

Identification et quantification de mycotoxines détectées à partir de différentes souches de champignons cultivés sur milieu de culture PDA en présence des œufs d'*Achatina fulica* (Bowdich)

[Identification and quantification of mycotoxins detected from different strains of fungi grown on PDA culture medium in the presence of eggs of *Achatina fulica* (Bowdich)]

DEDI née KY Juliette¹, OTCHOUMOU Atcho², and ALLOU Kouassi³

¹Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Université Nangui Abrogoua, UFR-SN, Abidjan, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Biologie et Cytologie Animale, Université Nangui Abrogoua, UFR-SN, Abidjan, Côte d'Ivoire

³Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Station de recherche Marc Delorme, Laboratoire de Défense des cultures sur le programme cocotier, Abidjan, Côte d'Ivoire

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The characterization of the fungal flora of the breeding litter *Achatina fulica* and different incubation substrates (coconut husks, cotton wool, sawdust, planting soil, virgin forest soil) of the eggs revealed the presence cosmopolitan fungi such as *Aspergillus Niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor* sp., *Penicillium decumbens*, *Penicillium* sp. and *Trichoderma* sp. Note however that fusaria are only present on the breeding litter the giant African snail. The percentage of occurrence of fungi varies from one substrate to another. *Aspergillus Niger* remains the only fungus present on all substrates and *Penicillium decumbens* only on the planting soil. Similarly, the characterization of the potential of each of toxigenic strains performed through the identification technique by HPLC was able to detect and quantify ochratoxin A and aflatoxin G2, G1, B1 at most samples (eggs + fungus) except that consisting of eggs + *Fusarium solani* or no mycotoxins were detected. Ochratoxin A detected in samples containing *Aspergillus Niger*, *Oxysporum Fusarium*, *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. is present in very small quantities in the set. The aflatoxin B2 is absent in all samples.

KEYWORDS: aflatoxins, ochratoxin A, fungi, incubation substrates, eggs.

RESUME: La caractérisation de la flore fongique de la litière d'élevage d'*Achatina fulica* et des différents substrats d'incubation (bourres de coco, coton hydrophile, sciure de bois, sol de plantation, sol de forêt vierge) des œufs a révélé la présence de champignons cosmopolites comme *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor* sp., *Penicillium decumbens*, *Penicillium* sp. et *Trichoderma* sp. Il faut cependant noter que les *Fusarium* ne sont présents que sur la litière d'élevage de l'escargot géant africain. Le pourcentage d'apparition des champignons est variable d'un substrat à un autre. *Aspergillus niger* reste le seul champignon présent sur tous les substrats et *Penicillium decumbens* uniquement sur le sol de plantation. De même, la caractérisation du potentiel toxigène de chacune des souches, réalisée grâce à la technique d'identification par HPLC, a permis de détecter et quantifier l'ochratoxine A et les aflatoxines G2, G1, B1 au niveau de la majorité des échantillons (œufs + champignon) sauf celui constitué des œufs + *Fusarium solani* ou aucune des mycotoxines n'a été détectée. L'ochratoxine A, détectée au niveau des échantillons contenant *Aspergillus niger*, *Fusarium Oxysporum*,

Mucor sp. et *Penicillium sp.* est présente en très faible quantité dans l'ensemble. L'aflatoxine B2 est absente au niveau de tous les échantillons.

MOTS-CLEFS: aflatoxines, ochratoxine A, mycètes, substrats d'incubation, œufs.

1 INTRODUCTION

Achatina fulica (Bowdich) est originaire d'Afrique de l'Est [1]. Les œufs fécondés sont pondus vingt-huit jours après l'accouplement et sont déposés dans des nids ou parmi les roches et les sols sur le terrain. Les œufs éclosent habituellement à des températures supérieures à 15 °C. Dans les bonnes conditions, ils vont éclore après onze à quinze jours d'incubation et donner des naissains. Le nombre d'œufs que l'escargot pond dépend souvent de la maturité et de l'âge de l'escargot et se situe entre 100 à 500 œufs [2]. Les œufs ont un gros diamètre et un petit diamètre respectivement de 4 mm et de 3 mm [3] avec des jeunes très fragiles. Cet escargot est très actif la nuit ou après les pluies tropicales [4] et se réfugie sous abri durant le jour. *Achatina fulica* atteint la maturité sexuelle à trois mois d'âge et les premières pontes surviennent à 3 mois en élevage [5]. C'est un escargot dont les plus gros individus d'élevage peuvent dépasser 20 cm, avec une masse de plus de 120 g. Cependant la taille moyenne est plus réduite. Elle est généralement comprise entre 8 et 13 cm [6].

Les œufs d'une ponte, en particulier ceux d'*Achatina fulica*, sont en général blanc jaunâtre avec un diamètre de 4 mm [6]. Dans l'œuf, l'embryon se développe au détriment des réserves nutritives qu'il contient jusqu'à ce que le naissain sorte de sa coquille en ce qui concerne l'escargot. Cependant, dépourvus de chlorophylle, les champignons se nourrissent par l'intermédiaire de leur organe végétatif appelé mycélium constitué de fins filaments parfois visibles à l'œil nu [7]. Le mycélium sécrète des enzymes puissantes qui lui permettent de décomposer la matière organique afin d'absorber les éléments carbonés qui s'y trouvent et qui sont nécessaires à la survie de ses cellules. Ces fins filaments possèdent également un grand pouvoir de pénétration et de dissémination dans le substrat [7]. Les champignons produisent des mycotoxines qui sont des composés chimiques toxiques élaborés par des espèces de champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* [8]. Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent aussi diffuser dans le substrat qu'elles contaminent [9].

Ces métabolites sont dits « secondaires » [10] car ils ne sont pas directement nécessaires à la vie du champignon.

En revanche, indirectement, ils font partie de leur arsenal chimique de défense contre les concurrents comme les bactéries, d'autres champignons ou animaux. Parmi les animaux d'élevage, les aflatoxines sont particulièrement toxiques pour les poulets.

La présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe. Si les mycotoxines ont en commun le fait d'être produites par des moisissures et d'avoir des effets toxiques sur la santé humaine et animale, elles ne sont pas définies par référence à une structure chimique commune [11]. Or la structure chimique d'une molécule détermine sa fonction et ses propriétés à savoir sa condition de formation, sa résistance, sa stabilité et ses effets toxiques.

Les mycotoxines peuvent aussi entrer dans la chaîne alimentaire via la viande ou d'autres produits animaux tels que les œufs, le lait et le fromage en raison de la contamination de l'alimentation de l'animal [12]. Une atmosphère humide et chaude favorise leur sécrétion. De plus, les substrats riches en glucides représentent un milieu plus propice à la production de mycotoxines que celles riches en protéines. Les œufs de poules, de cailles, de poissons, de canes et d'escargots (*Helix*) sont en général plus riches en protéines qu'en glucides. L'œuf, et surtout le blanc d'œuf, contient des protéines de qualité supérieure qui permettent le maintien de la substance tissulaire et une prise rapide de masse musculaire. Les protéines de l'œuf sont considérées comme protéines de référence. La teneur protéique de l'œuf entier est de 14 % ce qui représente un apport de 8 g pour un œuf de 55 g [13]. Ce sont donc des milieux très peu propices à la production de mycotoxines.

En général, les œufs d'*Achatina fulica* mis à incuber sur différents substrats d'incubation n'éclosent pas tous. Il se pourrait que des microorganismes tels que les champignons soient présents dans ses derniers et qu'en conditions favorables ces champignons produisent des mycotoxines qui pourraient agir sur les œufs d'*Achatina fulica* en réduisant leur taux d'éclosion.

Le but de ce travail est de caractériser la flore fongique des substrats d'élevage et d'incubation des œufs d'*Achatina fulica* afin d'identifier et de quantifier par HPLC les mycotoxines (aflatoxines et ochratoxine A) produites par chacun des champignons isolés après incubation des œufs d'*Achatina fulica* en présence de chacun d'eux.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Le matériel biologique était constitué d'une part du substrat d'élevage composé d'un mélange à quantité égale de sol brun sablo argileux provenant des plantations de la forêt de l'Université Nangui Abrogoua d'Abidjan et de sol sableux d'environ 87 % de quartz (sol de mer) ; des substrats d'incubation que sont le Sol de Forêt Vierge, le Sol de Plantation, le Coton Hydrophile, les Bourres de Coco (*Coco nucifera*) et la Sciure de Bois et d'autre part des escargots *Achatina fulica* et leur aliment composé de feuilles de papayer (*Carica papaya* : Caricaceae), de laitue (*Lactuca sativa* : Apiaceae) et de choux (*Brassica oleraceae* : Brassicaceae).

3 MÉTHODES

3.1 ISOLEMENT DES SOUCHES DE CHAMPIGNONS

Pour la recherche de champignons microscopiques, les prélèvements ont été effectués au niveau des bacs d'élevage et d'incubation avant et après 2 semaines d'incubation des œufs d'*Achatina fulica*. Une série de dilutions des échantillons au 1/10 a été effectuée selon la méthode de [14]. Les dilutions 10^{-4} et 10^{-5} ont été retenues pour l'ensemencement du milieu solide choisit pour l'isolement sélectif des champignons à raison de 3 boîtes de Pétri par dilution. Le milieu choisit est le Potato Dextrose Agar (PDA). L'acide citrique qui est un bactéricide a été ajouté au milieu au moment de sa distribution dans les boîtes de Pétri sous la hotte à raison de 0,25 g/ 250 ml d'extrait. Toutes les opérations sont faites dans des conditions d'asepsie rigoureuses en récipients stérilisés.

L'ensemencement a été effectué en surface par étalement de 1 ml de l'inoculum sur le PDA solidifié. Les boîtes ont été mises à incuber pendant 7 jours à une température moyenne de 28,28°C. Les souches ont été identifiées en se basant sur leurs caractères culturels et morphologiques [15 ; 16] permettant ainsi de déterminer le genre et si possible l'espèce de chaque souche.

3.2 IDENTIFICATION DES MYCOTOXINES PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

3.2.1 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les œufs ont été lavés délicatement à l'eau du robinet pour les débarrasser des résidus de substrats. Ils ont été ensuite désinfectés à l'alcool 50° puis rincés à l'eau distillée stérile.

Chacune des souches pures a été repiquée seule sur le milieu PDA à raison de trois boîtes de Pétri stériles par champignon en présence de 15 œufs d'*Achatina fulica*. Ces boîtes ont été mises à incuber à une température moyenne de 28,28 °C pendant dix jours.

3.2.2 MODE OPÉRATOIRE

3.2.2.1 EXTRACTION ET DOSAGE PAR CLHP DES AFLATOXINES B1, B2, G1 ET G2

Vingt grammes d'échantillon finement broyés ont été mis à dissoudre dans 100 ml de solution hydro - alcoolique (80 ml Méthanol + 20 ml H₂O) pendant 12 heures. L'extraction et la purification ont été faites selon la norme ISONF EN 14123 test DN 160, adaptée aux conditions du laboratoire (LCME). Puis, après attaque, nous avons procédé à la filtration sur du papier filtre Whatman dans des erlenmeyers de 100 ml et a constitué le filtrat n°1. A 50 ml du filtrat n°1, 40 ml de réactif de clarification composé de 5 g d'acide phosphotungstique (H₃ [P(W₃O₁₀)₄] x H₂O) hydraté a été ajouté. Après 15 min, l'extrait a été filtré et recueilli dans une ampoule à décanter et constitue ainsi le filtrat n°2 qui est le trichlorométhane (CHCl₃). 10 ml de CHCl₃ ont été prélevés à trois reprises ; tous les extraits sont réunis et placés dans un ballon à colle rodé NS29/32 de 50 ml pour l'évaporation à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C.

Le résidu obtenu après évaporation a été dissout dans 400 µl de HCl auquel est ajouté aussitôt 4,6 ml de H₂O bidistillée ou Lichrosol. Le résidu ainsi traité a été filtré deux fois à l'aide d'un filtre ReziSt dans une fiole sèche. 20 ml de ce filtrat final ont été injectés dans la colonne. Au cours de l'analyse des aflatoxines, il convient d'éviter autant que possible la lumière du jour, car l'aflatoxine se décompose progressivement sous l'influence de la lumière ultraviolette.

La colonne analytique utilisée est de type Supelco C18 VP-ODS-2 phase inverse, (154 x 4,6 mm) conditionnée à 40°C avec une pré-colonne de garde de 10 x 4,6 mm. La phase mobile est constituée d'un mélange préalable acétonitrile/ méthanol (50/50) puis ce mélange et eau (60/40) à un débit de 1 ml min⁻¹.

L'appareil utilisé pour la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est de marque Shimadzu, permet une détection par fluorescence (λ excitation : 365 nm et λ émission : 440 nm). Le détecteur fluorescent est de marque Shimadzu RF 10 AXL. Le système est équipé également d'une pompe qui permet la circulation des solvants dans le circuit et d'obtenir des gradients des solvants. Un logiciel (LC-Solution) permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données.

Les injections sont effectuées avec un injecteur automatique et le volume d'injection est de 100 μ l. La durée d'acquisition par l'analyse est de 25 min. Le temps de rétention est de l'ordre de 7 minutes.

Pour la quantification des métabolites, une gamme d'étalonnage est effectuée à l'aide de substances de référence pures (aflatoxine pure).

3.2.2.2 EXTRACTION ET DOSAGE DE L'OTA

Un échantillon de 15 g préalablement broyé et homogénéisé a été mis dans un pot plastique auquel a été ajouté 150 ml du mélange méthanol/hydrogénéocarbonate de sodium à 1 % (50/50 ; V/V). Une extraction a été faite à l'aide d'un Ultra Turax pendant 2 min. L'extrait a été centrifugé à 4000 tours/min pendant 5 min puis filtré à travers un papier filtre (185 mm) Whatman (Ref 066082.775) dans une éprouvette de 25 ml.

La purification de l'OTA se fait grâce à des colonnes d'immuno-affinité R.Biopharm. 11 ml du filtrat obtenu a été dilué dans 11 ml de tampon Phosphate Butter Saline (PBS) et 20 ml de ce mélange ont été prélevés à l'aide d'une pipette et déposé en haut de la colonne d'immuno affinité à un débit de 2ml/min pour la purification.

La colonne a été ensuite lavée avec 10 ml de PBS (Phosphate Butter Saline) à un débit de 3 ml/min puis avec 1,5 ml du mélange méthanol/acide acétique en trois étapes de 0,5 ml avec une pause de 1 mm entre chaque étape à un débit de 0,5 ml/min. La colonne retient alors les molécules d'OTA grâce à un gel d'anticorps monoclonaux anti-OTA.

L'éluat se fait après lavage de la colonne avec 1,5 ml de PBS à un débit de 5 ml/min. L'éluat est évaporé jusqu'à siccité (sécher) sous un flux d'azote à une température d'environ 50°C. Il est de nouveau dissout dans 250 μ l de la phase mobile de la CLHP. L'appareil utilisée pour la Chromatographie Liquide Haute Performance permet une détection par fluorescence (λ excitation : 330 nm et λ émission : 460 nm). Le système est équipé également d'une pompe qui permet la circulation des solvants dans le circuit et d'obtenir des gradients des solvants. Un logiciel (LC-Solution) permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données.

La colonne analytique utilisée est de type Shim A – Park VP – ODS 250 x 4.6 mm, avec une pré- colonne Shim A GVP-ODS 10 x 4,6 mm. La phase mobile est un mélange acétonitrile /eau/acide acétique (99/99/2 ; V/V/V) à un débit de 1 ml/min et la température de la colonne est de 40 °C. Les injections sont effectuées avec un injecteur automatique et le volume d'injection est de 100 μ l. La durée d'acquisition par l'analyse est de 12 min. Le temps de rétention est de l'ordre de 9 minutes.

Pour la quantification des métabolites, des courbes d'étalonnage ont été réalisées à partir de standards purs des différents métabolites. Nous avons utilisé de l'ochratoxine A pure qui a pour numéro CAS 303-6479 (Iarc 1993).

3.3 TRAITEMENT DES RÉSULTATS

L'analyse statistique des valeurs a été réalisée grâce au logiciel SPSS. Duncan nous a permis de faire une comparaison des moyennes deux à deux et nous donne le comportement des champignons par groupe homogène. La différence entre les moyennes est considérée statistiquement significative au seuil de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTATS

4.1 CHAMPIGNONS IDENTIFIÉS

Les champignons isolés et identifiés ainsi que leur pourcentage d'apparition sont répartis dans le tableau I. Le pourcentage d'apparition d'un champignon est calculé selon la formule :

$$\% \text{apparition d'un champignon} = \frac{\text{Nombre d'apparitions du champignon}}{\text{Nombre total de tous les champignons}} * 100$$

% = Pourcentage

- = absence du champignon

Tableau I : Pourcentage d'apparition des champignons isolés sur substrats non stériles d'élevage et d'incubation d'œufs d'*Achatina fulica*

| Champignons | Substrats (%) | | | | | |
|------------------------------|---------------|----|------|-------|-------|-----|
| | LE | SP | SFV | SB | CH | BNC |
| <i>Aspergillus niger</i> | 10 | 10 | 12,5 | 62,5 | 28,57 | 20 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 20 | - | - | - | - | - |
| <i>Fusarium solani</i> | 20 | - | - | - | - | - |
| <i>Mucor sp.</i> | - | - | 25 | 37,50 | - | 20 |
| <i>Penicillium decumbens</i> | - | 20 | - | - | - | - |
| <i>Penicillium sp.</i> | 10 | - | 12,5 | - | 28,57 | - |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 10 | 30 | 25 | - | - | 60 |

- = absence du champignon

LE = Litière d'Elevage

SB = Sciure de Bois

SP = Sol de Plantation

CH = Coton Hydrophile

SFV = Sol de Forêt Vierge

BNC = Bourres de Noix de Coco

4.2 MYCOTOXINES IDENTIFIEES AU NIVEAU DE CHAQUE CHAMPIGNON

Les aflatoxines et l'ochratoxine A identifiées sont inventoriées dans le tableau II.

Tableau II: Récapitulatif des mycotoxines isolées à partir de chacun des champignons cultivés en présence des œufs d'*Achatina fulica*

| Mycotoxines (µg /kg) | Aflatoxine G2 | Aflatoxine G1 | Aflatoxine B2 | Aflatoxine B1 | Ochratoxine A |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Champignons | | | | | |
| <i>Aspergillus niger</i> | 14 | N/D | N/D | 5,7 | 0,15 |
| <i>Fusarium Oxysporum</i> | 4,227 | 2,420 | N/D | 0,564 | 0,13 |
| <i>Fusarium solani</i> | N/D | N/D | N/D | N/D | N/D |
| <i>Mucor sp.</i> | 65 | N/D | N/D | N/D | 0,09 |
| <i>Penicillium decumbens</i> | 174 | N/D | N/D | 26 | N/D |
| <i>Penicillium sp.</i> | N/D | 100 | N/D | N/D | 0,10 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 34 | N/D | N/D | N/D | 0,15 |

N/D : Non détecté ; LD : Limite de Détection ; LQ : Limite de Quantification

4.3 CHROMATOGRAMMES DE CHACUN DES ECHANTILLONS

Les chromatogrammes de 1 à 7 et ceux de 8 à 14 représentent respectivement l'apparition des aflatoxines et de l'ochratoxine A pour chaque champignon.

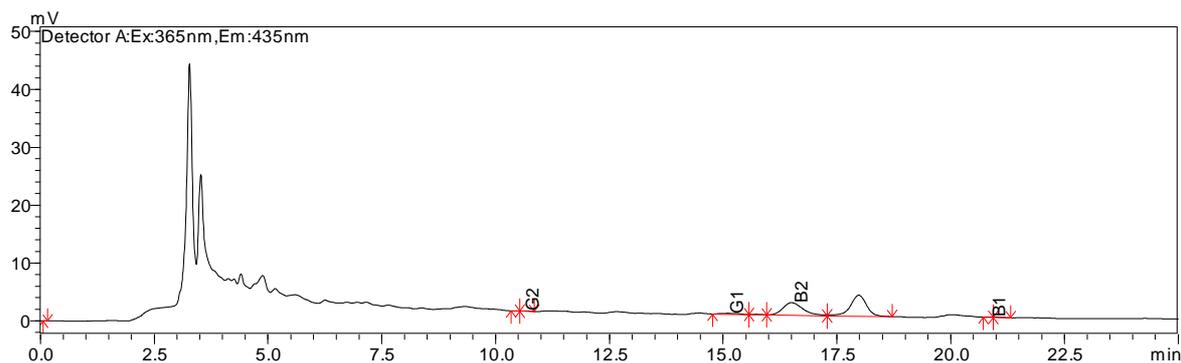


Figure 1: Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau d'*Aspergillus niger*

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|-------|--------|------|-----------------------|--------|--------|
| G2 | 10.580 | 723 | 66 | V | 14 | 0.0025 | 0.0084 |
| G1 | 15.080 | 5396 | 197 | | ND | 0.11 | 0.38 |
| B2 | 16.491 | 68031 | 2185 | V | ND | 0.0052 | 0.017 |
| B1 | 20.832 | 579 | 61 | | 5, 7 | 0.125 | 0.42 |

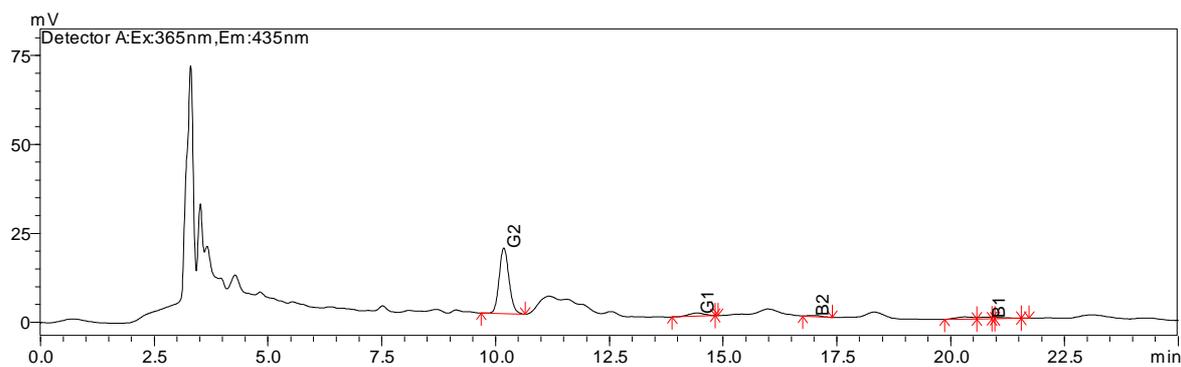


Figure 2 : Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Penicillium decumbens*

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|--------|--------|------|-----------------------|--------|--------|
| G2 | 10.177 | 278221 | 18497 | | 174 | 0.0025 | 0.0084 |
| G1 | 14.421 | 21626 | 858 | | 1 00 | 0.11 | 0.38 |
| B2 | 16.960 | 6537 | 333 | | ND | 0.0052 | 0.017 |
| B1 | 20.827 | 8331 | 429 | V | 26 | 0.125 | 0.42 |

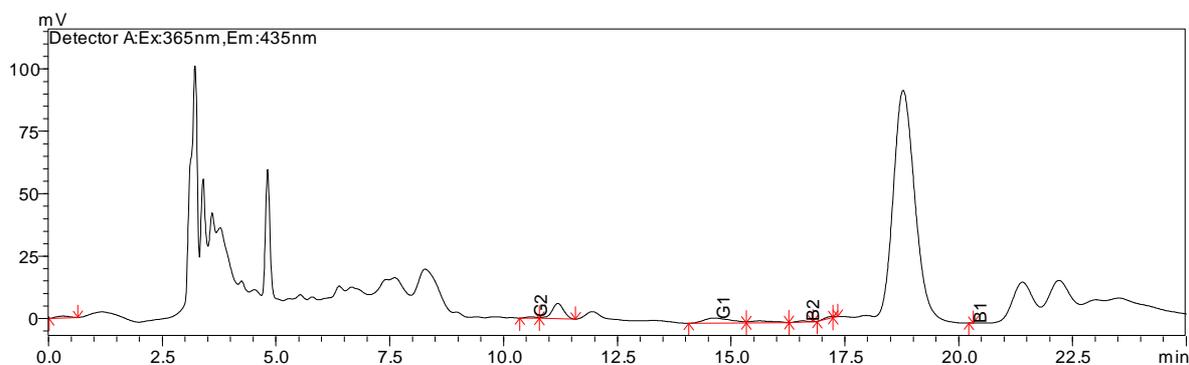


Figure 3: Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Penicillium sp.*

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|-------|--------|------|-----------------------|--------|--------|
| G2 | 10.593 | 8459 | 491 | | ND | 0.0025 | 0.0084 |
| G1 | 14.603 | 86020 | 2027 | | 1 00 | 0.11 | 0.38 |
| B2 | 16.567 | 845 | 538 | | ND | 0.0052 | 0.017 |
| B1 | 20.247 | 34 | 8 | | ND | 0.125 | 0.42 |

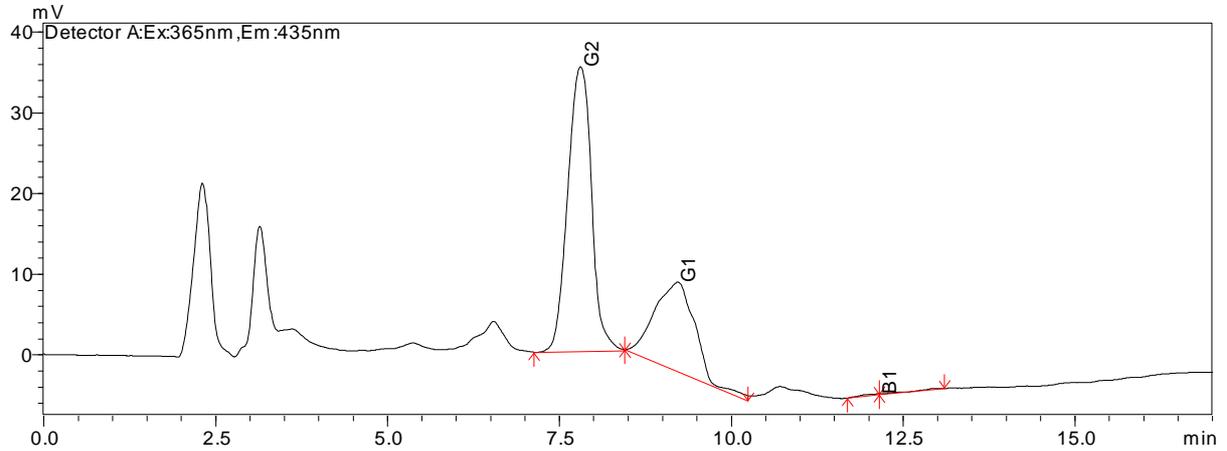


Figure 4 : Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Fusarium oxysporum*

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|-------|--------|------|-----------------------|--------|--------|
| G2 | 10.678 | 1550 | 122 | | 4,227 | 0.0025 | 0.0084 |
| G1 | 14.700 | 37194 | 786 | | 2,420 | 0.11 | 0.38 |
| B2 | 20.608 | 1465 | 98 | V | ND | 0.0052 | 0.017 |
| B1 | 20.247 | 34 | 8 | | 0,56 | 0.125 | 0.42 |

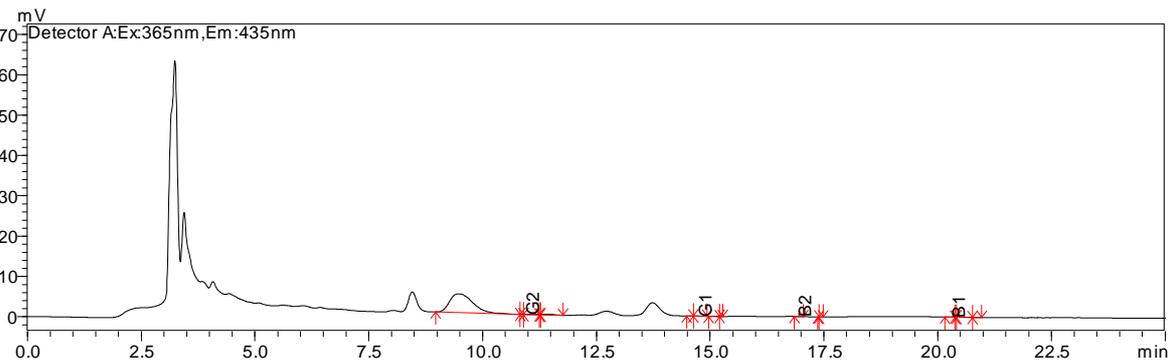


Figure 5: Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Fusarium solani*

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|------|--------|------|-----------------------|---------|--------|
| G2 | 10.878 | 41 | 14 | | ND | 0.0025 | 0.0084 |
| G1 | 14.673 | 332 | 29 | V | ND | 0.11 | 0.38 |
| B2 | 16.858 | 10 | 109 | 4 | ND | 0.00003 | 0.0001 |
| B1 | 20.237 | 13 | 319 | 34 | ND | 0.125 | 0.42 |

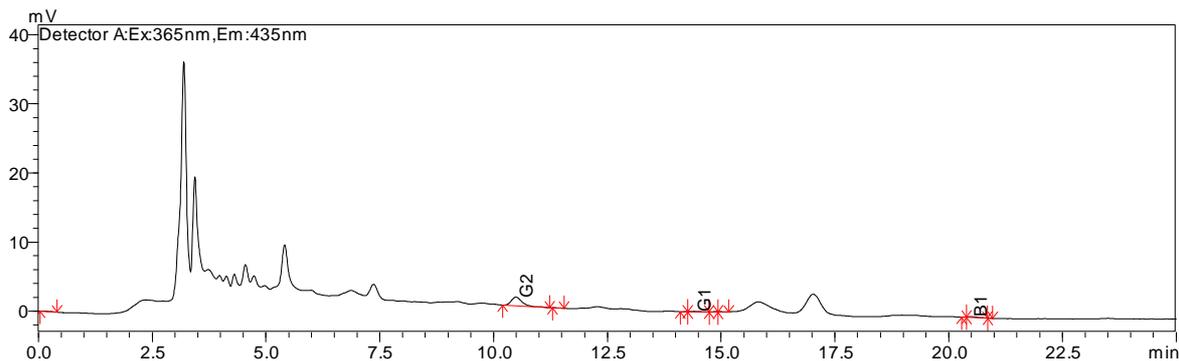


Figure 6 : Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Mucor* sp.

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|-------|--------|------|-----------------------|--------|--------|
| G2 | 10.492 | 21102 | 1253 | | 65 | 0.0025 | 0.0084 |
| G1 | 14.405 | 1353 | 108 | V | ND | 0.11 | 0.38 |
| B1 | 20.474 | 1867 | 104 | V | ND | 0.0052 | 0.017 |
| B2 | 20.608 | 1465 | 98 | V | ND | 0.125 | 0.42 |

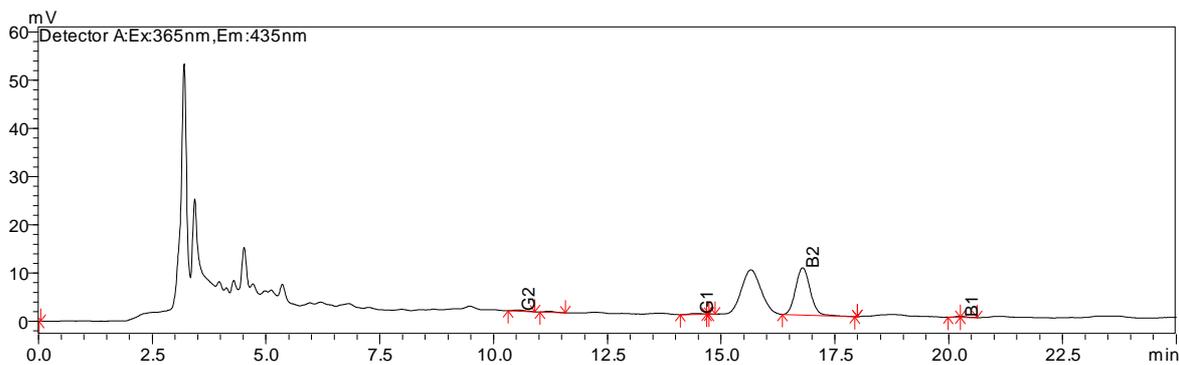


Figure 7 : Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Trichoderma* sp.

| Name | Ret Time | Area | Height | Mark | Concentration (µg/kg) | LD | LQ |
|------|----------|--------|--------|------|-----------------------|----|---------------|
| G2 | 10.537 | 4255 | 222 | | 34 | | 0.0025 0.0084 |
| G1 | 14.460 | 3563 | 192 | | ND | | 0.11 0.38 |
| B2 | 16.788 | 217314 | 9820 | S | ND | | 0.0052 0.017 |
| B1 | 20.274 | 1892 | 178 | V | ND | | 0.125 0.42 |

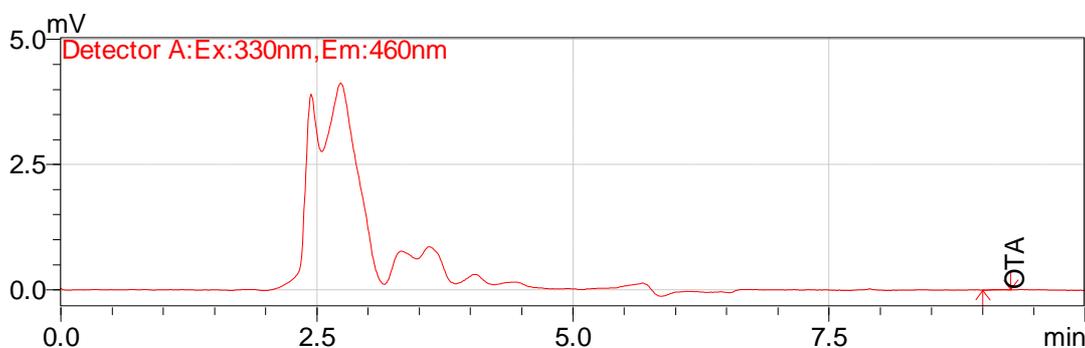


Figure 8 : Chromatogramme de l'OTA au niveau d'*Aspergillus niger*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|----------|--------|-----------------------|---------------|------|----|
| 9.10 | Detected | | 0.15±0.02 | OchratoxineA | 0.05 | 0 |

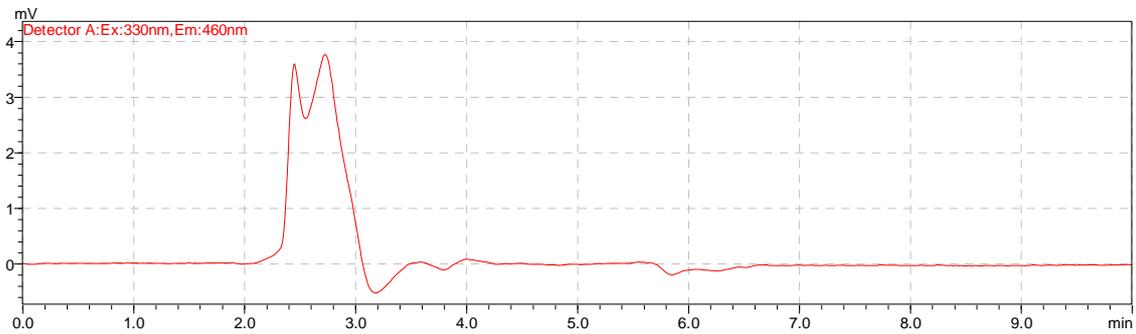


Figure 9 : Chromatogramme de l'OTA au niveau de *Penicillium decumbens*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|--------|--------|-----------------------|---------------|------|-----|
| 9.10 | ND | | 0.000 | Ochratoxine A | 0.05 | 0.2 |

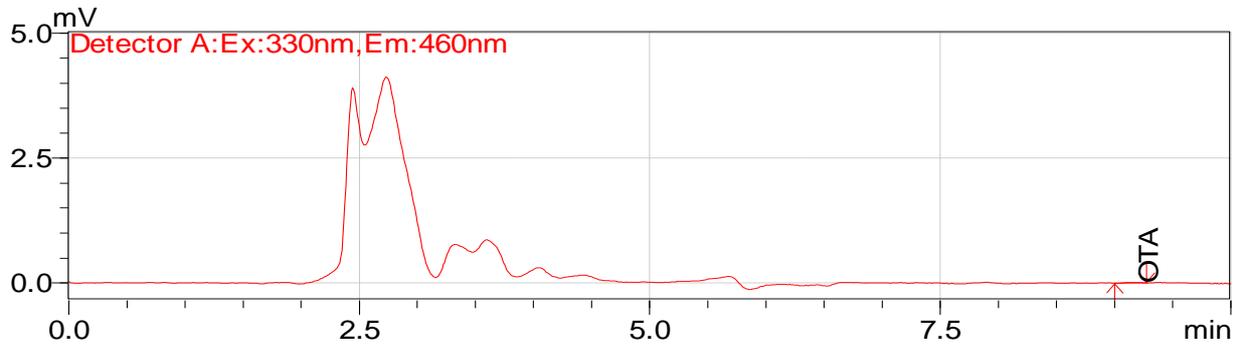


Figure10: Chromatogramme de l'OTA au niveau de *Penicillium sp.*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|----------|--------|-----------------------|---------------|------|-----|
| 9.10 | Detected | | 0.10±0.02 | OchratoxineA | 0.05 | 0.2 |

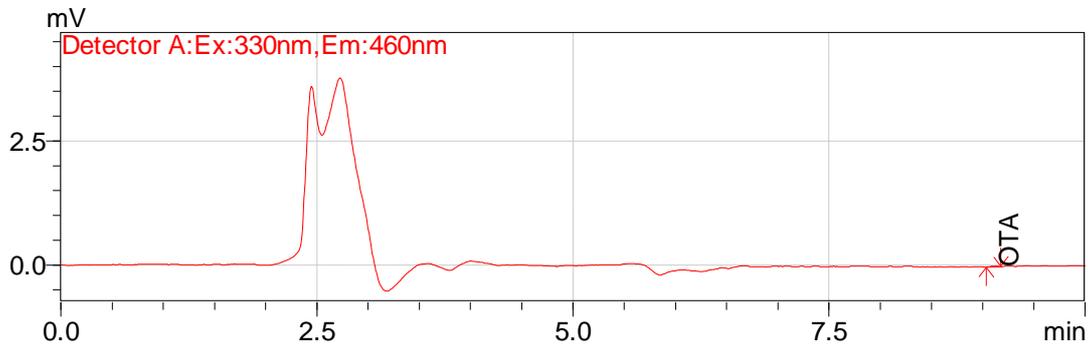


Figure 11 : Chromatogramme de l'OTA au niveau de *Fusarium oxysporum*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|----------|--------|-----------------------|---------------|------|-----|
| 9.10 | Detected | | 0.13±0.02 | Ochratoxine A | 0.05 | 0.2 |

LD : Limite de Détection ; LQ : Limite de Quantification

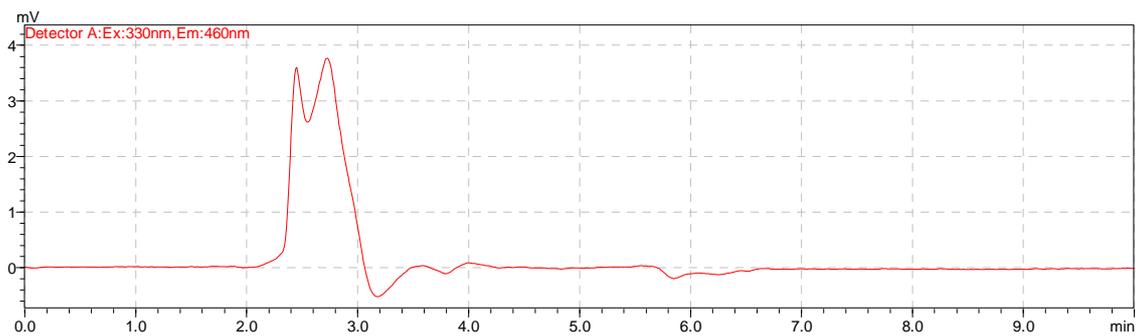


Figure 12: Chromatogramme de l'OTA au niveau de *Fusarium solani*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|--------|--------|-----------------------|---------------|------|-----|
| 9.10 | ND | | 0.000 | OchratoxineA | 0.05 | 0.2 |

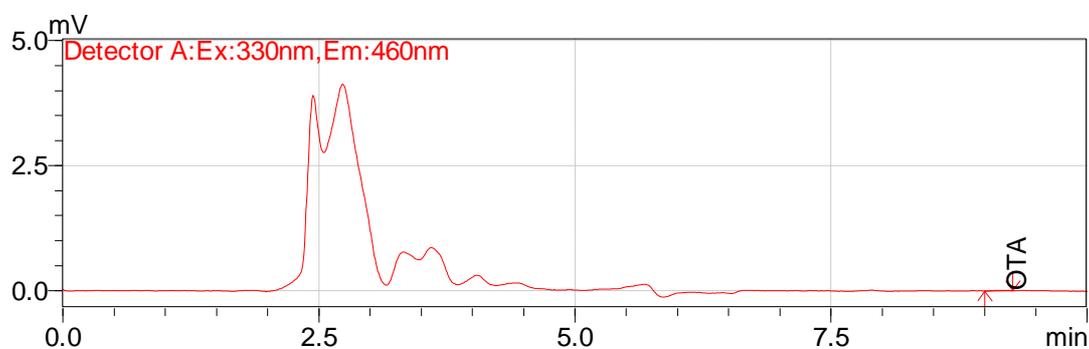


Figure 13 : Chromatogramme de l'OTA au niveau de *Mucor sp.*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|----------|--------|-----------------------|---------------|------|-----|
| 9.10 | Detected | | 0.09 ±0.02 | OchratoxineA | 0.05 | 0.2 |

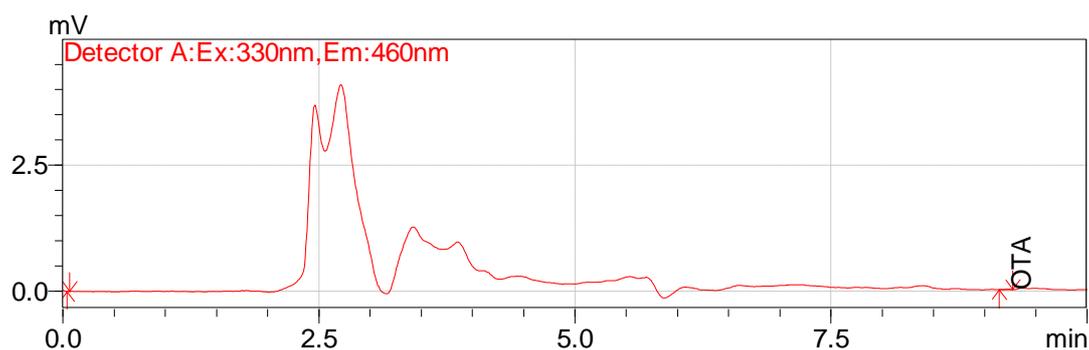


Figure 14 : Chromatogramme de l'OTA au niveau de *Trichoderma sp.*

| Ret.Time | Search | Report | Concentration (µg/kg) | Compound Name | LD | LQ |
|----------|----------|--------|-----------------------|---------------|------|-----|
| 9.10 | Detected | | 0.15 ±0.02 | OchratoxineA | 0.05 | 0.2 |

Analyse réalisée par le LCAE (Laboratoire Central d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie) labeco@aviso.ci
 ND : non détecté ; LD : Limite de Détection ; LQ : Limite de Quantification

5 DISCUSSION

Les champignons isolés sont pratiquement les mêmes dans presque tous les substrats avec des pourcentages d'apparition plus ou moins variables. Ces champignons se sont développés à une température moyenne de 28,28 °C et à une humidité moyenne de 82,2 %. Selon [17], ces conditions sont favorables à la croissance des champignons. Le pourcentage d'apparition des champignons est lié à la fréquence de leur présence sur les différents substrats.

La nature et la quantité des mycotoxines produites dépendent des espèces fongiques, des conditions écologiques et de la stabilité de ces toxines dans les milieux alimentaires [8]. En effet au cours de notre travail, plusieurs mycotoxines ont été identifiées à des quantités différentes.

En présence d'*Aspergillus niger*, la concentration d'AFB1 est de 5,7 µg/kg, la quantité d'OTA de 0,15 µg/kg et l'AFT de 19,87 µg/kg. La réglementation européenne [18] établie respectivement à 2 µg/kg, 4 µg/kg et 4 µg/kg la limite maximale de chaque entité dans les céréales et dérivés. Si nous nous référons à cela, nous constatons que les œufs qui constituent un substrat nutritif pour le champignon, ont été mis à incuber sur une souche qui a permis une production importante d'aflatoxine B1 qui est reconnue pour sa grande toxicité. Ce sont les aflatoxines B1 et G2 qui auront un effet négatif sur les œufs ce qui aboutira à un taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* très faible sachant que leur toxicité s'échelonne dans l'ordre suivant : B1 > G1 > B2 > G2 [19].

En ce qui concerne *Fusarium oxysporum* les concentrations d'AFB1 (0,564 µg/kg) et d'OTA (0,13 µg/kg) sont faibles et resteront sans effet réel sur le taux d'éclosion des œufs parce qu'elles sont en dessous des normes qui sont de 2 µg/kg pour AFB1 et de 5 µg/kg pour l'OTA. Par contre le taux d'AFT de l'ordre de 7,211 µg/kg est au dessus de la norme européenne (4 µg/kg). Les AFG2 et AFG1 sont des métabolites de l'AFB1. La toxicité des aflatoxines G2 et G1 sont respectivement 90 % et 50 % moindre que celle de l'AFB1 [20]. Le fait que G2 et G1 soient des toxines accessoires et produites à faible concentration ne leur permettra pas d'atteindre réellement leur fin c'est-à-dire détruire les œufs d'*Achatina fulica* mais associés leur effet sera néfaste pour les œufs. Selon [19], le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même mais peut aussi venir de ses métabolites et de l'effet de synergie possible en cas de multi contamination. Dans l'échantillon *Fusarium solani* par contre, aucune des deux mycotoxines n'a été détectée. Cela signifie que la présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe [8 ; 21] c'est-à-dire présence d'atmosphère humide et chaude avec un substrat riche en glucide.

Cependant au niveau de *Mucor sp.* (65 µg/kg) et de *Trichoderma sp.* (34 µg/kg) seule l'AFG2 est détectée. L'AFG2 représente ici la concentration d'AFT présente dans chacun des deux échantillons. Ses différentes concentrations sont supérieures à la norme européenne (4 µg/kg). L'OTA est produite à très faible quantité.

Malgré le fait que l'AFG2 ait une toxicité moindre de 90 % que celle de l'AFB1, l'association AFG2 et OTA pourrait avoir un effet négatif sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* si les conditions environnementales sont réunies.

La concentration d'AFB1 détectée au niveau de l'échantillon *Penicillium decumbens* est de 26 µg/kg. Cette concentration dépasse la teneur maximale admissible fixée par la réglementation européenne (2 µg/kg) pour les céréales et dérivés. Les œufs en présence d'une telle quantité d'AFB1 redouté pour sa toxicité, aura un effet négatif sur les œufs. A partir des œufs infectés avec les champignons isolés, nous sommes arrivés grâce à l'HPLC à détecter des mycotoxines, ce qui nous amène à dire qu'à partir de la qualité et de l'état sanitaire des aliments consommés par l'escargot, les œufs issus des pontes peuvent être contaminés par ces toxines. [19] le confirme.

6 CONCLUSION

Six des sept champignons arrivent à produire des aflatoxines et l'ochratoxine A. Cette dernière est présente en très faible quantité quelque fois sous forme de traces. Malgré que les mycètes soient en présence d'un substrat nutritif que sont les œufs d'*Achatina fulica* très peu riches en glucides, il y a eu production de mycotoxines par ces derniers. C'est dire que malgré l'utilisation d'un substrat très peu propice, en milieu favorable, les champignons toxigènes sont susceptibles de produire des mycotoxines. Ces quantités de mycotoxines bien que faibles pourraient avoir une incidence sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*. Une bonne hygiène de base peut prévenir la propagation des maladies. Il faut nettoyer les bacs d'élevage régulièrement en retirant les excréments et les reliquats de nourriture ainsi que toute autre matière en décomposition qui pourraient devenir un substrat pour des organismes pathogènes. La stérilisation à la vapeur ou par chauffage de la litière d'élevage réduirait de manière significative la présence de microorganisme sur la litière avant que les géniteurs ayant atteint la maturité sexuelle y soient déposés pour y pondre. Les aliments doivent être bien frais et sans moisissure.

REFERENCES

- [1] B. Rowson, Warren, & C. Ngereza, Les mollusques terrestres de l'île de Pemba, à Zanzibar, en Tanzanie et son statut de île océanique *Zookeys* 70, doi : 10, 3897, 2010.
- [2] T. Hoffman, & N. Pirie, *Achatina fulica* giant african snail. Animal diversity Web. http://animaldiversity.org/accounts/Achatina_fulica/ 2014.
- [3] D. Zongo, L'élevage des escargots, une source insoupçonnée de protéines de hautes valeurs nutritionnelles, Fiche technique n° 2 ENSA/ Lacena, 5-9 ; une zootechnie nouvelle AISA développement 4 : P 3-4, 1994.
- [4] P. Mespoulhé, Les Achatines 11p, 2004. <http://www.futura-sciences.com/magazines/nature/infos/dossiers/d/zoologie-achatines-326/>
- [5] A. Otchoumou, K. N'da, & K. D. Kouassi, L'élevage des escargots géants comestibles d'Afrique : Inventaire de végétaux sauvages consommés par *Achatina achatina* (Linné 1758) et préférences alimentaires, *Livestock Research for Rural Development* 17(3) 028, 2005.
- [6] J. C. Cobbina, & A. Vink Onwuka, L'élevage d'escargots: production, transformation et commercialisation, *Agrodok* 47: 14- 23, 2008.
- [7] Anonyme, Initiation à la mycologie, Mode de vie et écologie, 11p, 2015. <http://mycostra.free.fr/initiation/ecologie.htm>
- [8] N. Belkacem, Les mycotoxines : production et voie de biosynthèse, Institut National Polytechnique de Toulouse, Master 2 Recherche, 23p, 2008.
- [9] E. Bloom, E. Nyman, A. Must., C. Pehrson , & L. Larsson, Molds and mycotoxins in indoor environments - A survey in water-damaged buildings " *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* ", 6(11), p.671- 678, 2009.
- [10] A. Pfohl-Leszkowicz, Risques mycotoxicologiques pour la santé des animaux et de l'homme, Doi : CND-12-2000-35-6-0007-9960-101019-ART5, 2008.
- [11] J. F. Quillien, Les mycotoxines. Projet européen Flair Flow Europe 4. Production semestrielle. INRA France, PME n°3, 24p, 2002.
- [12] Eufic (The European Food Information Council), La sécurité alimentaire. 9P, 2006.
- [13] CEN (Collège des Enseignants de Nutrition), Les catégories d'aliments. Support de Cours (Version PDF). Université Médicale Virtuelle Francophone 31p, 2011.
- [14] J. Pochon, & P. Tardieux, Techniques d'analyse en microbiologie du sol, Edition de la Tourell. St Mandé, 108p, 1962.
- [15] H. L. Barnett, & B. Hunter, Illustrated genera of imperfect fungi, Third edition. Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA, 241p, 1972.
- [16] R. Champion, Identifier les champignons transmis par les semences, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) 147, rue de l'Université, 75338 Cedex 07,398p, 1997.
- [17] J. P. Larpent, Mémento de microbiologie, édition Lavoisier, 1990.
- [18] C.E N°1126, Rapport portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs / *Off Union Eur*, PP. 1-255, 2007.
- [19] AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales, Rapport final pp. 13-45, 2009.
- [20] R. J. Cole, & R. H. Cox, Handbook of Toxic Fungal Metabolites, New York: Academic Press, 894-897, 1981.
- [21] A. Pfohl-Leszkowicz, Les mycotoxines dans l'alimentation: Évaluation et gestion du risque, Publié par tec-et-doc. 500p, 2014.