R.A. (1996). Introductory microbiology. Edition : Cambridge University Press, pp. 234.
- Herzallah, S., Alshawabkeh, K. & Al Fataftah, A. (2008). Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating. *Journal of Applied Poultry Research*, **17**, 515-521.
- Herzallah, S.M. (2013). Aflatoxin B₁ residues in eggs and flesh of laying hens fed aflatoxin B₁ contaminated diet. *American Journal of Agricultural and Biological Science*. **8**, 156-161.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G. & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**, 437-456.
- Imtiaj, A. & Lee, T.S. (2007). Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural*. **3(3)**, 316-321.
- Isman, M.B. & Machial, C.M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. *Advances in Phytomedicine*. **3**, 29-44.
- Jarvis, B.B. & Miller, J.D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **66**, 367-372.
- Jiambo, Y., Dianjun, S. & Zhiwu, W. (1995). Determination of toxin T-2 in the staple food from the sick families in kashin-Beck Diseases areas. *China Journal of Endemiology*. **14**, 146-149.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J. S., Ellis, W.O., Phillips, T.D. & Williams, J.H. (2008). Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. *Clinical and Developmental Immunology*. <http://dx.doi.org/790-309/10.1155/790309>.
- José Velázquez-Nuñez, M., Avila-Sosa, R., Palou, E. & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*. **31**, 1-4.
- Joseph, G.S., Jayaprakasha G.K., & Selvi. A.T. (2005). Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **101**, 153-160.

- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L. & Mañes, J. (2008) .Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*. **19**, 849-853.
- Kalemba, D., & Kunicka, A . (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 813-829.
- Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M., & Sarkari, S. (2012). Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control*, **23(1)**, 271-274.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2014). Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*. **1(7)**, 168-169.
- Khadri, A., Serrlheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Neffati, M., Suiti, S., & Araujo, M.E.M. (2008). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oil from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C-NMR. *Food Chemistry*, **109**, 630-637.
- Kim J. H., Mahoney N., Chan K. L., Molyneux R. et Campbell B. C. (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting antioxidant stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70**, 735–739.
- King A.D., Hocking A.D. et Pitt J.I. (1979).- Dichloran-rose bengal medium for enumeration
- Kitagawa, S., Fujisawa, H., & Sakurai H. (1992). Scavenging effect of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **40(2)**, 304-307.
- Klich, M. A. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*. **25**, 657-667.
- Klich, M.A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 713-22.
- Kohiyama, C.Y., Ribeiro, M.M.Y., & Mossini, S.A.G. (2015). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, **173**, 1006-1010.
- Krishnamsrthy, Y.L., & Shashikala, J. (2006). Inhibition of aflatoxin B production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Letters in Applied Microbiology*, **43**, 469- 474.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry*, **110**, 881-890.

- Leveau, J.Y. & Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Édition : Tec et Doc, Lavoisier et APRIA, France, pp. 612.
- Liu, Y. & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, **118**(6), 818-824.
- Lucarini M., Mugnaini V. et Pedulli G. F. (2002). "Bond Dissociation Enthalpies of Polyphenols: The importance of cooperative effects." *Journal of Organic Chemistry*, **67** (3), 928-31.
- Magan, N., Medina, A., & Aldred, D. (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, **60**, 150-163.
- Mandeel, Q.A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, **159**, 291-298.
- Mantle, P., G. (2002).- Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International*
- Maraqa, A., Alsharoa, N. F., Farah, H., Albjeirami, W. M., Shakya, A. K. & Sallal, A. J. (2007). Effect of *Nigella sativa* extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Turkish Journal of Biology*, **31**, 155-159.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, **60**, 218-237.
- Martha E .G. P. (2008). Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune: étude de leur capacité antioxydante. Diplôme de maître en sciences du bois. Département des sciences du bois et du forêt. Thèse de doctorat .
- Meissonier, G.M., Oswald, I.P. & Galtier, P. (2005). Aflatoxicoses chez le porc -Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **156**(12), 591-605.
- Milani, J.M. (2013) Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Veterinarni Medicina*, **58**, 405-411.
- Miraliakbari H et Shahidi F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, **111**(2), 421-427.
- Mishra, P.K., Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, anti-aflatoxigenic, and antioxidant efficacy of *Jamrosia* essential oil for preservation of herbal raw materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **74**, 11-16.
- Mishra, P.K., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2013). Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **80**, 16-21.

- Mohammedi, D., & Mohammedi, S. (2014). Ochratoxine A dans les aliments, les fluides et les tissus de volaille en Algérie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **67**(1), 35-39.
- Naboulsi, I., Aboulmouhajir, A., Kouisni, K., Bekkaoui, A.Y. (2018). Plants extracts and secondary metabolites, their extraction methods and use in agriculture for controlling crop stresses and improving productivity: A review. *Academia Journal of Medicinal Plants*, **6**(8), 223-240.
- Nehdi, I.A., Mokbli, S., Sbihi, H., Tan, C.P., & Al-Resayes, S.I. (2014). *Chamaerops humilis* L. var. *argentea* André date palm seed oil: a potential dietetic plant product. *Journal of Food Science*, **79**(4), 534-539.
- Nemati, M., Mehran, M.A., Hamed, P.K. & Masoud, A. (2010). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control*. **21**(7), 1022-1024.
- Nguyen, M.T. (2007). Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Institut national polytechnique de Toulouse. Thèse de doctorat, pp.23- 28, 32- 35. France.
- Nikhat, F., Satynarayana, D., & Subhramanyam, E.V.S. (2009). Isolation, characterization and screening of antioxidant activity of the roots of *Syzygium cumini* (L) Skeel. *Asian Journal of Research in Chemistry*, **2**(2), 218-221.
- Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I. & Accensi, F. (2005). Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Additives and Contaminants*. **22**, 354-360.
- Ozkan, M., Kirca, A., & Cemeroglu, B. (2003). Effect of moisture content on CIE color values in dried apricots. *European Food Research and Technology*, **216**, 2170-2219.
- Parent-Massin, D. & Parchment, R.E. (1998). Haematotoxicity of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **149**, 591-598.
- Passone M.A., Girardi N.S. et Etcheverry M. (2012). Evaluation of the control ability of five
- Paterson, R.R.M. (2006). Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research*. **110**, 1003-1010.
- Pinton, P. (2012). Toxicité et mode d'action, du déoxynivalenol et de ses dérivés acétylés sur l'intestin. Ecole doctorale 472. Thèse de doctorat, pp.10. France.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3^{ème} édition, Springer, London, New York, pp.524.

- Prakash B., Shukla R., Singh P., Kumar A., Mishra P.K. et Dubey N.K. (2010). Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, **142**, 114-119.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Mishra, P. K., Dubey, N. K., & Kharwar, R. N. (2011). Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Research International*. **49**, 201-208.
- Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, **15(6)**, 479-483.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Allameh, A., Tiraihi, T., Shams-Ghahfarokhi, M., & Ghorbanian, M. (2005). Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia*, **159(4)**, 565e570.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Eslamifar, A., Schmidt, O. J., Gharebaghi, R., Karimian, M., et al. (2006). Inhibitory effects of Akacid⁺ plus on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, **161(4)**, 245-249.
- Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., & Muralidharan, K. (2009). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*, **20(2)**, 173-178.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International journal of food microbiology*, **119** (1-2), 3-10.
- Rojas, T.R., Sampayo, C.A.F., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepada, A. (2005). Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control*. **16**, 445-450.
- Ruppel, P., Delfosse, P.H. & Hornick, J.L. (2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annales de Médecine Vétérinaire*. **148**, 141-146.
- Saleemullah, I.A., Khalil, I.A. & Shah, H. (2006). Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*. **98**, 690-703.
- Samson, R., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. Utrecht : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, pp.390.
- Samson, R.A. & Pitt, J.I. (2000). Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. Harwood academic publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp.510.

- Samson, R.A., Hong, S.B. & Frisvad, J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. **44**, 133-148.
- Sandosskumar, R., Karthikeyan, M., Mathiyazhagan, S., Mohankumar, M., Chandrasekar, G., Velazhahan, R. (2007). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B₁ by the medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. × *Allium cepa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**,1007-14.
- Scheidegger, K.A. & Payne, G.A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism, a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*. **22**, 427-463.
- Shams-ghahfarokhi, M., Kalantari, S., & Razzaghi-abyaneh, M. (2013). Terrestrial Bacteria from Agricultural Soils : Versatile Weapons against Aflatoxigenic Fungi. In *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, (2), 23-39.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*. **25**, 27-33.
- Singh, P. & Srivastava, B. (2008). Spices and efficacy of essential oil of *Amomum subulatum* as a novel aflatoxin B₁ suppressor. *Journal of Herbs*. **6475**, 37-41.
- Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U., Weschke W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Plant Physiology*, **109**, 435-442.
- Stević, T., Berić, T., Šavikina, K., Soković, M., Godevac, D., Dimkić, I. & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*. **55**, 116-122.
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., Brune, M., et al. (2006). Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, **114**(12), 1898-1903.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Institut national polytechnique de Toulouse et université de Bucarest. Thèse de doctorat, pp. 65. France.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B. & Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*. **145**, 464-470.

- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J. & Wang, Y. (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*. **130**, 520-527.
- Tozlovanu, M. (2008). Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A): Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Institut national polytechnique de Toulouse Thèse de doctorat, pp. 25. France.
- Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I., Niwa, M., & Ozaki M. (1987). Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Medical Science Research*, **15**, 831-832.
- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. & Kozakiewicz, Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*. **41**, 29-36.
- Velazhahan, R., Vijayanandraj, S., & Vijayasamundeeswari, A. (2010) Detoxification of aflatoxin by seed extracts of the medicinal plants, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turill structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G2. *Food Control*, **21**, 719-725.
- Vilela, G.R., de Almeida, G.S., & D'Arce, M.A.B.R. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, **45**, 108-111.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, **19**, 1130-1138.
- Wang, L., & Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, **17**(6), 300-312.
- Wang, S.Y, Chen, C.T, Sciarappa, W., Wang, C.Y., Camp, M.J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 5788-5794.
- Wild, C.P. & Montesano, R. (2009). A model of interaction: aflatoxin B1 and hepatitis viruses in liver cancer aetiology. *Cancer Letters*. **286**, 22-28.

- Wu, F. & Khlangwis , P. (2010). Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and postharvest interventions. *Food Additives and Contaminants*. **27**, 496-509.
- Yiannikouris, A. & Jouany, J.P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *Productions Animales*. **15**, 3-16.
- Yoshinari, T., Akiyama, T., Nakamura, K., Kondo, T., Takahashi, Y., Muraoka, Y., et al. (2007). Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology*, **153(8)**, 2774-2780.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, **15**, 129-144.

ANNEXES

Annexe I

Appareillage

- Agitateur magnétique.
- Autoclave.
- Spectrophotomètre : UV/ visible
- pH-mètre
- Balance analytique.
- Centrifugeuse.
- Vortex.
- Four à moufle.
- Micropipettes.
- Plaque chauffante.
- Etuve.
- Bec benzène.
- Microscope optique.
- Evaporateur rotatif.

Verreries

- Bêches.
- Entonnoirs.
- Eprouvettes graduées à pied.
- Erlenmeyers.
- Fioles jaugées à 1 trait.
- Pipettes graduées à écoulement.
- Tubes à essai.

Produits chimiques

- HCl : 1N.
- NaOH : 1N.
- Agar
- Chloramphénicol
- Citrate d'ammonium ferreux
- Cu SO₄, 5 H₂O
- Czapek Concentré
- Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)
- Eau distillée
- Extrait de levure
- Extrait de Malt
- Fe SO₄, 7H₂O
- Glucose
- Glycérol
- KCl
- KH₂PO₄
- KNO₃
- MgSO₄, 7H₂O
- MgSO₄, 7H₂O
- NaNO₃
- Noix de coco
- Peptone
- Pomme de terre
- Rose Bengale
- Saccharose
- Zn SO₄, 7H₂O
- β-cyclodextrine (β-cyd)
- Folin
- Na₂CO₃
- Acide gallique
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Méthanol
- BHT
- β-carotène
- Acide linoléique
- Diméthyl sulfoxyde(DMSO)
- Tween-40
- Tween-80
- Chloroforme
- Hexane
- Ethanol
- Alcool isoamylique
- Standard analytique AFB1
- Huile à immersion
- Plaque CCM
- Toluène

Annexe II

Préparation des solutions

Acide chlorhydrique (HCl) 1N

20,725ml.....250ml

Hydroxyle de sodium (NaOH) 1N

10g.....250ml

Eau physiologie : 0,9% de NaCl

Compositions des milieux de culture

Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar)

Pomme de terre200 g

Agar15 g

Glucose20 g

Eau distillée1000 ml

pH = 5,6 ± 0,2

Extract de Malt Agar (MEA)

Extrait de Malt.....20 g

Glucose.....20 g

Peptone.....20 g

Eau distillée1000 ml

pH = 5,6 ± 0,2

G25N (25% Glycérol Nitrate Agar)

KH₂PO₄.....0,75 g

Czapek Concentre.....7,5 ml

Extrait de levure.....3,7 g

Glycérol.....250 g

Agar.....12 g

Eau distillée.....750 ml

pH = 7,00

Czapek concentré

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	5 g
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,05 g

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose	30 g
Extrait de levure	5 g
Czapek concentré	10 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6,7 ± 0,2	

Milieu AFPA

Peptone.....	10 g
Extrait de levure	20 g
Citrate d'ammonium ferreux	0,5 g
Chloramphénicol	100 mg
Agar.....	15 g
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline).....	2 mg
Eau distillée	1000 ml
pH = 6,00 ± 0,2	

Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium) (CAM)

Noix de coco.....	100 g
Agar.....	20 g
β-cyclodextrine (β-cyd)	3 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7,00	

Milieu SMKY

Saccharose	200 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5 g
KNO ₃	0,3 g
Extrait de levure	7 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 6,8 ± 0,2

Milieu DRBC

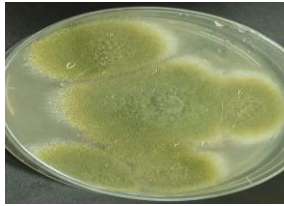
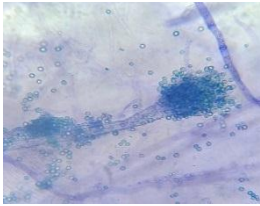


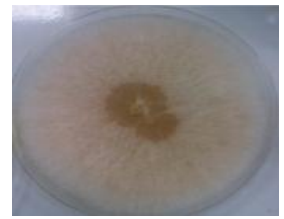

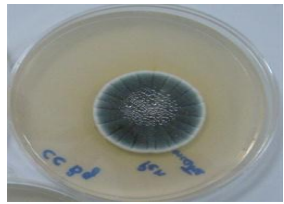
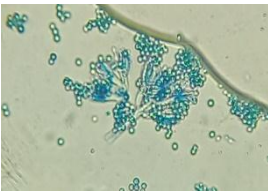
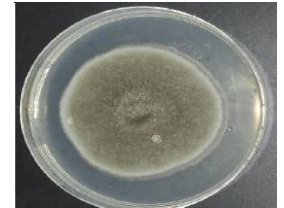
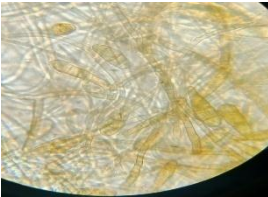
Glucose.....	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5 g
Rose Bengale.....	25 mg
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline).....	2 mg
Chloramphénicol.....	100 mg
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 5,6 ± 0,2

N.B. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120 °C/15 min.

Annexe III

Tableau 1. Caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures isolées.

Souche	Aspect macroscopique	Aspect Microscopique ($\times 100$ avec et sans Bleu de méthyl)	Description
<i>A. flavus</i>			<ul style="list-style-type: none"> -Une tête aspergillaire bisériée mais on peut rencontrer des têtes plus petites unisériées ou mixtes. -La vésicule est sphériques à légèrement allongées, fertiles sur toute la surface. Les conidies sont globuleuses à ellipsoïdes
<i>A. niger</i>			<ul style="list-style-type: none"> -Les têtes aspergillaires sont bisériées avec des métules-phialides tout autour d'une vésicule ronde. -Les conidies de couleur brune, sphériques parfois côtelées.
<i>Fusarium</i> sp.			<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophores courts et souvent ramifiés. -Porte des phialides pour la production des conidies. -Les conidiophores sont simples ou disposés en verticilles ; porte de longues monophialides d'aspect cylindrique.
<i>Penicillium verrucosum</i>			<ul style="list-style-type: none"> -Mycélium cloisonné ; -Conidiophores isolés, ramifiés terminés par un pénicille ; -Pénicille constitué de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.
<i>Alternaria</i> sp.			<ul style="list-style-type: none"> -Filaments septés, fin et régulier bruns foncé à noirs. -Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.

Annexe IV

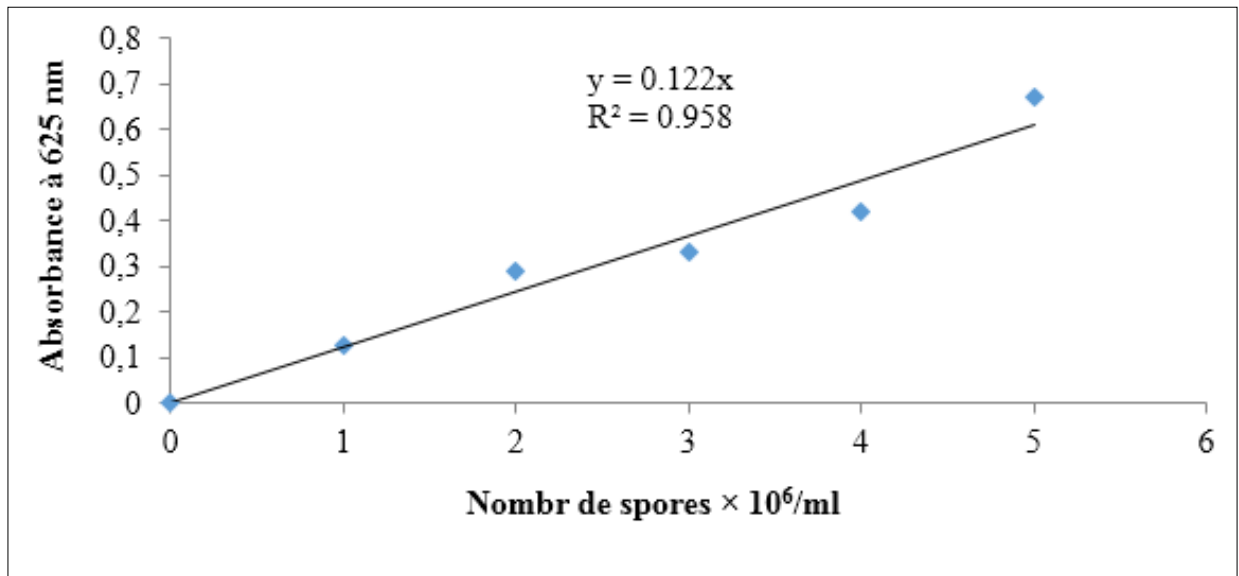


Figure 1. Courbe d'étalonnage des spores d'*A. flavus*.

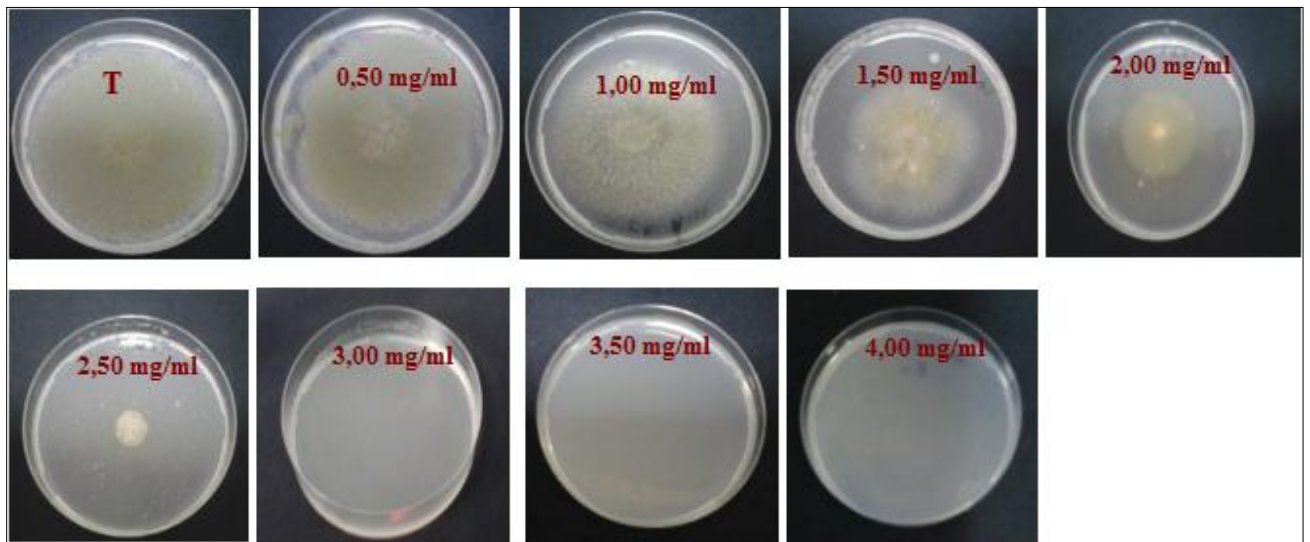


Figure 2. Sensibilité de l'*A. flavus* BBH (6) à l'extrait par rapport au témoin.



Figure 3. Détermination de CMI de chaque extrait.

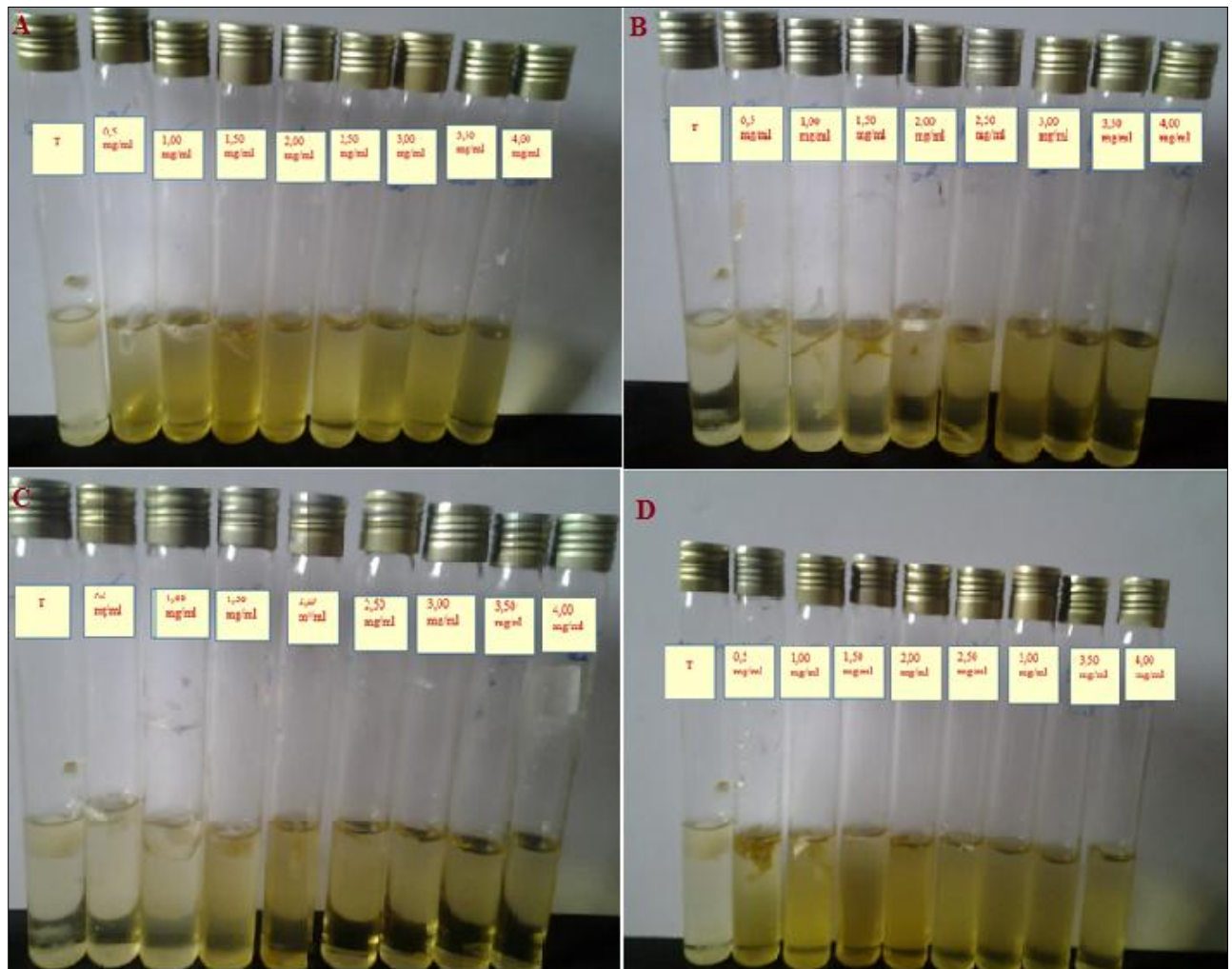


Figure 4. Les CMIs des extraits contre la souche toxigène *A. flavus* BBH (6) : **A** : EHX ; **B** : EEth ; **C** : ECh, **D** : EMth.



Figure 5. Les étapes de test d'inhibition de la production des AFB₁.

Annexe V

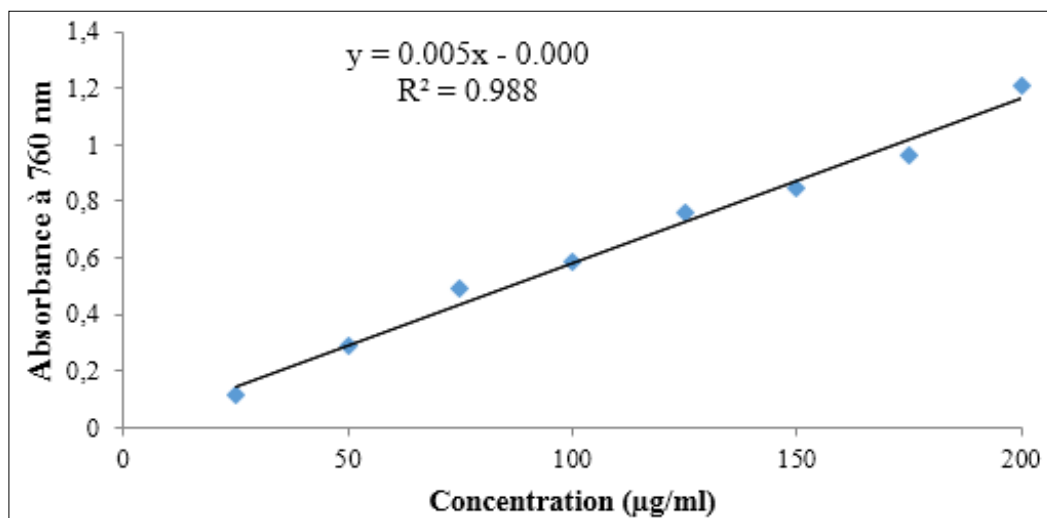


Figure 6. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.