

**MYCOTOXICOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL STUDY OF INFANT FLOUR
MARKETED IN SOUTH-WEST OF ALGERIA AND ANTI-MYCOTOXIN EFFECT
OF THE AQUEOUS EXTRACT OF *ANETHUM GRAVEOLENS* L.**

A. Khaldi^{*1}, A. Moussaoui¹, B. Meddah^{1,2}

¹Laboratory of Plant Resource Development and food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, BP 417, University of Tahri Mohamed Bechar, 08000, Bechar, Algeria

²Laboratory of Bioconversion, microbiological engineering and safety health, University of Mascara, 29000 Mascara, Algeria

Received: 08 March 2019 / Accepted: 15 August 2020 / Published online: 01 September 2020

ABSTRACT

The current work focuses on a mycotoxicological study and the control of the physicochemical quality of infantile flours marketed in the city of Bechar in the South-West of Algeria, thus aiming to study phenolic composition, antioxidant activity and efficacy of the anti-mycotoxin effect of the aqueous extract of *Anethum graveolens* L. The mycotoxicological analysis revealed that the first sample of the infant flour type I (FIT I/E1) is unsatisfactory product with a contamination rate 12.54×10^3 UF/g whose 40% of *Aspergillus flavus* strains isolated are producers of aflatoxin B1 and 50% of *A ochraceus* are producers of ochratoxin A. The aqueous extract of *A graveolens* L. showed significant anti-mycotoxin activity, *A flavus* was inhibited from a minimum inhibitory concentration MIC of 300 µg/ml and *A ochraceus* at 650 µg/ml. The total phenol content is also determined for extract. The antioxidant activities was estimated and the aqueous extract showed a good scavenging activity with a concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) value of 0,14±0,31 mg/ml.

Keywords: Infant flour; mycotoxins; *Anethum graveolens* L.; anti-mycotoxin activity.

Author Correspondence, e-mail: achrafssystemdz@yahoo.fr

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v12i3.12>



1. INTRODUCTION

L'alimentation infantile présente une préoccupation fondamentale dans la stratégie de sécurité alimentaire. En effet les céréales trouvent leur place dans la diététique de la petite enfance en général à partir du 3^{ème} mois, elles constituent la première étape de la diversification alimentaire [1]. A cet effet une farine infantile doit avoir une composition importante en nutriments indispensables pour satisfaire les besoins nutritifs, assurant une bonne alimentation du nourrisson et de son immaturité ; notamment doit être salubre ; ne doit pas contenir des germes pathogènes ; de toxines ou de résidus chimiques toxiques susceptibles d'avoir des répercussions sur la santé du nourrisson.

Parmi ces toxines naturelles, les mycotoxines sont considérées, comme faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique, la sécurité alimentaire et l'économie de nombreux pays [2]. Ce problème a pris une importance considérable pour l'alimentation des adultes mais il faut signaler qu'aussi de graves problèmes sanitaires surgissent sur l'alimentation infantile.

En parallèle, *Anethum graveolens* L. est parmi les familles de plantes aromatiques les plus populaires utilisées dans le monde entier. Elle est employée fréquemment par nos populations dans la médecine traditionnelle, ainsi, elle est connue par son utilisation dans divers domaines (alimentaire, médicinal, pharmaceutique) [3].

L'ambition de ce travail cadre l'approche problématique de la présence des moisissures sur les farines infantiles à base de céréales et leur possibilité de contamination en mycotoxines. Ainsi, il est axé sur l'étude de la composition phénolique, l'activité antioxydante et l'effet antimycotoxinogène de l'extrait aqueux d'*A. graveolens* L. sur ces moisissures toxigènes isolées de ces farines infantiles

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Choix de type des farines

Parmi quinze types de farines infantiles existantes sur le marché local dans la ville de Béchar au Sud-Ouest Algérien, nous avons choisis trois types de farines à base de céréales, dont la composition et la marque sont différentes, jugées les plus commercialisées (FIT I, FIT II et

FIT VII) d'après une enquête socio-économique, basé sur le nombre des boites vendues pendant 1 ans par 40 commerçants, répartie sur les grands quartiers populaires.

2.2 Echantillonnage

Le type d'échantillonnage suivi dans ce travail est l'échantillonnage multiple, chaque échantillon est la moyenne de trois prélèvements (unités), pour chaque type de farine en analyse trois échantillons (E1, E2 et E3) [4]. L'échantillonnage intéresse les farines appartenant au même lot, présentant la même date de fabrication et la même date de péremption (homogène).

2.3 Analyses physico-chimiques

Certains paramètres : humidité relative : HR (NA 5732), pH (AFNOR, 1980) [6], sucres totaux (méthode de Dubois, 1956) [7], teneur des protéines par dosage de l'azote total (méthode de Kjeldhal, NA 1185/1990 correspond à la norme ISO 1871) [8] sont déterminés.

2.4 Analyses mycotoxicologiques

2.4.1 Dénombrement de la flore fongique

2.4.1.1 Méthode de dilution

On réalise une suspension de farine contenant 5g du produit et 45ml d'eau physiologique. A partir des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de chaque farine, trois boites de chaque échantillon sontensemencées avec 1ml d'inoculum étalé en surface sur le milieu PDAA (Potatoes Dextrose Agar acidifiée), ce dernier est acidifié jusqu'à un pH de 4,5 à 5 en ajoutant 1 ml d'acide lactique à 25% par flacon, l'incubation se fait à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 5 à 7 jours [5].

2.4.1.2 Méthode d'Ulster

Elle consiste à déposer 1g de farine de chaque échantillon, dans des boites de Pétri stériles coulés par les milieux PDAA à raison de trois boites pour chaque milieu. Les boites sont incubées à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 5 à 7 jours [6].

2.4.2 Identification des moisissures

Après purifications des moisissures l'identification des genres a été faite par la technique de Micro culture Décrite par [7]. Les genres sont déterminés par les caractères cultureux et microscopiques en se référant au manuel de [8]. L'identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* est réalisée par la méthode dite Single Spore de [9,10].

2.4.3 Test mycotoxiques

2.4.3.1 Recherche des souches productrices de mycotoxines

Toutes les souches d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* identifiées des prélèvements analysés sont cultivés sur milieu PDAA pendant 7 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sont soumises aux analyses mycotoxiques. Les souches sont réensemencées dans 50 ml de milieu YES (Yeast Extract Sucrose), l'incubation se fait à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 14 jours [11]. Après 14 jours d'incubation, on se débarrasse de la biomasse formée en filtrant le milieu YES à travers du papier filtre, 50 ml du filtrat obtenu est additionné à 180 ml de chloroforme, l'ensemble est vigoureusement agité pendant 30 min, on laisse ensuite le mélange décanté en utilisant une ampoule à décantation. La phase chloroformique ainsi obtenue est filtrée sur du papier filtre plissé puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml [12]. La séparation chromatographique se fait sur une plaque de sélicagel sur laquelle sont déposés deux spots de 10 μl et 20 μl de chaque extrait à analyser et 5 μl de chaque solution standard d'aflatoxines et d'ochratoxine. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'élution toluène/Ethyl acetate/Formic acid (50:40:10, v/v/v) pendant 1 à 2 heures. Après migration et évaporation du produit d'élution à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, la plaque est examinée sous UV à 365 nm. La présence d'aflatoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques bleue pour l'aflatoxine B1 (AFB1) et verte pour l'ochratoxine A (OTA) comme le contrôle Rf [13].

2.4.3.2 Détection des mycotoxines au niveau du substrat

50 g de chaque échantillon de farine infantile sont additionnés à 100 ml de solvant (chloroforme – méthanol V/V) [14], le mélange est agité pendant 10 min, la phase liquide est séparée du culot par filtration. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant au culot récupéré à chaque fois après filtration. Ensuite, le filtrat est concentré jusqu'à un volume de 2 à 3 ml par évaporation au rotavapor. L'extrait est étalé sur un gel d'agar à 2 % et à pH 7 coulé préalablement sur boîtes de pétri puis sont gardées à 4°C pendant 24 h. Après la diffusion des mycotoxines à l'intérieur de la gélose, sa surface est essuyée à plusieurs reprises avec du papier filtre imbibé d'hexane pour éliminer les macromolécules de matière organique. Le gel d'agar est ensuite coupé en petits carreaux et

mélangé avec 100 ml de chloroforme. Le tout est agité pendant 10min puis filtré. Le culot est additionné ensuite à 50 et 30 ml de chloroforme et agité à chaque fois qu'il est récupéré après filtration. Le filtrat obtenu est également concentré à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml, puis subit une séparation par CCM de la même façon que pour les souches productrices.

2.5 Matériel végétal

Les graines d'*Anethum graveolens* L. ont été collectées au mois de mars 2017, de façon aléatoire aux alentours de la région Igli dans la wilaya de Bechar (Sud-ouest algérien). Un spécimen de référence (LB / 17 / UB-025) a été déposé à l'herbier du laboratoire pédagogique de botanique dans l'institut de biologie, Université Tahri Mohamed Bechar.

2.6 Préparation de l'extrait aqueux

L'extraction des composés phénoliques est faite sur les graines broyées et préalablement dilapidées au soxhlet (avec de l'hexane). 5 g de poudre dilapidée introduite avec 50 ml d'eau distillée est porté à l'ébullition pendant 30 min dans un montage à reflux. Après filtration sous vide sur papier wattman le surnageant récupéré est porté à une centrifugation à 4500 tr/15 min et filtré de nouveau. L'extrait obtenu est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide pour obtenir une poudre séchée. L'extrait est conservé à 4 ° C dans l'obscurité jusqu'à ce qu'il soit testé [15].

2.7 Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols dans l'extrait a été déterminée en utilisant le réactif de Folin – Ciocalteu et l'acide gallique comme standard, comme décrit par Obiang-Obounou and Ryu [16]. Le mélange réactionnel était composé de 0,1 ml de l'extrait et 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Après 5 min, 1,5 ml de carbonate de sodium à 6% sont ajoutés. Après 90 min d'incubation à l'obscurité, les absorbances sont lues avec un UV / Vis à 725 nm (spectrophotomètre Camspec M550). Le méthanol acidifié a été utilisé à blanc. Les concentrations en composés phénoliques sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide gallique utilisé comme standard et les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent acide gallique (GAE) / g d'extrait sec.

2.8 L'activité antiradicalaire du DPPH

Le test du pouvoir antiradicalaire est réalisé selon la méthode Ksouri et *al.*, [17]. 1 ml de différentes concentrations de l'extrait (0.0156 mg/ml à 1 mg/ml) dans de méthanol a été ajouté à 1,9 ml d'une solution de DPPH méthanol fraîchement préparée (0.004% w/v). Le mélange est agité et incubé pendant 30 minutes à l'obscurité. La lecture se fait au spectrophotomètre à 515nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions sans DPPH. Un témoin positif avec l'acide ascorbique est réalisé comme un standard. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) suivant l'équation : $I (\%) = [(A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle}] \times 100$. Dont, A contrôle correspond à l'absorbance du contrôle et A échantillon correspond à l'absorbance de l'échantillon. La concentration (IC₅₀) en extrait brut permettant de réduire 50 % du DPPH est déterminée en traçant une courbe de pourcentage de réduction en fonction de la concentration.

2.9 Effet antimycotoxinogène

2.9.1 Préparation de l'inoculum

Deux souches fongiques toxigènes productrices des mycotoxines *A flavus* (AFB1) et *A ochraceus* (OTA) sont utilisées pour tester l'effet antimycotoxinogène de l'extrait aqueux. Les deux souches sont cultivées sur milieu PDAA pendant 7 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sont soumises aux analyses. Après incubation on prépare la suspension sporale dans 0.85% (w/v) sodium chloride, ajustée à 10^5 spores /ml à l'aide d'une cellule de Malassez [13].

2.9.2 Détermination du pourcentage d'inhibition mycélienne par la technique de la biomasse en milieu liquide

Afin de tester la concentration minimale inhibitrice de la biomasse (MIC), des dilutions sont préparées dans une solution d'agar à 0,2 % pour favoriser le contact germe/composé. Dans des flacons contenant 45 ml de milieu YES, stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 121°C) avec quelques gouttes de l'acide lactiques, on ajoute 5ml de chacune des dilutions préparées préalablement selon la masse du résidu sec de l'extrait de façon à obtenir des concentrations finales de 100 à 1500 µg extrait/ml de milieu. Des témoins, contenant le milieu YES plus la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés. Ensuite, on ajoute 0,1 ml de l'inoculum (10^5 spore/ml). L'incubation se fait à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 14 jours. Après filtration

du milieu par du papier filtre on obtient des biomasses, ces derniers sont séchés dans l'étuve à 60°C pendant 24h, après séchage on prend les poids des marcs [13]. Le poids de la biomasse est déterminé selon la formule suivante : $P = P_1 - P_0$. Donc, P_0 étant le poids du papier filtre et P_1 le poids du papier filtre et la biomasse des champignons après le séchage. Le pourcentage d'inhibition de la biomasse I_b est déterminé par la formule suivante : $(I_b \%) = [(C - P) / C] \times 100$. Dont, C étant la biomasse formée chez le témoin et P la biomasse formée en présence de l'extrait.

2.9.3 Test de mycotoxinogènes

Après filtration et élimination de la biomasse formée, le filtrat obtenu est destiné au test de la mycotoxinogènes, dont ce test est réalisé de la même façon que pour la recherche des souches productrices.

2.10 Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type. Les données ont été analysées par une analyse de variance (ANOVA) et on a utilisé l'Excel avec le logiciel XLSTAT 2017.2. pour la comparaison des variations du taux des facteurs. Une différence significative a été considérée au niveau de $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

3. RESULTATS

3.1 Analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physicochimiques sont illustrés dans le tableau 1. Tous les échantillons sont peu hydratés avec une moyenne totale d'HR 9,14 %. La moyenne totale du pH est de 6,83. Les taux des sucres totaux et des protéines indiquent une moyenne totale de 69,67 % et 9,02 %, respectivement.

Tableau 1. Résultats des analyses physicochimiques des différents échantillons

Echantillon	Humidité (%)	pH	Sucres totaux (%)	Protéines (%)
FIT I/E1	10.99*	6.40*	60.70*	5.60*
FIT II/E1	9.36*	6.84*	80.08*	2.99*
FIT VII/E1	8.66*	6.93*	50.99*	13.20*
FIT I/E2	9.84*	6.70*	75.15*	9.39*
FIT II/E2	9.27*	6.83*	80.46*	3.06*
FIT VII/E2	8.34*	6.97*	54.89*	14.87*
FIT I/E3	9.03*	6.91*	78.65*	10.53*
FIT II/E3	8.66*	6.92*	85.20*	4.76*
FIT VII/E3	8.11*	7.00*	60.90*	16.81*
moyenne totale	9.14*	6.83*	69.67*	9.02*
Ecart type	0,84	0,17	12,03	4,90
Variance	0,68	0,03	144,60	24,06

* significative au niveau de $P < 0,05$.

Toutes les valeurs sont des moyennes ($n = 3$) et les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type.

3.2 Analyses mycologiques

Les expressions de ces résultats sont concrétisées dans le tableau 2. Les valeurs moyennes de la mycoflore totale, ainsi que les différentes souches fongiques apparues par la méthode de dilution sur le milieu PDA pour les échantillons de FIT I témoignent que ce type de farine infantile prend la première place par un taux de contamination élevée varie entre $2,98 \times 10$ UF/g à $12,54 \times 10^3$ UF/g, d'une moyenne totale ($4,20 \times 10^3$ UF/g). Pour les échantillons de farine FIT II, le taux de contamination atteste que ces fractions est moins élevé que ceux de type I. avec une moyenne totale ($2,98 \times 10$ UF/g). Enfin, les échantillons de FIT VII sont les moins contaminés par rapport aux autres types avec une moyenne totale ($0,84 \times 10$ UF/g). Pour la méthode d'Ulster, Les données reportées confirment les résultats de la méthode de dilution et montrent que les échantillons de FIT I sont toujours les plus contaminés que ceux FIT II et FIT VII avec une moyenne totale (4,69 %), (2,21 %) et (0,51 %) respectivement.

Notant que, l'échantillon de FIT I/E1 présente un taux de contamination très important (8,54 %). En comparant les deux méthodes, on constate la même biodiversité, dont, l'échelle de dominance a été respectée en ce qui concerne les souches fongiques révélées par la dominance généralement des *A. flavus* et *A. ochraceus* contre les échantillons de FIT I/E1, FIT I/E2, FIT II/E1, FIT II/E2 et les *Aspergillus spp* dans l'échantillon FIT I/E3, par contre les *Penicillium spp* dominent les échantillons de FIT VII et FIT II/E3.

Tableau 2. Valeurs moyennes de la mycoflore totale et les différentes souches fongiques relevées par la méthode d'Ulster (%) et la méthode de dilution dans les échantillons de farines infantiles ($\times 10^3$ UF/g), à

l'exception de l'échantillon FIT I/E1 ($\times 10^3$ UF/g)

Echantillon	<i>Aspergillus spp</i>		<i>Penicillium spp</i>		<i>A. ochraceus</i>		<i>A. flavus</i>		<i>Alternaria alternata</i>		Moyenne de la mycoflore	
	D	U	D	U	D	U	D	U	D	U	D	U
FIT I/E1	2,33*	2,10*	0,44*	0,44*	3,88*	2,33*	5,33*	3,66*	0,55*	-	12,54*	8,54*
FIT I/E2	1*	0,44*	0,33*	0,22*	2,53*	1,66*	1,77*	1,21*	-	-	5,66*	3,54*
FIT I/E3	1,99*	1,33*	-	0,11*	0,44*	0,11*	0,55*	0,44*	-	-	2,98*	1,99*
Moyenne totale											4,20*	4,69*
Ecart type											589,11	2,79
Variance											347045,66	7,81
FIT II/E1	0,22*	0,11*	0,55*	0,44*	1,33*	1,11*	1,77*	1,55*	-	-	3,87*	3,21*
FIT II/E2	0,55*	0,22*	-	-	1,88*	1,11*	1,33*	0,77*	-	-	3,76*	2,10*
FIT II/E3	0,44*	0,44*	0,88*	0,88*	-	-	-	-	-	-	1,32*	1,32*
Moyenne totale											2,98*	2,21*
Ecart type											1,18	0,78
Variance											1,39	0,60
FIT VII/E1	-	-	0,88*	0,55*	0,33*	0,11*	0,11*	-	-	-	1,32*	0,66*
FIT VII/E2	0,22*	0,22*	0,55*	0,44*	-	-	-	-	-	-	0,77*	0,66*
FIT VII/E3	0,11*	-	0,33*	0,22*	-	-	-	-	-	-	0,44*	0,22*
moyenne totale											0,84*	0,51*

	Ecart type	0,36	0,21
	Variance	0,13	0,04

* significative au niveau de $P < 0,05$.

D : méthode de dilution, U : méthode d'Ulster, - : non disponible.

Toutes les valeurs sont des moyennes ($n=3$) et les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type.

3.3 Analyses mycotoxicologiques

Pour la recherche des souches productrices des mycotoxines, la séparation chromatographique faite sur cinq souches d'*A. flavus* et deux souches d'*A. ochraceus* isolées de nos différents échantillons et cultivées sur milieu YES, a révélé que deux souches sont productrices d'AFB1 d'où elles ont émis une fluorescence bleue, et une seule souche productrice d'OTA d'où elle a émis une fluorescence bleue. La recherche des mycotoxines sur les différents substrats s'est révélée négative malgré la présence des souches productrices de la toxine.

3.4 Teneurs en polyphénols totaux et activité antioxydante

Les graines d'*Anethum graveolens* L. représentent une bonne source de composés phénoliques comme indiqué dans le tableau 3. Les résultats ont révélé que l'extrait aqueux présente une teneur élevée 130.55 ± 0.32 mg GAE/g en composés phénoliques totaux.

Les résultats de la capacité antioxydante sont illustrés dans le tableau 3 et la figure 1. L'activité antioxydante de l'extrait aqueux ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,31$ mg/ml) est importante en comparaison avec l'acide ascorbique 0.12 ± 0.1 mg/ml utilisé comme un standard.

Tableau 3. Teneurs en polyphénols totaux et l'activité antioxydante d'*Anethum graveolens* L.

Extrait	teneur en polyphénols totaux ^a mg of GAE/g d'extrait	$IC_{50}^{a,b}$ (mg/ml)
Aqueux	$130,55 \pm 0,32$	$0,14 \pm 0,31$
Acide ascorbique	-	$0,12 \pm 0,1$

^a Toutes les données sont réalisées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type.

Une différence significative a été considérée au niveau de $P < 0,05$.

^b La concentration IC_{50} en extrait brut permettant de réduire 50 % du DPPH.

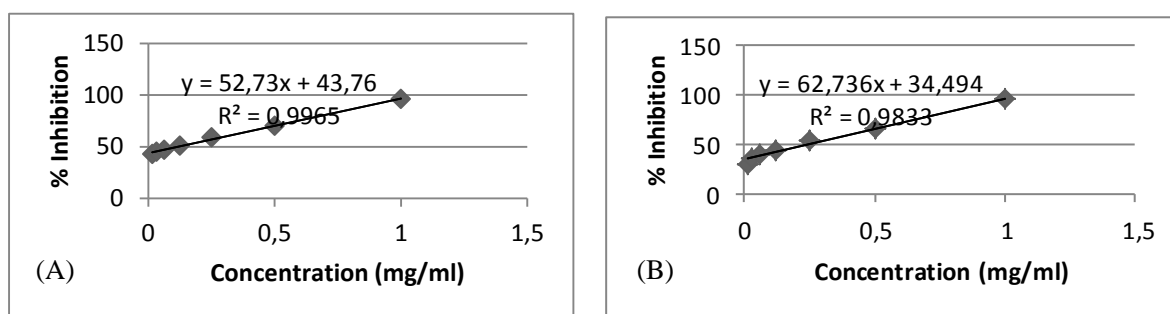


Fig 1. Activité antiradicalaire du DPPH de l'acide ascorbique (A) et l'extrait aqueux (B), (les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type, $n = 3$)

3.5 Test antimycotoxinogène

Les résultats de l'effet antimycotoxinogène et les inhibitions des biomasses formées en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de l'extrait aqueux ont montré une corrélation significative avec les valeurs MIC ($P < 0,05$ et $P < 0,01$) (Tableau 4). La biomasse formée par *A. flavus* a été inhibée à une CMI de 300 $\mu\text{g/ml}$ et *A. ochraceus* à 650 $\mu\text{g/ml}$. Le test antimycotoxinogène a révélé que les deux souches n'ont pas fait la production des mycotoxines ni AFB1 ni OTA (absence de fluorescence bleue et verte sur la plaque CCM) à partir de ces CMI.

Tableau 4. Pourcentages d'inhibitions de la biomasse formée et résultat du test antimycotoxinogène de l'extrait aqueux d'*Anethum graveolens* L.

	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
	Effet d'inhibition (%)	
Témoin	0	0
100 $\mu\text{g/ml}$	15,12 \pm 06 (f)	6,22 \pm 0,9 (f)
250 $\mu\text{g/ml}$	91,33 * (f)	75,47 \pm 0,2 (f)
600 $\mu\text{g/ml}$	100 *** (nf)	95,05 ** (f)
1000 $\mu\text{g/ml}$	100 *** (nf)	100 *** (nf)
1500 $\mu\text{g/ml}$	100 *** (nf)	100 *** (nf)
MIC $\mu\text{g/ml}$	300 (nf)	650 (nf)

* Significatif à $p < 0,05$; ** Significatif à $p < 0,01$; *** Significatif à $p < 0,001$ selon les témoins. MIC: concentration minimale inhibitrice

Les valeurs sont réalisées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne \pm d'écart-type.

f: apparition de la fluorescence dans la plaque de chromatographie en couche mince (fluorescence bleue pour les Aflatoxines B et verte pour l'Ochratoxine A); nf: absence de fluorescence dans la plaque CCM.

4. DISCUSSION

Les résultats de l'HR de tous nos échantillons permettent de classer les trois types de farines (FIT I, FIT II et FIT VII) dans la catégorie des produits peu hydratés, avantage qui n'exclut pas leur contamination par une flore fongique xérotolérante prépondérante [18]. A côté de l'HR, le pH peut avoir un effet critique pour la croissance fongique et la production de mycotoxine. Les mesures du pH de toutes les farines infantiles, révèlent que nos échantillons ont un pH légèrement acide à neutre. Signalons à ce passage que la plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9, à une température optimale comprise entre 20°C et 30 °C [19]. La composition qualitative et quantitative en certains nutriments (sucre notamment) influe sur la contamination en aflatoxines. Le taux inférieur des sucres totaux qui est de 60.70 % marqué sur la FIT I/E1 est due à l'activité métaboliques des moisissures, qui peuvent modifier les valeurs nutritionnelles et technologiques des farines, ce qui se traduit par une dégradation dans le taux des sucres totaux [20]. Pour ce qui est du taux des protéines, les valeurs des échantillons de FIT I et FIT II sont nettement inférieures à la norme, cela peut être due à une activité métabolique fongique qui se représente par la dégradation des protéines, rappelant que les normes internationales du *Codex Alimentarius* imposent une teneur minimale en protéines qui ne doit pas être inférieure à 15% du poids sec de la farine infantile [21].

Ainsi et en vertu des dispositions de l'arrêté interministériel [22] fixant les critères microbiologiques des aliments pour nourrissons et enfants en bas âge, la limite d'acceptabilité pour les préparations destinées aux nourrissons *vis à vis* les moisissures est de ($M = 10^3$ UF/g). En conséquence, et en application de la norme fixée par le texte cité ci-dessus, l'échantillon du FIT I/E1 est considéré comme étant un produit non satisfaisant ; alors que le reste des échantillons sont satisfaisants.

La méthode d'Ulster nous a démontré que la composition du substrat est en relation avec la

croissance des champignons filamenteux, ou en a vu que ces derniers considèrent les farines comme milieu de culture. A ce stade de l'analyse on peut émettre l'hypothèse que les moisissures se trouvent en état de spores. Les champignons isolés par cette méthode témoignent que ces moisissures constituent la flore réelle contaminant les échantillons, autrement dit ces champignons sont biologiquement active sur cette substrat.

L'exploitation des résultats de l'étude de la flore fongique totale, réalisée par la méthode directe et indirecte montre la dominance des moisissures filamenteuses, très sporulantes, dotées d'un grand pouvoir de dissémination qui sont les *Aspergillus* et les *Penicillium* [23]. Soulignons que les valeurs de dénombrement sont bien corrélées avec celle des autres critères de qualité : taux des glucides, protéines, d'acidité...etc. Selon Berthier et Valla [24] les *Penicillium* et les *Aspergillus* sont des contaminants des denrées alimentaires maltraitées mais surtout mal conservés ; ils sont considérés comme contaminants de stockage. La forte révélation des *A. flavus* et *A. ochraceus* sur quelques échantillons et surtout dans l'échantillon de FIT I/E1 témoigne de la contamination externe et interne de ce dernier.

Les résultats mycotoxicologiques montrent que 40 % des souches d'*A. flavus* étaient productrices d'AFB1 et 50 % d'*A. ochraceus* productrices d'OTA, en fait pour une espèce réputée toxigène, toutes les souches ou isolats pas forcément élaborent des mycotoxines [24].

Des récentes travaux, dans le même cadre de recherche ont confirmé la présence d'AFB1 et OTA sur des préparations à base de céréales destinées pour nourrissons en Portugal, Pakistan, Italie, Burkina Faso et Qatar avec des pourcentages de contamination différentes [25, 26, 27, 28, 29] Dans notre étude, le résultat négatif de l'analyse sur CCM pour la détection des mycotoxines au niveau des substrats, n'élimine pas toute la suspicion de leurs présences. Cela peut s'expliquer probablement par le fait que les mycotoxines contenues dans les substrats étaient inférieur au seuil de détection de ce type de chromatographie ; sachant que cette méthode possède un seuil de détection de 10 ppm [24]. Autrement, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a un effet inhibiteur sur la production de toxine. Cela s'explique par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine. Ainsi, le taux des mycotoxines est souvent moins important lorsque la souche introduite simultanément est une

souche non-toxinogène. Signalons aussi que l'inhibition de la production d'aflatoxine par *A. flavus* lorsqu' *A. niger* est présent, est due à la synthèse par ce dernier d'un produit inhibant la biosynthèse d'aflatoxine [30]. Ce qui revient à dire que si l'absence de moisissures sur un produit n'est pas la garantie de l'absence de mycotoxine ; la présence d'une moisissure bien développée sur une denrée n'est pas non plus l'assurance d'une présence de mycotoxines [24].

L'extrait aqueux des graines d'*A. graveolens* L. se caractérise par une teneur importante en composés phénoliques totaux (130.55 ± 0.32 mg GAE/g), valeur nettement supérieure à ceux trouvés d'Isbilir et Sagiroglu [31] et El Mansouri *et al.* [32] $65,05 \pm 2,06$ mg et 24.08 GAE/g respectivement. En revanche, inférieur à ceux trouvés d'Oshaghi *et al.* [33] et Stanojević *et al.* [34] $163 \pm 3,8$ mg/g et 573.81 mg GAE/g respectivement. La variation des teneurs en polyphénols totaux peut également résulter de facteurs génétiques, aux conditions climatiques et environnementales, conservation des échantillons et les conditions d'extraction et de dosage [35]. Les composés phénoliques constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydante des végétaux, fruits, céréales et d'autres matériels à base de plantes [36]. En effet, cette plante connue pour son pouvoir antioxydant et son intérêt dans la lutte contre les radicaux libres. L'activité antioxydante de notre extrait est en accord avec les résultats de autres auteurs [31, 32, 33, 34]. Cette activité des graines d'*A. graveolens* L. peut être due à des terpénoïdes tels que le limonène, la carvone et des composés phénoliques tels que l'apiole et l'anethole. De nombreuses études publiées décrivent des corrélations significatives et positives entre le contenu phénolique total d'un extrait et son pouvoir antioxydant et que cette activité dépend plus de la structure et de la conformation des composés phénoliques totaux que de leur concentration [32].

L'activité antimycotoxinogène et les inhibitions des biomasses formées sous l'effet de l'extrait, pourraient être due, soit à une réaction entre la mycotoxine (si elle était déjà produite) et l'extrait qui formeraient un complexe non fluorescent sous UV ; ou à une inhibition de la production de la mycotoxine par la souche fongique en présence de l'extrait, favorisée par l'aptitude de ce dernier à traverser la membrane plasmique. Selon Thanaboripat *et al.* [37] ; Bhatnagar et McCormick [38] les extraits obtenus à partir des parties supérieures de plantes possèdent la capacité de supprimer la croissance des champignons toxinogènes et par

conséquent, la production de toxines dans les supports synthétiques. Ils peuvent aussi bloquer entièrement la biosynthèse des mycotoxines [38]. Hua *et al* [39] ont rapporté que les composés phénoliques inhibent au début plutôt qu'à la fin des étapes de la voie de biosynthèse d'AFB1. Ghorbanian *et al* [40] ont également signalé que l'inhibition de la synthèse des aflatoxines est en relation avec le temps de contact et la dose de l'extrait.

5. CONCLUSION

Les résultats de ce travail seraient peut-être une alerte sur la contamination par les moisissures toxigènes capables de produire les mycotoxines contaminant la farine infantile, et qui constituent par leurs propriétés toxicologiques un risque majeur pour la santé de nos nourrissons. Cette étude a permis de montrer également l'efficacité de l'extrait aqueux d'*Anethum graveolens* L. dans la lutte contre la production de ces mycotoxines. Cette plante pourrait alors constituer une alternative efficace en remplacement des antifongiques chimiques de synthèse qui sont parfois néfastes pour la santé des bébés.

6. REFERENCES

- [1] Cezard IP, Cuny M, Terrolle C. Alimentation spéciales de l'enfant, Les sucres dans l'alimentation de l'enfant. In Multon JL. Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les IAA, Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 1992, pp. 715-729.
- [2] Pitt JI, Basílico JC, Abarca ML, López C. Mycotoxins and toxigenic fungi. Medical mycology. 2000, 38: 41-46.
- [3] Khaldi A, Meddah B, Moussaoui A, Sonnet P. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Anethum graveolens* L. from South-western Algeria (Bechar). J. Chem. Pharm. Res, 2015, 7(9): 615-620.
- [4] Bertrand R, Valiquette C. Pratique de l'analyse statistique des données : Concepts de l'analyse confirmatoire, PUQ, Chapitre 4, 1986, pp 141-204.
- [5] Référentiel normatif Algérien (NA) 1133. Céréales et produits céréaliers- Détermination de la teneur en eau- Méthode pratique (avec ou sans broyage et conditionnement). 2009.
- [6] AFNOR (Association Française de Normalisation). Recueil de normes françaises. Laits

et produits laitiers. Méthodes d'analyse. Normalisation française, ed paris, 1980, 286 p.

[7] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Pebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem, 1956, 28, p: 350-356.

[8] Organisation internationale de normalisation (ISO) 1871. Produits alimentaires et aliments des animaux : Lignes directrices générales pour le dosage de l'azote selon la méthode de Kjeldahl. Edition 2, ISO/TC 34 Produits alimentaires, 2009, 8 p.

[9] Khosravi AR, Dakhili M, Hojjatollah S. Mycological Survey on Feed Ingredients and Mixed Animal Feeds in Ghom Province, Iran. Pakistan Journal of Nutrition. 2008, 7 (1): 31-34.

[10] Hannin S, Hassikou K, Benkirane R, Ouazzani TA, Douira A. Étude de l'état sanitaire des semences du riz, Actes Inst. Agron. vet, Maroc. 2002, 23 (2-3): 127-134.

[11] Haris C. Introduction to modern microbiology black wall scientific publication. 1989, pp 179.

[12] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972, 241 p.

[13] Pitt JI. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycology. 1973, 65, pp 1135-1157.

[14] Ramirez C. Manual and Atlas of Penicillia. New York (USA), Elsevier biomedical publishers, 1982, 874 p.

[15] Davis ND, Diener UL, Eldridge, DW. Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, Applied Microbiology, American Society for Microbiology. 1966, 14(3): 378-380.

[16] Frayssinet C, Cahagnier B. Recherché et dosage des toxines dans les grains et graines et produits dérivés : céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Paris : technique et documentation (Lavoisier). 1982, pp 558-559.

[17] Khaldi A, Meddah B, Moussaoui A, Sonnet P. Anti-mycotoxin Effect and Antifungal Properties of Essential Oil from *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*. JEOP, 2017, 20 (1): 36-44.

-
- [18] Betina V. Chromatography of mycotoxins techniques and applications, Journal of chromatography library, Elsevier science 1st edition, 1993, 433 p.
- [19] Oomah BD, Caspar F, Malcolmson LJ, Bellidoc AS. Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. Food Research International. 2010, 44: 436-441.
- [20] Obiang-Obounou BW, Ryu GH. The effect of feed moisture and temperature on tannin content, antioxidant and antimicrobial activities of extruded chestnuts. Food Chem, 2013, 141: 4166–4170.
- [21] Ksouri A, Dob T, Belkebir A, Lamari L. Total Phenolic, Antioxidant, Antimicrobial Activities and Cytotoxicity Study of Wild *Anethum graveolens* L. IJPPR, 2015, 7 (6) : 1025-1032.
- [22] Cahagnier B. Qualité microbiologique des grains et teneurs en ergostérol. Cahier Scientifiques et Techniques, Jan. Fév. 1998, pp 5-15.
- [23] Reboux G. Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique. 2006, 46, 208–212.
- [24] Godon B, Willm C. Les industries de première transformation des céréales (2^o tirage) collection STAA, Tec & Doc, 1998, 680 p.
- [25] Codex Stan. Norme codex pour les aliments traités à base de céréales pour nourrissons et enfants en bas âge. Codex Stan, 1981, 74-1981. 7 p.
- [26] Jora. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 oct 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Aliments pour nourrissons et enfants en bas âge, journal officiel de la republique algerienne, 2017, N° 39, 22 p.
- [27] Le bars J, Le Bars P. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférence « Section Midi –Pyrénées » cf. bulletin de l'association des anciens élèves de l'institut pasteur, 4eme trimestre, 1987.
- [28] Berthier J, Valla G. Mycotoxines et Aliments : du Risque à la Prévention. Laboratoire de Mycologie : Biosystématique et Nuisances Fongiques. Université Claude Bernard, Lyon I, 1998, pp 05-20.
- [29] Alvito PC, Sizoo EA, Almeida CMM, Van Egmond HP. Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Baby Foods in Portugal, Food analytical methods, 2010, 3 (1): 22-30.

-
- [30] Mushtaq M, Sultana B, Anwar F, Zargham Khan M, Ashrafuzzaman M. Occurrence of Aflatoxins in Selected Processed Foods from Pakistan, *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13(7): 8324-8337.
- [31] Juan C, Raiola A, Mañes J, Ritieni A. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market, *Food Control*, 2014, 39, 227-236.
- [32] Ware LY, Durand N, Nikiema PA, Alter P, Fontana A, Montet D, Barro N. Occurrence of mycotoxins in commercial infant formulas locally produced in Ouagadougou (Burkina Faso), *Food Control*, 2017, 73, 518-523.
- [33] Ul Hassan Z, Al Thani R, AAtia F, Al Meer S, Migheli Q, Jaoua S. Co-occurrence of mycotoxins in commercial formula milk and cereal-based baby food on the Qatar market, *Food Addit Contam Part B Surveill*, 2018, 11(3):191-197.
- [34] Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leszkowicz A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam, *Food Chemistry*, 2007, 105(1):42-47.
- [35] Isbilir SS, Sagiroglu A. Antioxidant Potential of Different Dill (*Anethum Graveolens* L.) Leaf Extracts, *International Journal of Food Properties*, 2011, 14:894–902.
- [36] El Mansouri L, Bousta D, Balouiri M, Ouedrhiri W, Elyoubi-El Hamsas A. Antioxidant activity of aqueous seed extract of *Anethum graveolens* L. *IJPSR*, 2016, 7(3): 1219-1223.
- [37] Oshaghi EA, Khodadadi I, Tavailani H, Goodarzi MT. Aqueous Extract of *Anethum Graveolens* L. has Potential Antioxidant and Antiglycation Effects, *Iran J Med Sci.* 2016, 41(4): 328–333.
- [38] Stanojević LP, Stanković MZ, Juma A. Antioxidant activity of aqueous extracts from dill fruit (*Anethi fructus*) obtained by different extraction techniques. *Advanced technologies*, 2016, 5(2): 46-52.
- [39] Hristov A, Oh J, Firkins J, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HP, Adesogan AT, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. Special topics Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(11): 5045-5069.

- [40] Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract, Food Chemistry, 2007, 103 (2): 381-388.
- [41] Thanaboripat D, Nontabenjawan K, Leesin K, Teerapiannont D, Sukcharoen O, Ruangrattanamatee R. Inhibitory effects of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. Journal of Forestry Research, 1997, 8, 39–42.
- [42] Bhatnagar D, McCormick SP. The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. Journal of the American Oil Chemical Society, 1988, 65, 1166–1168.
- [43] Hua SS, Grosjean OK, Baker JL. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds Lett Appl Microbiol, 1999, 29(5):289-91.
- [44] Ghorbanian M, Razzaghi-Abyaneh M, Allameh A, Shams-Ghahfarokhi M, Qorbani M. Study on the effect of neem (*Azadirachta indica* A. juss) leaf extract on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin by it at different incubation times. Mycoses, 2008, 51(1):35-9.

How to cite this article:

Khaldi A, Moussaoui A, Meddah B. Mycotoxicological and physicochemical study of infant flour marketed in south-west of Algeria and anti-mycotoxin effect of the aqueous extract of *anethum graveolens* l.. J. Fundam. Appl. Sci., 2020, 12(3), 1172-1190.