

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaia



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : - GAROUI Bouchra Imane
- CHEHAM Nabila

Thème

**Isolement des moisissures à partir d'arachide (*Arachis hypogaea*)
et extraction de leurs mycotoxines**

Soutenu publiquement, le 12 / 06 / 2022 , devant le jury composé de :

Mme. MAIDI Lila	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaia	Président
M. BELGHIT Saïd	Maitre des conférences A	Univ. Ghardaia	Directeur de mémoire
M. BOURAS Nouredine	Professeur	Univ. Ghardaia	Examineur

Année universitaire : 2021/2022



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions **Dieu** le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force, le courage et la patience pour compléter ce modeste travail.

Nous exprimons nos sentiments de reconnaissance et de gratitude à notre directeur de mémoire, Dr. **BELGHIT Saïd**, qui nous a appris le sens de la patience, la persévérance et la détermination, et pour ses conseils et ses encouragements tout au long de ce parcours.

Nous exprimons également notre appréciation et nos remerciements au professeur **BOURAS Noureddine** et à Mme **MAIDI Leila**, qui ont soigneusement examiné notre travail.

Merci beaucoup à Messieurs, **MAHAMEDI Alla Eddine** et **DJELLID Youssef** pour leur gentillesse et bienveillance envers nous tout au long de notre parcours académique.

Merci beaucoup, mon père, ma mère, pour votre soutien et vos prières pour nous, pour le succès et la réussite tout au long de notre vie.

Merci beaucoup à toute l'équipe du Laboratoire pédagogique de Microbiologie et Mycologie de la faculté SNVST : Mesdames et Messieurs, **Ali, Noureddine, Hicham, Bachir, Abderrahmane, Nadjet, Ahlem...** Pour leur gentillesse et leur bienveillance envers nous.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicace

Avec tout mon amour et ma gratitude, je dédie ce travail à mon **père**, la prunelle de mes yeux, et mon soutien, car il est mon modèle de vie et symbole du dévouement et de la sincérité, à **ma mère** pour le soutien et l'encouragement, que Dieu les prête longue vie, les protège pour nous

A mon frère et sa femme.

A mes sœurs **Asma, Iman, Souad, Rania** et notre **Messouda**, choyée, elles sont la source de force et d'amour.

A ma défunte grand-mère, à mes oncles et tantes.

A mes tantes **Fatima** et **Aicha**, je les remercie beaucoup.

A ma chère amie et sœur, **Bouchra**, et nous n'oublions pas **Fatima, Halima, Noor El-Houda** et **Meriem**.

Je tiens également à remercier le père de mon amie, M. **Graoui Mustapha**, pour nous avoir aidés à compléter cette note.

Et à tous ceux qui ont contribué à notre soutien et à notre assistance de près ou de loin.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur

Nabila

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation
digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

A **Mon père** qui m'a soutenu sans relâche et m'a
donné la force et la volonté et de ne jamais abandonner
dans ma vie, que Dieu te protège pour nous.

A **ma mère**, dont les prières n'ont jamais quitté ma vie, que Dieu te protège pour
nous.

A mon frère, **Mokhtar**, qui est toujours là pour me protéger et pour me soutenir
quoi qu'il arrive.

A ma très chère, sœur, **Maria**, source de force et de courage.

A ma bien-aimée **Hadjer** et la douce **Samira** et la joie de nos vies, mon petit
frère Med **Yacine**, que dieu te protège et te garde pour nous.

A ma très chère amie **Nabila**.

A ma chère grand-mère et grand-père.

A mon oncle **Moussa, Nouredine, Youcef**.

A mes chères tantes **Amina, Amel, Zineb, Halima**, la plus chère à mon cœur,
Zahia.

A l'âme de la défunte, ma tante Messouda, que Dieu lui fasse miséricorde et la
mette en paix.

A ma chère et bien-aimée grand-mère, **Zineb**.

A mes chères cousines **Houda** et l'adorable petite **Wissam**.

A la femme de mon oncle Lamia et ses enfants **Aymen, Anas** et la petite
Mallak.

Bouchra

Liste des abréviations

AF : Aflatoxine

Aw : Activité de l'eau

CAM: Coconut Agar Medium

CCM: Chromatographie sur couche mince

CYA: Czapeck Yeast Agar

ELISA: Enzyme linked Immuno Adsorbent Assay

FPS : Filtre en papier stérile

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute performance

OTA: Ochratoxine

PDA: Potato Dextrose Agar

RF : Rapport Frontal

SAB : Sabouraud

UV : Ultra_Violet

عزل فطريات مجهرية من الفول السوداني (*Arachis hypogaea*) وإستخلاص سمومها الفطر

ملخص

يهدف العمل الذي قمنا به إلى عزل فطريات مجهرية من ثمار الفول السوداني ثم دراسة قدرتها على إنتاج السموم الفطرية، حيث تم جمع بعض عينات من فاكهة الفول السوداني المعروفة باسم (cacahouète Sebseb) من بعض نقاط البيع على مستوى دائرة متليلي (ولاية غرداية) ليتم بعد ذلك نقلها إلى المخبر أين تم إجراء العزل على أوساط الزرع PDA و Sabouraud مدعمة بالكورامفينيكول وذلك باستخدام الطرق التالية: الطريقة المباشرة بوضع البذور على الوسط الزراعي، طريقة المعلقات المخففة الغير مباشرة وطريقة ورق الترشيح المبلل. بعد تخمين في درجة حرارة 28 °د لمدة 6 أيام تم الكشف عن ثلاث عزلات فطرية تنتمي إلى الجنس *Aspergillus* (43%) و أربع عزلات تنتمي إلى الجنس *Penicilium* (57%). تم بعد ذلك استخلاص السموم الفطرية باستخدام المذيبات على مستوى المادة (ثمار الفول السوداني) وعلى مستوى سلالات الفطريات المعزولة عن طريق حضنها لمدة 7 أيام في الأوساط الصلبة CAM و CYA. تم الكشف عن السموم الفطرية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) وتحت الأشعة فوق البنفسجية عند طول الموجة 365 نانومتر. أظهرت النتائج عدة بقع مفصولة بواسطة CCM منها المفلورة تحت الأشعة فوق البنفسجية، إلا أن تحديدها التقريبي تطلب منا استعمال طريقة الكشف الكيميائي، حيث أظهر استخدام نترات الفضة وكور الحديد نتيجة سلبية، بينما استخدام مركز حمض الكبريتيك مكننا من الكشف عن ثلاث أنواع رئيسية من السموم الفطرية، وهي Aflatoxine G ، Ochratoxine A و Ochratoxine B.

الكلمات المفتاحية: الفول السوداني، السموم الفطرية، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، الكشف الكيميائي.

Isolement des moisissures à partir d'arachide (*Arachis hypogaea*) et extraction de leurs mycotoxines

Résumé

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'isolement des moisissures à partir des fruits d'arachide puis l'étude de leur pouvoir producteur des mycotoxines. Ainsi, nous avons collecté quelques échantillons des fruits d'arachide connus sous le nom (cacahouète Sebseb) à partir de certains points de vente à Metlili (commune de la wilaya de Ghardaïa). L'isolement a été effectué sur milieux PDA et Sabouraud additionnés du chloramphénicol. Les méthodes utilisées est celles des graines (directe) et de suspension dilution (indirecte) et de filtre en papier stérile (directe). Ainsi, sept isolats fongiques ont été détectés après incubation à 28 C° pendant 6 jours et sont affiliés aux deux genres *Aspergillus* (43%, soit 3 isolats) et *Penicillium* (57%, soit 4 isolats). L'extraction des mycotoxines a été faite par l'utilisation des solvants au niveau du substrat d'arachide et à partir des isolats des champignons après fermentation pendant 7 jours sur les milieux solides CAM et CYA. La détection a été faite par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et sous lumière UV à 365 nm. Les résultats ont montré plusieurs taches séparées par CCM et fluorées sous UV, cependant leur identification approximative nécessite des révélations chimiques, L'utilisation de nitrate d'argent et de chlore ferrique a conduit à un résultat négatif cependant, l'utilisation d'acide sulfurique concentré, nous a permis de détecter trois principaux types de mycotoxines, il s'agissait de l'aflatoxine G, l'ochratoxine A et l'ochratoxine B, produits par *Aspergillus* et *Penicillium*.

Mots clés : Arachides, moisissures, mycotoxines, CCM, révélation chimique,

Isolation of microscopic fungi from peanut (*Arachis hypogaea*) and extraction of their mycotoxins

Abstract

The work that we have undertaken aims to the isolation of microscopic fungi from peanut fruits and then the study of their mycotoxin-producing power. Thus, we collected some samples of peanut fruits known as (cacahouète Sebseb) from certain points of sale in Metlili (City in wilaya of Ghardaïa). The isolation was carried out on PDA and Sabouraud media supplemented with chloramphenicol. The methods used are those of seed and suspension dilution and sterile paper filter. Thus, seven fungal isolates were detected after incubation and affiliated to the two genera *Aspergillus* (43%) and *Penicillium* (57%). The extraction of mycotoxins was done by the use of solvents, from the substrate of peanut and from the isolates fungi after their fermentation during 6 days on the solid media CAM and CYA. Detection of mycotoxins was made by Thin Layer Chromatography (TLC) and under UV light at 365 nm. The results showed several spots separated by TLC and fluorinated under UV, however their approximate identification requires chemical revelation, The use of silver nitrate and ferric chlorine led to a negative result, but the use of concentrated sulfuric acid concentrate allowed us to detect three main types of mycotoxins, these were aflatoxin G, ochratoxin A and ochratoxin B, produced by *Aspergillus* and *Penicillium*.

Key words: Peanuts, mycotoxins, microscopic fungi, CCM, Chemical detection.

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I	
1. Généralité sur l'arachide	3
2. Organisation d'une graine d'arachide	3
3. Conservation et stockage	4
4. Composition et valeur nutritive	4
5. les moisissures d'arachides	5
II.1. Les Moisissures	6
2. Classification.....	7
3. Cycle de vie des moisissures.....	8
4. Types de moisissures	9
4. 1. Les moisissures de champ.....	9
4. 2. Les moisissures de stockag.....	9
5. Les moisissures toxigènes.....	9
5.1. Genre <i>Aspergillus</i>	9
5.2. Genre <i>Penicillium</i>	10
5.3. Genre <i>Fusarium</i>	10
5.4. Genre <i>Alternaria</i>	10
III.1. les mycotoxines.....	11
2. Principales mycotoxines	11
3. La mycotoxinogénèse	12
4. Conditions de croissance fongique et de production de mycotoxines.....	12
4.1. Température	12
4.2. PH.....	12

4.3. Présence d'oxygène	13
4.4. Activité en eau (Aw).....	13
4.5. Nature du substrat	13
5. les effets des mycotoxines sur santé humaine.....	14
6. Détection de mycotoxines.....	14
6.1. méthode physicochimique	14
6.2. La méthode ELISA	16

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Etude mycologie des arachides	17
1.1 Echantillonnage.....	17
1.2. Isolement de la flore fongique	17
1.2.1 Désinfection de la surface des graines d'arachide.....	17
1.2.2. Méthode directe	18
1.2.3. Méthode indirect	19
1.2.4. Méthode de filtre en papier stérile (FPS).....	21
1.3. purification	22
1.4. Identification des isolats..	22
1.4.1. Identification macroscopique.....	22
1.4.2. Identification microscopique	22
2. Etude mycotoxicologique	23
2.1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat	23
2.2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation.....	25
2.2.1. Préparation du milieu de fermentation et ensemencement	25
2.2.2. Extraction des mycotoxines	25
3. Séparation des taches par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	25
4. Détection des mycotoxines par révélations chimiques.....	26
4.1. Détection des mycotoxines séparées à partir du substrat	26
4.2. Détection des mycotoxines séparées à partir des isolats fongiques.....	27

Chapitre III

Résultats

1. Etude mycologique des graines d'arachide	29
1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons d'arachide	29
1.2. Identification des souches fongiques isolées	30
1.2.1. Identification macroscopique	30
1.2.2. Identification microscopiques	31
2. Etude mycotoxicologique d'arachide	34
2.1. CCM de l'extrait obtenu à partir du substrat	34
2.2. CCM des extraits obtenus par les isolats après fermentation sur milieux solides.....	35
3. Essai de la détection des mycotoxines par révélations chimiques.....	38
3.1. Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir de l'extrait du substrat	38
3.2. Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir des extraits des isolats fongiques.....	39
3.2.1 La plaque n° 1 contenant les extraits des souches <i>Aspergillus</i> sp.1 et <i>Aspergillus</i> sp.2	39
3.2.2. La plaque n° 2 contenant les extraits des souches <i>Penicillium</i> sp.1 et <i>Aspergillus</i> sp. 3 ..	40
3.2.3. La plaque n° 3 contenant les extraits des souches <i>Penicillium</i> sp. 3 et <i>Penicillium</i> sp. 4..	41
3.2.4. La plaque n° 4 contenant les extraits des souches <i>Penicillium</i> sp. 2 et <i>Aspergillus</i> sp.1' ...	42

Chapitre IV

Discussion	43
Conclusion	46
Références bibliographiques	47

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : Arachide présentée dans et hors de sa cosse, enveloppée de sa pellicule et dépelliculée.	3
Figure 02 : Quelques champignons filamenteux.	6
Figure 03 : Classification des mycètes dans le monde vivant.	7
Figure 04 : Cycle de vie de moisissures.	8
Figure 05 : photo d'arachide.	17
Figure 06 : Ensemencement des graines d'arachide sur milieu Sabouraud et PDA (Photographie originale).	18
Figure 07 : Techniques d'isolement des souches fongiques à partir d'arachide par la méthode directe.	19
Figure 08 : Les étapes de l'isolement de la flore fongique à partir d'arachide.	20
Figure 09 : Techniques d'isolement des souches fongiques à partir d'arachide par la méthode indirecte.	21
Figure 10 : Isolement par la méthode de filtre en papier stérile (Photographie originale).	21
Figure 11 : purification des isolats (photo originale).	22
Figure 12 : Détection des mycotoxines au niveau du substrat.	23
Figure13 : Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide.	24
Figure14 : Détection des mycotoxines au niveau des isolats.	25
Figure 15 : Préparation de la CCM.	26
Figure 16 : pulvérisation des plaques.	27
Figure 17 : Affiliation des isolats fongique au genres.	29
Figure 18 : Chromatogramme présentant la réaction des taches avant et après traitement chimique pour les extraits des souches <i>Aspergillus</i> sp. 1 et <i>Aspergillus</i> sp. 2.	39
Figure 19 : Chromatogramme présentant la réaction des taches avant et après traitement chimique pour les extraits des souches <i>Penicillium</i> sp. 1 et <i>Aspergillus</i> sp. 3.	40
Figure 20 : Chromatogramme présentant la réaction des taches avant et après traitement chimique pour les extraits des souches <i>Penicillium</i> sp. 3 et <i>Penicillium</i> sp. 4.	41
Figure 21 : CCM présentant un spot de mycotoxine produites par <i>Penicillium</i> sp.2.	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Température de stockage et temps de conservation	4
Tableau 2 : Valeur nutritive pour 100 g d'arachide	5
Tableau 3 : Principales mycotoxines, leurs champignons producteurs et les types d'aliments concernés	11
Tableau 4 : mycotoxines et leurs principaux effets	14
Tableau 05 : Couleurs avant et après traitement chimique	27
Tableau 06 : les isolats fongiques obtenus à partir d'arachide	29
Tableau 07 : Caractéristiques macroscopiques des souches isolées d'arachide.	30
Tableau 08 : Caractères microscopiques des souches isolées d'arachide.	32
Tableau 09 : Visualisation sous UV des taches séparées par CCM à partir de l'extrait de substrat (Arachide)	35
Tableau 10 : Les valeurs Rf des spots séparés par CCM.	35
Tableau 11 : Chromatographie sur couche mince présentant les taches séparées à partir des extraits des isolats fongiques.	36
Tableau 12 : Les valeurs Rf des spots séparés à partir des extraits des isolats par la CCM.	37



Introduction

Introduction

Les légumineuses constituent une grande famille (*Fabaceae*) qui regroupe des plantes à visée ornementale (pois de senteur), fourragère (trèfle) et, bien sûr, alimentaire. Ces dernières se répartissent en 3 groupes : les « légumes secs » (lentilles, pois cassés, pois chiches, fèves, haricots secs ...), les oléagineux (arachide, soja ...) et les légumes à cosses (petit pois, haricots verts...) (Rémond et Walrand, 2017).

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire. De nombreuses espèces de légumineuses sont utilisées comme sources protéiques dans l'alimentation humaine. Les grains des légumes secs s'altèrent rapidement s'ils sont stockés dans des conditions défavorables. Plusieurs phénomènes en sont la cause (insectes, microorganismes, oxydation, etc.) Parmi les microorganismes, les moisissures représentent le groupe le plus diversifié qui peut causer des pertes importantes en réduisant la qualité et/ou la quantité des légumes secs stockés (Laib, 2012).

L'arachide (*Arachis hypogaea*) est une plante oléagineuse appartenant au genre *Arachis*, de la famille des *Fabaceae* qui inclue la plupart des graines légumineuses et ayant une haute importance économique et nutritive (Eke-Ejiofor *et al.*, 2012 ; Noba *et al.*, 2014). C'est une plante tropicale originaire de l'Amérique du Sud qui a été introduite en Afrique, en Asie et en Europe (Ferguson *et al.*, 2005). L'arachide est la cinquième culture parmi les oléagineux les plus importants dans le monde (Sanginga et Bergvinson, 2015), la deuxième source d'huile comestible (Knoden *et al.*, 2003), la troisième source importante de protéines végétales et la douzième production végétale dans le monde (FAOSTAT, 2008). Malgré ses potentialités économiques et nutritives, l'arachide rencontre d'énormes difficultés pour sa récolte et son stockage. Selon Chapeland-Leclerc *et al.* (2005), l'arachide est l'un des oléagineux le plus contaminé par les moisissures toxigènes le plus souvent pendant la culture, la récolte et au cours du stockage. Par ailleurs, selon Wagacha *et al.* (2013), certaines moisissures comme les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont capables de produire des toxines dites mycotoxines dans les graines d'arachide et ses dérivés qui peuvent se révéler très toxiques pour le consommateur (Boli *et al.*, 2018).

Les moisissures ou champignons filamenteux sont des acteurs importants du monde microbien. Ils peuvent être définis comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique. Les moisissures sont impliquées dans une multitude de processus biologiques de l'environnement.

Ils présentent, en outre, un intérêt économique, en raison à la fois de leur utilité et de leurs activités néfastes multiples : altérations des produits alimentaires, détériorations dans de nombreux autres domaines, la production de mycotoxines, parasitisme chez l'homme, les animaux et les plantes. Certains produits du métabolisme secondaire des champignons, les mycotoxines, peuvent avoir des effets nocifs divers pour la santé et représenter une grave menace pour les êtres humains comme les animaux d'élevage. Ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce, même lorsque les éléments fongiques ne sont plus viables. Les effets nocifs peuvent être immédiats, comme l'intoxication aiguë, ou sur le long terme, comme la déficience immunitaire ou le cancer (Abdoullahi *et al.*, 2019).

Des études récentes réalisées sur des denrées alimentaires commercialisées en Algérie ont mis en évidence la présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans le blé et les arachides (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016).

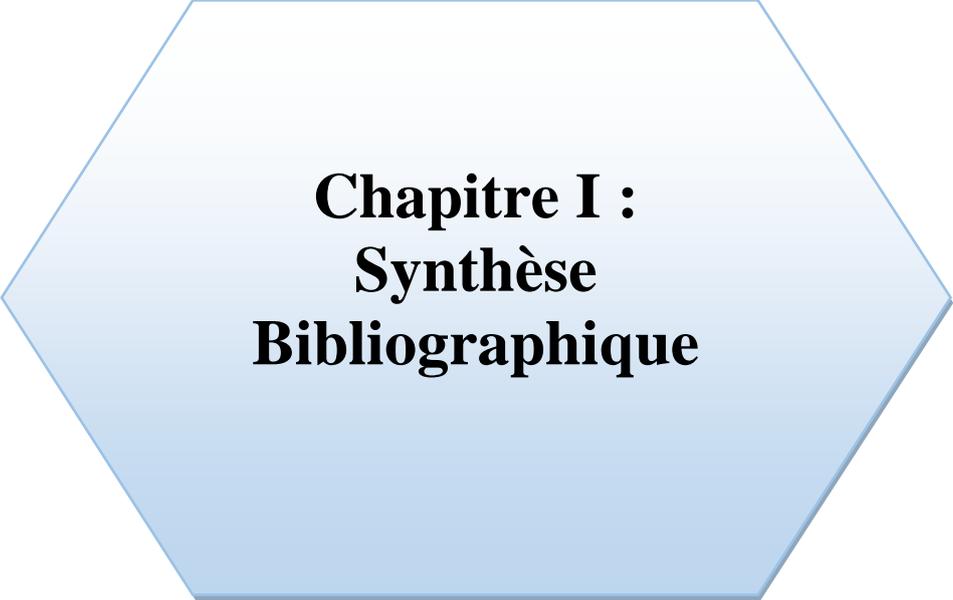
L'objectif de ce travail est l'isolement des moisissures à partir d'arachide (*Arachis hypogaea*), commercialisée au niveau de la commune de Metlili et évaluation de leur pouvoir producteur des mycotoxines.

Le manuscrit est subdivisé en 3 chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la présentation bibliographique.

Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et à la description des méthodes utilisées. Le troisième chapitre inclut la présentation des résultats et le quatrième leur discussion.

Une conclusion générale et les perspectives qui en découlent ainsi que les références bibliographiques clôturent ce manuscrit.



**Chapitre I :
Synthèse
Bibliographique**

I. Arachide

1. Généralité :

Les cacahuètes ou arachides (*Arachis hypogaea*) sont une source de nourriture importante et puissante pour les populations du monde entier (Reese et Leherer, 1999 ; Chang *et al.*, 2013). L'arachide appartient à la famille des Fabacées (haricots), est le «roi» des oléagineux dérivé de deux mots grecs, arachis signifie légumineuse ou haricots et hypogaea signifie sous l'arachide (fait référence à la formation de gousses dans le sol). On l'appelle aussi noix merveilleuse, noix de terre, noix de singe, goobers, pinder, panda, noix de manille et noix de cajou des pauvres (Woodroof, 1983 ; Madhusudana, 2013 ; Chang *et al.*, 2013; Gadhiya *et al.*, 2014) . Les arachides seraient originaires d'Amérique du Sud et se seraient propagées au Brésil (Zhao *et al.*, 2012). Il a été introduit par les Portugais du Brésil en Afrique de l'Ouest puis dans le sud-ouest de l'Inde au 16ème siècle. Ceux-ci sont cultivés dans presque tous les pays tropicaux et subtropicaux du monde. Un sol limoneux léger et sablonneux est préféré pour la production d'arachides. Les conditions climatiques influencent significativement la croissance de l'arachide. Une température de 30°C est considérée comme la température optimale pour une germination et un développement rapides des gousses (Nautiyal, 2002).

2. Organisation d'une graine d'arachide

L'arachide, une fois récoltée, est composée de trois parties distinctes (figure 1) :

- la cosse, non comestible
- une pellicule rouge-brune qui protège les cotylédons
- les cotylédons (deux à quatre selon la variété)

Ce sont ces cotylédons qui composent la partie comestible de l'arachide et c'est à eux que l'on fait référence lorsqu'on utilise le terme de « graine ». La graine correspond à 96 % de la masse de l'arachide et est de forme ovale. Elle est facilement séparable en deux cotylédons (pour les variétés Spanish, Runner et Virginia, 3 ou 4 pour la variété Valencia), avec une indentation sur leur face interne (Young et Schadel, 1990).



Figure 01 : Arachide présentée dans et hors de sa cosse, enveloppée de sa pellicule et dépelliculée (Basse, 2020).

3. Conservation et stockage

L'arachide est une denrée semi-périssable. Stockée dans des conditions favorables, elle peut se conserver pendant plusieurs années. Dans le cas contraire, elle peut devenir impropre à la consommation en l'espace d'un mois à cause de la moisissure, des insectes ou de l'absorption de saveur étrangère qu'on appelle alors rancissement.

Les conséquences fâcheuses entraînées par un mauvais stockage sont cumulatives et irréversibles. Certaines conditions doivent dès lors être scrupuleusement respectées lors du stockage de l'arachide :

- la température doit être suffisamment basse. Le temps de conservation est d'autant plus grand que la température est basse et que les graines n'ont pas été décortiquées (tableau 1).
- l'humidité relative doit être basse. Plus que tout autre facteur une humidité trop élevée peut causer une détérioration majeure. Pour une humidité relative comprise entre 65 et 70 %, la teneur en eau de l'arachide est d'environ 7 %. Au-dessus de cette valeur l'arachide a tendance à moisir. Les conditions de stockage doivent absolument prévenir l'apparition de moisissures.
- le lieu de stockage doit être débarrassé des odeurs et bien aéré. L'ammoniac pouvant se dégager dans les hangars de stockage étant la principale cause des avaries, doit être éliminé par la combustion de bâton de soufre par exemple (Knoden *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Température de stockage et temps de conservation (Knoden *et al.*, 2003).

Température de stockage	Temps de conservation (avec coque)	Temps de conservation (sans coque)
21 °C	6 mois	4 mois
8 °C	9 mois	6 mois
0 à 2 °C	3 ans	2 ans
- 4 °C	7,5 ans	5 ans
- 12 °C	15 ans	10 ans

4. Composition et valeur nutritive

L'arachide constitue une légumineuse alimentaire relativement importante dans la région des terres tropicales d'altitude d'Afrique. Elle est très riche en lipides, en protéines et même en glucides. Cette teneur diffère suivant le type d'arachide. Pour l'arachide de bouche, les graines contiennent 22 à 32 % de protéines, 34 à 54 % de lipides et plus ou moins 12% de

glucides. En ce qui concerne l'arachide industrielle (pour les huileries), les graines décortiquées contiennent de 45 à 54 % de lipides, 20 à 36% de protéines et 9 à 13 % de glucides selon les variétés (Nyabyenda, 2005).

Tableau 2 : Valeur nutritive pour 100 g d'arachide (Woodroof, 1983 ; Misra, 2004 ; Akcali *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2014; Gadhiya *et al.*, 2014).

Nutriments	Valeur nutritionnelle (pour 100 g)
Calories	593 calories
Protéines	20-50%
Calcium	61 mg
Potassium	725 mg
Magnésium	176 mg
Phosphore	396,4 mg
Sodium	320 mg
Folate	120 mg
Carbohydrates	10-20%
Fibres alimentaires	9,3 g
Graisse totale	40-50%
Huile comestible	43-55%

5. Les moisissures d'arachides

Il est rapporté que les graines d'arachide sont très sensibles aux maladies, car elles servent de source de nutriments stockés pour les champignons tels que *Rhizopus* spp, *Penicillium* spp. *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Cela est évident dans les travaux de (Woodroof, 1984), qui a observé que les échantillons de graines d'arachide qui ne sont pas retirés de leur coque ne sont pas sujets aux attaques de micro-organismes et d'insectes comme ceux qui ne sont pas retirés de leur coque. Ce rapport a été corroboré par les travaux de (Ibrahim *et al.*, 1986), qui ont déclaré que si les graines sont récoltées à sec, ils ne seraient pas soumis à de grands dommages par les micro-organismes, car ces organismes ont besoin d'une certaine quantité d'humidité pour se développer et se multiplier. McDonald. (1970) a rapporté que *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp. étaient les champignons les plus abondants rencontrés dans les graines d'arachide testées avant la récolte, tandis que *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium* spp. étaient abondants sur les graines de fruits trop mûrs et séchés à la fenêtre. Il a en outre déclaré que le facteur environnemental abondant le plus important qui influence la croissance de la microflore endo-giocarpique pendant et après le séchage et le durcissement des gousses et des graines est l'humidité, et qu'en dehors de la teneur en humidité des graines, plusieurs facteurs environnementaux, l'humidité relative et la température dans les installations de stockage, influencent l'ampleur de la croissance fongique

et de la contamination par les aflatoxines. Diener *et al.* (1986), ont déclaré que si la teneur en humidité des graines d'arachide dépassait 9 % à une humidité d'équilibre de 80 et 90 %, les risques d'invasion par *Aspergillus flavus* augmentaient considérablement (Ibiam et Egwu, 2011).

Les cacahuètes sont des substrats importants pour la croissance et production d'aflatoxine par différents membres d'*Aspergillus* section Flavi : *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. arachidicola* et *A. minisclerotigenes*. Le sol sert de réservoir pour l'inoculum primaire d'*A. flavus* et *A. parasiticus*, et les gousses d'arachide sont en contact direct avec les populations du sol de champignons aflatoxigènes (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2013).

II. Moisissures

1. Généralités

Les moisissures sont des champignons microscopiques, ubiquistes, eucaryotes, hétérotrophes, pluricellulaire, filamenteux, sans organisation tissulaire et qui peuvent se reproduire soit sexuellement soit de façon asexuée (Nishio *et al.*, 2008). L'appareil végétatif (le thalle), est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés (hyphes mycéliens) (figure 2).

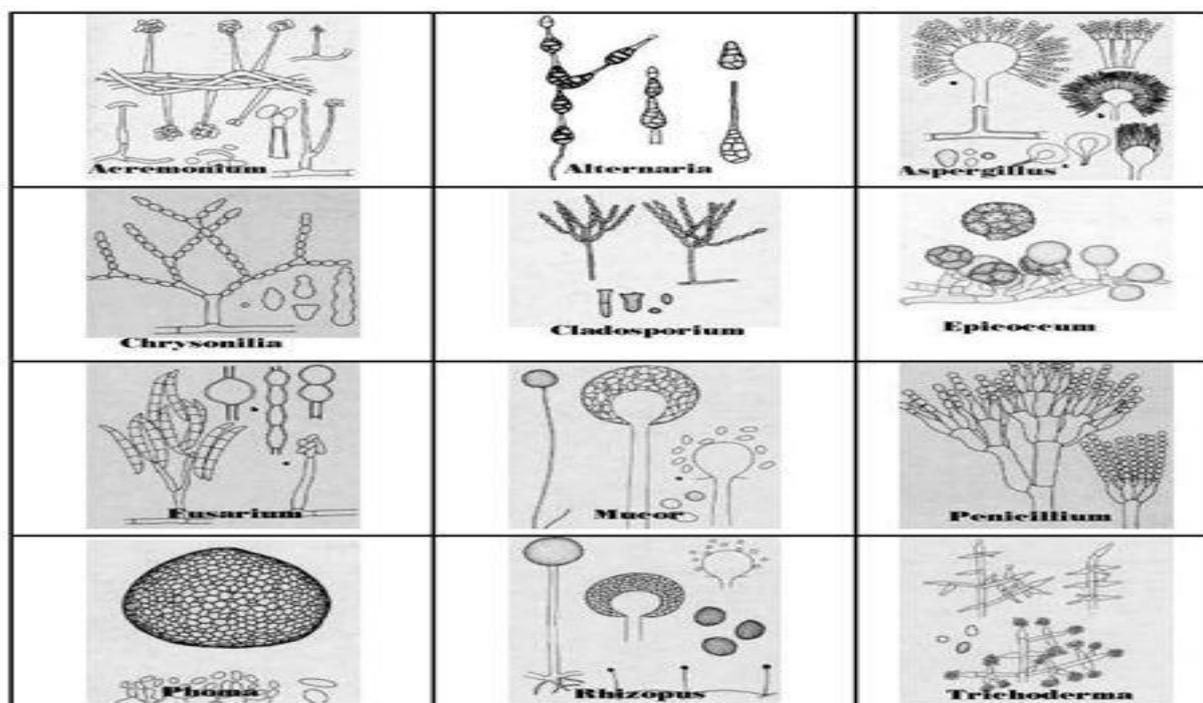


Figure 02 : Quelques champignons filamenteux (Lecomte, 1997).

Dans les conditions environnementales appropriées, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu et chargé de spores de couleur variée (vert, jaune, blanc, noir, gris...). En raison de la structure filamenteuse du thalle qui les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides ; les moisissures peuvent alors acidifier, décolorer, fermenter et altérer la qualité organoleptique des aliments. Les moisissures regroupent des milliers d'espèces. Ces champignons produisent des spores qui sont invisibles à l'œil nu et qui peuvent passer, chez la plupart des espèces, en suspension dans l'air. Elles peuvent également élaborer des substances chimiques susceptibles de demeurer à l'intérieur des spores, ou d'être libérées dans les matériaux qu'elles colonisent ou encore d'être libérées dans l'air ambiant (D'Halewyn, 2002).

2. Classification

La classification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères morphologiques (structure du mycélium), et au mode de reproduction (sexuée ou asexuée), pour définir les grandes classes de moisissures (figure 3). On différencie ainsi quatre subdivisions selon les modalités de reproduction sexuée : les *Mastigomycotina* (*Chytridiomycotina*), les *Zygomycotina*, les *Basidiomycotina* et les *Ascomycotina*. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée *Deuteromycotina* ou Fungi imperfecti (Heritage *et al.*, 1996 ; Leveau et Bouix, 1993).

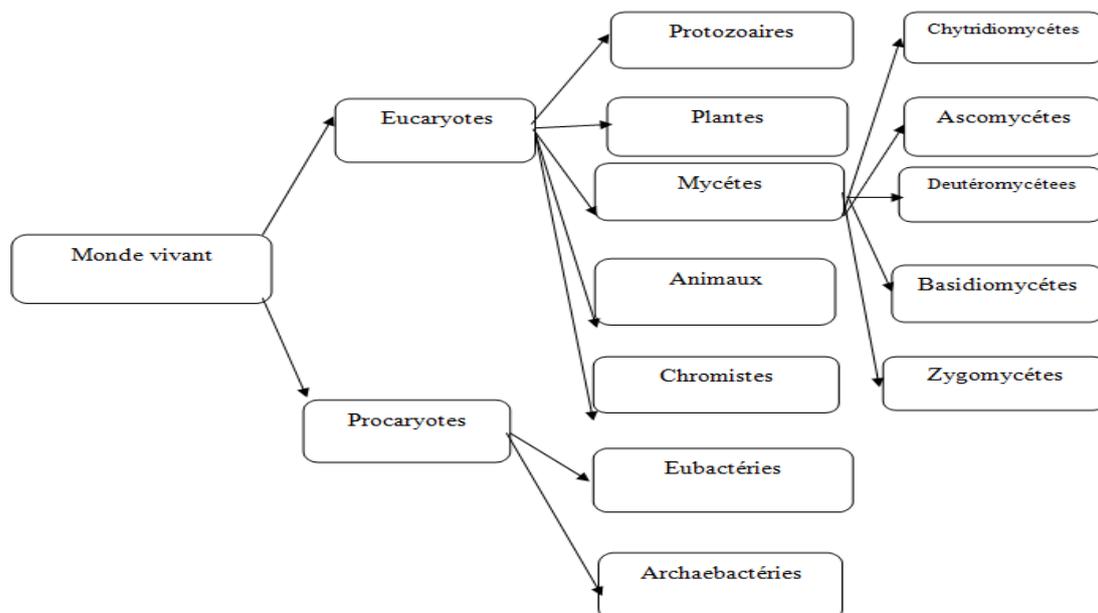


Figure 03 : Classification des mycètes dans le monde vivant (Blackwell *et al.*, 2012).

Les *Deuteromycotina* ne sont pas une division véritable, mais un groupe dans lequel sont réunies les espèces qui n'ont pas de reproduction sexuée ou, que l'on ne connaît pas encore. Le tri est en cours, et les organismes qui y sont classés trouvent peu à peu leur place chez les *Basidiomycotina* et les *Ascomycotina* (Branger *et al.*, 2007).

3. Cycle de vie des moisissures

Le cycle de vie des moisissures en milieu externe débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance (figure 4). En fait, la germination se déclenche par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphes, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produisant des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées (Chabasse *et al.*, 2002).

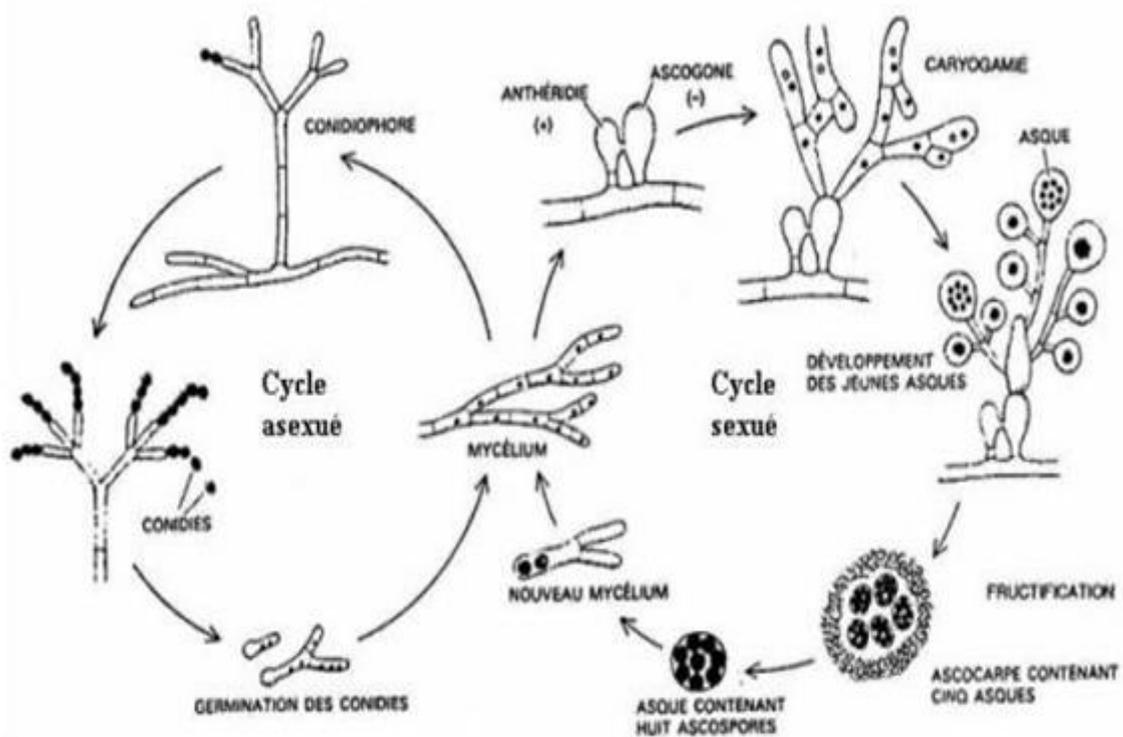


Figure 04 : Cycle de vie de moisissures (Roquebert, 1997).

La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleurs, de dimension et de formes relativement constantes ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique. Le diamètre des structures fongiques de reproduction varie entre 2 et 200 µm (Stetzenbach et Buttner, 2000).

4. Types de moisissures

4. 1. Les moisissures du champ

Les principaux genres sont : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* et *Fusarium*. Ces moisissures peuvent survivre pendant des années dans la graine sèche. Parmi les quatre genres, la toxicité du *Fusarium spp* présente un grand risque pour la santé humaine et animale. Les espèces de ce genre contaminent diverses cultures, principalement le maïs, le blé, le mil et le sorgho, ainsi que des plantes ligneuses. Le genre *Fusarium* est considéré comme "champignon des champs", qui secrète sa toxine lorsque les conditions lui deviennent favorables (Atoui, 2006 ; FAO, 1984).

4. 2. Les moisissures de stockage

Les principaux genres inclus dans cette catégorie sont : *Aspergillus* et *Penicillium*. Le premier genre est considéré comme champignon d'entreposage, bien que la contamination débute fréquemment dans les champs. Le genre *Fusarium* (champignon des champs) peut apparaître durant le stockage avec un taux d'humidité élevé et une température basse. Presque tous les champignons des stocks envahissent d'abord, et de préférence, le germe des grains, ce qui a pour effet immédiat la réduction du pouvoir germinatif.

Les différents facteurs environnementaux, la nature du substrat, le degré de contamination initial, ainsi que les modes de stockage, ont une incidence très importante sur les dégâts causés par le développement fongique, la production des mycotoxines, et la perte de qualité des grains (Atoui, 2006 ; FAO, 1984).

5. Les moisissures toxigènes

Les mycotoxines sont principalement synthétisées par cinq espèces toxigènes champignons microscopiques : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Fusarium* et *Alternaria* (Gauthier, 2016).

5.1. Genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* croissent plutôt en milieu chaud et humide, comme dans les zones tropicales de la planète. Lorsqu'elles colonisent des cultures d'oléagineux (maïs, arachides, noix, amandes, pistaches) ou de céréales, les *Aspergillus* élaborent des aflatoxines, des ochratoxine, de la stérigmatoystine...Les spores sont formées dans une zone caractéristique de cette moisissures apparaissant comme une chevelure ou une pomme d'arrosoir plus ou moins arrondie, de couleur verte, brune ou noire (Dragacci *et al.*, 2011).

5.2. Genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* fait partie des champignons filamenteux appartenant au phylum des Ascomycètes (Pitt, 1987). Il est saprobe mais il peut devenir parasite en présence d'humidité au cours du stockage. Les *Penicillium* sont ubiquistes et polyphages, pouvant être responsables à la dégradation de plusieurs substrats. Ils sont des contaminants répandus dans le sol ainsi que dans divers substrats organiques notamment les céréales, les arachides, les produits laitiers. Ils sont également des contaminants communs de laboratoires. Les *Penicillium* spp. se développent, principalement, dans des milieux humides avec une activité d'eau très élevée et des températures plus basses que celles favorisant la croissance des *Aspergillus* (Houissa, 2020).

5.3. Genre *Fusarium*

Ce genre, décrit pour la première fois en 1809, regroupe des espèces telluriques saprophytes et des pathogènes de plantes. Ces organismes sont également impliqués en pathologie humaine, causant des mycotoxicoses et des infections qui peuvent être locales ou disséminées. Très cosmopolites, on trouve les *Fusarium* dans les zones tropicales, les régions tempérées, les zones désertiques, montagneuses et même arctiques (Hocquette *et al.*, 2005).

5.4. Genre *Alternaria*

Alternaria est une moisissure extrêmement banale, saprophyte, notamment des céréales avec des concentrations plus élevées les jours de forte chaleur. C'est la spore dominante dans les climats chauds et secs. Les activités humaines, comme les pratiques agricoles, notamment la moisson, qui interviennent sur la végétation, peuvent être à l'origine de variations saisonnières des taux de nombreuses spores dans l'air. Ainsi, les concentrations de spores d'*Alternaria*, saprophyte des céréales, sont plus élevées pendant la moisson (Caillaud *et al.*, 2020).

III. Mycotoxines

1. Généralité

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison. Il s'agit donc de substances chimiques toxiques, issues du métabolisme secondaire de certaines moisissures qui se développent sur une large variété de denrées alimentaire. Les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes, la zéaralénone, la patuline (Portelli, 2005).

Les mycotoxines peuvent être classées en polycétoacides, terpènes, cyclopeptides et métabolites azotés selon leur origine biologique et leur structure. On peut aussi classer les mycotoxines plus simplement selon leurs principaux effets toxiques (Afssa, 2009). Elles sont produites sur une large variété de denrées alimentaires avant, pendant et après récolte. En raison de la diversité de leurs effets toxiques et de leurs propriétés synergiques, les mycotoxines présentent un risque pour le consommateur d'aliments contaminés (Yiannikouris et Jouany, 2002).

2. Principales mycotoxines

Actuellement, plus de 400 mycotoxines sont connues et possèdent de grandes variations dans l'origine fongique, la structure, la fonction et l'effet biologique, mais seules quelques-unes d'entre elles semblent avoir un effet significatif sur la santé et l'agriculture (tableau3), (Daou *et al.*, 2021 ; Alban, 2016).

Tableau 3. Principales mycotoxines, leurs champignons producteurs et les types d'aliments concernés (Daou *et al.*, 2021).

Mycotoxine	Production de champignons	Denrées alimentaires concernées
Aflatoxine B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i>	Blé, maïs, riz, arachides, noix, épices, graines oléagineuses et graines de coton
Aflatoxine M1	Métabolite de l'aflatoxine B1	Lait et produits laitiers
Ochratoxine A	<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium cyclopium</i>	Blé, orge, avoine, fèves de cacao, grains de café, fruits et jus de fruits, fruits secs et vin
patuline	<i>Penicillium expansum</i> <i>Byssochlamys nivea</i> <i>Aspergillus clavatus</i>	Fruits et jus de fruits, fromage et blé
Trichothécènes	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium langsethiae</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i>	Maïs, blé, orge, avoine, céréales et aliments pour animaux
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium incarnatum</i>	Maïs, blé, orge, seigle et aliments pour animaux
Fumonisine B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Maïs, riz, blé, sorgho, orge et avoine

3. La mycotoxinogénèse

La mycotoxinogénèse, c'est-à-dire les conditions de synthèse et d'excrétion des mycotoxines, est un phénomène d'une grande complexité. Mais les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique. Les conditions optimales de la toxinogénèse dépendent d'une combinaison de facteurs conduisant à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée alimentaire, nous pouvons distinguer les facteurs intrinsèques qui sont liés à la souche fongique elle-même et les facteurs extrinsèques qui sont constitués par l'ensemble des conditions écologiques (Royer & Tap, 2003).

4. Conditions de croissance fongique et de production des mycotoxines

4.1. Température

La température optimale de toxinogénèse est généralement voisine (légèrement inférieure) de la température optimale de croissance des souches productrices (Samson, 1991). La patuline, l'acide pénicillique et l'Ochratoxine sont élaborés à des températures généralement inférieures à celles de la croissance. Les températures optimales de croissance et de production d'aflatoxines chez *A. flavus* sont proches. Pour d'autres toxines (trichothécène et zéaralénone), la température optimale de toxinogénèse peut être jusqu'à 10°C inférieure à celle de la croissance (Samson, 1991).

4.2. pH

Concernant le pH, les champignons sont encore beaucoup plus tolérants que les bactéries alors que ces dernières exigent souvent des pH compris entre 7 et 8. La plupart des champignons se développent normalement à des pH compris entre 3 et 8, leur croissance optimale étant généralement obtenue pour des pH compris entre 5 et 6. En raison de leur acidité (pH < 6) de nombreux aliments tels que les légumes, les fruits et la viande sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne (Guezlane-tebibel *et al.*, 2016).

4.3. Présence d'oxygène

Généralement, la production de mycotoxines est plus sensible à la variation de la composition de l'air que la croissance fongique. La réduction de la pression partielle en oxygène jusqu'à moins de 1% et l'accroissement des concentrations de CO₂ empêchent l'élaboration des mycotoxines (Keller *et al.*, 1997 ; Cairns-Fuller *et al.*, 2005). Par contre, *F. roseum*, dans une atmosphère confinée, peut encore élaborer de la zéaralénone. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse (Lahouar, 2016).

4.4. Activité en eau (Aw)

L'activité hydrique nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszcwicz, 2001). Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une Aw de 0,80 ; par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque l'Aw est $\geq 0,85$ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005). De même, *Fusarium graminearum* peut

se développer dans des substrats dont l'activité hydrique est de l'ordre de 0,93. La production de déoxynivalénol, est importante pour des Aw de 0,995 (Ramirez *et al.*, 2006).

4.5. Nature du substrat

Les nutriments, dont les champignons ont besoin pour pousser, sont élémentaires et proviennent de matières organiques en décomposition. Les enzymes catabolisent le substrat pour former les nutriments requis, qui seront ensuite absorbés au travers des membranes cellulaires des moisissures. Ces molécules sont des sucres simples, des fractions d'amidon, des peptides et des substances carbonées (comme les acides aminés). Les moisissures ne sont pas capables de proliférer sur n'importe quel substrat. Dans certaines conditions, elles peuvent se développer sur des matières inorganiques (polymères, métaux), à condition que celles-ci présentent des résidus de matières organiques. La toxigenèse dépend fortement de la composition chimique du substrat sur lequel le champignon prolifère. Par exemple, l'acide phytique (souvent présent dans les céréales) diminue la synthèse d'Aflatoxines (AF) par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*. À l'inverse, certains acides aminés (comme la proline) stimulent cette production (Gauthier, 2016).

5. Les effets des mycotoxines sur santé humaine

La palette des effets néfastes des mycotoxines est très étendue : des effets cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction, immunomodulateurs, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotoxiques, hépatotoxiques ont été rapportés (tableau 4).

Tableau 4 : mycotoxines et leurs principaux effets (Brochard & Le Bacle, 2009).

Mycotoxines	Effets avérés ou suspectés
Aflatoxines	Hépatotoxiques- Mutagène – Cancérogène - Immunotoxique
Ochratoxine A	Néphrotoxiques – Cancérogène - Mutagène
Fumonisine B1	Neurotoxiques - Hépatotoxique – Immunotoxique - Cancérogène
Trichothécènes	Hématotoxique – Immunotoxiques – Toxicité cutanée
Zéaralénone	Estrogénique – Effets sur la fertilité et la reproduction
Patuline	Neurotoxiques – Mutagène (in vitro)
Citrinine	Néphrotoxiques
Pénitrème A	Neurotoxiques
Stéigmatocystine	Hépatotoxique – Cancérogène

Les mycotoxines sont généralement thermostables et ne sont pas détruites par les procédés habituels de cuisson et de stérilisation. Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et

leur lipophilie en font des toxiques capables de persister dans l'organisme en cas d'expositions répétées et rapprochées (Afssa, 2009).

6. Détection de mycotoxines

6. 1. Les méthodes physico-chimiques

Les méthodes chromatographiques appliquées à la séparation et la mesure ont un principe commun qui fait intervenir une différence de comportement des constituants d'un mélange (comprenant l'analyte) entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les techniques chromatographiques sont principalement utilisées pour doser les mycotoxines : la chromatographie en couche mince (CCM), la chromatographie liquide haute performance (CLHP)... (Afssa, 2009).

Au début des années 70, la chromatographie sur couche mince (CCM) est reportée par l'équipe de Gimeno comme la première technique reconnue et recommandée pour la détection des mycotoxines. Cette technique permet, en jouant avec les solvants d'élutions, de séparer des mycotoxines en fonction de leurs rapports frontaux (Rf) différents. Cette méthode a été utilisée pour des analyses unidimensionnelles et bidimensionnelles. Les techniques de détection varient en fonction des mycotoxines à détecter : les substances colorées sont visualisées sous la lumière visible. Les mycotoxines fluorescentes sont examinées sous la lumière UV. Tandis que pour les toxines non fluorescentes des réactifs de pulvérisation spécifiques chromogéniques ou fluorogéniques sont utilisés pour relever des couleurs ou de la fluorescence (Gargouri, 2020).

La méthode de chromatographie sur couche mince (CCM) représente une méthode simple, rapide et économique pour la détection semi-quantitative de nombreuses mycotoxines. L'utilisation de plaques CCM est devenue la technique la plus largement utilisée pour la détection, la quantification et la confirmation de l'identité. Bien que l'avantage le plus important de cette technique étant le faible coût de chaque analyse, l'étape de quantification souffre d'un niveau élevé de variation. Elle est classée comme méthode semi-quantitative en raison de la détection visuelle des taches développées sur une plaque. En comparaison de CCM (Sokolović et Šimpraga, 2006).

-la phase stationnaire est généralement constituée de liant fixé sur de la silice (greffée ou non) étalé en fine épaisseur (inférieure au 1/2 mm) le plus souvent sur une plaque de verre mais aussi sur d'autres supports (aluminium...) de dimension variable (20 x 20 cm, 20 x 10 cm, 10 x 10cm).

-la phase mobile est soit apolaire à base de mélanges de solvants et alcools, soit polaire car constituée de mélanges d'alcools, eau ou autres préparations aqueuses), selon le type de phase stationnaire (respectivement plutôt polaire ou plutôt apolaire) (Afssa, 2009).

La chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) couplée aux détecteurs à ultraviolet (UV), à barrette diode (photo diode array [PDA]) ou à fluorescence (FD) est actuellement la technique de référence la plus couramment employée pour l'analyse des mycotoxines des produits agricoles. Des réactifs spécifiques de dérivation des mycotoxines non-fluorescents ont été développés pour former les dérivés fluorescents. La détection par fluorescence est la meilleure alternative face au manque de sensibilité de la détection UV. Grace au couplage avec la fluorimétrie, elle peut atteindre des limites de détection très faibles (de l'ordre de 10 ng/kg). Elle est combinée à une étape préalable de purification (SPE, IAC).

A côté de ces techniques chromatographiques traditionnelles, les analystes ont recours à la MS qui s'est principalement développée comme une technique de confirmation des mycotoxines. De nos jours, la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS et surtout LC-MS/MS) est de plus en plus utilisée pour quantifier plusieurs mycotoxines ou métabolites associés (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2002; Spanjeret *et al.*, 2008; Monbaliuet *et al.*, 2010) car elle permet une détection simultanée de plusieurs composés (Huybrechts *et al.*, 2013).

6.2. La méthode ELISA

La méthode ELISA (Enzyme Linked Imuno-Adsorbent Assay) est une méthode immuno-enzymatique. Elle est très populaire actuellement en raison de son coût relativement faible et de son application facile (Turner *et al.*, 2009).

Cette technique repose sur la réaction Antigène-Anticorps et donc sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, monoclonaux ou polyclonaux, dirigés vers la mycotoxine. La réaction est compétitive ou non selon que le réactif est limitant (méthode indirecte) ou en excès (méthode directe). La technique la plus utilisée est la méthode indirecte, par compétition, car elle s'applique aux antigènes de toute taille, y compris les haptènes. Dans ce cas, la détection est une réaction colorimétrique avec une enzyme liée à l'anticorps.

La méthode ELISA utilisée généralement en mode compétitif se décompose en quatre étapes :

- Séparation de l'échantillon ;
- Extraction de la molécule à l'aide d'un solvant adéquat ;

- Fixation des toxines à un support solide greffé avec des anticorps nécessite de coupler les mycotoxines à une protéine pour les rendre antigéniques et permettre la liaison antigène-anticorps ;

- Utilisation d'un réactif qui se fixe sur les anticorps libres. Une étape de lavage est réalisée pour éliminer les molécules non fixées. Lors de l'ajout du substrat, une réaction colorimétrique se produit en présence du conjugué.

L'intensité de la coloration diminue, généralement, de façon non linéaire quand la concentration en toxine augmente dans l'échantillon. Ceci nécessite l'établissement préalable d'une courbe d'étalonnage et des étapes de dilution de l'échantillon pour se placer dans la gamme de concentration et de coloration exploitable. Toutefois, de nombreux échantillons peuvent être analysés en parallèle en ayant recours à des microplaques (Heit, 2015).



Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'étude mycologique et mycotoxicologique d'arachide et a été réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie (Université de Ghardaïa).

1. Etude mycologique

1.1 Echantillonnage

Nous avons collecté quelques échantillons des fruits d'arachide connus sous le nom (cacahouète Sebseb) à partir de certains points de vente à Metlili (commune de la wilaya de Ghardaïa). Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier stériles



Figure 05 : photo d'arachide

1.2. Isolement de la flore fongique

L'isolement a été effectué à partir d'arachide sur milieux de culture : Sabouraud (SAB) et gélose de la pomme de terre dextrose (PDA) (Compositions en annexe)

Après stérilisation à 121°C pendant 20 minutes, ces milieux ont été refroidis à 45°C et coulés dans des boîtes de pétri stériles. L'ajout du chloramphénicol (filtré à 0,22 µm) à ces milieux après leurs stérilisations est indispensable pour inhiber les bactéries contaminantes.

1.2.1 Désinfection de la surface des graines d'arachide

Afin d'éviter l'apparition d'autres micro-organismes parasites, les graines d'arachide de chaque échantillon ont été désinfectées en surface par l'eau de javel 0,5% puis dans l'éthanol pendant une minute, puis deux rinçages à l'eau distillée stérile. Les graines ont été séchées avec du papier filtre stérile pour être ensuiteensemencées.

- Trois méthodes sont utilisées pour isoler les moisissures des échantillons d'arachide considérés :

1.2.2. Méthode directe

Sous conditions aseptiques, les graines d'arachide désinfectées, ont été placées directement à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA et Sabouraud (2 boîtes pour chaque milieu) à raison de trois d'arachide par boîte. L'ensemble est incubé à 28 °C pendant 4 à 6 jours (Figures 6 et 7).



Figure 06 : Ensemencement des graines d'arachide sur milieu Sabouraud et PDA
(Photographie originale)

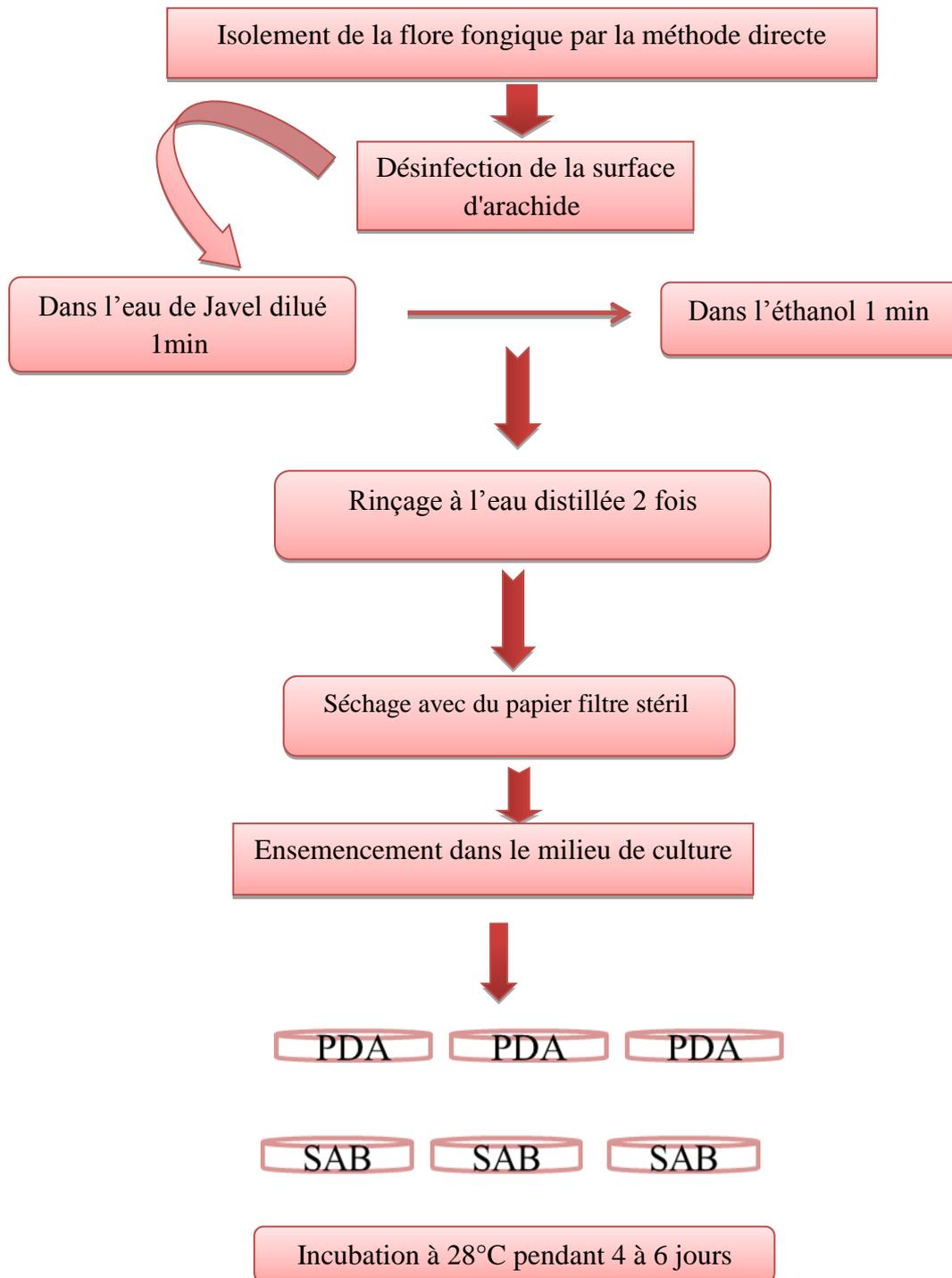


Figure 07 : Techniques d'isolement des souches fongiques à partir d'arachide par la méthode directe.

1.2.3. Méthode indirecte

Les isollements des moisissures à partir des échantillons d'arachide ont été réalisés selon la technique des suspension-dilutions et l'ensemencement a été effectué sur milieux gélosés

PDA et Sabouraud additionnés du chloramphénicol. Ainsi, après désinfection et broyage de l'échantillon d'arachide un gramme de ce-ci est ajouté à un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique. Le mélange est homogénéisé par vortex pendant 15 min et sert à former une solution mère (10^{-1}). 1 mL de cette solution après homogénéisation est ajouté à 9 mL d'eau physiologique pour former la dilution 10^{-2} et ainsi de suite. Cent microlitres de chaque dilution sont étalés sur la surface des boîtes de Pétri contenant les milieux PDA et Sabouraud. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 4 à 6 jours à l'obscurité. Deux répétitions sont réalisées par dilution.

Des colonies caractéristiques aux moisissures ont été isolées et conservées pour une identification.

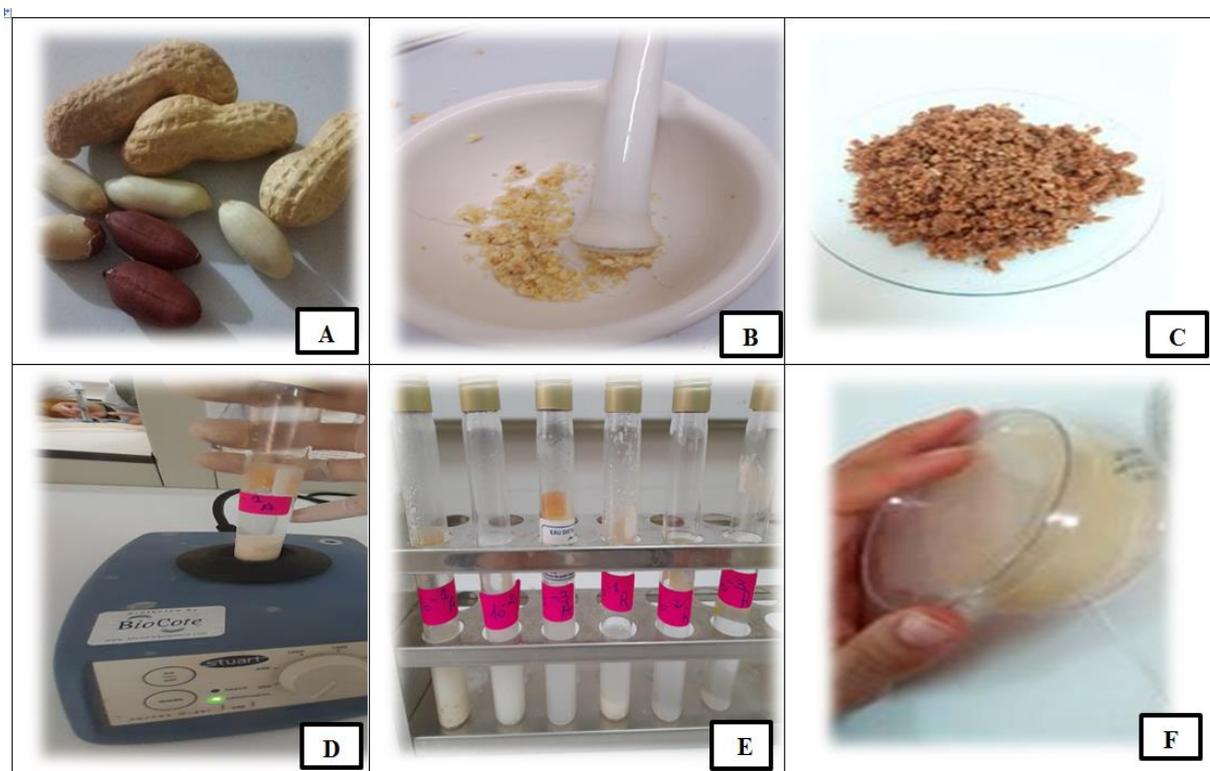


Figure 08 : Les étapes de l'isolement de la flore fongique à partir d'arachide. **A)** échantillon d'arachide, **B)** broyage de l'échantillon, **C)** arachide moulue, **D)** agitation, **E)** dilutions décimales, **F)** ensemencement.

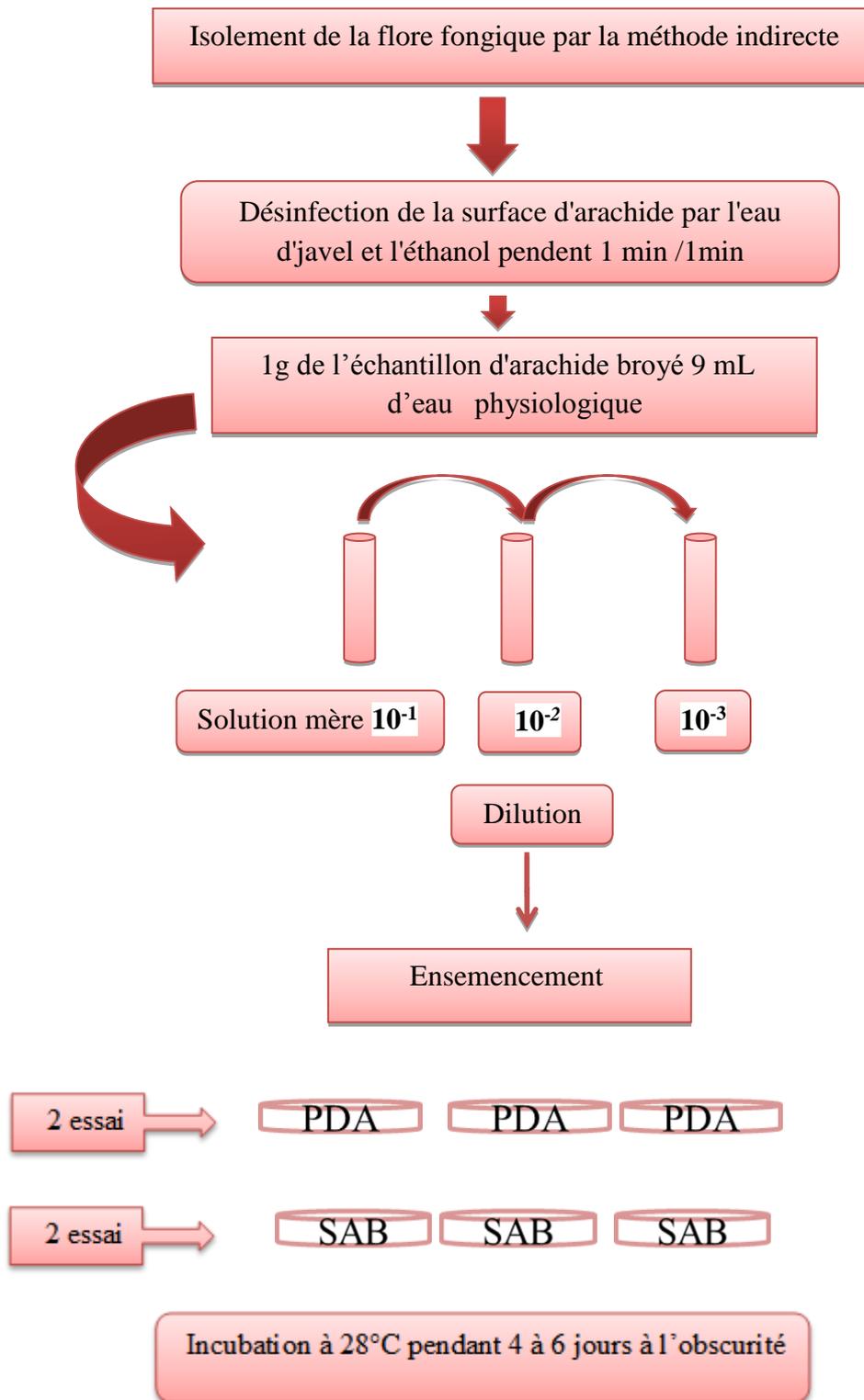


Figure 09 : Techniques d'isolement des souches fongiques à partir d'arachide par la méthode indirecte.

1.2.4. Méthode de filtre en papier stérile (FPS)

Dans des conditions aseptique trois moitiés de graines d'arachide sélectionnées au hasard ont été mises dans une boîte de Pétri stériles tapissée du papier filtre stérile imbibé avec l'eau physiologique Stériles. La même opération a été répétée pour deux boîtes autres. Les boîtes ainsi préparées ont été incubées à 28°C l'obscurité pendant 4 à 6 jours.



Figure 10 : Isolement par la méthode de filtre en papier stérile (Photographie originale).

1.3. Purification

Des observations quotidiennes ont été effectuées dès l'apparition de mycélium des isolats. Chaque mycélium développé a été repiqué, à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée au centre de boîte de Pétri contenant le milieu PDA, puis incubé à 28 °C pendant 6 jours.

Les souches pures obtenues ont ensuite été conservées à +4 °C (Tidjani *et al.*, 2019).

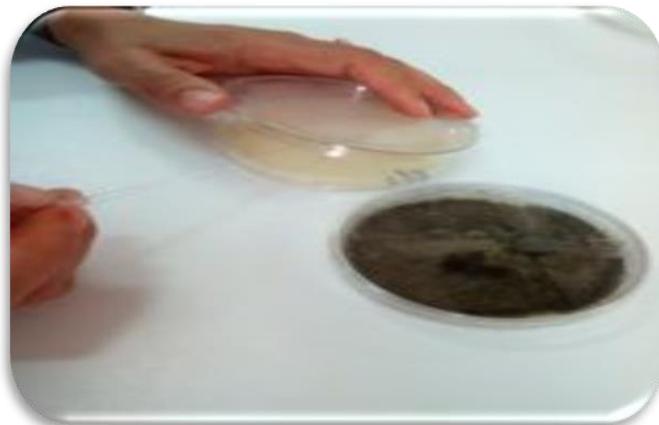


Figure 11 : purification des isolats (photo originale).

1.4. Identification des isolats

1.4.1. Identification macroscopique

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés s'est faite tout d'abord à l'œil nu, puis en utilisant une loupe binoculaire.

Les caractères étudiés sont :

Au niveau du mycélium : La couleur et la texture du thalle, la couleur du verso de la colonie, le contour de la colonie et la vitesse de croissance apicale.

Au niveau des spores : La densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux poudreux), la présence de pigment diffusible et les exsudats (Djossou *et al.*, 2011).

1.4.2. Identification microscopique

En utilisant une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Les prélèvements sont déposés sur une lame « mouillées » avec une goutte d'eau puis on pose une lamelle de couverture. On procède ensuite à l'examen au microscope photonique (X100, X400).

2. Etude mycotoxilogique

2.1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat (Arachide)

50g de l'échantillon d'arachide a été finement broyé dans des conditions stériles. Sous hotte chimique, le broyat est ajouté à 100 ml d'un mélange des solvants (méthanol _ acétate d'éthyle V/V). Le mélange a été agité pendant 10 min et la phase liquide a été séparée du culot par filtration. Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant d'acétate d'éthyle au liquide récupéré à chaque fois après filtration. Les filtrats obtenus ont été mélangés puis concentrés à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3ml (Zuber *et al.*, 1987) (Figure 12 et 13). L'extrait obtenu a été étalé sur un gel d'agar à 2 % et à pH 7 coulé préalablement sur boîtes de pétri puis solidifié. Les boîtes ont été laissées entrouvertes afin de permettre l'évaporation du solvant d'extraction, puis elles ont été gardées à 4°C pendant 24 heures. Après la diffusion des mycotoxines à l'intérieur de la gélose, la surface a été essuyée à plusieurs reprises avec du papier filtre imbibé d'hexane pour éliminer les macromolécules de la matière organique. Le gel d'agar a été ensuite découpé en petits carreaux et mélangé avec 100 ml d'acétate d'éthyle. Le tout a été agité pendant 10 minutes

puis filtré. Le liquide obtenu a été ensuite additionné à 50 et 30 ml d'acétate d'éthyle et agité à chaque fois qu'il est récupéré après filtration. Les filtrats obtenus ont été également mélangés puis concentrés à l'aide d'un l'évaporation jusqu'à un volume de 2 à 3 ml.

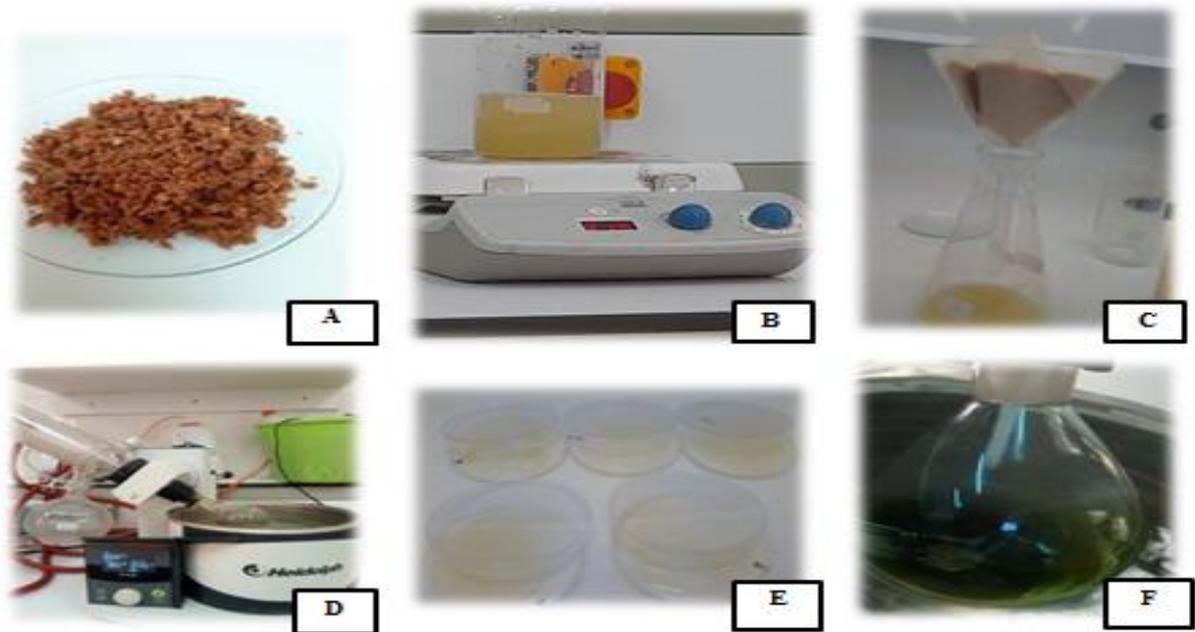


Figure 12 : Détection des mycotoxines au niveau du substrat. **A)** Broyage d'arachide, **B)** Agitation (solvants+ l'arachide), **C)** Filtration du mélange, **D)** Evaporation de l'extrait, **E)** Diffusion des mycotoxine, **F)** Extrait.



Figure13 : Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide (Zuber *et al.*, 1987).

2.2. Production des mycotoxines par fermentation

La production des mycotoxines par les souches isolées a été mise en évidence par une extraction et purification à partir d'une culture de fermentation, suivie par la détection qualitative des mycotoxine par chromatographie sur couche mince (CCM).

2.2.1. Préparation des milieux de fermentation et ensemencement

Deux milieux de culture : CYA (Czapek Yeast extract Agar) et CAM (Coconut Agar Medium) ont été choisis pour leur faveur à la production des mycotoxines (Rojas *et al.*, 2005 ; Pamel *et al.*, 2010). Les milieux ont été préparés, stérilisés puis coulés sur boites de Petri à raison de 2 boites pour chaque milieu et chaque souche. L'ensemencement des souches fongiques sur CAM et CYA est fait par point centrale (une souche par boite). Les boites sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

2.2.2. Extraction des mycotoxines

Après 7 jours d'incubation, quatre rondelles (6mm de diamètre) de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boite de Pétri, les carottes découpées sont introduites dans des tubes Eppendorf de 2ml.

L'extraction des mycotoxines est réalisée par l'addition de 1ml de méthanol, toute en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une micropipette puis injecté dans un autre tube Eppendorf, le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et à une température de +4°C pour une analyse ultérieure.

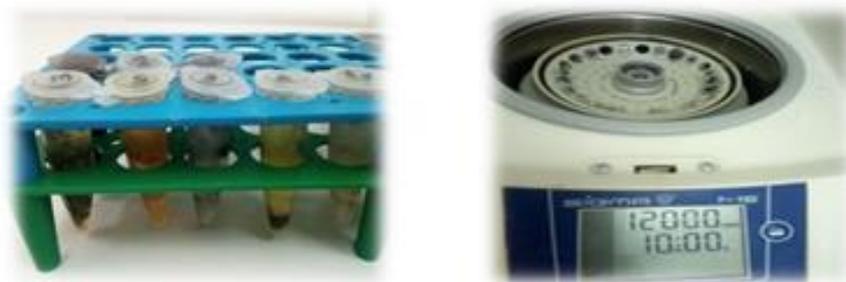


Figure14 : Détection des mycotoxines au niveau des isolats.

3. Séparation des taches par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est basée essentiellement sur des phénomènes d'adsorption et sur le principe de la capillarité. Lorsque la plaque sur laquelle on dépose l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la

phase stationnaire. Mais, en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile et des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant. La CCM constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle a été faite sur une plaque de silicagel sur laquelle est déposé un spot entre (15µl à 20µl). La plaque a été ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'éluion constitué de toluène, acétate d'éthyle, l'acide formique de volume (50:40:10, v/v/v) Chloroforme-acétone (90:10, v/v) respectivement.

Après migration et évaporation du produit d'éluion à sec, la plaque a été examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques.

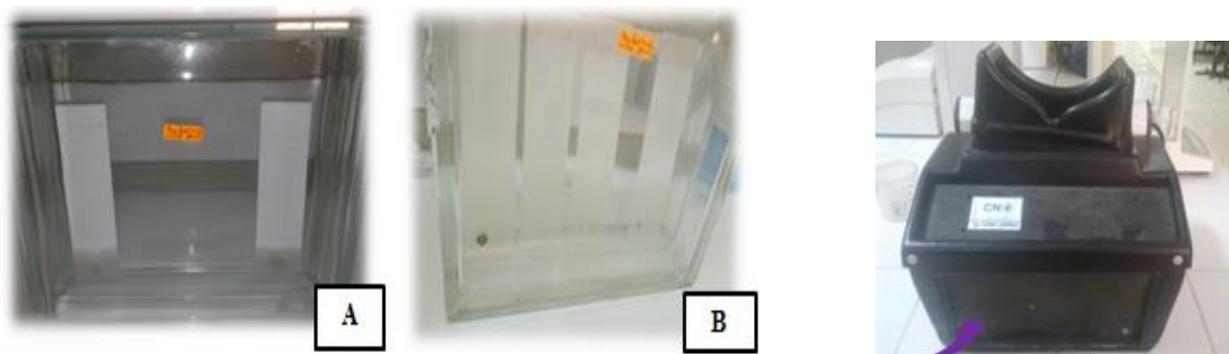


Figure 15 : Préparation de la CCM, (A) Eluant : Chloroforme-acétone ; (B) Eluant : toluène, acétate d'éthyle et acide formique.

4. Détection des mycotoxines par révélations chimiques

La détection de zones chromatographiques sur un chromatogramme repose généralement sur l'absorption ou l'émission de rayonnement électromagnétique dans la gamme visible ou ultraviolette. Certains composés sont visiblement colorés, d'autres absorbent la lumière UV ou présentent fluorescence lorsqu'elle est excitée par les UV ou la lumière visible, mais la plupart nécessitent une visualisation à l'aide d'une pulvérisation ou trempage de réactif. En raison de la nature inerte des adsorbants couramment utilisés en couche mince, les réactions chimiques peuvent être effectuées in situ sans détruire les caractéristiques de l'adsorbant ou du liant (Wall, 2000).

4.1. Détection des mycotoxines séparées à partir du substrat

Les chromatogrammes de CCM obtenu après la séparation de l'extrait du substrat sont traités comme suit : Une plaque de CCM a été pulvérisée avec une solution de nitrate d'argent (1g

dans 100ml d'eau) et l'autre a été pulvérisée avec une solution de chlore de fer (1g dans 100ml d'eau), (Scott *et al.*, 1970).

4.2. Détection des mycotoxines séparées à partir des isolats fongiques

Les chromatogrammes sont pulvérisés avec de l'acide sulfurique concentré à 20 % dans du méthanol. Après la pulvérisation, la plaque a été chauffée dans le four à 110 °C pendant 10 minutes (Bilan, 2015).



Figure 16 : pulvérisation des plaques.

Les couleurs des différentes mycotoxines sous lumière UV et après pulvérisation avec les réactifs colorants sont consignées dans le tableau 05.

Tableau 05 : Couleurs avant et après traitement chimique (tableau de référence), (Bilan, 2015).

Mycotoxines	Fluorescence à 365 nm	Réactifs de couleur Sous UV
		H ₂ SO ₄
Aspertoxine	Jaune clair	Vert- Jaune
Ochratoxine B	Blue	Sans couleur
Acide sécalonique D	Foncé	Brun clair
8 α -(3-méthylbutyryloxy)- 4 β , 15- diacétoxyscirp- -9-èn-3 α -ol	---	Gris Plomb
Aflatoxine G1	Verte	Vert Gris
Aflatoxine B1	Bleue	Green-Grey
6 β -Hydroxyroscnonolactone	---	Rouge-Orange
Ochratoxine A	Vert	Sans couleur
Acide cyclopiazonique	Foncé	Rouge-Marron
Zéralénone	Bleu Pale	Jaune Clair
Stéigmatocystine	Orange	Vert Gris



Résultats

Résultats

1. Etude mycologique des graines d'arachide

1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminantes les échantillons d'arachide

Au total 7 isolats fongiques ont été obtenus après incubation de 6 jours à 28 C°. Après la reconnaissance des genres, 3 isolats ont été affiliés au genre *Aspergillus* sp. Tandis que 4 ont été affilié au genre *Penicillium* sp. (Tableau 6 et figure 17)

Tableau 06 : les isolats fongiques obtenus à partir d'arachide

L'échantillon	Nombre d'isolats	Genres	Pourcentage
Arachide	3	<i>Aspergillus</i> sp.	43%
	4	<i>Penicillium</i> sp.	57%

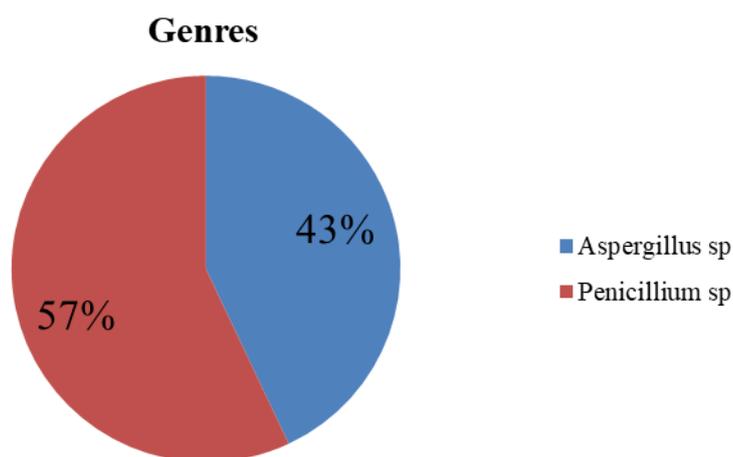


Figure 17 : Affiliation des isolats fongique au genres.

Concernant la répartition des isolats selon les milieux de culture, 2 isolats appartenant au genre *Penicillium* ont été trouvés sur milieu PDA et 5 isolats, dont 4 appartenant au genre *Aspergillus* et un au genre *Penicillium* ont été trouvés sur milieu Sabouraud.

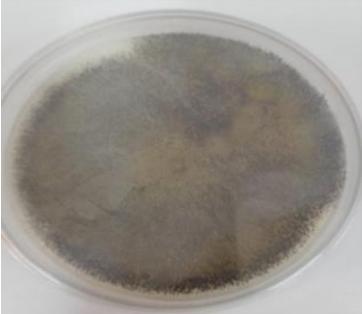
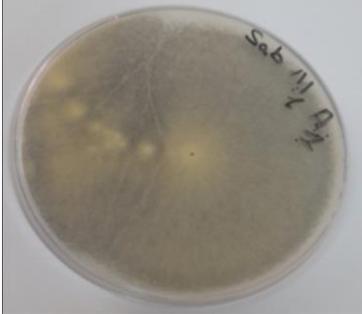
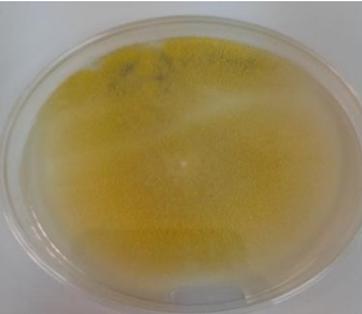
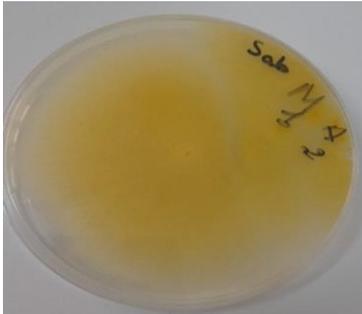
D'après la répartition des isolats selon les méthodes isolats, la méthode directe a permis d'obtenir deux isolats appartenant au genre *Aspergillus* et un genre *penicillium* et pour la méthode indirecte, 3 isolats du genre *penicillium* et un genre *Aspergillus*

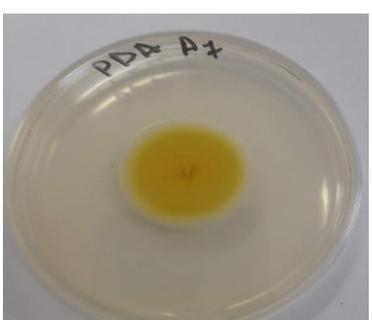
1.2. Identification des souches fongiques isolées

1.2.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée pour les sept souches par observation, à l'œil nu, des caractères cultureux (aspect de la colonie, couleur, verso de la colonie, et la vitesse de la croissance). Les résultats obtenus, ont été rassemblés dans le tableau 07.

Tableau 07 : Caractéristiques macroscopiques des souches isolées d'arachide.

Surface (Recto de la boîte)	Verso de la boîte	Aspect macroscopique
		Recto : Grande colonie duveteuse à poudreuse, croissance rapide, couleur noir. Verso : noir jaunâtre. <i>Aspergillus sp. 1</i>
		Recto : Grande colonie poudreuse, croissance rapide, tout d'abord jaune puis verdâtre, verso : jaune. <i>Aspergillus sp.2</i>
		Recto : Aspect laineux, d'abord gris claire puis jaune claire, verso : marron puis jaune. <i>Penicillium sp. 1</i>

		<p>Recto : Aspect laineux, d'abord marron puis jaune, verso : marron foncé puis jaune.</p> <p><i>Aspergillus sp. 3</i></p>
		<p>Recto : Aspect laineux, d'abord gré foncé, verso : marron puis jaune.</p> <p><i>Penicillium sp. 2</i></p>
		<p>Recto : Aspect velouté. , d'abord vert foncé puis jaune, verso : jaune.</p> <p><i>Penicillium sp.3</i></p>
		<p>Recto : Colonie poudreuse, d'abord verre bleuâtre, verso : jaune pâle, croissance lente.</p> <p><i>Penicillium sp.4</i></p>

1.2.2. Identification microscopiques

Toutes les moisissures isolées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100. Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau 8.

Parmi les 7 isolats, 3 ont présenté les caractéristiques suivantes :

- ✓ Conidiophore : long, hyalin.
- ✓ Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules.
- ✓ Spores : claires, globuleuses ou ovoïdes, plus ou moins colorées ou noirâtres selon les isolats.
- ✓ Tête aspergillaire: bisérée, radiée.

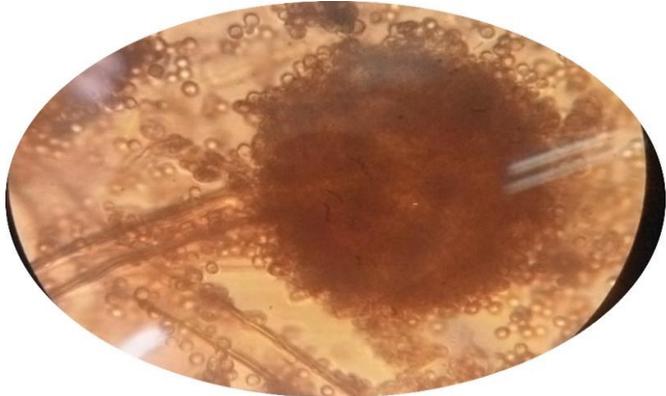
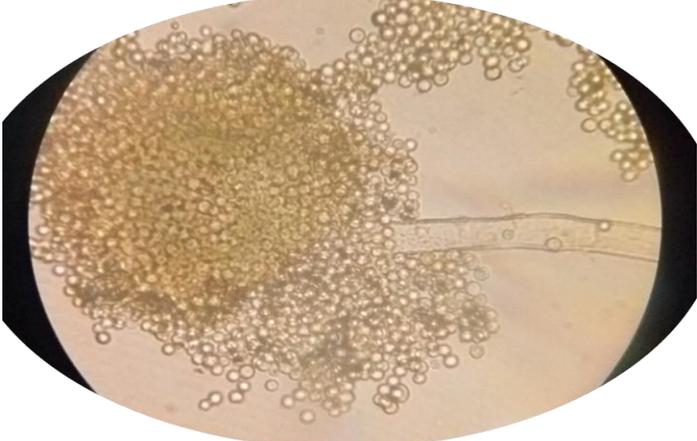
Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*.

Les 4 autres isolats présentent les caractéristiques suivantes :

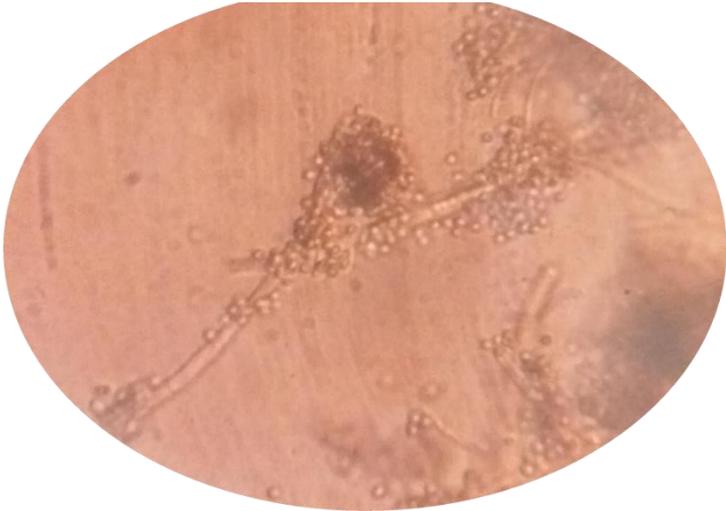
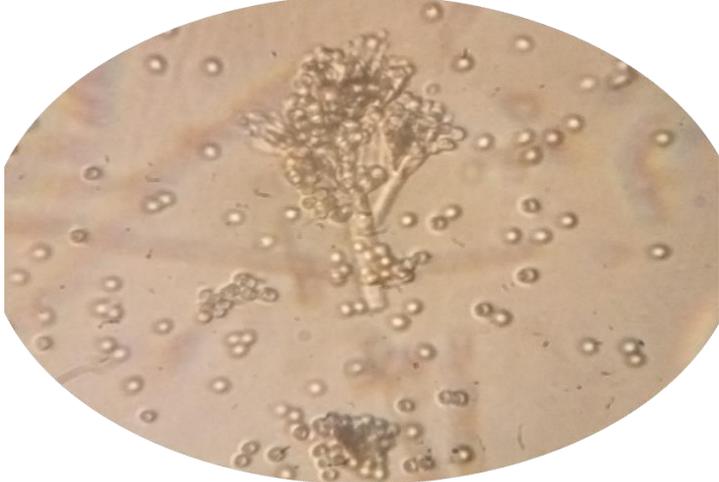
- ✓ Mycélium cloisonné, conidiophores simples ou ramifiés, parfois regroupés terminés par un pénicille.
- ✓ Phialidie donne naissance à des spores.
- ✓ Pénicille constitué de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium*.

Tableau 08 : Caractères microscopiques des souches isolées d'arachide.

Aspect microscopique X100	Identification de la souche
	<p style="text-align: center;"><i>Aspergillus</i> sp. 1</p>
	<p style="text-align: center;"><i>Aspergillus</i> sp.2</p>

	<p><i>Penicillium sp. 1</i></p>
	<p><i>Aspergillus sp. 3</i></p>
	<p><i>Penicillium sp. 2</i></p>

	<p><i>Penicillium sp.3</i></p>
	<p><i>Penicillium sp.4</i></p>

2. Etude mycotoxique d'arachide

L'utilisation de la CCM permet la détection des taches fluorées sous UV (365 nm) qui représentent probablement des mycotoxines.

Le Rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

$$Rf = \frac{\text{Hauteur de la tache}}{\text{Hauteur du front du solvant}}$$

2.1. CCM de l'extrait obtenu à partir du substrat

La chromatographie sur couche mince a été effectuée pour l'extrait d'acétate d'éthyle obtenu à partir de substrat (arachide) en utilisant deux systèmes de solvant : Toluène- acétate d'éthyle- acide formique v/v/v (50:40:10) et Chloroforme-acétone v/v (90:10). Les résultats

ont montré plusieurs taches visualisées sous UV à 365 nm avec différents RF et certaines entre elles sont fluorées (tableau 9 et 10).

Tableau 09 : Visualisation sous UV des taches séparées par CCM à partir de l'extrait de substrat (Arachide)

Taches séparées par CCM		
Systèmes des solvants	Toluène- acétate d'éthyle- acide formique v/v/v (50:40:10)	Chloroforme-acétone v/v (90:10)

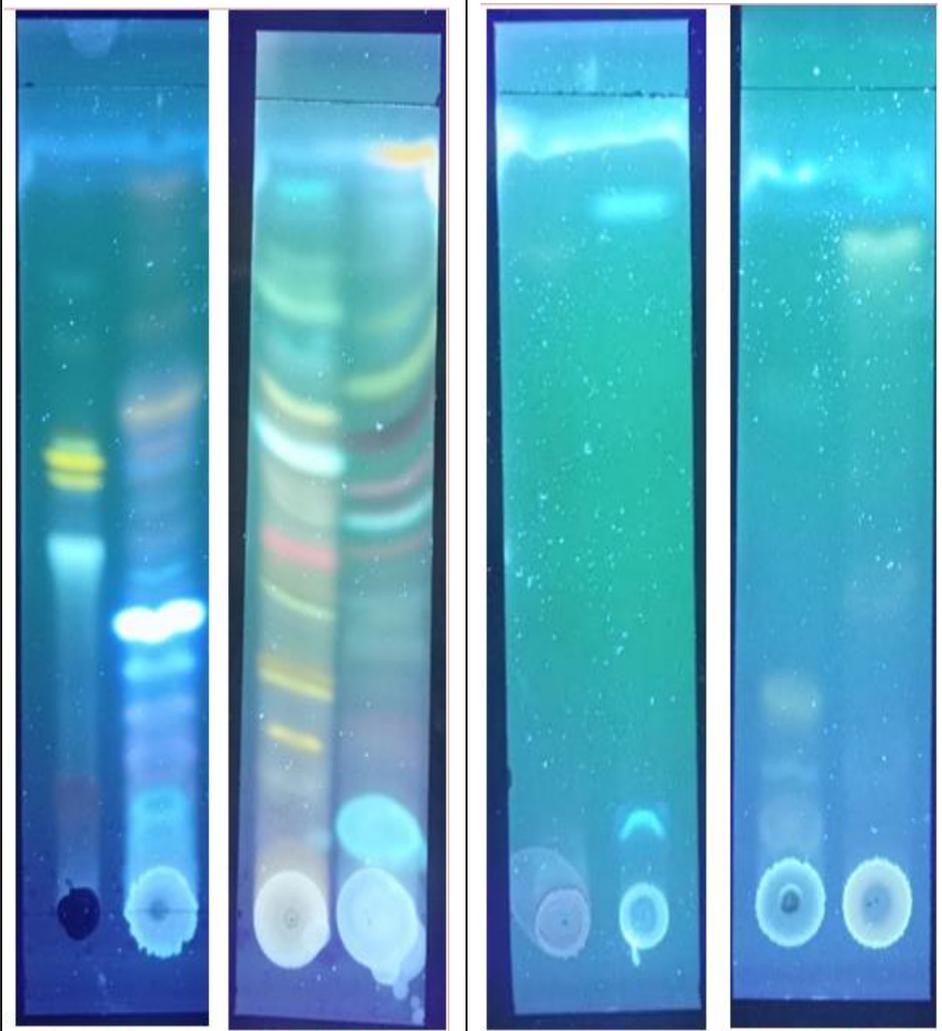
Tableau 10 : Les valeurs Rf des spots séparés par CCM.

Système de solvant	Numéro des taches	Couleur des taches sous Longueur d'onde 365 nm	Rf
Plaque1 : chloroforme acétone v/v (90:10)	1	Rose	0.87
	2	Vert bleuâtre	0.51
	3	Rouge	0.45
	4	Rouge	0.37
	5	Bleu verdâtre	0.15
Plaque2 : Toluène- acétate d'éthyle-acide formique V/V (50:40:10)	1	Vert jaunâtre	0.5
	2	Jaune verdâtre	0.31

2.2. CCM des extraits obtenus par les isolats après fermentation sur milieux solides

Les extraits méthanolique obtenu après fermentation de chaque isolat sur milieux de culture solides (CYA et CAM) ont été l'objet d'une chromatographie sur couche mince. Les résultats obtenus ont montré beaucoup de taches colorées avec différents Rf sous UV notamment dans les extrait des souches : *Aspergillus* sp.1 ; *Aspergillus* sp.2 ; *Penicillium* sp.1 ; *Aspergillus* sp.3. Certaines tâches sont fluorées (Tableaux 11 et 12).

Tableau 11 : Chromatographie sur couche mince présentant les taches séparées à partir des extraits des isolats fongiques.

Extraits des isolats séparés par CCM								
	A	B	C	D	A'	E	F	G
Milieu de fermentation	CYA				CAM			
Systèmes des solvants	Toluène- acétate d'éthyle-acide formique V/V (50:40:10)				Chloroforme-acétone v/v (90:10)			

A: *Aspergillus* sp.1; B: *Aspergillus* sp.2; C: *Penicillium* sp.1; D: *Aspergillus* sp.3; A': *Aspergillus* sp.1'; E: *Penicillium* sp.2; F: *Penicillium* sp.3; G: *Penicillium* sp.4

Tableau 12 : Les valeurs Rf des spots séparés à partir des extraits des isolats par la CCM

Souches	Numéro des taches	Couleur des taches sous Longueur d'onde 365 nm	Rapport frontal Rf
<i>Aspergillus</i> sp. 1	1	Maroon	0.14
	2	Bleu	0.44
	3	Jaune	0.52
	4	Jaune	0.55
	5	Vert	0.57
<i>Aspergillus</i> sp. 2	1	Marron	0.14
	2	Move	0.16
	3	Bleu	0.19
	4	Bleu Claire	0.23
	5	Bleu	0.29
	6	Bleu	0.34
	7	Bleu	0.40
	8	Bleu	0.49
	9	Bleu clair	0.59
	10	Move	0.55
<i>Penicillium</i> sp. 1	1	Orange	0.60
	1	Jaune	0.16
	2	Orange	0.22
	3	Orange	0.28
	4	Orange	0.29
	5	Rouge	0.28
	6	Bleu	0.44
	7	Bleu	0.55
	8	Vert	0.62
	9	Vert	0.75
<i>Aspergillus</i> sp. 3	10	Bleu	0.88
	1	Bleu	0.11
	2	Rose	0.45
	3	Rose	0.48
	4	Rose	0.49
	5	Bleu	0.59
	6	Vert	0.66
7	Jaune	0.73	
<i>Aspergillus</i> sp. 1'	1	Vert jaunâtre	0.10
	2	vert jaunâtre	0.16
	3	vert jaunâtre	0.25

<i>Penicillium</i> sp. 2	1	vert jaunâtre	0.80
	2	Vert	0.88
<i>Penicillium</i> sp. 4	1	Bleu	0.12
	2	Bleu	0.87

3. Essai de la détection des mycotoxines par révélations chimiques

En raison du manque des mycotoxines standards (Aflatoxines et Ochratoxines) au niveau de notre laboratoire nous n'avons pas pu détecter les mycotoxines par la méthode de comparaison des RF après séparation par CCM. Pour cela, nous étions obligés de penser à une autre méthode disponible. La méthode des révélations chimiques par pulvérisation des chromatogrammes obtenus après CCM est une méthode connue pour son utilisation dans La seconde moitié du vingtième siècle. Elle consiste à contrôler les changements des couleurs sous lumière visible et/ou Ultraviolet au niveau des taches entre avant et après leurs pulvérisations par des réactifs chimiques. Le principe est la réaction des fonctions de la mycotoxine avec le réactif chimique utilisé ce qui donne une couleur différente.

3.1. Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir de l'extrait du substrat

En se basant sur les travaux de (Scott *et al.*, 1970 ; Jens *et al.*, 1989 ; Saini *et al.*, 2012 Penugonda *et al.*, 2010 ; Bilan, 2015), nous avons utilisé le nitrate d'argent et le chlore de fer pour pulvériser les plaques CCM contenant la séparation des extraits obtenus à partir du substrat d'arachide. Et malheureusement les résultats n'ont pas montré des données exploitables.

3.2. Révélation chimique des chromatogrammes CCM obtenus à partir des extraits des isolats fongiques

Les chromatogrammes obtenus après séparation des extraits fongiques par CCM ont été pulvérisés par l'acide sulfurique concentré à 20 % dans du méthanol. Les plaques ont été par la suite chauffées dans le four à 110 °C pendant 10 minutes et visualisées sous UV.

Nous avons essayé de reconnaître les mycotoxines suite aux changements des couleurs compatibles aux données consignées dans le tableau de référence (chapitre matériel et méthodes).

3.2.1. La plaque n° 1 contenant les extraits des souches *Aspergillus* sp.1 et *Aspergillus* sp.2

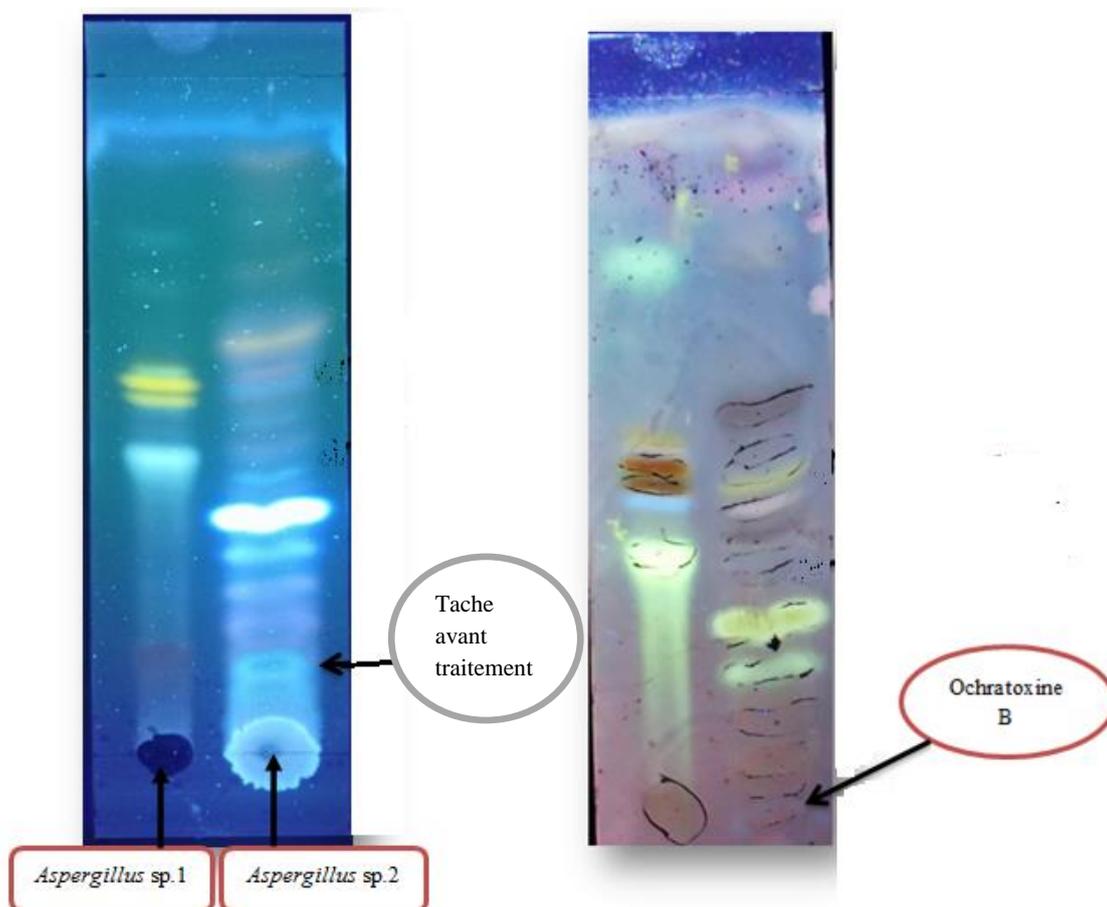


Figure 18 : Chromatogramme présentant la réaction des taches avant et après traitement Chimique pour les extraits des souches *Aspergillus* sp. 1 et *Aspergillus* sp. 2

D'après la figure 18, La visualisation sous UV avant traitement des taches de l'extrait de la souche *Aspergillus* sp.2, a montré la présence de 11 taches distinctes. Après le traitement chimique, nous avons constaté la perte de couleur au niveau de la tache 3 ($R_f = 0,11$) ce qui correspond probablement à l'ochratoxine B (Figure 18).

Concernant les taches de l'extrait de la souche *Aspergillus* sp.1, n'ont pas révélé des changements des couleurs compatibles.

3.2.3. La plaque n° 3 contenant les extraits des souches *Penicillium* sp. 3 et *Penicillium* sp. 4

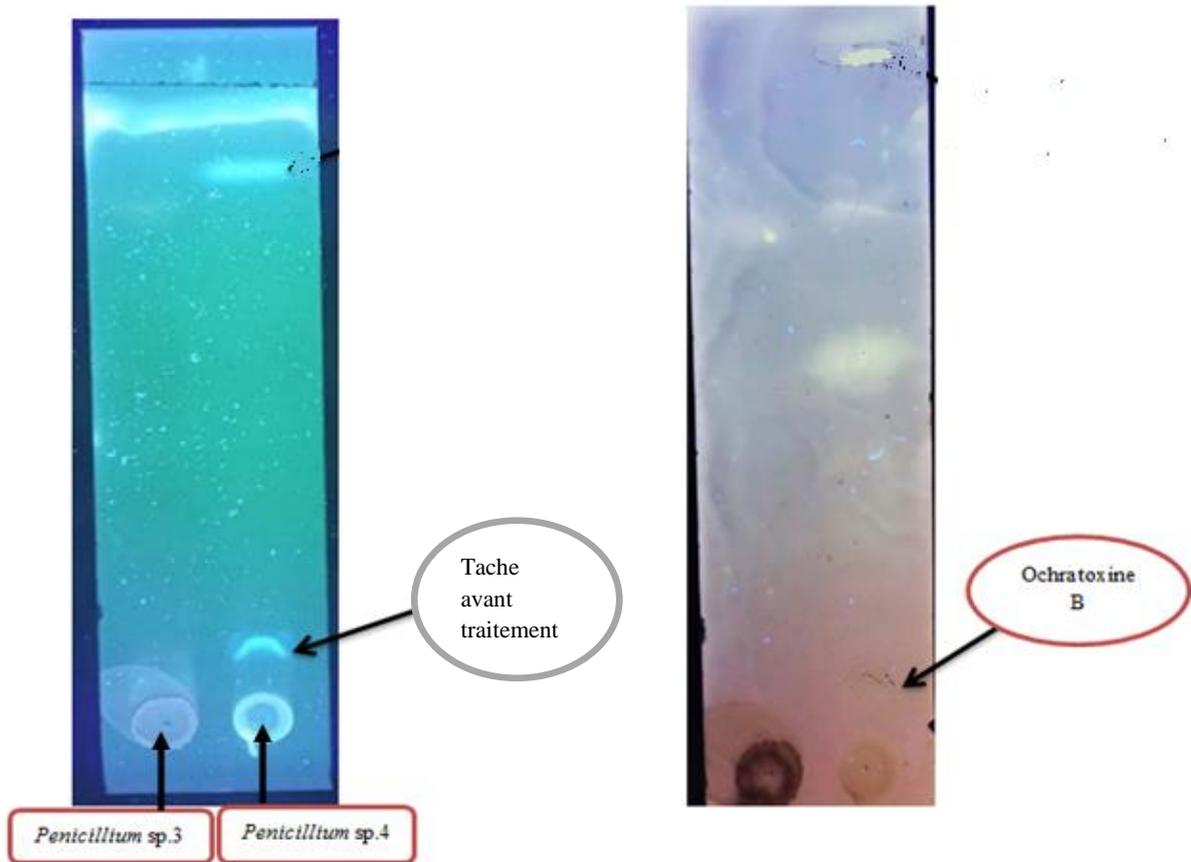


Figure 20 : Chromatogramme présentant la réaction des taches avant et après traitement Chimique pour les extraits des souches *Penicillium* sp. 3 et *Penicillium* sp. 4.

Selon la figure 20 une tache de l'extrait de la souche *Penicillium* sp. 4 ($R_f = 0.12$) a perdu sa couleur bleu ce qui correspond à la présence probablement de la mycotoxine Ochratoxine B.

3.2.4. La plaque n° 4 contenant les extraits des souches *Penicillium* sp. 2 et *Aspergillus* sp.1'

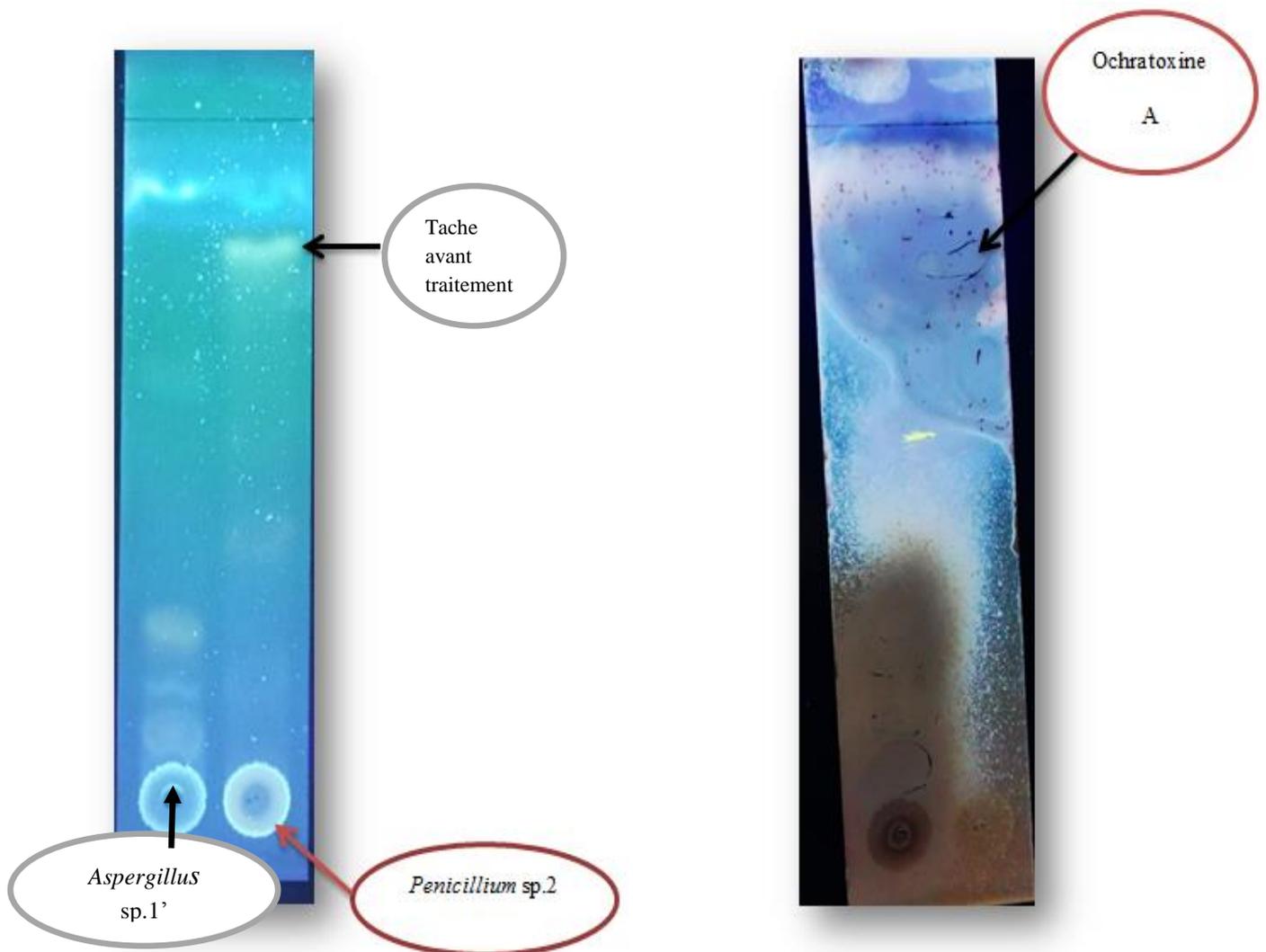


Figure 21 : CCM présentant un spot de mycotoxine produites par *Penicillium* sp.2

La figure 21 montre que l'extrait de la souche *Penicillium* sp. 2 contient une tache ($R_f=0,88$) avec une couleur verte a perdu sa couleur ce qui nous indique probablement de la présence d'Ochratoxine A.



Discussion

Discussion

La contamination fongique des denrées alimentaires peut causer la dépréciation de leur valeur nutritionnelle ainsi que la détérioration de leurs qualités organoleptiques. S'il s'agit de souches toxigènes de moisissures et si les conditions environnantes sont favorables, il peut y avoir également synthèse et accumulation de mycotoxines (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994).

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).

Notre étude a pour objectif d'isoler des moisissures à partir d'arachides destinées à la commercialisation dans la commune de Metlili, Wilaya de Ghardaïa et de rechercher leur pouvoir mycotoxinogènes. La variété d'arachide utilisée pour l'isolement est celle connue sous le nom de (cacahouète Sebseb). Les milieux de culture utilisés sont PDA et Sabouraud. Il faut rappeler que ces deux milieux sont connus pour leur utilisation afin d'isoler des moisissures contaminantes des aliments (Chabasse *et al.*, 2002 ; Compaore *et al.*, 2016). Les résultats de l'isolement ont montré que les échantillons sont contaminés par les moisissures. Il n'y a que 7 isolats fongiques ayant eu le pouvoir de croissance ce qui représente un taux faible. Il faut noter ici que le développement des moisissures dépend énormément de la température et du degré d'humidité et des conditions environnementales (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2013).

L'étude macro et micromorphologique des isolats fongiques a montré leur affiliation aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. L'activité de l'eau optimale pour la plupart des espèces fongiques est comprise entre 0,85 et 0,99. Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont la capacité de se multiplier à des A_w inférieurs à 0,75 et pour une température de 25°C. Elles font partie des espèces xérophiles que l'on retrouve dans les produits pauvres en eau (céréales, arachide...), notamment au moment de la phase de stockage (Lesage-Meesen *et al.*, 1998).

La température optimale de croissance de la plupart des espèces d'*Aspergillus* se situe entre 25 et 40°C. La plupart des *Aspergilli* poussent à 20-25°C. Les espèces thermophiles, comme *Aspergillus fumigatus*, se développent au-delà de 35°C et parfois même jusqu'à 57°C. C'est pourquoi ils se développent très bien dans les produits alimentaires dits « secs » comme les arachides (Badillet *et al.*, 1987). Les moisissures peuvent croître dans une gamme de pH allant de 3 à 8, leur pH optimal de croissance étant plutôt situé entre 5 et 6. Les aliments (en

particulier les fruits et les légumes) ayant un pH inférieur à 6, se trouvent être des cibles privilégiées de l'infestation fongique (Alban, 2016).

L'étude mycotoxicologique a consisté une extraction des mycotoxines qui s'est faite à partir du substrat d'arachide et à partir des isolats fongiques obtenus. La culture des isolats a été faite sur milieux solides CYA (Czapek Yeast extract Agar) et CAM (Coconut Agar Medium). Le choix de ces milieux est basé sur leur pouvoir de favoriser la production des mycotoxines notamment les Aflatoxines et les Ochratoxines (Davis *et al.*, 1987 ; Pitt et Hocking, 1997 ; Matmoura *et al.*, 2019). La séparation des extraits a été effectuée par la méthode de chromatographie sur couche mince. Il est à noter que cette dernière est une technique de chromatographie utilisée pour séparer les mélanges non volatils. Elle est souvent utilisée pour identifier les mycotoxines. En CCM, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est de polarité variable, ce qui permet de séparer les mycotoxines (Elsaadani, 2019). Les systèmes des solvants utilisés sont le (Chloroforme- Acétone 90/10 ; V/V) et (Toluène-éthyle acétate-acide formique, 50:40:10). Ces systèmes sont connus pour leur utilisation de séparation des mycotoxines notamment pour les aflatoxines et les Ochratoxines successivement (Lafont et Lafont, 1980).

Les résultats ont montré plusieurs taches séparées avec des rapports frontaux différents. Certaines entre elles se sont avérées fluorescentes sous UV à 365 nm. La détection des taches probablement contenant des mycotoxines a été effectuée par la méthode des révélations chimiques. Il est à signaler à ce point, que cette méthode a été adoptée en raison du manque des mycotoxines standards au niveau de notre laboratoire. Plusieurs chercheurs de par le monde ont l'utilisé pour la détection des mycotoxines notamment avant l'apparition des techniques récentes (Scott *et al.*, 1970 ; Jens *et al.*, 1989 ; Saini *et al.*, 2012 Penugonda *et al.*, 2010 ; Bilan, 2015).

En ce qui concerne les extraits du substrat, les révélations chimiques n'ont pas donné des résultats exploitables. Cependant, le traitement chimique des chromatogrammes des extraits fongiques a révélé la présence probable de trois types des mycotoxines. Il s'agit d'Aflatoxine G1 à partir de l'isolat *Aspergillus* sp. 2, l'Ochratoxine A à partir de l'isolat *Penicillium* sp. 2 et Ochratoxine B à partir des isolats *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 3 et *Penicillium* sp. 4. Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines (AFs), les ochratoxines (OTA) et la patuline, ont une incidence économique et sanitaire. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (Smith

et Moss, 1985). Le genre *Penicillium* est capable de produire des ochratoxines même à des températures n'excédant pas 5°C (OMS, 1980). L'arachide est connue comme le substrat de prédilection des *Aspergillus* notamment le groupe flavus producteurs d'aflatoxines. Si ce produit est destiné à l'alimentation humaine, il représente manifestement une menace directe pour le consommateur. S'il est destiné à la trituration pour la production d'huile, c'est dans les tourteaux que se concentrent les aflatoxines. Les tourteaux étant utilisés dans l'alimentation des animaux, la conséquence prévisible de cette contamination est le passage dans les produits d'origine animale, notamment le lait, de quantités non négligeables de ces toxines (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994).



Conclusion

Conclusion

Notre étude a porté sur la recherche des moisissures dans les arachides destinées à la consommation au niveau de la commune de Metlili et la mise en évidence de leur pouvoir mycotoxinogènes. La collection des échantillons a été faite à partir de quelques points de vente au niveau de la commune. L'isolement de la flore fongique a été effectuée sur les milieux de culture PDA et Sabouraud. Après l'incubation à 28 C° pendant 6 jours nous avons pu isoler 7 isolats fongiques. Ces isolats ont été affiliés aux genres *Aspergillus* (43%) et *Penicillium* (57%) après avoir étudiés macro morphologiquement et micro morphologiquement. L'étude mycotoxicologique a été entreprise en faisant des extractions directes à partir de substrat d'arachide ou indirecte à partir des isolats fongiques après leurs cultures sur milieux (CYA) et (CAM). Les extraits obtenus ont subi pour leurs séparations des chromatographies sur couche mince. Plusieurs taches ont été séparées. La méthode de révélation chimique a été utilisée pour la détection probable des mycotoxines. Les résultats des révélations chimiques pour les taches des extraits obtenus à partir des isolats ont montré la présence des mycotoxines : Aflatoxine G, Ochratoxine A et Ochratoxine B.

En fin, nous pouvons dire que cette étude a montré une fois de plus que les aliments en générale et les arachides spécialement destinées pour la consommation ne sont pas dépourvues des mycotoxines et nous pouvons citer comme perspectives :

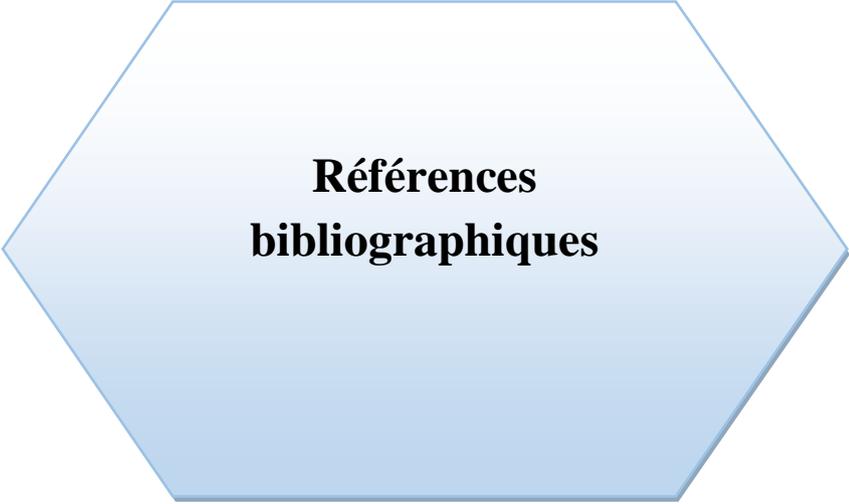
- Faire des études pour améliorer les méthodes de traitement qui permettent la décontamination des aliments.
- Il est important d'étudier l'effet de la compétition entre les champignons toxinogènes sur la croissance et la production des mycotoxines et l'usage des agents antifongiques

Comme recommandations on peut citer :

- Il est recommandé de respecter les règles au moment de la récolte, du stockage et du transport des aliments.
- La sensibilisation des gens au danger des moisissures qui affectent les fruits et légumes et les mycotoxines qu'elles peuvent produire.
- La nécessité de sensibiliser les gens de l'abstention à consommer les aliments clairement infectés par les moisissures et à ne pas consommer la partie seime et laisser la partie pourri de l'aliment en croyant que la partie seime ne contient pas la mycotoxine.

« Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison »

Philippus Aureolus



**Références
bibliographiques**

Référence bibliographiques

Abdollahi, O., Tidjani, A., Sawadogo, A., Tarnagda, B., & Idriss, L. (2019). Isolement et caractérisation de souches fongiques à partir de poissons fumés/sèches du lac Fitri au Tchad. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2(4), 155-160.

Aboulhassane, K. (2020). Étude prospective de la flore fongique de cinq plages du Maroc. (Doctoral dissertation).

Afssa. (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final*, 1-308.

Akcali, I D., A. Ince, and E. Guzel. (2006). Selected physical properties of peanuts. *International Journal of Food Properties*, 9(1) : 25–37.

Alban, G. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé.

Aoues, K., Boutoumi, H., & Benrima, A. (2017). État phytosanitaire du blé dur locale stocké en Algérie. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 286-296.

Atayde, D., Reis, A., Godoy, J., Zorzete, P., Reis, M., & Corrêa, B. (2012). Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. *Crop Protection*, 33, 7-12.

Atoui, K. (2006). Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius* : étude moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat, institut national polytechnique de Toulouse, 1-10p.

Badillet G, de Briève C, Guého E. (1987) Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, dans : Atlas clinique et biologique, volume II. Paris : Edition VARIA.

Basse, B. (2020). Valorisation de la graine d'arachide broyée : rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).

Bennett, W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 497-516.

Bilan, A. (2015). The separation and detection of several mycotoxines by thin-layer chromatography.

Blackwell M., Vilgalys R., James T-Y., Taylor J-W. (2012). *Fungi*. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.

<http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Boli, A., Camara, F., Toka, M., Koussemon, M., & Koffi-Nevry, R. (2018). Validation de la méthode de détermination d'aflatoxine B1 dans les pâtes d'arachide vendues sur les marchés de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(2), 796-803.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Edition : Educagri. p : 38.

Caillaud, D., Muti, D., & Soumare, D. (2020). Moisissures extérieures et santé respiratoire. *Revue Française d'Allergologie*, 60(4), 233-236.

Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin a production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of Applied Microbiology* 99, 1215-1221.

Chabasse, D., Bouchara, P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation*, (25).

Chang, S., Sreedharan, and K. R. Schneider. (2013).peanut and peanut products: A food safety perspective. *Food Control*.

Chapelard-Leclerc, F., Papon, N., Noël, T., Villard, J. (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Française des Laboratoires*, p. 373.

Christian, R. (2013). *Mycologie médicale*. Lavoisier.

Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou, D., & Traore, A. (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 198-210.

Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R. G., Khabbaz, L. R., Ismail, A., & El Khoury, A. (2021). Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agriculture and Food*, 6(1), 416-447.

Davis, N. D., Iyer, S. K. et Diener, U. L. (1987). - Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 1593– 1595.

D'Halewyn M. A., Leclerc J. M., King N., Bélanger M., Legris M., and Frenette Y. (2002). Document synthèse : Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, Consulté 29 Septembre 2014. Lien du site : http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/127_risquesmoisissuresmilieuinterieurresume.pdf

Diener, U.L and Cole, R.J. (1982). Aflatoxins and other Mycotoxinsin peanuts.In: Peanut Science and Technology.Pattee, H. E and Young, C. T (eds) pp486-519. Yakum, Texas U.S.A. American Peanut Researchand Educational Society.

Djossou O., Perraud-Gaime I., Lakhel Mirleau, F., Rodriguez-Serrano G., Karou, G., Niamke S., Ouzari I., Boudabous, A and Roussos, S. (2011). Robusta coffee beans post-harvest

microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. Anaerobe. p : 1-6.

Dragacci, S., Zakhia-Rozis, N., & Galtier, P. (2011). Danger dans l'assiette. Éditions Quæ.

Eke-Ejiofor, J., Kiin-Kabari, B., Chukwu, EC. (2012). Effect of processing method on the proximate, mineral and fungi properties of groundnut (*Arachis hypogea*). Seed Journal of Agricultural and Biological Science, **3**: 257-261.

Elsaadani, M. (2019). Détection des Ochratoxine s A dans la production alimentaire par l'utilisation d'aptacpteur capacitif. Thèse de doctorat. Université de Montpellier, France.

F.A.O. (1984). Pertes de qualité des grains alimentaires après la récolte. Édition ROME, 37, 41- 42 p.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2008). Statistics Food. Production data. Available online at: <http://faostat.fao.org>.

Ferguson, ME., Jarvis, A., Stalker, HT., Williams, DE., Guarino, L., Valls, JF., Pittman, RN., Bramel, PJ. (2005). Biogeography of wild *Arachis* (*Leguminosae*): distribution and environmental characterisation. *Biodiversity and Conservation*, **14**: 1777-1798.

Gadhiya, A., P. K. Borad, and J. B. Bhut. (2014). Effectivness of synthetic insecticides against helicoverpa armigera (hubner) hardwick and spodoptera litura (fabricius) infesting groundnut. *The Bioscan, an International Journal of Life Sciences*, **9**(1): 23-26.

Gargouri, D. (2020). Synthèse de réactifs multifonctionnels et d'analogues de mycotoxine. Application à la détection de mycotoxines dans des solutions alimentaires (Doctoral dissertation, Normandie).

Gauthier, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. *Sciences pharma-ceutiques*.

Guezlane-tebibel, N., Bouras, N., ET Old el hadj, M.D. (2016). Les mycotoxines : un danger de santé public. *Algerian journal of arid environment*, **6**(1), 32-49.

Guezlane-Tebibel, N., Bouras, N., Mokrane, S., Benayad, T., & Mathieu, F. (2013). Aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Annals of Microbiology*, **63**(1), 295-305.

Hanlin, R. T. (1970). Invasion of peanut fruits by *Aspergillus flavus* and other fungi. *Mycopathologia et mycologia applicata*, **40**(3), 341-348.

Heit, S. (2015). Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Heritage, J., Evans, E-G-V., Killington, R-A. (1996). Introductory microbiology. Edition: Cambridge University Press, p: 8-18-23.

Hocquette, A., Grondin, M., Bertout, S., & Mallié, M. (2005). Les champignons des genres *acromonium*, *beauveria*, *chrysosporium*, *fusarium*, *onychocola*, *paecilomyces*, *penicillium*, *scedosporium* et *scopulariopsis* responsables de hyalohyphomycoses. *Journal de Mycologie Médicale*, 15(3), 136-149.

Houissa, H. (2020). Les Mycotoxines du mil : occurrence et flore fongique (Doctoral dissertation, Université Montpellier ; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie).

Huybrechts, B., Tangni, E. K., Debongnie, P., Geys, J., & Callebaut, A. (2013). Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles : une revue. *Cahiers Agricultures*, 22(3), 202-215.

Ibiam, A., & Egwu, N. (2011). Post-harvest seed-borne diseases associated with the seeds of three varieties of groundnuts, (*Arachis hypogaea* L.) Nwakara, Kaki and Campalla. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(4), 598-602.

Ibrahim, H et Ebo, K. (1986) Mycoflora of stored crops from six northern States in Nigeria. National Stored Products Research Institute technical No.1:26.

Juliette, D. E. D. I., Otchoumou, A., & Allou, K. incubation in vitro et in vivo d'œufs d'*achatina fulica*, bowdich, 1820 en présence de souches pures de: *aspergillus niger*, *fusarium oxysporum*, *fusarium solani*, *penicillium decumbens*, *penicillium* sp. *phoma* sp, *trichoderma* sp. Et *mucor* sp.

Keller, S.E., Sullivan, T.M., Chirtel, S. (1997). Factors affecting the growth fo *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Industrial Microbiology, Biotechnology*. 19, 305-309.

Knoden, J. L., Dufour, L., & Bindelle, J. (2003). Fabrication de beurre de cacahuete. Collection Manuels et Techniques, Brussels, Belgium, 14.

Lafont, P., Lafont J. (1980). Contaminations du maïs par des mycotoxines. *Bulletin de l'académie vétérinaire*, (53), 533-538.

Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologicals (Doctoral dissertation, Universitat de Lleida).

Laïb, I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Nature & Technology*, (7), 44.

Lecompte, M., Gerault, A., & amp., Fannechere, G. Chromatographie sur papier ou en couche mince (CCM). Application à la mycologie.

Leveau, J-Y., Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition : Tec&Doc Lavoisier et APRIA. France. p114-115.

- Lecomte, M. (1997). La détermination des moisissures (Deutéromycètes). Traduction et adaptation par Marcel Lecomte de la clé, Université de Toronto, 36.
- Lesage-Meesen, L., Cahagnier, B. (1998). Mécanisme d'adaptation des micromycètes aux activités de l'eau réduite, dans : Cahagnier B. Moisissures des aliments peu hydratés. Paris, Londres, New-York : Tec&Doc. pp. 21-35.
- Madhusudana, B. (2013). A Survey on area, production and productivity of groundnut crop in India. *IOSR Journal of Economics and Finance*, 1(3): 01-07.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. & Sanchis, V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- Matmoura, A., Bouti, K., Bouras, N., & Houmani, Z. (2019). Recherche des populations d'*Aspergillus* section *flavi* aflatoxinogènes dans les amandes commercialisées dans trois régions algériennes. *African Review of Science, Technology and Development*, 4(01), 1-13.
- McDonald, D. (1970). Fungal infection of groundnut fruits after maturity and during drying. *Trans. Brit. Mycol.* 54:461-472.
- Misra, J. B. (2004). A Mathematical approach to comprehensive evaluation of quality in groundnuts. *Journal of food composition and analysis*, 17(?): 69-79.
- Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E. (2010). Occurrence of mycotoxins in feed analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58: 66-71.
- Mounjouenpou, P. (2008). *Aspergillus* noirs producteurs d'ochratoxine A dans le cacao. Biodiversité et incidence des traitements post-récolte au Cameroun (Doctoral dissertation, UM2).
- Nautiyal, P. C. (2002). Groundnut: Post Harvest Operations. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Online] Available from http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Groundnut.pdf (Accessed on June 14, 2014).
- 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 : étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines (Doctoral dissertation).
- Nishio, Z., Iriki, N., Takata, K., Ito, M., Tabiki, T., and Murray T. D. (2008). Influence of cold-hardening and soil matric potential on resistance to speckled snow mold in wheat, *Plant Disease* 92:1021-1025.
- Noba, K., Ngom, A., Guèye, M., Bassène, C., Kane, M., Diop, I., Ndoye, F., Mbaye, MS., Kane, A., Ba AT. (2014). L'arachide au Sénégal: état des lieux, contraintes et perspectives

pour la relance de la filière. *Oilseeds Crops and Lipids Journal Organisation*, 21(2) : 1-5.
DOI : 10.1051/ocl/2013039.

Nyabyenda, P. (2005). Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : Généralités, Légumineuses alimentaires, Plantes à tubercules et racines, Céréales (Vol. 1). Presses agronomiques de Gembloux.

Ouattara-Sourabie, P. B., Nikiema, P. A., & Traore, A. S. (2011). Caractérisation de souches d'*Aspergillus* spp isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(3).

Pamel, E.V., Vlaemynck, G., Heyndrickx, M., Herman, L., Verbeken, A., and Daeseleire, E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p : 1-11.

Pfohl-Leszkowicz, A. (2001), Définition et origines des mycotoxines in Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, Ed. Tec & Doc, 3-14.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997). - Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.

Portelli, C. (2005). Mycotoxines. Bulletin vétérinaire bimestriel-société vétérinaire pratique de France, 89(1), 47.

Ramirez, M., Chulze, S., Magan, N., (2006), Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain, *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 291-296.

Razzazi-Fazeli, E., Rabus, B., Cecon, B., Bohm, J. (2002). Simultaneous quantification of A-trichothecenemycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation massspectrometry. *Journal of Chromatography A* 968 :129-42.

Reese, G., and S. B. Lehrer. (1999). Food allergens in M. Frieri, & B. Kettelhut (Eds.), Food hypersensitivity and adverse reactions: A Practical Guide for Diagnosis and Management: 69-97. New York : Marcel Dekker, Inc.

Roquebert. (1997). Les moisissures : nature, biologie et contamination.

Royer, G., & TAP, J. (2003). Les mycotoxines. *Université Paris XII Année, 2004*.

Rémond, D., & Walrand, S. (2017). Les graines de légumineuses : caractéristiques nutritionnelles et effets sur la santé. *Innovations Agronomiques*, 60, np.

Sahdev, R. K. (2015). Present status of peanuts and progression in its processing and preservation techniques. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 17(3).

Samson, R.A. (1991). Identification of food -borne *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. In ACIAR proceedings No 36, Bangkok, Thailand, 23-26 April pp.39-45.

- Sanginga, N., Bergvinson, D. (2015). Un plan d'action pour la transformation de l'agriculture africaine. Oléagineux et Niébé. p. 27.
- Sara, R. S. (2016). Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar. Annaba).
- Scott, P. M., Lawrence, J. W., & Van Walbeek, W. (1970). Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Applied Microbiology*, 20(5), 839-842.
- Sokolović, M., & Šimpraga, B. (2006). Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, 17(9), 733-740.
- Spanjer, MC., Rensen, PM., Scholten, JM., (2008). LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after singleextraction with validation data for peanut, pista-chio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives and Contaminants* 25: 472-89.
- Stetzenbach, L., et Buttner, M. (2000) Airborne Microorganisms and Indoor Air Quality,"In"Encyclopedia of Microbiology. Second Edition, Academic Press. Rockefeller University. Vol.1: 116-125.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines (Doctoral dissertation).
- Tantaoui-Elaraki, A., Benabdellah, L., Majdi, M. Elalaoui, R., Dahmani, A. (1994). Recherche De Mycotoxines Dans Des Denrées Alimentaires Distribuées Au Maroc. *Actes Inst. Agron. Vét.* (Maroc), 14, 11-16.
- Toffa, D. (2015). Étude de la contamination de certains aliments d'origine végétale de la République du Niger les moisissures toxigènes.
- Torres, A. M., G. G. Barros, S. A. Palacios, S. N. Chulze, and P. Battilani. (2014). Review on Pre and Post-Harvest Management of Peanuts to Minimize Aaflatoxin Contamination. *Food Research International*, 62: 11–19.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* 632, 168-180.
- Varga, J., Kevei, E., Rimyu, E., Teren, J., Kazakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by* *Aspergillus* species, *Appl. Environ. Microb.*, 62, 4461-4464.
- Wagacha, JM., Mutegi, CK., Christie, ME., Karanja, LW., Kimani, J. (2013). Changes in Fungal Population and Aflatoxin Levels and Assessment of Major Aflatoxin Types in Stored Peanuts (*Arachis hypogaea* Linnaeus). *Journal of Food Research*, 2(5): 10-23.
- Wall, P. E. (2000). Spray Reagents. *Chromatography: Thin-Layer (Planar)/Spray Reagents*, 907-915.

Woodroof, J. G. (1983). Peanut: Production, processing, products. Westport, CT: AVI.

Woodroof, J. G. (1984). Peanuts: Production, Processing, Products 3rd West Port Connecticut Publishing. 895 pp.

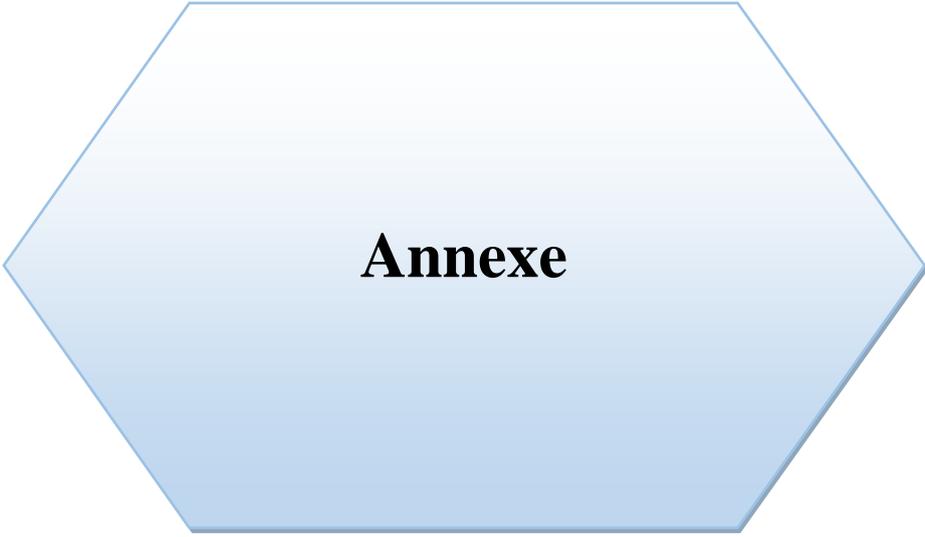
Yiannikouris, A., & Jouany, J. P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal.

Young, C.T., Schadel, W.E., (1990). Microstructure of Peanut Seed: A Review. Food Struct. 9, 317–328.

Zhao, X., J. Chen., and F. Du. (2012). Potential use of peanut by-products in food processing: a review. *Journal of Food Science Technology*, 49(5): 521–529.

Zinedine, A., & Idrissi, L. (2007). Présence et réglementation des mycotoxines dans les aliments au Maroc : Situation actuelle et perspectives. *Les technologies de laboratoire*, 2(7).

Zuber, Y.M.H., Lillehoj, E, B. et Renfro, B.L., (1987). Aflatoxinein maize: A proceeding of the workshop. Published by cimmyt, mexico, pp.389.



Annexe

Annexe

Composition des milieux de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	200m g
Dextrose	20g
Agar	10 g
Eau distillée	1L
pH	6
Chloramphénicol	0.1g

Milieu Sabouraud

Glucose	20g
Peptone	5g
Agar	10g
L'eau physiologie	1L
Chloramphénicol	0.1g

C zapek Concentré

KCL	1 g
MgSO ₄	1 g
FeSO ₄	0.02 g
NaNO ₃	6 g
FeSo ₄	0.02g
CuSO ₄	0.02g
Eau distillée	1000 ml

Milieu CYA (C zapek Yeast Agar)

Czapek Centre	10 ml
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Extrait de levure	2.5g
Sucrose	15 g
Agar	10 g
Eau distillée	500ml

Milieu coconut Agar Medium (CAM)

Noix de coco	50g
Eau distillé	150m

عزل فطريات مجهرية من الفول السوداني (*Arachis hypogaea*) وإستخلاص سمومها الفطر

ملخص

يهدف العمل الذي قمنا به إلى عزل فطريات مجهرية من ثمار الفول السوداني ثم دراسة قدرتها على إنتاج السموم الفطرية، حيث تم جمع بعض عينات من فاكهة الفول السوداني المعروفة باسم (cacahouète Sebseb) من بعض نقاط البيع على مستوى دائرة متليلي (ولاية غرداية) ليتم بعد ذلك نقلها إلى المخبر أين تم إجراء العزل على أوساط الزرع PDA و Sabouraud مدعمة بالكورامفينيكول وذلك باستخدام الطرق التالية: الطريقة المباشرة بوضع البذور على الوسط الزراعي، طريقة المعلقات المخففة الغير مباشرة وطريقة ورق الترشيح المبلل. بعد تحضين في درجة حرارة 28 ° لمدة 6 أيام تم الكشف عن ثلاث عزلات فطرية تنتمي إلى الجنس *Aspergillus* (43%) و أربع عزلات تنتمي إلى الجنس *Penicillium* (57%). تم بعد ذلك استخلاص السموم الفطرية باستخدام المذيبات على مستوى المادة (ثمار الفول السوداني) وعلى مستوى سلالات الفطريات المعزولة عن طريق حضنها لمدة 7 أيام في الأوساط الصلبة CAM و CYA. تم الكشف عن السموم الفطرية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) وتحت الأشعة فوق البنفسجية عند طول الموجة 365 نانومتر. أظهرت النتائج عدة بقع مفصولة بواسطة CCM منها المغلورة تحت الأشعة فوق البنفسجية، إلا أن تحديدها التقريبي يتطلب منا استعمال طريقة الكشف الكيميائي، حيث أظهر استخدام تترات الفضة وكور الحديد نتيجة سلبية، بينما استخدام مركز حمض الكبريتيك مكنتنا من الكشف عن ثلاث أنواع رئيسية من السموم الفطرية، وهي Aflatoxine G ، Ochratoxine A و Ochratoxine B.

الكلمات المفتاحية: الفول السوداني، السموم الفطرية، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، الكشف الكيميائي.

Isolement des moisissures à partir d'arachide (*Arachis hypogaea*) et extraction de leurs mycotoxines

Résumé

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'isolement des moisissures à partir des fruits d'arachide puis l'étude de leur pouvoir producteur des mycotoxines. Ainsi, nous avons collecté quelques échantillons des fruits d'arachide connus sous le nom (cacahouète Sebseb) à partir de certains points de vente à Metlili (commune de la wilaya de Ghardaïa). L'isolement a été effectué sur milieux PDA et Sabouraud additionnés du chloramphénicol. Les méthodes utilisées est celles des graines (directe) et de suspension dilution (indirecte) et de filtre en papier stérile (directe). Ainsi, sept isolats fongiques ont été détectés après incubation à 28 C° pendant 6 jours et sont affiliés aux deux genres *Aspergillus* (43%, soit 3 isolats) et *Penicillium* (57%, soit 4 isolats). L'extraction des mycotoxines a été faite par l'utilisation des solvants au niveau du substrat d'arachide et à partir des isolats des champignons après fermentation pendant 7 jours sur les milieux solides CAM et CYA. La détection a été faite par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et sous lumière UV à 365 nm. Les résultats ont montré plusieurs taches séparées par CCM et fluorées sous UV, cependant leur identification approximative nécessite des révélations chimiques, L'utilisation de nitrate d'argent et de chlore ferrique a conduit à un résultat négatif cependant, l'utilisation d'acide sulfurique concentré, nous a permis de détecter trois principaux types de mycotoxines, il s'agissait de l'aflatoxine G, l'ochratoxine A et l'ochratoxine B, produits par *Aspergillus* et *Penicillium*.

Mots clés : Arachides, moisissures, mycotoxines, CCM, révélation chimique,

Isolation of microscopic fungi from peanut (*Arachis hypogaea*) and extraction of their mycotoxins

Abstract

The work that we have undertaken aims to the isolation of microscopic fungi from peanut fruits and then the study of their mycotoxin-producing power. Thus, we collected some samples of peanut fruits known as (cacahouète Sebseb) from certain points of sale in Metlili (City in wilaya of Ghardaïa). The isolation was carried out on PDA and Sabouraud media supplemented with chloramphenicol. The methods used are those of seed and suspension dilution and sterile paper filter. Thus, seven fungal isolates were detected after incubation and affiliated to the two genera *Aspergillus* (43%) and *Penicillium* (57%). The extraction of mycotoxins was done by the use of solvents, from the substrate of peanut and from the isolates fungi after their fermentation during 6 days on the solid media CAM and CYA. Detection of mycotoxins was made by Thin Layer Chromatography (TLC) and under UV light at 365 nm. The results showed several spots separated by TLC and fluorinated under UV, however their approximate identification requires chemical revelation, The use of silver nitrate and ferric chlorine led to a negative result, but the use of concentrated sulfuric acid concentrate allowed us to detect three main types of mycotoxins, these were aflatoxin G, ochratoxin A and ochratoxin B, produced by *Aspergillus* and *Penicillium*.

Key words: Peanuts, mycotoxins, microscopic fungi, CCM, Chemical detection.