

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE –ALGER



Mémoire

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER COMPLEMENTAIRE EN SCIENCES VETERINAIRES

THEME

**Recherche de l'aflatoxine B1 dans l'aliment complet de volaille par la
technique d'ELISA**

Présenté par : HAMICI Amira

Soutenu le 09/03/2019

Devant le jury

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| - Président : M.Zaouani M. | Maître de Conférences Classe B (ENSV) |
| - Promoteur : M.Mohammedi D. | Maître de Conférences Classe A (ENSV) |
| - Examineur 01 : Mme Mohammedi S. | Maître Assistante Classe A (ENSV) |
| - Examineur 02 : Mme Yahiaoui F. | Maître de Conférences Classe B(ENSV) |

Année Universitaire 2018/2019

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie Dieu Tout Puissant de m'avoir accordé la force et la volonté de poursuivre mes études et achever ce travail.

Je remercie mon promoteur Monsieur Mohammedi Dahmane pour ses conseils et pour m'avoir honorée en acceptant de diriger ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à M. Zaouani Mohammed, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Et mes examinateurs : Mme Mohammedi Sarah et Mme Yahiaoui Fatima qui ont bien voulu examiner mon modeste travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à tout le cadre professoral et administratif de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Finalement, j'exprime mes vifs et sincères remerciements à toute personne ayant participé de près ou de loin au bon déroulement et à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents :

La prunelle de mes yeux, celle qui m'a donné la vie et sans qui je ne peux vivre :

À toi maman

Mon père, qui est toujours à mes cotés

Ma sœur Sarah qui n'a cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage et de
générosité.

À toute ma merveilleuse famille, ma grand-mère et mes oncles que j'aime beaucoup;

À tous les amis qui ont été présents pour moi.

A tous ceux que j'aime.

HAMICI AMIRA

Sommaire

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I : Mycotoxines	3
---------------------------------------	---

1-Histoire	3
-------------------------	---

2-Définition	3
---------------------------	---

3-Origine des mycotoxines	5
--	---

4-Structure des mycotoxines	5
--	---

5- Mycotoxinogène	6
--------------------------------	---

5.1 Généralités.....	6
----------------------	---

5.2 Facteurs physiques.....	6
-----------------------------	---

5.3 Facteurs chimiques.....	7
-----------------------------	---

5.4 Facteurs biologiques	8
--------------------------------	---

Chapitre II : Aflatoxines	10
--	----

1-Définition	10
---------------------------	----

2-Structure	10
--------------------------	----

3-Propriété physico-chimiques	12
--	----

4-Moisissures productrices – Toxinogène	13
--	----

5-Toxicocinétique	13
--------------------------------	----

Chapitre III : Impact des Aflatoxines dans les productions animales	16
--	----

1-Transfert des aflatoxines dans les productions animales	16
--	----

1.1 La contamination des productions carnées.....	16
---	----

1.2 La contamination du lait et des produits laitiers.....	16
--	----

Sommaire

2- Impact sanitaire	17
2.1 Toxicité des aflatoxines.....	17
2.2 Effets des aflatoxines.....	18
3- Impact économique	19
Chapitre IV : Détection, prévention et détoxification des mycotoxines	21
1-Méthodes de détection des aflatoxines	21
2-Prévention	22
2.1 Lutte avant la récolte.....	22
2.2 Lutte au moment de la récolte.....	22
2.3 Lutte et décontamination après récolte.....	22
3-Méthodes de détoxification ou de décontamination des aliments	22
3.1 Procédés physiques.....	22
3.2 Procédés chimiques.....	23
3.3 Procédés biologiques.....	24

Partie expérimentale

1-Objectifs	26
2-Matériels et méthodes	26
2.1 Matériels.....	26
2.2 Méthodes.....	28
2.2.1 Echantillonnage.....	28
2.2.2 Protocole d'extraction.....	28
2.2.3 Test ELISA.....	32

Sommaire

3- Résultats et discussion	34
3.1 Résultats.....	34
3.2 Discussion.....	36
Conclusion et perspectives	37

Figure 1 : Structure des principales aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1. (Amani L., 2016).

Figure 2 : Structure générale des aflatoxines. (Gauthier A., 2016).

Figure 3 : Voies de métabolisation et d'élimination de l'aflatoxine B1. (Kensler et al., 2003).

Figure 4 : Estimation des apports d'AFM1 en nanogramme (ng), par individu et par an, selon le type de produit laitier consommé. (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

Figure 5 : LC-MS. (Jean-Christophe Meil., 2017).

Figure 6 : ELISA. (Jean-Christophe Meil., 2017).

Figure 7 : Tests rapides. (Jean-Christophe Meil., 2017).

Figure 8 : Rangement idéal du réfrigérateur. (Gauthier A., 2016).

Figure 9 : Réactifs fournis avec le kit ELISA. (Photo personnelle).

Figure 10 : Protocole d'extraction. (Photos personnelles).

Figure 11 : Protocole d'ELISA. (Schéma de RomerLabs).

Figure 12 : Courbe d'étalonnage.

Tableau 1 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production. (El Khouri A., 2007).

Tableau 2 : Principales mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale. (Bennet et Klich., 2003).

Tableau 3 : Absorbance des standards.

Tableau 4 : Différentes concentrations de l'AFB1 dans les échantillons d'aliments destinés aux bétails et aux volailles.

Tableau 5 : Teneur en aflatoxines B1 des échantillons étudiés.

% : Pourcent

FAO : Food and Agriculture Organization

CPA : Acide CycloPiazonique

Aw : Activity of water

°C : Degré Celsius

pH : Potentiel hydrogène

O2 : Oxygène

CO2 : Dioxyde de Carbone

AF : Aflatoxine

OTA : Orchatoxine A

AFB1 : Aflatoxine B1

µL : Microlitre

mL : Millilitre

ng :nanogramme

Mg : Milligramme

g : Gramme

Kg : Kilogramme

CIRC : Centre International de la Recherche sur le Cancer

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

Ppb : Partie par billion

Ppt : Partie par trillion

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CYP450 : Cytochrome hépatique

VHB : Hépatite Virale B

DLC : Date Limite de Consommation

DLUO : Date Limite d'Utilisation Optimale

USDA : United State Departement of Agriculture

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

GIPSA : Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration

N° : Numéro

AFM1 : Aflatoxine M1

T° : Température

UV : Ultraviolet

FDA : Food and Drug Administration

LOD : Limit Of Detection (limite de détections)

Abs : Absorbance

Ech : Echantillon

Mn : Minute

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Introduction

Introduction

Les maladies d'origine alimentaire sont à l'heure actuelle un des problèmes les plus répandus à l'échelle internationale, cela a conduit le consommateur à se soucier de la qualité sanitaire des aliments, et demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination. **(Redouane-Salah S., 2016).**

En dehors des virus et des bactéries pathogènes existant, les champignons toxigènes sont un danger gravissime pour la santé de l'homme et des animaux du fait de la sécrétion de substances toxiques appelées mycotoxines. **(Abdellah Zinedine., 2004).**

Les premières mycotoxines ont été découvertes dans les années 1960 lors d'une intoxication massive en Grande-Bretagne ayant conduit à la mort de plus de 100 000 dindons qui avaient consommé du tourteau d'arachide importée du Brésil contaminé par des aflatoxines. **(Cole et al., 2003).** Les principaux facteurs responsables de la production de mycotoxines sont un contrôle inapproprié de la teneur en humidité et de la température. **(Mahmood S et al., 2017).**

La FAO (Food and Agriculture Organisation) estime qu'environ un quart des récoltes de la planète sont susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines. **(Yiannikouris et Jouany., 2002).** La contamination par les aflatoxines dans les produits agricoles est maintenant bien reconnue comme un risque pour la santé publique. **(Reddy et al. 2010).**

Un grand intérêt est actuellement attribué à travers le monde entier à ces substances afin que chaque région ou que chaque pays de doit d'adopter une législation spécifique pour chaque aliment susceptible d'héberger cette mycotoxine. **(Abdellah Zinedine., 2004).**

L'Algérie, pays importateur de produits en grains, dispose de très peu de laboratoires utilisant en routine le dosage des mycotoxines, n'applique pas régulièrement au niveau des ports stratégiques les diverses mesures préventives ou procédures de surveillance, par conséquent la contamination des matières premières et des aliments par les mycotoxines est un danger potentiel.

Dans cette étude, notre travail est élaboré en deux parties : la première est bibliographique consacrée aux mycotoxines et particulièrement l'Aflatoxine B1, la seconde est la partie expérimentale dans laquelle nous avons évalué la présence et les concentrations de

l'Aflatoxine B1 dans l'aliment de volaille par la méthode ELISA, et les comparer aux normes internationales.

Partie

Bibliographique

Chapitre I

Mycotoxines

1-Histoire

Dès le moyen âge, les effets néfastes et mortels de l'ergot de seigle causés par *Claviceps purpurea* responsable de l'élaboration d'une toxine mortelle : l'ergotamine ont été décrits.

(Abdellah Zinedine., 2004).

En Angleterre dans les années 1960, l'ingestion d'une farine d'arachide contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de dindonneaux après l'apparition des premiers symptômes : perte de l'appétit, faiblesse des ailes et léthargie. Cet événement dénommé autrefois tout simplement « *Turkey-X- Disease* » a donné le départ d'une série d'études et de recherches physicochimiques et toxicologiques sur les substances actives élaborées par les moisissures. Ainsi en 1960, le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle matière toxique. **(Tantaoui Elaraki A., 1977).**

D'autres travaux ont permis de démontrer la contamination des olives par *Aspergillus flavus* et *A. ochraceus* producteurs respectifs d'aflatoxines et d'ochratoxines ainsi qu'une multitude d'espèces fongiques ayant de pouvoir de synthétiser plusieurs types de toxines qui ont été mis en évidence par des tests biologiques. **(Zinedine A., 2004).**

En 1989, les recherches faites par Faid et Tantaoui Elaraki ont mis à jour la toxinogénèse de deux moisissures les plus fréquentes sur des agrumes *Penicillium italicum* et *P. digitatum*.

En 1993, Kichou et Wasler ont signalé la présence de l'aflatoxine B1 dans l'alimentation destinée à la volaille. **(Zinedine A. ,2004).**

2-Définition

Le terme **mycotoxine** vient du grec « mycos » qui signifie champignon, et du latin « toxicum » qui signifie poison. **(Yiannikouris et Jouany, 2002).**

Les mycotoxines sont des substances produites par une grande variété de moisissures se développant sur différents types d'aliments bruts (céréales, oléoprotéagineux, fruits) ou transformés, et dans des situations écologiques très diverses. Elles constituent un groupe de substances toxiques présentant notamment des activités mutagènes, cancérogènes, tératogènes, immunotoxinogènes, et œstrogènes. Elles affectent les animaux d'élevage Ecole

consommant les aliments bruts contaminés. Du fait de leur transfert dans la chaîne alimentaire, et de leur grande stabilité thermique, elles constituent un danger pour la santé de l'homme. **(Royer Gwladys et Tap Julien., 2003).**

Les mycotoxines sont de nature chimique, ce ne sont ni des protéines ni des macromolécules. Ces métabolites résistent aux phénomènes d'oxydation et aux processus de cuisson (thermostables), et ont une durée de vie bien plus longue que celle des champignons les ayant synthétisés. **(Gallot J et al., 2000).**

La contamination des produits par les mycotoxines se réalise lorsqu'un ensemble de conditions environnementales au champ, ainsi que des procédés mal maîtrisés de récolte, de stockage et de transformation sont réunies. **(Yannikouris et Jouany., 2002).**

Cinq genres de champignons, dits toxigènes ont la capacité de produire des mycotoxines. Il s'agit des genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps* présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production. (El Khouri A., 2007).

Champignons	Toxines
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ochratoxine A Stérigmatocystine
<i>Penicillium</i>	Citrinine ,Patuline ,Pénitern A Acide cyclopiazonique OchratoxineA
<i>Fusarium</i>	Trichothécénes ,Zéaralécone Fumonisines ,Fusarine Moniliformine
<i>Alternaria</i>	Acide ténuazonique Alternariol
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot

3-Origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont élaborées par des champignons ou micromycètes lors de quatre processus différents mettant en jeu respectivement le métabolisme secondaire fongique, la bioconversion de composés végétaux (dicoumarol), la réaction de la plante à des agressions (coumestrol), ou l'association plante-champignons (cas des champignons endophytes).

(Redouane-Salah S., 2016).

4-Structure des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés de structure variable, aliphatique ou polycyclique, aromatique ou non. Elles sont neutres, acides ou basiques, mais presque toujours peu hydrosolubles. **(Marasas et al., 1988).**

Les mycotoxines sont, pour la plupart, des composés hétérocycliques insaturés. La présence de doubles liaisons C=C joue souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes. C'est notamment le cas pour les aflatoxines dont la double liaison à l'extrémité des groupements furanes permet l'addition d'O₂ et la formation d'un cycle triangulaire époxyde, extrêmement toxique. **(Tabuc C., 2007).**

5-Mycotoxinogenèse

5.1 Généralités

La mycotoxinogenèse correspond à l'ensemble des conditions nécessaires au processus de synthèse et de sécrétion des toxines fongiques dans l'environnement. **(Moreau C., 1994).**

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit. **(Pfohl Leszkowicz A., 1999).**

La sécrétion des mycotoxines est un phénomène complexe conditionné par divers facteurs d'ordre physiques, chimiques et biologiques. **(D'Mello et al., 1997).**

5.2 Facteurs physiques

-Activité de l'eau (Aw)

L'activité de l'eau, symbolisée par le sigle Aw (pour Activity of Water), est définie comme le rapport de la pression de vapeur d'eau d'un produit (p) sur la pression de vapeur de l'eau pure (p₀), à une température donnée. **(Pit et Hoking., 1985).**

L'Aw exprime la quantité d'eau libre disponible dans une substance solide ou liquide, elle permet de rendre compte de la quantité d'eau indispensable aux réactions biochimiques des micro-organismes.

Ce paramètre peut varier de 0 à 1. Plus l'Aw est grande, plus la quantité d'eau disponible pour la croissance d'un micro-organisme est importante.

L'Aw requis pour la croissance d'une moisissure est inférieure à celui requis pour la mycotoxinogenèse. La présence d'une moisissure dans un aliment ne signifie donc pas obligatoirement que l'on y retrouvera des toxines fongiques. **(Pfohl-Leszkowicz A., 1999).**

La majorité des moisissures se forme à partir d'une Aw de 0.85. Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont la capacité de se multiplier à des Aw inférieures à 0.75 et pour une température de 25°C. **(Lesage et Kahagnier., 1998).** Elles font partie des espèces xérophiles que l'on retrouve dans les produits pauvres en eau comme les céréales et les fruits secs. En revanche, quelques espèces de *Fusarium* exigent une Aw supérieur à 0.98, il s'agit de

moisissures de champs qui se développent sur les plantes endommagées ainsi que dans les milieux riches en eau. (Castegnaro M et Pfohl., 2002).

-Température

La température est un facteur prépondérant de la production de toxines. Elle est intimement liée à l'activité de l'eau. De même que pour l'Aw, la température idéale de croissance d'un champignon ne correspond pas à celle de la production des toxines. (Norholt et al., 1979).

La température optimale pour la croissance des moisissures se situe entre 20 et 30°C, cependant elles peuvent croître dans un vaste intervalle de T° allant de 4 à 40°C. (Zinedine A., 2004).

-Lumière

Certaines espèces ne peuvent pas se passer de lumière tandis que d'autres la fuient : chez *Verticillium agricinum*, l'exposition prolongée aux rayons ultraviolets peut limiter la croissance voire provoquer la mort du mycélium. (Tabuc C., 2007).

5.3 Facteurs chimiques

-Acidité du milieu-pH

Le potentiel hydrogène (pH) reflète l'activité chimique des ions hydrogènes (protons) en solution. Il permet de déterminer si une solution est acide ou alcaline.

Les moisissures peuvent croître dans une gamme de pH allant de 3 à 8, leur pH optimal de croissance est situé entre 5 et 6 (pH acide). (Blackwell et al., 1994).

-Composition gazeuse

La plupart des moisissures sont aérobies, c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'oxygène, sous la forme de dioxygène (O₂) pour pouvoir se développer. (Paster et Bullerma., 1988).

-Nature du substrat

Ce sont des nutriments dont les champignons ont besoin pour pousser, ces molécules sont des sucres simples, des fractions d'amidon, des peptides et des substances carbonées comme les acides aminés. (Madhysta et al., 1990).

La toxigenèse dépend fortement de la composition chimique du substrat sur lequel le champignon prolifère. **(Payne et Hagler., 1983).**

-Traitement chimique du milieu

Bien que l'utilisation des pesticides diminue l'apparition des mycotoxines, il a été démontré qu'à des concentrations sub-létales la synthèse de certaines mycotoxines est facilitée. **(Moss et Frank., 1987).**

5.4 Facteurs biologiques

-Facteurs intrinsèques

Parmi les espèces réputées toxigènes, toutes les souches ne le sont pas. A chaque souche est déterminé un potentiel qui est exprimé par le logarithme de la concentration maximale en toxine. **(Royer Gwladys et Tap Julien., 2003).** Ce sont les facteurs qui sont directement liés à la souche elle-même, comme la vitesse de croissance, la capacité de dissémination ou encore la longévité des spores. **(Moreau., 1994).**

-Interactions entre les micro-organismes

La présence simultanée de micro-organismes module la production de mycotoxine ainsi que la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet inhibiteur sur la production de toxine. **(Nguyen M., 2007).**

-Pratiques agricoles

Les pratiques telles que le labourage, la rotation des cultures, ainsi que les mesures de stockage jouent un rôle dans le développement des toxines fongiques. **(Lis et Deep., 1991).**

Tableau 2: Principales mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale. (Bennett et Klich., 2003).

Mycotoxines	Champignons producteurs	Denrées alimentaires
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius, A. bombycis A. pseudotamarii, et A. ochraceoroseus</i>	Arachides, céréales, graines de coton, épices, fruits, etc.
Ochratoxines A, B et C	<i>Aspergillus ochraceus, A. westerdijkiae, A. carbonarius, A. niger, Penicillium viridicatum, P. verrucosum et P. nord</i>	Légumes, céréales et graines de café, fromages, poissons, viandes, etc.
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum Et F. sporotrichoides</i>	Maïs, blé, orge, etc.
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i>	Maïs et autres céréales.
Trichothécenes	<i>Fusarium spp.</i>	Maïs et blé.
Patuline	<i>Aspergillus spp. et Penicillium spp.</i>	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).
Citrinine	<i>Penicillium rubrum, P. purpurogenum, P. viridicatum, P. citrinum A. ochraceoroseus.</i>	Orge, blé, riz, soja et seigle.

Chapitre II

Aflatoxines

1-Définition

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difurano-coumarine. **(Bhatnagar et al., 2003)**. Ces substances sont produites par des espèces d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*. **(Kurtzman et al., 1987)**.

Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent : la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunosuppression. **(Eaton & Gallagher., 1994)**. Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1.

Parmi les aflatoxines, l'AFB1 est la plus fréquente et la plus toxique. Elle est considérée comme étant le plus puissant hépatocancérigène pour les mammifères et elle est classée en tant que cancérigène probable du groupe 1 par l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer (IARC). **(IARC., 1993)**.

2-Structure

Les aflatoxines forment un groupe de 18 composés structurellement proches, dont six constituent les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments (B1, B2, G1, G2, M1 et M2).

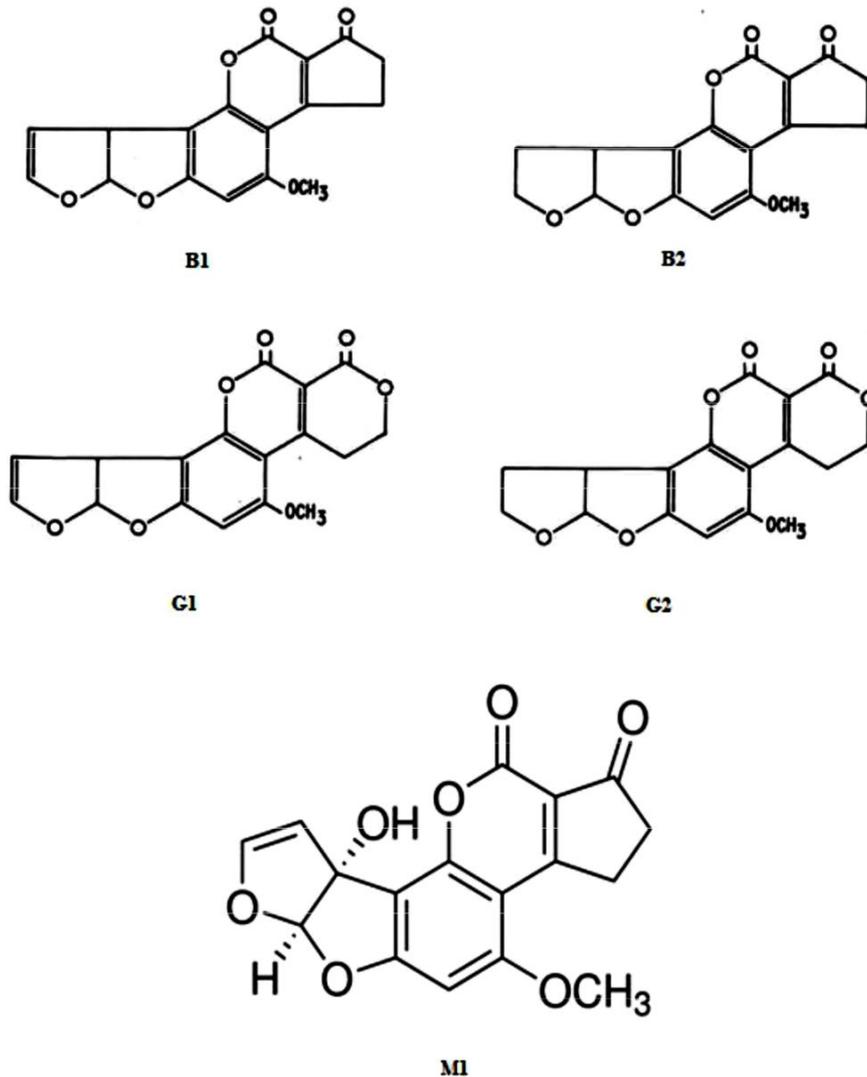


Figure 1 : Structure des principales aflatoxines : B1, B2, G1, G2 et M1.(**Amani L.,2016**).

La structure générale des AF est constituée d'un cycle coumarinique et de deux furanes, auxquels peuvent être accolés un cycle pentone (Aflatoxine B et M) ou un cycle lactone hexagonal (Aflatoxine G). Les structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur le squelette de base. (**Gauthier A., 2016**).

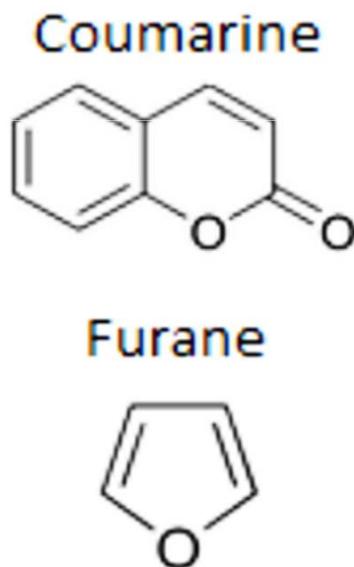


Figure 2 : Structure générale des Aflatoxines (Gauthier A., 2016).

3-Propriétés physico-chimiques

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire, très peu solubles dans l'eau, insoluble dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires. (AFSSA., 2009).

Sous une lumière UV, Les aflatoxines B émettent de manière intense une fluorescence bleue, tandis que les aflatoxines G émettent une fluorescence verte. (Asao et al., 1965). Ces couleurs sont d'ailleurs à l'origine de leurs dénominations « B » pour *Blue* et « G » pour *Green*.

Les pH extrêmes, supérieures à 10 et inférieures à 3, entraînent une instabilité de ces structures, également sensibles aux agents oxydants. La température minimale de décomposition s'élève à 237°C. Cette température peut atteindre 299°C pour les structures les plus thermostables telles que les aflatoxines M. Cette propriété les rend particulièrement résistantes aux traitements thermiques comme la congélation, la pasteurisation pu encore la stérilisation. (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

4-Moisissures productrices – Toxinogénèse

Les AF sont produites principalement par trois espèces appartenant au genre *Aspergillus* : *A.flavus*, *A. nomius* et *A. parasiticus*. *Aspergillus flavus* produit essentiellement les aflatoxines du groupe B tandis qu'*Aspergillus parasiticus* sécrète les quatre Aflatoxines principales appartenant aux groupes B et G. (Gauthier A., 2016).

Ce sont des espèces fréquemment retrouvées dans les zones chaudes et humides. Elles ont été mises en évidence dans les denrées alimentaires telles que les noix (arachides, pistaches, noisettes...), les grains (maïs, millet, sorgho...), le coton, les épices ainsi que le lait.

(Gauthier A., 2016).

La prolifération fongique et la production d'AFs ont lieu au champ et au moment du stockage. La contamination par la moisissure et la toxinogénèse sont facilitées par les mauvaises conditions de stockage, de transport et d'hygiène. En effet, l'humidité excessive, la sécheresse, les températures élevées sont autant de facteurs facilitant la croissance fongique et la toxinogénèse. (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

Les conditions optimales de croissance et de production d'AF nécessitent une activité en eau faible, de l'ordre de 0,84 à 0,86, ainsi qu'une température comprise entre 25 et 40°C.

Par ailleurs, une contamination conjointe avec une autre mycotoxine peut avoir un effet amplificateur sur la production d'une des toxines. C'est le cas de la production d'Aflatoxines si le substrat est déjà contaminé par des Fumonisines. (Gauthier A., 2016).

5-Toxicocinétique

L'absorption des AFs est possible par voie orale et trachéale. Elle est relativement rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle, plus précisément au niveau du duodénum. Les toxines sont ensuite transportées dans l'organisme grâce au phénomène de fixation aux protéines plasmatiques, notamment à l'albumine. (Gauthier A., 2016).

La distribution de l'AFB1 a lieu principalement au niveau du foie *via* la veine porte. Elle s'effectue à partir du plasma sanguin vers les hépatocytes, par un processus de diffusion passive à travers les membranes cellulaires. La distribution au sein même de la cellule se fait essentiellement au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique, du cytosol et des mitochondries. (Gauthier A., 2016).

Le métabolisme hépatique de l'AFB1 se produit en deux étapes :

La phase I s'effectue par l'intermédiaire des cytochromes hépatiques P450 (CYP450). Sous l'action des CYP450, notamment le cytochrome P1A2 (CYP1A2), l'AFB1 donne par hydroxylation l'AFM1 et par époxydation l'AFB1-8,9-époxyde, le métabolite le plus toxique. L'Aflatoxicol, l'AFM1, l'AFQ1 et l'AFP1 sont d'autres composés qui résultent du métabolisme de l'AFB1. **(Brochard G et Le Backe C., 2009).**

La phase II concerne le devenir de l'AFB1-8,9-époxyde.

L'AFB1 n'est pas directement néfaste, c'est sa métabolisation qui active sa toxicité. Bien que le métabolisme hépatique soit prédominant, un métabolisme pulmonaire est possible par l'intermédiaire d'enzymes oxydantes : la lipo-oxygénase et la prostaglandine-H-synthétase.

(Brochard G et Le Back C., 2009).

L'élimination est principalement biliaire. Elle représente environ 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales, tandis que la voie urinaire représente 15 à 25 % de la dose ingérée. La détoxification de l'AFB1-8,9-époxyde s'effectue principalement par conjugaison au glutathion par le biais de la glutathion-S-transférase. Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile, conjuguée au glutathion ou à l'acide glucuronique. Elle peut être excrétée dans les urines sous forme inchangée ou sous forme métabolisée. 1 à 10 % de l'AFB1 restent liés de façon covalente aux protéines hépatiques plusieurs jours après l'ingestion. Chez certains animaux, il semblerait que les Aflatoxines persistent dans le foie et le rein sous forme liée et non métabolisée. **(Gauthier A., 2016).**

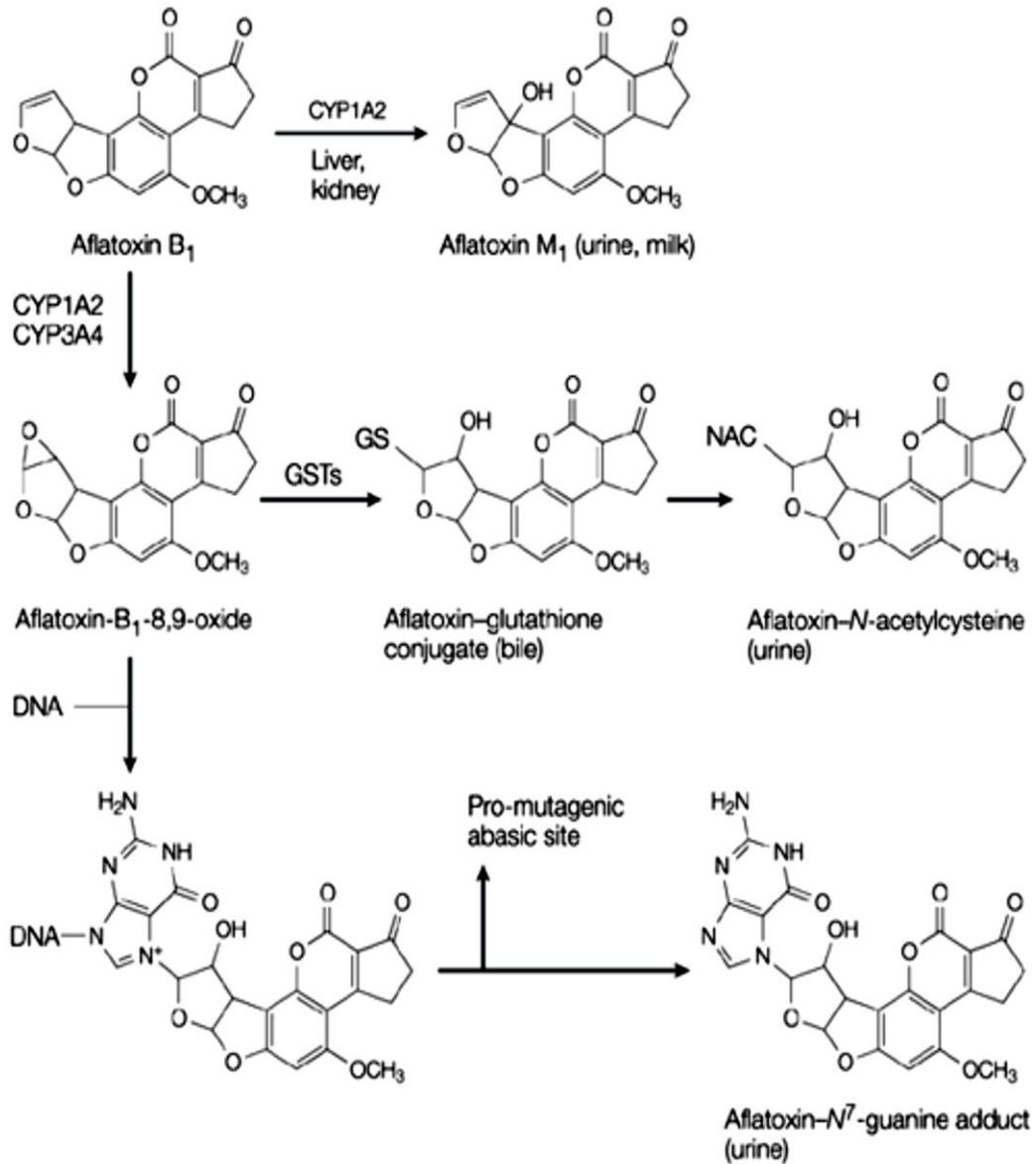


Figure3 : Voies de métabolisation et d'élimination de l'Aflatoxine B1. (Kensler et al., 2003).

Chapitre III

Impact des Aflatoxines dans les productions animales

1-Transfert des aflatoxines dans les productions animales

Du champ jusqu'à l'assiette, de nombreuses espèces de moisissures sont susceptibles de se développer et de sécréter des toxines si les conditions environnementales sont favorables. Étant peu métabolisées par les organismes vivants, les toxines fongiques peuvent également se propager *via* les produits alimentaires d'origine animale (produits laitiers, viandes...), si l'animal a consommé auparavant un aliment lui-même contaminé. (Pfohl-Leszkowicz A., 1999). Cela est particulièrement vrai pour les aflatoxines dont le transfert dans le lait et les tissus comestibles comme le foie, le muscle et les reins a été rapporté dans des situations de contaminations naturelles. (Stéphane Fimin., 2011).

1.1 La contamination des productions carnées

Les aflatoxines peuvent être détectées dans le foie, les reins et les muscles de volailles, de porcs ou des ruminants en conditions expérimentales. (Helferich et al., 1986, Zaghini et al., 2005a, Zaghini et al., 2005b).

1.2 La contamination du lait et des produits laitiers

Les aflatoxines peuvent être transférées de la ration animale contaminée au lait de mammifères. Contrairement aux autres types de productions, la contamination du lait est hautement surveillée et encadrée par une réglementation stricte vis-à-vis des aflatoxines. Les taux d'AFM1 mesurés en Europe sont généralement conformes à la teneur réglementaire maximale de 50ng/L. (Boudra et al., 2007, Prandini et al., 2009).

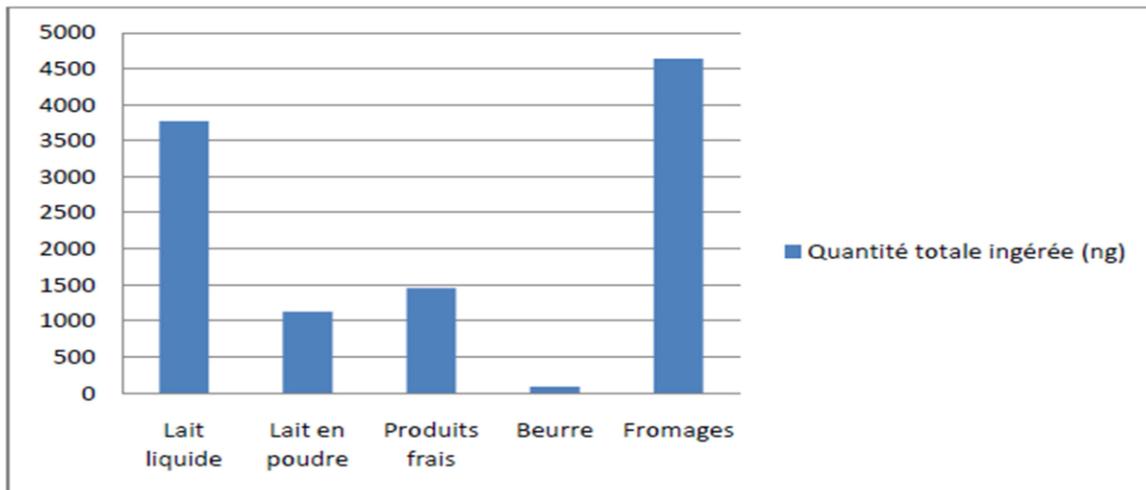


Figure 4: Estimation des apports d'AFM1, en nanogrammes (ng), par individu et par an, selon le type de produit laitier consommé. (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

2-Impact sanitaire

2.1 Toxicité des aflatoxines

La découverte des aflatoxines a excité l'intérêt des scientifiques à l'égard de la toxicité de ces substances. Les premières observations ont révélé qu'à fortes concentrations, les aflatoxines sont des poisons violents, et qu'administrées à petites doses à des animaux de laboratoire, elles produisent un cancer du foie. Selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer, l'AFB1 est un cancérogène probable classé dans le groupe 1. (IARC, 1993).

-Toxicité aiguë

La toxicité aiguë se caractérise par la dose létale 50% qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée. Concernant les aflatoxines, ce type de toxicité est moins fréquent chez l'homme que chez les animaux. Chez le caneton, la DL50 des AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 est respectivement de l'ordre de 0,36, 0,78, 1,70 et 3,44 mg/kg. (Hussein et Brasel, 2001).

- Toxicité chronique

La toxicité chronique des aflatoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles. Ce type de toxicité peut apparaître aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Des études épidémiologiques menées dans le Sud-est asiatique et en Afrique ont démontré que les cancers hépatiques sont beaucoup plus fréquents chez certains groupes de la population

humaine dont le régime alimentaire est élevé en aflatoxines. D'après **Hussein et Brasel 2001**, plus de 250 milles décès annuels sont recensés en Chine et en Afrique subsaharienne et qui sont causés par des carcinomes hépatocellulaires attribués aux facteurs de risques comme l'ingestion journalière élevée en aflatoxines qui atteint 1,4 µg/kg et l'incidence du virus de l'hépatite B (VHB). Selon **Herrman et Walker 1999**, la virulence des aflatoxines chez des individus porteurs du VHB est nettement plus élevée que chez ceux qui ne le sont pas. L'AFB1 et le VHB peuvent agir en synergie, l'infection par le VHB induit les enzymes activatrices de l'aflatoxine en augmentant son pouvoir cancérigène potentiel. (**Chen et al., 2001**).

2.2 Effets des aflatoxines

Chez les animaux, les aflatoxines entraînent divers effets indésirables :

Le porc et les volailles sont les plus sensibles aux effets des aflatoxines. (**Kurmanov., 1977**). Ces espèces sont particulièrement exposées aux contaminations du fait de pratiques alimentaires à risques orientées vers la consommation de céréales et de leur incapacité à dégrader les toxines avant leur absorption digestive. (**AFSSA., 2009, Hayes et al., 1978, Smith et al., 1976**).

Chez les poulets, les aflatoxines induisent des lésions hépatiques, une diminution de la productivité et de l'efficacité reproductive, une baisse de la production d'œufs, une altération de la qualité des coquilles et des carcasses et une augmentation de la susceptibilité aux maladies. (**OMS., 2018**).

Ovins et caprins sont souvent considérés comme résistants aux aflatoxines, la DL50 de l'AFB1 par voie orale chez le mouton étant à 2mg/kg. (**Patterson., 1973**).

Le plus fréquemment, les bovins sont atteints d'une toxicose chronique qui cible principalement le foie. (**Yiannikouris et Jouany., 2002**). Le tableau clinique est alors une réduction de l'indice de conversion alimentaire, une baisse de la production laitière, un ictère et une baisse de l'appétit. Cependant le seul signe d'une aflatoxicose chronique peut être la réduction de rythme de croissance. (**Raisbeck et al., 1991, Pier., 1992**).

En règle générale, on considère que les aflatoxines sont toxique entre 300 et 700 ppb chez les bovins de boucherie. (**Whitlow., 2001**).

La présence des aflatoxines dans les aliments de bétail, notamment l'AFB1 entraîne une diminution de leur qualité organoleptique et nutritive, une diminution des performances

zootechnique des animaux de production, et l'altération de la santé animale. (**Lamrani., 2009**).

Ces toxines fongiques agiraient comme des intercalant ADN qui, en se liant aux bases guanine, entraîneraient la mort de la cellule ou sa transformation en tumeur maligne. (**Riley., 1998**).

Le mécanisme par lequel les aflatoxines ralentissent la croissance est probablement relié à des perturbations du métabolisme des protéines, des glucides et des lipides. (**Whitlow et Hagler., 2001**).

3- Impact économique

Les conséquences économiques engendrées par les mycotoxines sont lourdes. Dans les pays d'Amérique du Nord, la productivité des animaux a connu des pertes énormes estimées à des milliards de dollars par année. (**Miller., 1998**). L'impact financier des mycotoxines concerne non seulement les risques pour la santé de l'homme et les animaux domestiques, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation. (**Zinedine A., 2004**).

La contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines occasionnent des coûts économiques directs et indirects pour la filière d'élevage. Les pertes directes sont dues à l'altération de l'aliment par les moisissures. Le développement fongique peut conduire à la destruction de la récolte lorsque le végétal est fortement attaqué et que le grain et les fourrages sont rendus inconsommables. Dans d'autres cas, la croissance des moisissures se traduit par une altération sensorielle et nutritionnelle des récoltes (diminution des teneurs en matière sèche, matière azotée et glucides) responsable d'un refus ou une diminution de l'ingestion par l'animal. Dans ces situations, la ration contaminée ne couvre pas les besoins énergétiques de l'organisme. Les animaux en bas âge ou en lactation réagissent très rapidement par un ralentissement de leur croissance ou par une chute de la production laitière. Une perte importante de rendement et de la valeur alimentaire des récoltes peut pousser les fermiers à l'achat d'aliments et d'ingrédients complémentaires, ou à la vente prématurée d'animaux en période de déficit alimentaire. (**Stéphane Firmin., 2011**).

Les pertes indirectes sont causées par la production de mycotoxines indépendamment de la qualité des récoltes. La présence de mycotoxines sur les aliments peut entraîner une baisse du revenu de l'éleveur par la chute de la productivité des animaux de rente auxquelles s'ajoutent

des frais de soins vétérinaires (vaccination, antibiothérapie). Des dépenses supplémentaires liées à la mise en place de réglementations (enquêtes et analyses de l'aliment), l'investissement en recherche et la mise en œuvre de moyens de prévention et de détoxification des aliments (emploi de conservateurs et d'additifs) peuvent également être comptabilisées dans le coût économique de la contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines. **(Stéphane Firmin., 2011).**

Chapitre IV

Prévention et détoxification des mycotoxines

1-Méthodes de détection des aflatoxines

Les aflatoxines revêtent une importance majeure et les techniques pour les détecter et les analyser ont fait l'objet de recherches poussées pour mettre au point des méthodes hautement spécifiques, utiles et pratiques. Quantité de méthodes sont disponibles pour répondre aux différents besoins et vont de techniques ou de méthodes destinées aux contrôles réglementaires dans les laboratoires officiels [CLHPSM (chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse), par exemple] aux kits de test rapides pour les usines et les silos à grains [méthode Elisa (épreuve immuno-enzymatique), par exemple]. Les futurs systèmes potentiels de détection des aflatoxines, reposant sur des technologies émergentes, pourront inclure des kits à base de bandelettes, l'imagerie hyperspectrale, des nez électroniques, des polymères à empreintes moléculaires et des biocapteurs utilisant des aptamers (petites molécules organiques pouvant se lier à des molécules cibles spécifiques). Cette dernière technologie peut être intéressante pour les zones reculées en raison de la stabilité et de la facilité de production et d'utilisation des dispositifs concernés. (OMS., 2018).



Figure 5 : LC-MS. (Jean-Christophe Meile., 2017).



Figure 6 : ELISA. (Jean-Christophe Meile., 2017).



Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire **Figure 7 : Tests rapides. (Meile J., 2017).** Page 21

2-Prévention

2.1 Lutte avant récolte

Sous des climats type tropicaux chauds et humides jugés à risque, la prévention aux champs consiste en l'utilisation raisonnée d'insecticides, et ce dans le but de diminuer les lésions des plantes et réduire de ce fait les portes ouvertes à l'envahissement par les moisissures ou l'utilisation de fongostatiques inhibant la croissance des moisissures et empêchant la toxinogénèse. La lutte contre les infestations d'insectes peut donc aider à éviter la prolifération des spores et la production ultérieure des mycotoxines. Cependant ces essais sont très difficiles à mettre au point et restent peu concluants.

2.2 Lutte au moment de la récolte

Le moment de la récolte a une grande influence sur la production des mycotoxines. Pendant cette période, deux facteurs sont à contrôler : le lavage et le séchage. Ces deux pratiques jouent un rôle important dans la prolifération fongique pendant l'entreposage.

2.3 Lutte et décontamination après récolte

Les procédures appliquées au cours de la période d'entreposage constituent une barrière importante pour éviter l'exposition des consommateurs aux mycotoxines. Les procédés de décontamination doivent être efficaces sans rendre impropres à la consommation les denrées traitées, elles doivent être simples à mettre en œuvre et peu coûteux puisque le traitement peut concerner des tonnages importants. **Selon Park (1993)**, les trois procédés d'élimination des aflatoxines (physiques, chimiques ou biologiques) constituent les stratégies de lutte les plus courantes après récolte, les méthodes sont nombreuses et varient selon le type de mycotoxines, mais **selon Galvano et al, (2001)**, l'efficacité de chaque approche doit être évaluée selon des critères spécifiques à savoir :

- Inactiver, détruire ou éliminer la toxine dans l'aliment,
- Ne générer aucun résidu toxique dans l'aliment,
- Ne pas altérer les propriétés technologiques et nutritionnelles de l'aliment,
- Être techniquement et économiquement faisable.

3-Méthodes de détoxification ou de décontamination des aliments

3.1 Procédés physiques

Les méthodes physiques sont nombreuses, elles sont basées en général sur le lavage, le séchage, le broyage, le tri manuel, la séparation mécanique, le traitement par un choc thermique et la torréfaction.

- **Traitement thermique**

Les mycotoxines sont en général thermostables et elles résistent à tous les procédés utilisés pour l'élimination des micro-organismes (chauffage et stérilisation). **Peers et Linsell (1975)** observaient que les aflatoxines restent stables dans les arachides ou dans le maïs après un chauffage à 200°C pendant 30 minutes. Il est à noter que les traitements thermiques dépendent en grande partie d'autres facteurs tels la teneur de l'aliment contaminé en eau et de son pH (**Rustom., 1997**).

- **Irradiation**

L'irradiation a été considérée pour longtemps comme une solution possible de lutte contre les microorganismes. Des méthodes satisfaisantes pour l'élimination des mycotoxines ne sont pas encore mises au point. Cependant l'irradiation peut être envisagée pour lutter contre les moisissures toxigènes.

- **Extraction**

L'extraction des aflatoxines avec des solvants est un procédé qui a été étudié pour leur élimination des arachides contaminées. Cependant le matériel traité par cette méthode ne peut être destiné qu'aux animaux. Le rapport solvant/aliment est un élément crucial dans le procédé. Quoique toutes les traces d'aflatoxines puissent être éliminées sans aucun risque de formation de produits toxiques, ce procédé reste limité du fait de son coût très élevé.

(**Rustom., 1997**).

- **Adsorption**

Certains produits possèdent des propriétés d'adsorption. Ils ont fait l'objet d'études pour évaluer leur capacité à éliminer les mycotoxines des aliments contaminés. Selon **Huwig et al., (2001)**, différents adsorbants ont été utilisés avec succès dans des procédés de détoxification des aliments de bétail contaminés par les mycotoxines. C'est le cas des argiles adsorbant les aflatoxines en particulier l'AFB1, le charbon actif adsorbant la plupart des mycotoxines, et finalement certains polymères comme la cholestyramine (résine échangeuse d'anions utilisée pour l'adsorption des acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal) adsorbant l'OTA.

3.2 Procédés chimiques

De nombreuses études ont évalué la capacité des substances chimiques à inactiver ou réduire certaines mycotoxines, cependant la plupart des études ont été axées sur les aflatoxines dans l'alimentation animale. D'autres recherches ont porté sur les propriétés protectrices d'autres substances contre les effets des mycotoxines. Il est à noter qu'actuellement le règlement européen interdit de décontaminer les aflatoxines par des procédés chimiques ou de mélanger

des produits contaminés avec d'autres produits qui ne le sont pas dans l'intention d'abaisser la teneur jusqu'à la limite maximale admissible.

- **Traitement à l'ammoniaque**

L'ammonisation (traitement des denrées contaminées par l'ammoniaque) est la méthode chimique qui a fait l'objet des recherches les plus poussées. **Selon Park (1993)**, le traitement à l'ammoniaque est une solution pratique et efficace pour la détoxification des aflatoxines dans les denrées alimentaires et l'alimentation du bétail. Quoique la décontamination des aflatoxines par l'hydroxyde d'ammonium a montré une grande efficacité (plus de 99%) et a été utilisée avec succès aux USA, en France, au Sénégal, au Brésil, au Mexique et en Afrique du Sud, la FDA "*Food and Drug Administration*" n'autorise pas ce type de traitement comme solution de réduction des taux d'aflatoxines dans les aliments. L'inconvénient majeur de cette technique est le refus des aliments traités par le bétail.

- **Bisulfites**

Les bisulfites ont été ajoutés aux aliments pour inhiber les activités de certaines enzymes mais aussi pour retarder la croissance des micro-organismes. **Doyle et Marth (1978)** ont constaté que les bisulfites réduisent les taux des aflatoxines B1 et G1 d'environ 50 % après environ 5 jours de traitement et que cette durée peut être réduite à une journée si la température atteint 55° C au cours du procédé de traitement.

- **Les antioxydants**

La recherche des propriétés protectrices des substances anti-oxydantes contre les effets néfastes des mycotoxines a été largement étudiée. Les vitamines (A, D et E) et le sélénium ont donné des résultats positifs en inhibant la complexation des mycotoxines à l'ADN. Des résultats similaires ont été obtenus avec les riboflavines et des caroténoïdes. (**Galvano et al., 2001**).

3.3 Procédés biologiques

La décontamination biologique est la transformation enzymatique des mycotoxines en métabolites moins toxiques, par l'intermédiaire de nombreux micro-organismes (levures, champignons, bactéries). Ainsi, il a été observé que des souches de *Bacillus* et de *Lactobacillus* étaient en mesure de détoxifier partiellement les aliments contaminés par l'OTA. (**Bohm et al., 2000**). En ce qui concerne la fermentation, le procédé permettrait de décontaminer la bière (malt) en AFB1 à hauteur de 80 à 82 %. (**Chu F.S. et al., 2000**).

Mesures sanitaires à respecter par le consommateur (Gauthier A., 2016)

Les intoxications alimentaires résultent souvent d'une mauvaise maîtrise des règles d'hygiène.

Il convient donc de respecter certaines règles élémentaires :

- Lavage des mains avant la manipulation des aliments.
- Respect des DLC et des DLUO.
- Respect de la chaîne du froid.
- Les denrées très périssables (viandes, poissons) doivent être conservées entre 0 et +4°C, et consommées dans les 4 jours suivant leur achat.
- Maîtrise du rangement et de l'entretien du réfrigérateur.

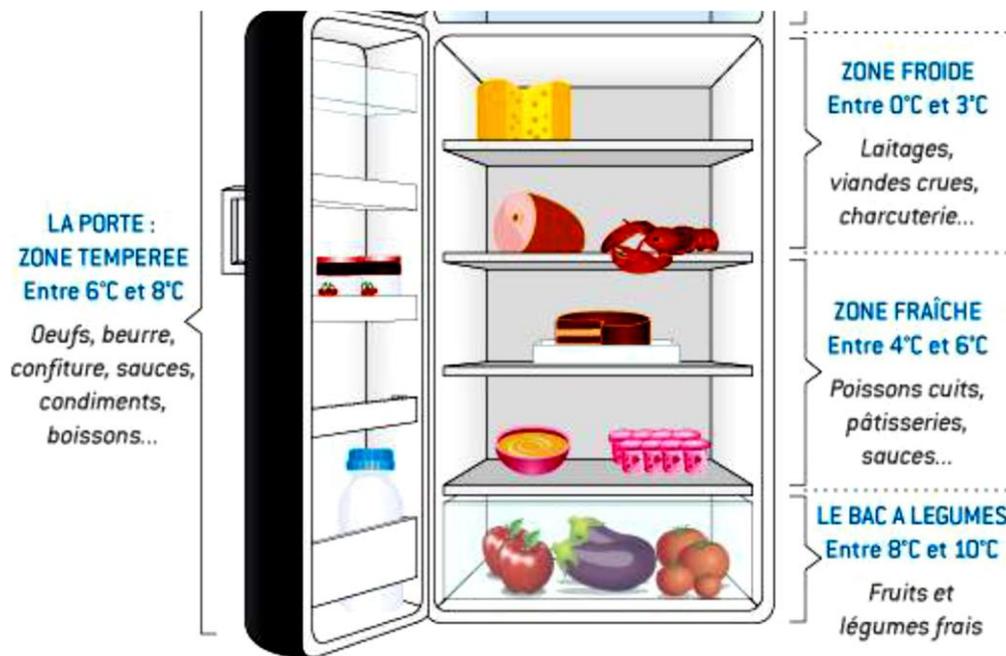


Figure 8 : Rangement idéal du réfrigérateur. (Gauthier A. ,2016).

- Ne pas recongeler un produit décongelé.
- Veiller à la propreté du plan de travail et des ustensiles de cuisine.
- Cuire suffisamment les aliments.
- Conserver séparément les aliments crus et ceux prêts à être consommés.
- Nettoyer les fruits et les légumes avant de les consommer.
- Éviter de consommer les fruits et légumes présentant des moisissures, même après les avoir débarrassés des parties abîmées.

Partie Expérimentale

Partie expérimentale

1-Objectifs

Le but de ce travail expérimental est la détermination des teneurs en Aflatoxine B1 dans l'aliment de volaille et la comparaison aux normes internationales. Cette recherche a été réalisée par une méthode immuno-enzymatique : l'ELISA.

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche « Santé & Production Animales » à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

2-Matériels et méthodes

2.1 Matériels

- **Matériels de laboratoire**

- Tubes à essai
- Portoir tubes à essai
- Tubes coniques
- Portoir tubes coniques
- Erlenmeyers
- Micropipettes
- Pipettes graduées
- Pipettes type pip-lab
- Eprouvette graduée
- Papier essuie-tout
- Béchers
- Papier filtre
- Balance
- Tamis
- Robot broyeur
- Vortex
- Centrifugeuse
- Lecteur ELISA
- **Réactifs**
- Méthanol
- Eau distillée

- **Matériaux fournis avec le kit ELISA**

La réalisation d'un test ELISA se fait dans une plaque de polystyrène contenant généralement 96 puits. Chaque test ELISA comprend :

- 3 puits servant à vérifier la qualité des tampons et des anticorps. Le premier puits sert de blanc (blank) afin d'établir la valeur de référence pour la lecture des densités optiques. Aucune suspension bactérienne ou extrait de plante n'est déposée dans ces puits.
- 3 puits pour le témoin négatif (suspension bactérienne autre celle de l'espèce recherchée ou plant sain de la même espèce végétale pour la détection de virus).
- 3 puits pour le témoin positif (suspension d'une souche type de l'espèce bactérienne recherchée ayant une concentration de 10^8 BACTERIES/ML ou plante infectée par le virus recherché).
- 6 flacons de 1,5 ml de chaque standard d'aflatoxine (0, 100, 200, 500, 1000,2000 ppt), prêt à l'emploi.
- 1 flacon de 25ml d'aflatoxine conjuguée prêt à l'emploi (bouteille au bouchon vert).
- 1 flacon de 15ml de solution de substrat prêt à l'emploi (bouteille au bouchon bleu).
- 1 flacon de 15ml de solution d'arrêt prêt à l'emploi (bouteille au bouchon rouge).
- 1 flacon de 10ml de diluant d'échantillon prêt à l'emploi (bouteille au bouchon bleu).
- 1 flacon de 25ml de solution de lavage 20 fois concentrée (doit être diluée 1+19 avec de l'eau distillée).



Figure 9 : Réactifs fournis avec le kit ELISA (photo personnelle)

2.2 Méthodes

2.2.1 Échantillonnage

L'échantillonnage a pour objet d'obtenir un échantillon de laboratoire (prise d'essai) représentatif du lot sur lequel il a été prélevé.

Selon l'étude de FAO en 1992, la plupart des mycotoxines ont une distribution hétérogène et il se peut qu'elle ne se présente que dans une fraction des éléments constituant le lot à inspecter. On peut donner comme exemple la distribution très inégale de l'aflatoxine B1, dans un lot d'arachide et dans certaines autres denrées se présentant en particules comme les céréales. (FAO., 1992).

Afin d'obtenir un échantillon représentatif, 20 échantillons d'aliments de bétail et de volailles ont été prélevés au hasard. Les échantillons ont été ramenés de différentes régions d'Algérie.

L'échantillonnage se fait en respectant certaines précautions :

-les endroits plus propices d'apparition des moisissures dans un lot sont les surfaces, les cotés et les rebords, et dans le lot d'aliment stocké, les moisissures se localisent dans les couches profondes ;

-les échantillons doivent être mis dans des sacs inertes pour éviter toute contamination externe ;

-acheminement rapide des échantillons vers le laboratoire et conservation dans un endroit frais et sec jusqu'à leur analyse.

2.2.2 Protocole d'extraction

Les échantillons d'aliment concentré complet sont broyés finement et passés au tamis. Dans une bouteille stérile, 20g de poudre d'aliment broyé sont mélangés à 70 ml de méthanol et 30 ml d'eau distillée, le tout est bien agité pendant 3 minutes. Le surnageant est filtré et recueilli.



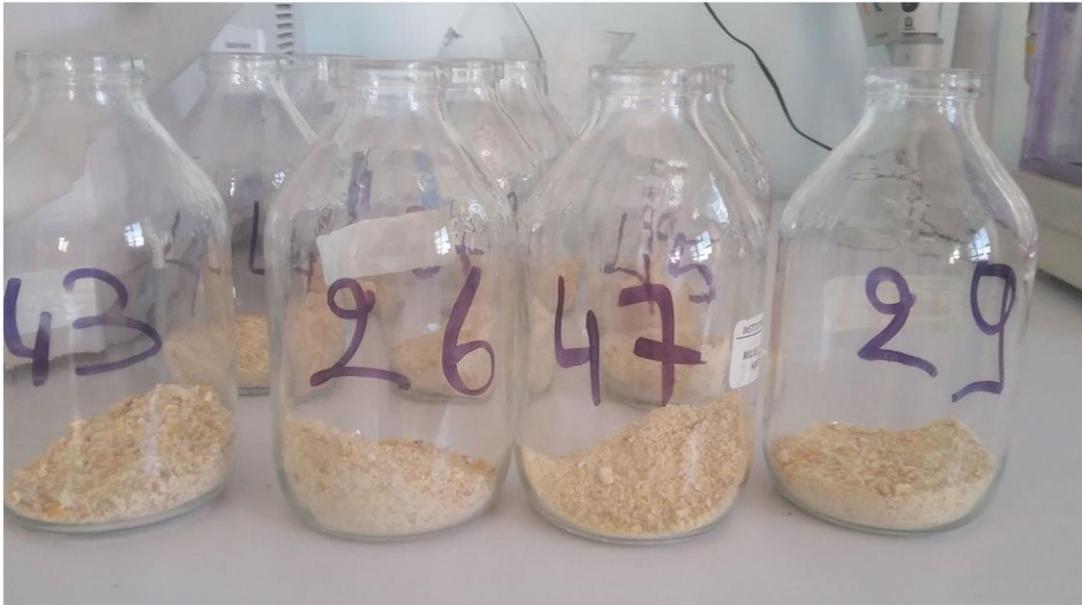
Broyage



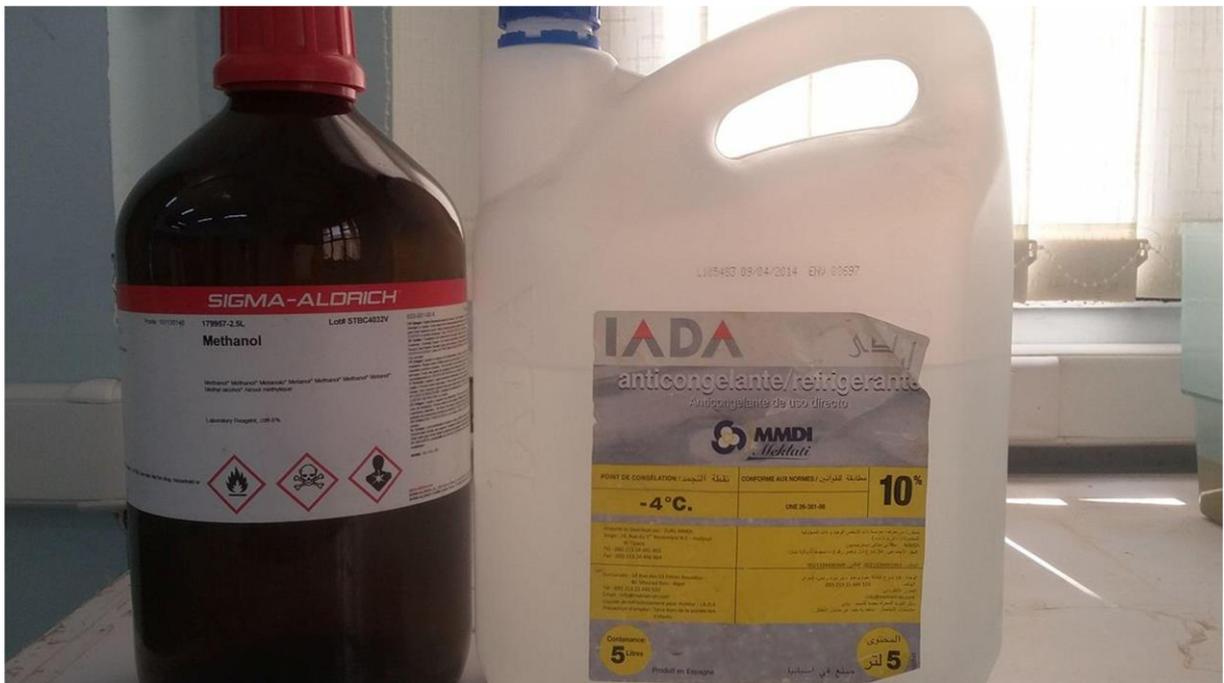
Tamissage



Pesage



20 g d'échantillon dans des bouteilles stériles



Méthanol + eau distillée



Ajout de 70ml de méthanol et 30ml d'eau distillée, bien agiter le tout



Filtration du surnageant

Figure 10 : Protocol d'extraction (photos personnelles)

2.2.3 Test ELISA

Description de l'ELISA (Protocole d'ELISA)

L'analyse quantitative d'AFB1 a été réalisée par l'ELISA direct et compétitif en utilisant le kit de test « AFB1 plus d'AgraQuant® » (Romer Lab).

Les kits **AgraQuant®** sont des **tests quantitatifs** ELISA (dosage immuno enzymatique) précis et fiables ayant une validation officielle par l'AOAC et l'USDA-GIPSA.

USDA (United States Department of Agriculture).

AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

GIPSA (Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration).

Le kit ELISA utilisé, ELISA compétitive, a un seuil de détection de **2 ppb et une gamme de détection de 2 à 50 ppb, fourni par Lbvet et fabriqué par Romer Labs**. Le test d'ELISA a été réalisé selon le protocole suivant :

1-Pipeter 200 µL de solution conjuguée dans les puits de dilution.

2-Ajouter 100 µL de chaque standard ou échantillon dans les puits de dilution.

3-Bien mélanger, transférer à partir de chaque puits de dilution 100 µL et verser dans la plaque à puits revêtus d'anticorps avec changement des embouts à chaque utilisation, incuber à température ambiante 15 minutes dans une chambre obscure.

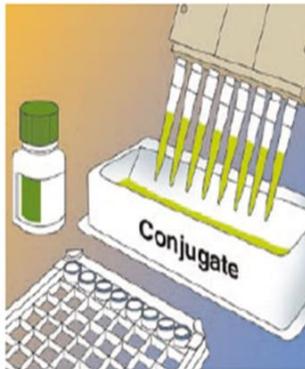
4-Laver 5 fois avec de l'eau distillée la plaque à anticorps.

5-Essuyer et bien sécher la plaque.

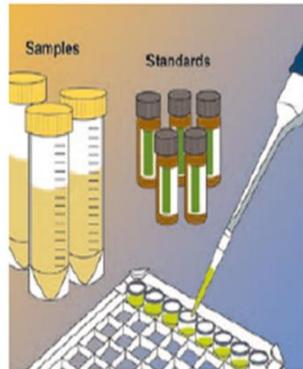
6-Pipeter 100 µL du substrat dans les puits à anticorps et incuber à température ambiante 5 minutes dans l'obscurité.

7- Ajouter 100 µL du stop solution ou solution d'arrêt dans les puits à anticorps.

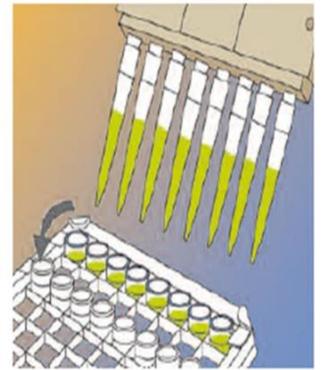
8-Lire les absorbances en utilisant une densité optique de 450 nm et 360 nm par un lecteur ELISA.



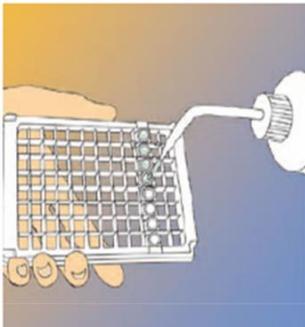
1) Ajouter 200 μ l de conjugué dans chaque puits coloré de dilution.



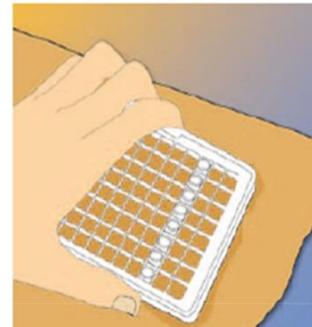
2) Ajouter 100 μ l de standard ou d'échantillon au conjugué.



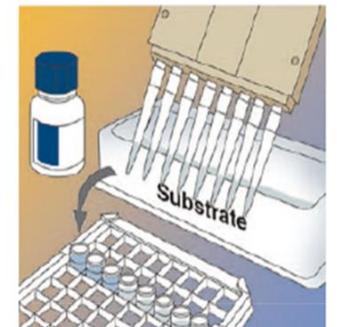
3) Bien mélanger. Transférer 100 μ l dans les puits recouverts d'anticorps. Laisser incuber 5 à 60 minutes (selon les kits).



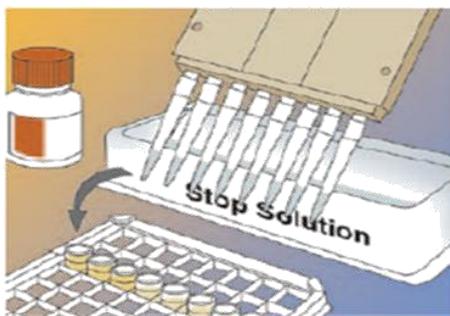
4) Vider le contenu des puits et laver les puits avec de l'eau désionisée ou la solution tampon (5X).



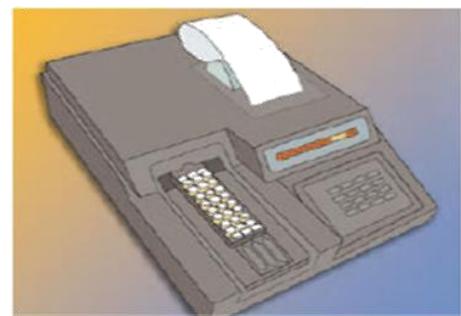
5) Sécher les puits en tapotant sur du papier absorbant.



6) Ajouter 100 μ l de Substrat dans chaque puits. Laisser incuber de 2 à 20 minutes (selon les kits).



7) Ajouter 100 μ l de solution Stop dans chaque puits.



8) Analyser les résultats à l'aide d'un lecteur ELISA, avec un filtre à 450 nm.

Figure 11 : Protocole d'ELISA. (Schéma de Romer Labs).

Résultats et discussion

3- Résultats et discussion

3.1 Résultats

Les densités optiques ont été obtenues par le lecteur ELISA. Ces dernières sont introduites dans un logiciel livré par le laboratoire Romer Labs, ce qui nous a permis d'obtenir les concentrations de l'AFB1.

Tableau3 : Absorbances des standards

Std. Level	Abs.	B/Bo	Log(Conc.)	Logit B/Bo
0 ppb =	2,172			
2 ppb =	1,550	0,71	0,30	0,40
5 ppb =	1,288	0,59	0,70	0,16
20 ppb =	0,496	0,23	1,30	-0,53
50 ppb =	0,184	0,08	1,70	-1,03

R =	-0,9918
Slope =	-1,0437
Intercept =	0,7925
50% Inhibition =	5,7980

La calibration nous a permis d'obtenir la courbe suivante :

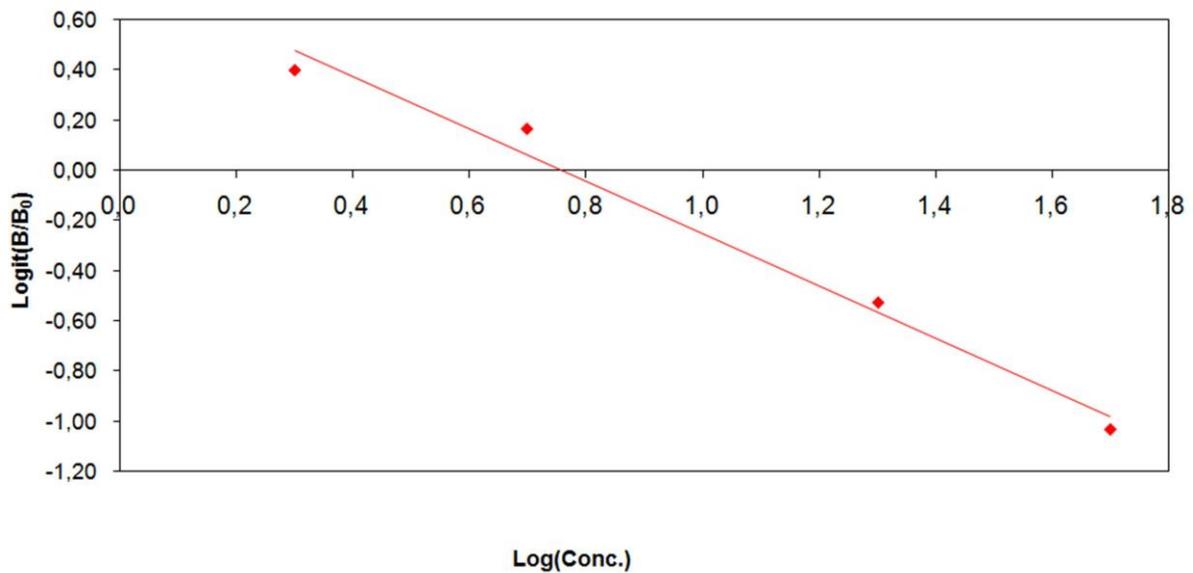


Figure12 : Courbe de calibration des standards (courbe d'étalonnage).

D'après la courbe d'étalonnage, nous pouvons observer que, lorsque la concentration d'antigène dans les standards augmente, les valeurs **B/Bo** diminuent.

Tableau 4: Différentes concentration de l'AFB1 dans les échantillons d'aliments destinés aux bétails et aux volailles.

N.	Ech.	Abs.	Aflatoxine B1 [ppb]
1	0 ppb Std.	2,172	0.00
2	2 ppb Std.	1,550	2,40
3	5 ppb Std.	1,288	4,01
4	20 ppb Std.	0,496	18,47
5	50 ppb Std.	0,184	56,35
6	E25 Ain taya	1,863	<LOD (2ppb)
7	E26 Ain taya	1,848	<LOD (2ppb)
8	E27 Ain taya	1,870	<LOD (2ppb)
9	E28 Ain taya	1,945	<LOD (2ppb)
10	E29 Khenchela	1,814	<LOD (2ppb)
11	E30 Khenchela	1,834	<LOD (2ppb)
12	E31 Khenchela	1,744	<LOD (2ppb)
13	E32 Khenchela	1,620	2,05
14	E33 Khenchela	1,903	<LOD (2ppb)
15	E34 Khenchela	1,900	<LOD (2ppb)
16	E35 Khenchela	1,909	<LOD (2ppb)
17	E36 Khenchela	2,181	<LOD (2ppb)
18	E37 Khenchela	2,191	<LOD (2ppb)
19	E38 Khenchela	1,880	<LOD (2ppb)
20	E49 Batna	2,049	<LOD (2ppb)
21	E40 Batna	1,727	<LOD (2ppb)
22	E41 Batna	1,709	<LOD (2ppb)
23	E42 Birkhadem	1,795	<LOD (2ppb)
24	E43 Birkhadem	1,727	<LOD (2ppb)
25	E44 Birkhadem	1,849	<LOD (2ppb)

Tableau5 : Teneur en aflatoxines B1 des échantillons étudiés.

Aliment	Nombre total d'échantillons	Echantillons positif	Moyenne (ppb)	Intervalle (ppb)
Volaille	20	1	2.78	[2.50-3.35]

3.2 Discussion

Sur les 20 échantillons analysés (aliment concentré complet de volailles) il a été observé que 95% sont considérés comme négatifs dans la limite de détection du kit ELISA (<LOD 2 ppb). Dans les 5% restants, la concentration de l'AFB1 est légèrement supérieure à la LOD, mais reste inférieure à la LMR qui est de 20ppb.

Ces résultats sont en accord avec **Carolina Nachi R et al**, qui ont montré la contamination d'aliment de poules pondeuses avec l'AFB1, les résultats ont montré une moyenne de contamination de 10.48 µg/kg qui est inférieure à la LMR européenne.

Une étude a été faite par **Anjum M.A, et al** en **2012**, qui a révélé une moyenne de contamination de 23.75 ppb qui est supérieure à au seuil autorisé par la réglementation européenne contrairement a nos résultats qui étaient nettement inférieure à la LMR.

Selon **Magnin et al (2016)**, la toxicité aigüe des mycotoxines chez les volailles montre une variabilité de réponse qui dépend de la voie d'administration, de l'espèce, de l'âge, du sexe de l'animal. Les doses létales 50%, qui varient de quelques mg/kg à plusieurs g/kg de poids vif, ne sont quasiment jamais atteintes dans les conditions normales d'exposition.

En Egypte, **El-Sayed et al (2003)**, ont montré la contamination des échantillons de maïs et des produits à base de maïs par plusieurs mycotoxines avec une teneur qui varie entre 0.01 et 0.78mg/kg.

En Italie, **Brera et al (2004)**, ont évalué le niveau de contamination de différents échantillons de maïs destinés à la consommation humaine et animale par l'AFB1, les résultats ont montré la contamination des échantillons de maïs analysés par des taux variables allant de 0.39 à 9.56mg/kg.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus lors de l'étude de la teneur en aflatoxine B1 des aliments concentrés complets pour la volaille permettent de conclure que 5% des aliments destinés aux volailles sont contaminés par l'AFB1 mais avec des taux qui ne dépassent pas la teneur maximale tolérée qui est de 20 ppb/kg.

La concentration de l'AFB1 dans les échantillons analysés est nettement inférieure à la limite maximale fixée par la législation européenne.

La contamination des aliments par l'AFB1 constitue un risque majeur pour la santé humaine et animale vu qu'elle est reconnue comme étant l'un des plus puissants cancérigènes d'origine naturelle, et avec le dérèglement climatique les taux de contaminations pourraient augmenter de plus en plus.

Pour cela, l'état Algérien devrait installer des laboratoires d'analyse spécialisés dans la recherche des mycotoxines, interdire l'introduction de céréales ayant une teneur supérieure à la teneur maximale tolérée.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdellah Zinedine., 2004 : Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels.

AFSSA., 2009 : Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animales.

Alban Gauthier., 2016 : Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Science pharmaceutiques. Université de Bordeaux.

Amani Lahouar., 2016 : Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie: Incidence et profils écophysiologicals.

Asao T, Buchi G, Abdelkader M.M, et al., 1965 : Structures of aflatoxins B and G.

Anjum M.A, et al.,2012 : Determination of Aflatoxin and Ochratoxin in poultry feed ingredients and finished feed in humid semi-tropical environment. Pakistan.

B

Bennet J.W., Klich M., 2003 : Mycotoxins. Clinical Microbiology Review.

Blackwell B.A, Miller J.D, Savard M.E., 1994 : Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. J Assoc. Off. Anal. Chem .Int, 1994. Pp. 506-511.

Bohm J, Grajewski J, Asperger H, et al., 2000 : Study on biodegradation of some A and B trichtheccenes and ochratoxin A by use of prpbiotic microganisms. Mycotoxin Res. 16,2000.

Boudra H., J. Barnouin, S. Dragacci, and D.P. Morgavi., 2007 : Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds.

Brera C, Debnach F, Grossi S et Miraglia M., 2004 : Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B1 in dry milling corn fraction.

Brochard G, Le Bacle C., 2009 : Mycotoxines en milieu de travail. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines.

C

Carolina Nachi R et al., 2013 : Assessment of exposure of broiler chicken in Brazil to mycotoxins through naturally contaminated feed.

Castegrano M. et Pfohl-Leszkowicz A., 2002 : Les mycotoxines contaminants omniprésents dans l'alimentation animales et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. 2^e édition. Paris : Lavoisier, Tec&Doc, 127-79.

Chen SY, Chen CJ, Chou SR, Hsieh LL, Wang LY, Tsai WY, Ahsan H et Santella RM., 2001 : Association of Aflatoxin B1–albumin adduct levels with hepatitis B surface antigen status among adolescents in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarker*, 10 (11): 1223-1226.

Chu F.S, Fang C.C, Ashoor S.H, et al : Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing.

Cole, R. J., B.B. Jarvis, and M.A. Schweikert., 2003 : Second handbook of secondary fungal metabolites. New York.

D

D'Mello J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997 : Mycotoxins. Animal Feed Science Technology.

Doyle MP et Marth EH., 1978 : Bisulfites dégradent Aflatoxins: Effect of temperature and concentration of bisulfite. *J Food Prot*, 41: 891-896.

E

El Khoury A., 2007 : Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et aflatoxine B1(AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine (thèse de doctorat).

El-Sayed A.M, Soher E.A et Sahab A.F., 2003 : Occurrence of certain mycotoxin in corn-based products and thermostability of fumonisin B1 during processing.

G

Gallot J, Abznhaim L, Guillou M., 2000 : Guide de bonnes pratiques d'hygiène dans l'industrie de semoulerie de blé dur. Edition : Les journaux officiels.

Galvano F, Piva A, Ritlen A et Galvano G., 2001 : Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *J Food Prot*, 64 (1): 120 -131.

H

Hayes, A.W., R.E. King, P.D. Unger, T.D. Phillips, J. Hatkin, and J.H. Bowen., 1978 : Aflatoxicosis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172(11)**:1295-1297.

Helferich W.G., R.L. Baldwin, and D.P.H. Hsieh., 1986 : Aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats.

Hussein H.S. et Brasel J.M., 2001 : Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals.

Huwig A, Freimund S, Käppeli O et Dutler H., 2001 : Mycotoxin detoxification of animal feed by different sorbents. *Toxicol lett* , 122: 179-188.

I

IARC., 1993 : Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 31 : Some food additives, feed additives and naturally occurring substances.

J

Jean-Christophe MEILE., 2017 : Risques & enjeux associés à la présence de mycotoxines sur les cultures et aliments de l'Océan Indien.

K

Kensler T, Qian G.S, Chen J.G, et al ., 2003 : Molecular pathway of aflatoxin detoxification.

Kurmanov, L. A., 1977 : Fusariotoxicosis in cattle and sheep. Marcel Dekker Inc., New York, U.S.A.

L

Lesage-Messen L, Cahagnier B., 1998 : Mecanisme d'adaptation des micromycetes aux activités de l'eau réduite, Cahagnier B. Moisissures des aliments peu hydratés. Paris, Londres, New York : Tec&Doc, 1998. Pp. 21-35.

Lis P.E, Deep I.W., 1991 : Influence of tillage and crop retention on yield, stalk rot and the recovery of Fusarium and Trichoderma spp in corn. Plant Disease.

M

Madhyastha S.M, Marquadt R.R, Frolich A.A, et al., 1990 : Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by Aspergillus.

Magnin N, Travel A et al., 2016 : Effets des mycotoxines sur la santé et les performances des volailles.

Marasas W.F., Kellerman T.S., Gelderblom W.C.,Coetzer J.A., Thiel P.G. et Vanderlugt J.J.,1988 : Leukoence-phalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from Fusarium moniliforme.

Moreau C., 1994 : Moisissures toxiques dans l'alimentation. Pologne : Masson et Cie, 322p.

Moss M.O, Franck M., 1987 : Prevention effects of biocides and other agents on mycotoxins production.

N

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.

Norholt M.D., Van Egmond H.P., Paulsch W.E., 1979 : Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*.

O

OMS., 2018 : Organisation Mondiale de la Santé, les aflatoxines.

P

Park D.L., 1993 : Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Add Contam*, 10: 49-60.

Paster N et Bullerman L.B., 1988 : Mould spoilage and mycotoxin formation in grain as controlled by physical means.

Payne G.A, Hagler W.M., 1983 : Effect of specific amino acids on *Aspergillus flavus* in defined media. *Appl. Environ. Microbiol* 46, 1983, pp. 805-812.

Patterson D.S.P., 1973 : Metabolism as a factor determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species.

Peers FG et Linsell CA., 1975 : Aflatoxin: contamination and its heat stability in Indian cooking oils. *Trop Sci*, 17: 229-232.

Pfohl-Leszkowicz A., 1999 : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Paris : Tec&Doc, 478p.

Pitt J.I, Hocking A.D., 1985 : Fungi and food spoilage. Sydney.

Prandini A., G. Tansini, S. Sigolo, L. Filippi, M. Laporta, and G. Piva., 2009 : On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products.

R

Reddy K.R.N. , S.B. Nurdijati and B. Salleh.,2010 : An overview of Plant-derived Products on Control of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins.

Redouane-Salah S., 2016 : Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxines M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé, Université des Frères Mentouri-Constantine.

Royer Gwladys, Tap Julien., 2003 : Les mycotoxines. Université Paris XII.

Rustom IYS., 1997 : Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59: 57-67.

S

S. Mahmood, M. Younus, A. Aslam and A. A. Anjum., 2017 : toxicological effects of aflatoxin B1 on growth performance, humoral immune response and blood profile of Japanese quail.

Stéfane Firmin., 2011 : Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un absorbant organique : évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Sciences agricoles.

T

Tantaoui-Elaraki A., 1977 : Production d'aflatoxine par *Aspergillus* du Maroc. Homme Terre et Eau.

Tabuc Cristina., 2007 : Flore fongique de différents substrats et conditions optimales d production des mycotoxines. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

W

Whitlow L-W., Hagler W-M-J., 2001 : La contamination des aliments par les mycotoxines : un facteur de stress additionnel pour les bovins laitiers.

Y

Yiannikouris A, Jouany J.P., 2002 : Mycotoxins in feeds and their fate in animals.

Z

Zaghini A., L. Sardi, A. Altafini, and L. Rizzi., 2005b : Residues of aflatoxins B1 and M1 in different biological matrices of swine orally administered aflatoxin b1 and saccharomyces cerevisiae.

Zaghini A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli and L. Rizzi., 2005a : Mannanligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens : Effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in egg and aflatoxin B1 levels in liver.

Résumé

Dans ce travail nous avons étudié la contamination des aliments concentrés complets de volaille en Algérie par les mycotoxines et plus précisément par l'aflatoxine B1. Pour cela, un total de 20 échantillons d'aliments a été prélevé dans différentes régions du pays. La détermination des mycotoxines a été faite par la technique d'ELISA. Les résultats ont montré que respectivement 5% des échantillons analysés sont contaminés par l'aflatoxine B1 (AFB1).

Les résultats obtenus ont montré que les taux d'aflatoxine B1 ne dépassaient pas les limites maximales fixées par la réglementation européenne et qui sont 5ppb pour l'aliment de bétail et 20ppb pour l'aliment de volaille.

Mots clés : mycotoxine, aflatoxine B1, aliment de volaille, seuil de contamination, ELISA.

Abstract:

In this work we studied the contamination of complete concentrated poultry feed in Algeria by mycotoxins and more specifically by aflatoxin B1. To do this, a total of 20 food samples were taken from different parts of the country. Mycotoxins were determined using the ELISA technique. The results showed that respectively 5% of the samples analyzed are contaminated with aflatoxin B1 (AFB1).

The results obtained showed that the levels of aflatoxin B1 did not exceed the maximum limits fixed by European regulations, which are 5ppb for livestock feed and 20ppb for poultry feed.

Key words : mycotoxin, aflatoxin B1, poultry feed, contamination threshold, ELISA.

ملخص:

قمنا في هذا العمل درسنا تلوث العلف الكامل للدواجن في الجزائر بالسموم الفطرية وبشكل أكثر تحديداً بواسطة الأفلاتوكسين ب1. للقيام لهذا، تم جمع 20 عينة طعام من أجزاء مختلفة من البلاد. تم تحديد السموم الفطرية باستخدام تقنية الـ ELISA. أظهرت النتائج أن 5% على التوالي من العينات التي تم تحليلها ملوثة بالأفلاتوكسين ب1 وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستويات الأفلاتوكسين ب1 لم تتجاوز الحدود القصوى التي تحددها اللوائح الأوروبية، والتي هي 5 جزء في المليون للأعلاف الحيوانية و 20 جزء في المليون لتغذية الدواجن.

الكلمات الرئيسية: السموم الفطرية، الأفلاتوكسين، العلف الكامل للدواجن، عتبة التلوث، تقنية الـ ELISA.