

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire
Rabie BOUCHAMA

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة
ربيع بوشامة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Prévalence des mycotoxines dans l'alimentation animale en Algérie,
impact des mycotoxines sur la santé publique et propositions de
méthodes de décontaminations des mycotoxines.**

Présentée par : Mme Mohammedi épouse. Ameer Sarah

Soutenu le : 06/01/2022

Les membres du jury :

Présidente	Mme Boukhors Karima Tamina	Professeur	ENSV
Rapporteur	Mme Ben-Mahdi Meriem Hind	Professeur	ENSV
Examineurs	Mme.Korichi Ouar Mounira Nabila	Professeur	Université d'Alger I
	Mme Yahiaoui Fatima	Maitre de conférences A	ENSV
	M. Boudis Hakim	Professeur	Université d'Alger I
	M. Zaouani Mohamed	Maitre de conférences A	ENSV

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire
Rabie BOUCHAMA

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة
ربيع بوشامة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Prévalence des mycotoxines dans l'alimentation animale en Algérie,
impact des mycotoxines sur la santé publique et propositions de
méthodes de décontaminations des mycotoxines.**

Présentée par : Mme Mohammedi épouse. Aneur Sarah

Soutenu le : 06/01/2022

Les membres du jury :

Présidente	Mme Boukhors Karima Tamina	Professeur	ENSV
Rapporteur	Mme Ben-Mahdi Meriem Hind	Professeur	ENSV
Examineurs	Mme.Korichi Ouar Mounira Nabila	Professeur	Université d'Alger I
	Mme Yahiaoui Fatima	Maitre de conférences A	ENSV
	M. Boudis Hakim	Professeur	Université d'Alger I
	M. Zaouani Mohamed	Maitre de conférences A	ENSV

Remerciements

*Au terme de ce travail je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame **Ben-Mahdi Meriem Hind**, Professeur à l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger) pour son encadrement et ses précieux conseils.*

*Je remercie Madame **Boukhors K.T**, Professeur à l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger) de nous faire l'honneur de présider ce jury.*

*J'adresse mes remerciements à Madame **Korichi Ouar Mounira**, Professeur à l'université d'Alger I, et à Madame **Yahiaoui Fatima**, Maitre de Conférence Classe A, à l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger), pour avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur **Boudis Hakim**, Professeur à l'Université d'Alger I, et à Monsieur **Zaouani Mohamed** Maitre de Conférence Classe A, à l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger), qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Il m'est particulièrement agréable d'adresser un remerciement très chaleureux à Monsieur **Brera Carlo**, Professeur, directeur de l'unité des mycotoxines et des phycotoxines à l'Institut Supérieur de Santé, Rome, Italie, à Monsieur **Moracci Gabriele** et à Madame **Gregori Emanuela** chercheurs à l'unité des mycotoxines à l'Institut Supérieur de Santé, Rome, Italie, pour leurs aide précieuse et leurs encouragement.*

J'exprime ma profonde gratitude à mes parents qui m'ont toujours soutenu durant ce parcours.

À mon mari, celui qui m'a toujours accompagné et soutenu durant ces années de thèse, merci de ta présence.

À mes enfants, leur amour me pousse à aller de l'avant chaque jour.

Je remercie mes sœurs, et mes amies qui m'ont toujours encouragé tout au long de cette thèse.

Sommaire

Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1
Partie I : Revue bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les mycotoxines	4
I.1.Définition des mycotoxines.....	4
I.2.Historique.....	5
I.3.Facteurs influençant la mycotoxinogénèse.....	6
I.3.1.La mycotoxinogénèse.....	6
I.3.2.Facteurs intrinsèques.....	7
I.3.3.Facteurs extrinsèques.....	7
I.3.3.1.Température.....	7
I.3.3.2. Activité de l'eau (A_w).....	8
I.3.3.3. Le PH	8
I.3.3.4. Présenced'oxygène.....	9
I.3.3.5 Composition du substrat.....	9
I.3.3.6 Interactions microbiennes.....	9
I.3.3.7. Présence d'insectes et d'acariens.....	10
I.4.Origine des mycotoxines	10
I.4.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	12
I.4.2. Le Genre <i>Fusarium</i>	12
I.4.3 Le genre <i>Penicillium</i>	12
I.5.Principales voies de biosynthèse des mycotoxines.....	14
Chapitre II : Les aflatoxines	
II. Généralités sur les aflatoxines.....	15
II.1.Caractérisiques biochimiques.....	15
II.2.Toxicité des aflatoxines	18

II.2.1.Effets des Aflatoxines sur la santé animale.....	18
II.2.2.Effets des aflatoxines sur la santé humaine	19
II.3.Toxicocinétique.....	20
II.6.Méthodes de dosage des mycotoxines dans les aliments.....	26
Chapitre III : Contamination des aliments et moyens de prévention du risque mycotoxicologique	27
III.1. Contamination des céréales et des aliments de bétail.....	27
III.2.Contamination du lait et produits laitiers par les aflatoxines.....	29
III.3.Méthodes de prévention du risque aflatoxique.....	37
III.3.1.Les bonnes pratiques agricoles	37
III.3.1.1. Mesures de prévention durant le stockage.....	37
III.3.1.2. L’usage des pesticides.....	38
III.3.1.2.1.Les fongicides.....	38
III.3.1.2.2.Les insecticide	39
III.3.2. Traitements physico-chimiques.....	40
III.3.3. L’utilisation des adsorbants	41
III.3.3.1.Les adsorbants inorganiques.....	42
III.3.3.2.Les adsorbants organiques.....	43
III.3.3.4.Les stratégies de bio contrôle	45
III.3.3.4.1.Bio-contrôle par des souches fongiques non toxiques.....	45
III.3.3.5.Utilisation des huiles essentielles comme stratégie alternative de lutte contre les aflatoxines.....	46
Chapitre IV : Impact économique et réglementation.....	48
IV.1. Impact économique.....	48
IV.2. Réglementation.....	49
Partie II : Etude expérimentale	
Objectifs et problématiques.....	53
I. Matériels et méthodes.....	54
I.1. Prévalence de l’AFB ₁ dans les aliments de bétail	54
I.1.1.Echantillonnage.....	54

I.1.2. Recherche de l'AFB ₁ par la méthode ELISA.....	55
I.1.2.1. Préparation des échantillons et extraction.....	55
I.1.2.2. Analyse des échantillons.....	55
I.1.2.3. Validation de la méthode ELISA pour l'analyse de l'AFB ₁	56
I.1.3. Recherche de l'AFB ₁ par la méthode HPLC-FLD.....	58
I.1.3.1. Réactifs utilisés.....	58
I.1.3.2. Equipements.....	58
I.1.3.2.1. Verrerie.....	59
I.1.3.3. Les conditions de l'HPLC.....	59
I.1.3.4. Préparation des solutions d'étalonnage.....	59
I.1.3.5. Extraction de l'AFB ₁	60
I.1.3.6. Méthode de validation de la technique HPLC-FLD pour la recherche de l'AFB ₁ dans l'alimentation animale.....	60
I.2. Prévalence de l'AFM ₁ dans le lait cru.....	64
I.2.1. Echantillonnage.....	64
I.2.2. Recherche de l'AFM ₁ par la méthode ELISA.....	64
I.2.2.1. Préparation des échantillons et techniques d'extraction.....	64
I.2.2.3. Analyse des échantillons.....	64
I.2.2.4. Validation de la méthode ELISA pour l'analyse de l'AFM ₁	65
I.2.3. Recherche de l'AFM ₁ par la méthode HPLC-FLD.....	67
I.2.3.1. Réactifs utilisés.....	67
I.2.3.2. Equipements.....	67
I.2.3.2.1. Verrerie.....	68
I.2.3.3. Les conditions HPLC.....	68
I.2.3.4. Préparation des solutions d'étalonnage	68
I.2.3.5. Extraction de l'AFM ₁	69
I.2.3.6. Méthode de validation de la technique HPLC pour la recherche de l'AFM ₁	69
I.2.4 Procédure de décontamination des Aflatoxines.....	71

I.2.5. Analyse statistique	71
II. Résultats.....	72
II.1. Présence de l'Aflatoxine B ₁ (AFB ₁) dans l'alimentation animale en Algérie.....	72
III. 2. Présence de l'AFM ₁ dans le lait cru collecté en Algérie.....	77
III. Discussion.....	84
III.1. Présence de l'Aflatoxine B ₁ (AFB ₁) dans l'alimentation animale en Algérie.....	84
III. 2. Présence de l'AFM ₁ dans le lait cru collecté en Algérie.....	96
Conclusion générale et perspectives.....	110
Références bibliographiques	

Liste des tableaux.

Tableau 1. Mycotoxines et moisissures productrices associées retrouvées en alimentation humaine et/ou animale.....	11
Tableau 2. Occurrence des mycotoxines dans les céréales et les produits dérivés des céréales en Algérie, Maroc et Tunisie.....	31
Tableau 3 . Occurrence des aflatoxines dans l'alimentation animale, en Afrique, Asie et en Europe.....	33
Tableau 4. Occurrence d'AFM ₁ dans le lait et les produits laitiers en Afrique, en Asie et Europe.....	35
Tableau 5. Valeurs réglementaires en vigueur en UE pour les aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale (µg d'AF par kg de matrice alimentaire) selon la Directive 2002/32/EC du 7 Mai 2002 et la Commission (EC) No 1881/2006 du 19 Décembre 2006.....	51
Tableau 6. Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord (INNORPI, 1983 ; FAO, 2004 ; Zinedine et al., 2006).....	52
Tableau 7. Paramètres de validation de la méthode ELISA utilisée pour la quantification de l'AFB ₁ dans les aliments de bétail.....	57
Tableau 8. Validation des paramètres de la méthode HPLC-FLD pour la détermination de l'AFB ₁ dans les aliments de bétail.....	63
Tableau 9 . Paramètres de validation de la méthode ELISA utilisée pour la quantification de l'AFM ₁ dans le lait cru.....	66
Tableau 10. Validation de la méthode HPLC-FLD pour la détermination des concentrations d'AFM ₁ dans le lait cru.....	70
Tableau 11. Répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB ₁ par la méthode ELISA, en fonction des différentes régions en Algérie.....	73
Tableau 12. Répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB ₁ par la méthode ELISA en fonction de la taille des exploitations en Algérie.....	73
Tableau 13. Répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB ₁ par la méthode ELISA en fonction des saisons en Algérie.....	74
Tableau 14. Analyse des variances des facteurs de risque associés aux taux de positivité en AFB ₁ en Algérie.....	74
Tableau 15 . Concentration de l'AFB ₁ dans les échantillons d'aliments de bétails déterminés par la méthode HPLC-FLD.....	75

Tableau 16. Niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB ₁ déterminés par la méthode HPLC-FLD.....	76
Tableau 17. Répartition des niveaux de contamination par l'AFM ₁ en fonction des différentes régions en Algérie.....	78
Tableau 18. Répartition des niveaux d'AFM ₁ selon la taille des exploitations en Algérie.....	79
Tableau 19. Répartition des niveaux d'AFM ₁ dans le lait cru en fonction de la saison.....	80
Tableau 20. Analyse des variances des facteurs de risque associés aux taux de positivité de l'AFM ₁ dans les élevages de bovins laitiers en Algérie.....	81
Tableau 21. Concentration de l'AFM ₁ dans les échantillons de laits cru déterminés par la méthode HPLC-FLD.....	82
Tableau 22. Niveaux de contamination du lait cru par l'AFM ₁ déterminés par la méthode HPLC-FLD.....	83

Liste des figures.

Figure 1 . Voies de biosynthèse des mycotoxines.....	15
Figure 2. Structures chimiques des aflatoxines B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ et M ₁	17
Figure 3. Bioconversion du 8,9-époxyde-AFB ₁	23
Figure 4. Métabolisme de l'aflatoxine B ₁ dans le foie.....	24
Figure 5. Toxicocinétique des xénobiotiques.....	25
Figure 6. Différents niveaux physiologiques de la toxicité de l'AFB ₁	26
Figure 7. Cycle d'infestation d' <i>A. flavus</i> , saprophyte du sol, sur des cultures de maïs.....	30
Figure 8. Exemples de préparations contenant des parois de levure et leur application en alimentation animale.....	44
Figure .9 Diagramme représentant les modes d'action cellulaires hypothétiques des huiles essentielles.....	48
Figure .10 Courbe d'étalonnage de la technique ELISA des solutions étalons de l'AFB ₁	49
Figure 11. Courbe d'étalonnage de la technique HPLC-FLD des solutions étalons de l'AFB ₁	63
Figure .12 Courbe d'étalonnage de la technique ELISA des solutions étalons de l'AFM ₁	66
Figure .13 Courbe d'étalonnage de la technique HPLC-FLD des solutions étalons de l'AFM ₁	70

Liste des abréviations

ADN : Acide desoxyribonucléique.

AFB₁ : Aflatoxine B₁.

AFB₂ : Aflatoxine B₂.

AFG₁ : Aflatoxine G₁.

AFG₂ : Aflatoxine G₂.

AFM₁ : Aflatoxine M₁

AFs : Aflatoxines.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

AOAC : Association of Official Analytical Chemists.

Ag HBs+ : Antigène pour l'hépatite B.

ALARA : As Low As Reasonably Possible.

ARN : Acide ribonucléique.

Aw : Activité de l'eau.

CAST : Council for Agricultural Science and Technology.

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer.

DON : Déoxynivalénol.

EC : European Commission.

EFSA : European Food Safety Authority.

FAO : Food and Agriculture Organisation.

FDA : Food and Drug Administration.

FUM : Fumonisines.

GC/MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

HACCP : Hazard Analysis of Critical Control Points.

HCSAS : Na-Ca-aluminosilicate hydraté.

HE : Huile Essentielle.

HPLC-FLD : High Performance Liquid Chromatography couplé à la fluorométrie.

ITTA : Institut International d'Agriculture Tropicale.

JEFCA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

LOD : Limite de détection.

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

Nb : Nombre.

ng/L : nanogramme par Litre.

OTA : Ochratoxine A.

PAT : Patuline.

ppb : Partie par billion.

RAR : Renouveau Agricole et Rural.

UHPLC-MS/MS : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse.

USDA-FGIS : United States Department of Agriculture- Federal Grain Inspection Service.

WHO : World Health Organization.

ZEN : Zéaralenone.

µg /kg : microgramme par Kilogramme.

Introduction générale

Introduction générale

Les récentes crises sanitaires qui ont perturbé les filières d'élevage comme l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) et la grippe aviaire, ont eu pour conséquence de rendre le consommateur plus soucieux et vigilant aux questions de la sécurité alimentaire (Firmin, 2011). Un rapport de l'OMS sur la prévalence des pathogènes d'origine alimentaire a révélé que 31 agents pathogènes ont causé 600 millions de cas de maladies d'origine alimentaire avec 420.000 décès enregistrés en 2010. Les agents étiologiques les plus couramment incriminés dans ces pathologies sont les *Campylobacter*, *Salmonella enterica*, *Salmonella Typhi* ainsi les mycotoxines telles que les aflatoxines (WHO, 2015).

Les mycotoxines sont des toxines issues du métabolisme secondaire des moisissures, qui lors de conditions de stress ou de compétition avec d'autres micro-organismes contaminent naturellement une large variété de denrées alimentaires, notamment les céréales (Vita et al., 2016). Selon une estimation de la FAO, 25% des cultures mondiales seraient contaminées par les mycotoxines, ce qui menace directement la sécurité sanitaire des aliments et causent des pertes économiques considérables (Kabak et al., 2006). Grâce à l'amélioration des performances des techniques d'analyses, plus de mille métabolites de moisissures toxigènes ont été identifiés (Cole et al., 2003), mais seule une trentaine de ces métabolites possèdent expérimentalement une activité biologique et sont responsables d'une contamination appréciable des denrées alimentaires (Boudra et al., 2009).

L'impact économique des mycotoxines est difficilement mesurable, en raison des pertes directes et indirectes liées à ces contaminants naturelles. Ces pertes économiques sur l'industrie alimentaire et l'élevage sont estimées à environ 5 milliards de dollars aux Etats-Unis et au Canada (Olsen et al., 2003).

Du fait de leur diffusion mondiale et de leur toxicité, les aflatoxines sont parmi les groupes de mycotoxines les plus largement étudiées et les plus strictement réglementées. Ces toxines sont les premières mycotoxines découvertes dans les années 1960 lors d'une intoxication massive en Grande-Bretagne ayant conduit à la mort de plus de 100 000 dindons (Richard, 2008). Les recherches scientifiques qui se sont poursuivies ont montré que les aflatoxines sont des substances génotoxiques, cancérigènes et immunosuppressives, elles provoquent également une toxicité aiguë et chronique. Cependant, les intoxications dues aux aflatoxines sont difficiles à diagnostiquer, en raison d'expositions difficilement mesurables, à la fois aiguës et chroniques (Battilani et al., 2016). La littérature scientifique a signalé

l'apparition de cas d'aflatoxicose aiguë remontant à l'année 2004 au Kenya où 317 cas et 125 décès ont été attribués à l'ingestion de maïs contaminé à l'aflatoxine B₁ (Lewis et al., 2005 ; Probst et al., 2007). De plus, de très nombreuses enquêtes épidémiologiques ont signalé des associations fréquentes entre la consommation de certains aliments contaminés par l'aflatoxine B₁ et l'incidence de cancer du foie.

En raison de sa valeur nutritionnelle élevée, le lait est considéré comme un aliment adapté à toutes les tranches d'âge. Cet aliment contribue considérablement à la couverture des besoins nutritionnels et apporte de nombreux nutriments tels que les glucides, les lipides, les protéines, les sels minéraux, vitamines et oligo-éléments essentiels (Ellen et al., 2013). La production mondiale de lait a augmenté considérablement ces dernières années, ainsi l'année 2018 a enregistré une augmentation de 1.6% avec un niveau de production mondial d'environ 838 millions de tonnes, cette production devrait croître de 1.7% par an au cours des dix prochaines années, pour atteindre 981 millions de tonnes en 2028 (OCDE-FAO, 2018).

L'État algérien accorde une grande importance au développement de la filière lait, en 2009 le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MADR) amorce un nouveau programme politique du Renouveau Agricole et Rural (RAR) visant à renforcer le développement des filières stratégiques dont la filière lait local, mais également à améliorer l'apport protéique de la population (Mamine et al., 2021). Ces programmes étaient orientés sur le développement de la production animale, l'extension des superficies fourragères, la reconstitution du cheptel bovin et le développement de la production laitière. Depuis, la subvention de la filière lait a alors été mise en place, avec des subventions à l'investissement, une augmentation des primes allouées à la production et à la collecte, et à la création de primes aux transformateurs pour l'intégration industrielle du lait local. L'adoption de ces politiques a eu des répercussions sur le niveau de consommation puisque ce dernier a connu une augmentation considérable, au détriment de la production qui est restée toujours limitée faute de compétitivité (Bellil et Boukrif, 2021). Ainsi, la consommation du lait en 2013 a été évaluée à 142 kg *per capita* et par an (FAO, 2020), ce qui place l'Algérie comme le septième pays importateur de produits laitiers dans le monde (Chatellier, 2019).

En raison d'un phénomène de transfert, l'aflatoxine M₁ (AFM₁), métabolite hydroxylé de l'AFB₁, peut se retrouver dans le lait des animaux en lactation nourris avec des aliments contaminés. L'AFM₁ possède seulement 2 à 10 % du pouvoir cancérogène de l'AFB₁, mais conserve toutefois l'hépatocarcinogénicité de l'AFB₁ (Hsieh et al., 1985). Du fait de la

stabilité élevée, de la toxicité et de la cancérogénicité des aflatoxines, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé l'AFB₁ dans le groupe 1 regroupant les molécules cancérigènes pour l'homme et l'animal. Concernant la toxicité de l'AFM₁, cette mycotoxine a été initialement classée par le CIRC comme cancérogène du groupe B2. Cependant en raison de l'existence de suffisamment de preuves de son pouvoir cancérigène chez l'homme, l'AFM₁ a été récemment classée comme substance cancérigène du groupe 1 (IARC, 2002).

A l'heure actuelle, en Algérie, très peu d'études sur la contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ ainsi que la présence de son métabolite hydroxylé l'AFM₁ dans le lait, sont disponibles dans la littérature scientifique, en effet, l'un des points forts de notre travail de thèse, est qu'elle s'inscrit parmi les premiers travaux à s'intéresser à la prévalence de ces deux mycotoxines, à la fois dans l'alimentation animale et humaine. Face à ces constats, il semble donc impératif d'établir un bilan de connaissance concernant la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette problématique, les travaux de notre thèse vont porter dans un premier temps sur la recherche de l'AFB₁ dans les aliments concentrés des vaches laitières. Ensuite, dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à rechercher l'AFM₁ dans le lait cru provenant d'exploitations laitières de différentes régions du nord Algérien.

Notre thèse s'articule de la manière suivante, une revue bibliographique comportant quatre chapitres. Les deux premiers portent sur quelques données de base concernant les mycotoxines en général et les aflatoxines en particulier. Le troisième chapitre concerne la contamination des aliments, les techniques de dosage des aflatoxines ainsi que des méthodes de prévention de la contamination par les aflatoxines. Le quatrième et dernier chapitre s'attachera à exposer l'impact économique lié à la présence de ces toxines, ainsi qu'aux différentes réglementations qui régissent ces contaminants dans le monde.

La partie expérimentale, comporte deux grandes parties, la première comprend l'évaluation des niveaux de contamination par l'AFB₁ dans les aliments de bétail destinés aux vaches laitières, ceci au niveau des différentes régions du nord Algérien, et l'analyse des facteurs de risques associés à cette contamination. Dans la seconde partie, une quantification de l'AFM₁ dans le lait cru a été réalisée afin d'estimer les niveaux de contamination du lait cru produit en Algérie.

Partie I : Revue Bibliographique

Chapitre I. Généralités sur les mycotoxines

I.1. Définition des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés chimiques toxiques, de faible poids moléculaire (<1000 Daltons), issus du métabolisme secondaire des moisissures, contaminant naturellement une grande variété de denrées alimentaires (Pittet, 1998 ; Binder et al., 2007 ; Boudra et al., 2009 ; Marin et al., 2013). Elles sont produites par des champignons filamenteux, plus particulièrement ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps*. Ces métabolites sont non-essentiels au cycle de vie du champignon, et sont considérés parmi les plus puissants contaminants chimiques auxquels les humains et les animaux sont exposés. (Fox et Howlett, 2008 ; Shephard, 2008 ; Marin et al., 2013).

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin « toxicum » qui signifie poison (Steyn, 1995 ; Pitt et al., 2000). Le métabolisme secondaire est très diversifié, d'où la multitude des métabolites secondaires secrétés, par ailleurs, sa régulation est très complexe et répond généralement à des stimuli environnementaux tels que le pH, la température et le substrat (Fox et Howlett, 2008).

Les mycotoxines sont considérées comme faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique et l'économie de nombreux pays.

De nos jours plus de 400 mycotoxines ont été recensées, mais seule une trentaine de molécules possède des propriétés toxiques inquiétantes pour l'homme et pour l'animal. Il s'agit des Aflatoxines AF, de l'Ochratoxine A (OTA), des Fumonisines (FUM, surtout FB₁), de la Patuline (PAT), de la Zéaralénone (ZEN) ainsi que quelques Trichothécènes (HT-2, Toxin-T2 et déoxynivalénol DON) (FAO, 2004 ; Paterson, 2006). De plus, il existe des effets synergiques observés entre certaines mycotoxines. Ainsi, le déoxynivalénol (DON) et la fumonisine B₁ (FB₁) possèdent un effet synergique négatif sur la croissance des animaux d'élevage (Harvey et al., 1996 ; Smith et al., 1997).

Il est important de noter qu'une même mycotoxine peut être sécrétée par plusieurs espèces et genres de moisissures, à l'inverse, une même moisissure peut produire plusieurs mycotoxines (Mansfield et al., 2008). Ce qui peut indiquer la coexistence dans un même aliment de plusieurs mycotoxines à la fois. Par ailleurs, la présence d'une moisissure

toxino-gène ne signifie pas la présence de mycotoxines, de plus la moisissure responsable de la production de mycotoxines peut être absente de la denrée alimentaire, alors que la/les mycotoxines persistent (Diaz ,2005 ; AFSSA, 2009 ; Parent-Massin et al., 2013).

Selon leur lieu de production, les moisissures toxino-gènes se répartissent en deux groupes :

-Des moisissures qui envahissent les plantes avant la récolte, communément appelées contaminants du champ.

-Celles qui surviennent après la récolte, au cours du séchage, du transport, du stockage et de la distribution appelées contaminants du stockage (Jouany et al., 2009).

Parmi les contaminants du champ nous citerons *Fusarium graminearum* pathogène des plantes produisant le déoxynivalénol et nivalénol. *Fusarium moniliforme* poussant sur les plantes sénescents ou stressés et produisant les fumonisines. *Aspergillus flavus* produisant les aflatoxines, ce champignon peut être considéré comme un contaminant des champs, néanmoins, ce dernier peut aussi produire des mycotoxines pendant le stockage (Ayalew, 2010 ; Alonso et al., 2013).

I.2.Historique

Plusieurs épidémies ont été décrites au Moyen-âge suite à la consommation de seigle contaminé par des alcaloïdes de l'ergot produits par *Claviceps purpurea* (Beardall et Miller, 1994). L'ergotisme est l'une des plus anciennes mycotoxicoses connues, cité dans l'ancien testament de la bible, appelé communément « Feu de Saint-Antoine », les signes cliniques se manifestaient par des hallucinations et des gangrènes des extrémités (Schoental , 1984 ; Chapeland-Leclerc *et al.* 2005). Les fusariotoxines comme la toxine T-2 ou la zéaralénone ont été considérées comme responsables du déclin de la civilisation Etrusque (Schoental ,1991). En 1900, au Japon, la consommation de riz jaune contaminé par une espèce de *Penicillium*, a entraîné des très graves intoxications hépatiques (Pitt et Hocking, 1997).

Entre 1942 et 1947, une autre intoxication est décrite en Russie sous le nom d'Aleucie Toxique Alimentaire (ATA), survenue suite à la consommation de farine contaminée par *Fusarium sp.* et *Trichoderma sp.* Ce n'est que plus tard que les toxines élaborées par ces espèces seront isolées et étudiées sous le nom de trichothécènes (Chapeland-Leclerc et al., 2005).

En 1956 une épidémie nommée Néphropathie Endémique des Balkans s'est déclarée dans certains pays du Sud-Est de l'Europe, cette pathologie était caractérisée par une augmentation inhabituelle d'insuffisances rénales chroniques surtout dans les populations rurales. Il semblerait que son étiologie soit liée à la consommation répétée de céréales contaminées par l'ochratoxine A (OTA) (AFSSA, 2009).

Il a fallu attendre l'année 1960 pour que la mise en cause de la toxicité des moisissures ait été envisagée. En effet, en Angleterre la Turkey « X » Disease à l'origine de la mort de plusieurs dizaines de milliers de dindonneaux a permis la découverte d'une famille de molécules appelées aflatoxines (Richard ,2008). Par la suite, des recherches ultérieures montrèrent l'existence de quatre aflatoxines (B1, B2, G1, G2) et aboutirent à la mise en évidence d'un puissant pouvoir cancérigène de certaines de ces toxines (Chapeland-Leclerc et al., 2005). Depuis, des travaux scientifiques d'envergure ont permis la découverte de nombreuses mycotoxines, le dernier grand groupe étant celui des fumonisines (découvert en 1988) (Yiannikouris et Jouany, 2012).

I.3.Facteurs influençant la mycotoxinogénèse

I.3.1.La mycotoxinogénèse

La mycotoxinogénèse correspond à l'ensemble des conditions nécessaires à la synthèse et à la sécrétion des toxines fongiques. Il semblerait qu'il s'agisse d'une réaction du champignon face à des conditions environnementales stressantes. Ces toxines sont synthétisées pendant la phase en plateau, (idiophase), c'est-à-dire après la phase active de multiplication cellulaire (trophophase) (Chapeland-Leclerc et al., 2005).

La production de mycotoxines et la croissance fongique sont intimement liées. Il a été démontré que les conditions favorables à la toxinogénèse sont plus spécifiques que celles nécessaires au développement fongique (Olsen et al., 2003 ; Blumenthal, 2004).

La mycotoxinogénèse est un processus d'une grande complexité qui n'est pas complètement élucidé. Ainsi, les conditions optimales de toxinogénèse dépendent d'une association de différents paramètres conduisant à la libération des mycotoxines dans les denrées alimentaires (D'Mello et al., 1997).

Deux types de facteurs sont responsables de la production et de la dissémination des mycotoxines : des facteurs intrinsèques liés à la souche fongique elle-même et des facteurs extrinsèques, représentés par l'ensemble des conditions écologiques.

I.3.2.Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques représentent l'ensemble des éléments qui sont directement liés à la souche elle-même, comme la vitesse de croissance, la capacité de dissémination, la dispersion des spores ou encore la longévité des spores (Moreau, 1994).

Un aliment moisi n'est pas forcément contaminé par les mycotoxines car certaines moisissures sont toxigènes mais d'autres ne le sont pas. De plus au sein d'une même espèce toxigène, certaines souches sont fortement productrices de mycotoxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindres (Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 2002 ; Zinedine, 2004).

De plus, une espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines comme par exemple *Aspergillus flavus* qui peut produire entre autre les aflatoxines, l'acide cyclopiazonique et l'aspertoxine. De même certaines mycotoxines peuvent être produites par plusieurs espèces de moisissures comme par exemple l'aflatoxine qui est produite par *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* (AFSSA, 2006).

I.3.3.Facteurs extrinsèques

La production de mycotoxines par les moisissures est fortement dépendante des conditions climatiques, notamment de la température et de l'humidité (A_w), mais aussi des nutriments présents. Ces facteurs sont d'origine physique, physico-chimique ou biologique (Mitchell et al., 2004).

I.3.3.1.Température

La température est un facteur prépondérant de la croissance des micromycètes ainsi qu'à la production de toxines. Elle est aussi intimement liée à l'activité de l'eau (A_w). La température optimale de croissance d'un champignon ne correspond pas à celle de la production de la toxine. De manière générale, elle est supérieure à la température optimale de la toxigenèse. Pour *Penicillium viridicatum* (producteur d'Ochratoxine A), sa croissance a lieu à un intervalle de température compris entre 0 et 31°C et pour un A_w de 0,95, alors que la synthèse d'Ochratoxine A n'est possible qu'à une température comprise entre 12 et 24°C (Norholt et al.,1979). Une production optimale d'aflatoxines a été signalée à une gamme de température allant de 20 à 35°C pour des isolats d'*A. flavus* et *A. parasiticus* (Schroeder et Hein, 1967).

L'impact des changements climatiques sur la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires est très préoccupant. En effet, de récentes études ont démontré que l'AFB₁ devrait constituer un danger potentiel pour la sécurité sanitaire du maïs provenant des pays de l'Europe du sud (Grèce, sud de l'Italie, Bulgarie, Albanie) (Battilani et al., 2016). Selon différents scénarios prévus pour la région méditerranéenne, des températures supérieures à 30°C devraient être enregistrées dans les années à venir, en effet, il semblerait qu'une température de 37°C soit favorable à la production d'AFB₁ par *A. flavus* et *A. parasiticus* (Lahouar et al., 2016).

I.3.3.2. Activité de l'eau (A_w)

Il a été établi que l'activité hydrique requise à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance des micromycètes (Pfohl-Leszkowicz, 2001) (4). L'activité de l'eau optimale pour la plupart des espèces fongiques est comprise entre 0,85 et 0,99.

Le genre *Aspergillus* est considéré comme semi-thermophile et semi-xérophile (Shinha and Bhatnagar, 1998). En effet, en raison de sa grande capacité d'adaptation aux conditions climatiques *A. flavus* peut se développer à la fois aux champs, durant la récolte ainsi qu'au moment du stockage (Klich, 2007). À titre d'exemple la formation d'aflatoxines par *A. flavus* nécessite une valeur d'A_w comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance fongique peut avoir lieu à des valeurs d'A_w plus basses (Troller, 1980). Aussi, la production d'aflatoxines diminue avec l'A_w et s'arrête complètement quand cette dernière atteint 0.70 (Battilani et al., 2013).

I.3.3.3. Le pH

Les moisissures se développent sur de larges gammes de pH compris entre 3 et 8. Comme pour les autres paramètres, il existe des pH pour lesquels la croissance fongique est optimale, généralement ces valeurs de pH se situent entre 5 et 6 (Reboux, 2006).

À l'instar du couple température/A_w, la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. En effet, la synthèse d'aflatoxines se fait à un pH proche de 6 (Molina et al., 2002), tandis que la croissance de sa moisissure productrice *A. flavus* s'effectue à un pH de 5 (Holmquist et al., 1983).

I.3.3.4. Présence d'oxygène

Généralement, la synthèse de toxines fongiques est plus influencée par la variation de la composition de l'air que la croissance fongique. Il a été constaté qu'une diminution de la pression partielle en oxygène jusqu'à moins de 1% et l'augmentation des concentrations en CO₂ inhibent la production des mycotoxines (Paster N et Bullerman ., 1988). Aussi, un taux de 80% de CO₂ inhibe la formation des aflatoxines (Pfohl-Leszkowicz, 1999). De même, la diminution des niveaux de concentration en O₂ affecte la croissance de *Fusarium proliferatum* et rend indécélable la synthèse de Fumonisine B₁ (Keller et al., 1997).

I.3.3.5 Composition du substrat

La composition qualitative et quantitative du substrat peut influencer l'expression du pouvoir toxigène de certaines moisissures (Reboux, 2006). La présence de certaines molécules dans le substrat peut influencer la production des mycotoxines .En effet, un taux élevé de sucres et / ou de lipides est favorable à la toxinogénèse. Ainsi, du fait de leur richesse en sucres et en lipides, les céréales et les oléagineux, sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines. La production des aflatoxines par *A. flavus* est favorisée par certains sucres comme le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Une plus faible croissance et peu ou pas de toxinogénèse ont lieu sur des substrats contenant du lactose ou sorbose comme source de carbone (Luchese et al, 1993 ; Emar 1997).

La toxinogénèse dépend fortement de la présence de certaines molécules dans le substrat. Par exemple, l'acide phytique (souvent présent dans les céréales) diminue la synthèse d'aflatoxines (AF) par *A. parasiticus* et *A. flavus*. À l'inverse, certains acides aminés (comme la proline) stimulent cette production (Payne et al., 1983).

I.3.3.6 Interactions microbiennes

De manière générale, la présence simultanée dans le même milieu, de différentes espèces de micro-organismes influence négativement la synthèse de mycotoxines. Cela s'explique par la possible destruction de la toxine par une autre souche et par la compétition pour le substrat. Une compétition entre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* a été rapportée, avec une diminution de la synthèse d'aflatoxines B₁, ceci même si la souche d'*A. parasiticus* est une souche non toxigène (Pfohl-Leszkowicz, 2001). De même pour *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus flavus* qui lorsqu'ils sont présents dans le même substrat,

induisent une augmentation de la production d'aflatoxines et une diminution voire une absence de la sécrétion d'ochratoxines. Ce phénomène s'explique par la monopolisation de la source de phénylalanine par *Aspergillus flavus*. L'OTA étant un analogue structural de cet acide aminé, elle ne peut alors plus être synthétisée (Bouraima et al., 1993).

La présence de *Fusarium verticilloides* sur les épis protège le maïs d'une contamination ultérieure avec l'*Aspergillus flavus* et réduit la quantité d'aflatoxine produite (Zummo et Scott, 1992).

I.3.3.7. Présence d'insectes et d'acariens

Les prédateurs tels que les insectes et les acariens sont des vecteurs de dissémination des spores de moisissures. Ils contribuent à l'infestation des denrées par les micromycètes ainsi qu'à la production de toxines. En détruisant l'enveloppe extérieure des grains et des graines, les insectes facilitent la pénétration des moisissures à l'intérieur des graines. Les acariens, vivant sur les céréales atteintes transportent les spores de champignons sur leur corps et dans leur tube digestif. Par conséquent, la contamination se produit lorsque des acariens arrivent en contact avec les grains, ce qui constitue des foyers favorables pour la production de mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

L'infestation de l'arachide, du coton et du maïs, par *Aspergillus flavus* (producteur de l'AFB₁) avant la récolte, est souvent liée à l'agression du végétal par des insectes (Le Bars, 1988).

I.4.Origine des mycotoxines

Comme détaillé précédemment, deux groupes de champignons toxigènes peuvent être distingués. Le premier groupe est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant des mycotoxines sur les plantes au niveau du champ, appelé « **toxines de champs** ». L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte ; on les qualifiera de « **toxines de stockage** ». Les principales mycotoxines peuvent être produites par trois principaux types de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Yiannikouris et Jouany, 2002). Le **Tableau 1** présente les mycotoxines les plus importantes ainsi que les moisissures toxigènes qui leur sont associées.

Tableau 1. Mycotoxines et moisissures productrices associées retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (AFSSA, 2009).

	Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Mycotoxines réglementées ou en cours de réglementation	Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius</i>
	Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus, Aspergillus carbonarius</i>
	Patuline	<i>Penicillium expansum, Aspergillus clavatus</i> <i>Byssochlamys nivea</i>
	Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides, F. proliferatum</i>
	Trichothécènes (groupes A et B)	<i>Fusarium langsethiae, F. sporotrichioides, F. poae, F. graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. tricinctum, F. acuminatum</i>
	Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum, F. culmorum</i> <i>F. crookwellense.</i>
	Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)	<i>Claviceps purpurea, C. paspali, C. africana, C. fusiformis</i>
Autres mycotoxines	Citrinine	<i>Aspergillus terreus, A. carneus, A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum, P. citrinum, P. expansum</i>
	Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata, Alternaria solari</i>
	Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus, A. versicolor, A. tamarii</i> <i>Penicillium dont P. camemberti</i>
	Stéigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans, A. versicolor, A. flavus</i>
	Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
	Stachybotryotoxines	<i>Strachybotrys chartarum</i>
	Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrème B)	<i>Neotyphodium coenophialum, N. lolii</i>
	Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii, P. crustosum, P. puberulum</i> <i>Aspergillus clavatus, A. fumigatus</i>	

I.4.1. Le genre *Aspergillus*

Ce genre appartient à la classe des *Ascomycètes*. Le genre *Aspergillus* regroupe environ 250 espèces (Klich, 2007). Les *Aspergilli* ont une large répartition géographique, mais sont le plus souvent présents dans les zones tropicales et subtropicales, donc adaptés aux climats chauds et aux milieux pauvres en eau (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). La température optimale de croissance de la plupart des espèces d'*Aspergillus* se situe entre 25 et 40°C. Les espèces thermophiles, comme *Aspergillus fumigatus*, se développent au-delà de 35°C et parfois même jusqu'à 57°C (Morin, 1994). Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou infestés par d'autres champignons. Ils sont aussi présents sur la surface des graines (Hocking, 2006). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et l'animal à cause de leur capacité d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses telles que les mycoses pulmonaires (Morin, 1994). Les *Aspergilli* sont aussi capables de produire des mycotoxines toxiques pour l'homme et l'animal (Botton et al., 1990).

Les deux espèces aflatoxinogènes majeures restent *A. flavus* et *A. parasiticus*, qui sont le plus souvent responsables de la production de quantités importantes d'aflatoxines dans les matrices alimentaires au niveau mondial (El Khoury et al., 2011). Les souches d'*Aspergillus flavus* présentent une grande variabilité génétique, leur pouvoir toxino-gène peut aussi varier de souches non toxino-gènes à hautement toxino-gènes avec une production plus importante d'AFB₁ que d'AFG₁ (Perrone et al., 2014). Selon plusieurs études, *A. flavus* est considéré comme l'espèce fongique la plus préoccupante, ceci est dû à sa capacité à se développer sur différentes denrées agricoles et matrices alimentaires et à y produire de l'aflatoxine B₁ aux niveaux des champs comme lors du stockage (Amaiike & Keller, 2011 ; Baranyi, 2013 ; Varga et al., 2015).

Les souches d'*Aspergillus parasiticus* sont plus uniformes dans leurs pouvoirs toxino-gènes et sont généralement fortement aflatoxinogènes avec une production d'AFB₁ et des quantités variables d'AFB₂, AFG₁, AFG₂ (Gourami et Bullerman, 1995).

I.4.1 Le Genre *Fusarium*

C'est un genre qui comprend 40 espèces largement répandues (Nelson et al., 1983). Le genre *Fusarium* tire son nom du latin « *fusus* » qui signifie fuseau, en référence à la forme des conidies. Les moisissures de ce genre sont très répandues et elles peuvent être observées sur presque l'ensemble de la surface du globe. Les *Fusarium* peuvent être retrouvés aussi bien dans des zones tempérées que dans des régions froides, tropicales ou subtropicales (Smith and Moss, 1985).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* exerce un impact important, car il renferme des espèces phytopathogènes qui peuvent contaminer de nombreuses céréales, des légumes, et des arbres fruitiers. Il se développe préférentiellement sur les végétaux sénescents ou stressés. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage. (Trenholm et Prelusky, 1988; Chabasse et al., 2002).

Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines. Comme exemple, nous citerons *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum* capables de produire des trichothécènes de types A et B (Pitt, 2000).

I.4.3 Le genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Le genre *Penicillium* comprend entre 150 et 300 espèces (Pitt, 1987). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, on les retrouve aussi bien dans le sol et les matières organiques en décomposition que dans les denrées alimentaires telles que les céréales, les arachides et les produits laitiers (Storey et al, 2014).

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses (Pitt, 1988). Leur croissance est optimale à des températures allant de 20 à 27°C, pour une humidité importante. Il s'agit d'un contaminant fréquent des régions tempérées (Storey et al, 2014).

Les espèces du genre *Penicillium* peuvent être à l'origine de plusieurs pathologies, causées par le champignon lui-même ou par les toxines qu'il produit. En effet les *Penicillia* peuvent causer des inflammations de la cornée (kératomycose) ainsi que des onychomycoses (Hannequin et Lavarde, 1998).

Parmi les mycotoxines pouvant être produites par les espèces toxigènes du genre *Penicillium*, nous citerons : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (Pitt, 2000).

I.5.Principales voies de biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont considérées comme des métabolites secondaires, donc en théorie non indispensables au développement des moisissures. Contrairement au métabolisme primaire commun à toutes les moisissures, le métabolisme secondaire dépend de l'espèce et de la souche considérée. Il aboutit à une grande variété de molécules, dont les mycotoxines.

Les voies de biosynthèse des mycotoxines sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques au métabolisme secondaire. Les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques principales :

- dérivées des acides aminés : alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, gliotoxine, roquefortine, sporidesmines ;

- issues de la voie des polyacétates : aflatoxines, acide penicillanique, citrinine, fumonisines, ochratoxines, patulines, stérigmatocystine, zéaralénone ;

- dérivées des terpènes : diacétoxyscirpenol, déoxynivalénol, trichothécènes (Luchese et Harrigan, 1993 ; Steyn, 1980).

Les principales voies de biosynthèse des mycotoxines sont présentées dans la **Figure 1**.

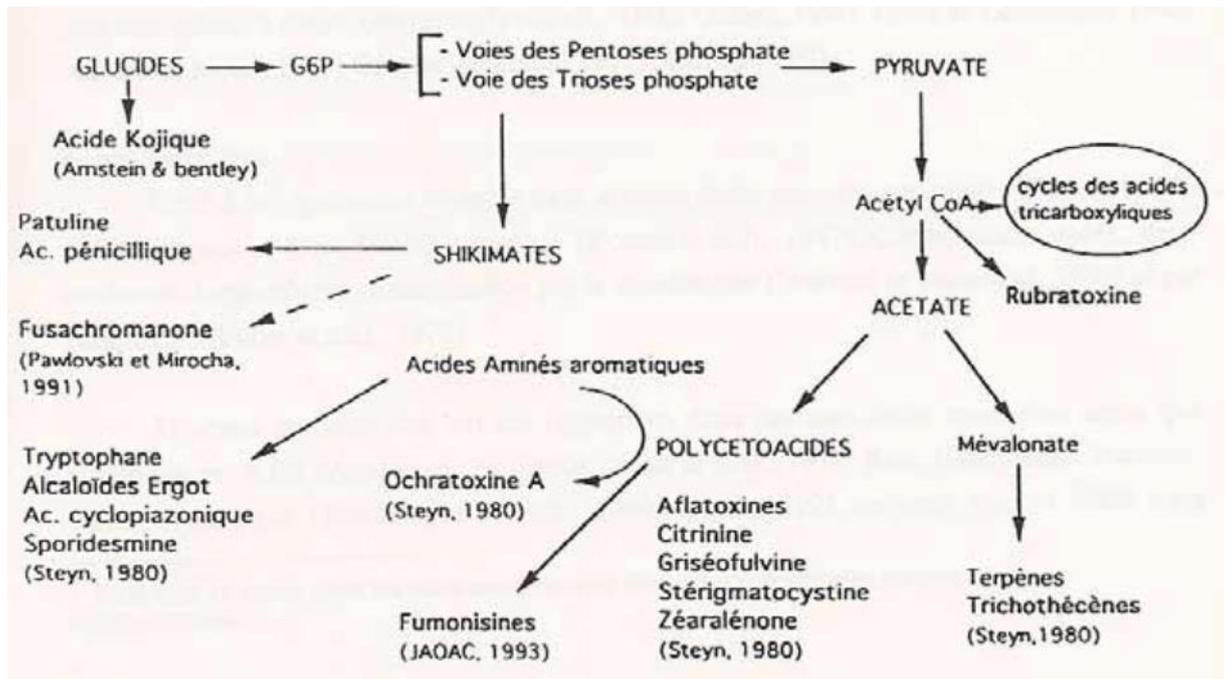


Figure 1 .Voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc, 2007).

Chapitre II : Les aflatoxines

II. Généralités sur les aflatoxines

Le terme aflatoxine (AF) est un acronyme qui provient de la combinaison de la lettre «A» pour *Aspergillus* et «FLA» pour *flavus*. Ce nom fait référence à l'espèce incriminée dans la contamination de la farine d'arachides «*Aspergillus flavus*», habituellement consommée par les volailles et responsable de la «Maladie X du dindon», le mot toxine signifie poison (Rawal et al., 2010).

II.1.Caractéristiques biochimiques

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparenté au difurano-coumarine (Bennett et Klich, 2003). Ces toxines regroupent 18 composés structurellement proches. Elles sont produites par des moisissures du genre *Aspergillus spp.* *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B₁ et l'aflatoxine B₂, *A. parasiticus*, produit les 4

aflatoxines (B₁ ; B₂ ; G₁ ; G₂) et *A. nomius*, une souche rare, proche de *A. flavus*, est aussi capable de produire des aflatoxines (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Les Aflatoxines sont des molécules de faibles poids moléculaires (312 à 330 g/mol). Elles sont très peu solubles dans l'eau (10 à 30 µg/ml), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants polaires comme le chloroforme et le méthanol (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

À l'heure actuelle, 17 aflatoxines ont été identifiées, mais seules cinq d'entre elles sont largement étudiées d'un point de vue toxicologique. Il s'agit de l'aflatoxine B₁ (AFB₁), B₂, G₁, G₂ et M₁. Sous lumière UV, les aflatoxines B émettent de manière intense une fluorescence bleue, tandis que les Aflatoxines G émettent une fluorescence verte, d'où leurs dénominations «B» pour Blue et «G» pour Green, les numéros désignent les molécules majeures et mineures. Le «M» provient quant à lui du nom de l'aliment à partir duquel les aflatoxines M ont été extraites pour la première fois : «M» pour *Milk* (IARC, 2002).

Les aflatoxines sont classées par ordre décroissant de toxicité de la manière suivante : AFB₁, AFM₁, AFG₁, AFB₂ et AFG₂ (Cole et Cox, 1981). Cette différence de toxicité s'expliquerait par la présence d'une double liaison sur le cycle dihydrofurane de l'AFB₁, AFG₁, AFM₁, cette liaison est absente chez leur homologue AFB₂, AFG₂, AFM₂. Aussi, les aflatoxines du groupe B possèdent un cycle cyclopentone accolé à leur structure, ce cycle est substitué par un cycle lactone chez le groupe G (Lee et al., 1981) (**Figure 2**).

Les conditions les plus favorables à la production d'aflatoxines sont une activité en eau relativement faible (0,84 -0,86) et une température élevée, comprise entre 25 et 40 °C (Pfohl-Leszkowicz, 2001; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Les changements climatiques peuvent modifier la température et l'A_w des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, ceci va directement influencer l'expression des gènes régulateurs (aflS and aflR) responsables de la synthèse des aflatoxines, provoquant ainsi la sécrétion des aflatoxines par les *Aspergilli* (Schmidt-Heydt et al., 2010 ; Gallo et al., 2016)

L'AFB₁ est le composé le plus abondant dans les aliments contaminés, cette toxine est également considérée comme le cancérigène naturel le plus puissant. L'AFB₁ a été classée dans le groupe 1 des composés cancérigènes chez l'homme par l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer (IARC) (Gourama et Bullerman, 1995 ; IARC, 2002).

Une fois ingérée par les femelles laitières, l'aflatoxine B₁ présente dans l'alimentation est métabolisée au niveau hépatique et transformée en son dérivé 4-hydroxy, connu sous le nom d'AFM₁, elle est par la suite retrouvée dans le lait (Patterson et al., 1980). À l'instar des

autres aflatoxines, l'AfM₁ a été classée comme cancérogène pour l'homme du fait de l'existence de suffisamment de preuves concernant son hépatocarcinogénicité (IARC, 2002). Les aflatoxines sont des molécules stables et très résistantes aux différents procédés de transformation alimentaire tels la torréfaction, l'extrusion et la cuisson (Marin et al., 2013).

Les AFs sont des toxines peu sensibles aux traitements thermiques (stérilisation, pasteurisation, congélation, etc.) ou au séchage. Des températures très élevées sont nécessaires pour leur dénaturation, ce qui est difficilement compatible avec les procédés de fabrication ou de transformation des aliments (El khoury, 2016). 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 (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Une instabilité de ces structures est constatée à des pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10). Par oxydation, le cycle lactone des aflatoxines devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. Les AFs sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique (El Khouri, 2007).

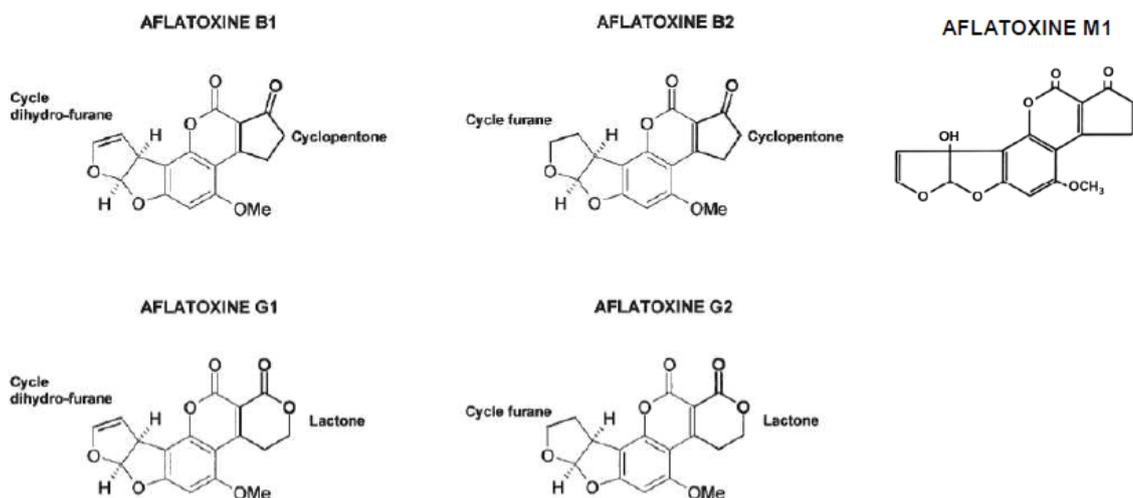


Figure 2. Structures chimiques des aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ et M₁. (AFSSA, 2009).

II.2.Toxicité des aflatoxines

La découverte des aflatoxines a suscité un grand intérêt de la part des scientifiques à l'égard de la toxicité de ces substances. La toxicité des aflatoxines et en particulier de l'aflatoxine B₁ dépend de la concentration et de la durée d'exposition mais aussi d'autres paramètres tels que l'âge, le sexe, l'espèce animale concernée, l'état physiologique de l'animal et sa tolérance, le statut nutritionnel, le mode d'administration et la composition de l'alimentation (El khoury, 2017).

II.2.1.Effets des Aflatoxines sur la santé animale

Chez l'animal, l'intoxication aiguë se traduit par un malaise, une perte d'appétit, un ictère, de l'ascite puis par la mort rapide de l'animal. Le foie présente un aspect décoloré, une hépatomégalie, des lésions nécrotiques ainsi que des foyers d'infiltration grasseuse. Des lésions rénales et une congestion des poumons sont aussi observables (Brochard et Le Bacle, 2009).

L'exposition chronique aux aflatoxines (AFs) est responsable de cancers chez diverses espèces animales. En effet, il a été démontré que les AFs sont hépatotoxiques, mutagènes, tératogènes ; immunosuppressives (Lereau et al., 2012), elles sont aussi responsables d'un dysfonctionnement de la reproduction et d'un retard de croissance (El khoury et al., 2019).

La forme chronique de l'intoxication demeure plus fréquente. Elle fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés pendant plusieurs semaines. En effet, Il a été démontré que l'AFB₁ provoque un carcinome hépatocellulaire chez de nombreuses espèces animales, les poissons et la volaille sont connus pour être extrêmement sensibles à cette toxine. En effet, des doses de 15 à 30 µg/kg d'AFB₁ provoqueraient des hépatocarcinomes chez ces espèces (Wogan, 1992). Une étude portant sur l'effet de l'AF chez la volaille a indiqué qu'une dose de 0.7 mg/kg d'AF provoquerait un retard de croissance chez les dindonneaux, par contre aucun effet n'a été signalé chez les poulets et les cailles (Arafa et al., 1981). Cette étude vient conforter l'hypothèse selon laquelle les dindons seraient plus sensibles aux effets toxiques des AFs que les poulets (Lozano et Diaz, 2006). La volaille est particulièrement exposée aux contaminations aux AFs du fait d'une consommation importante de céréales, mais aussi à son incapacité à dégrader les mycotoxines avant leur absorption digestive (Smith et al., 1976 ; AFSSA, 2009). Chez ces espèces, l'intoxication chronique se manifeste par une diminution des performances zootechniques (chute de ponte), des hémorragies, des défauts de pigmentation des carcasses ainsi que des lésions hépatiques (AFSSA, 2009). Une excrétion

d'AFB₁ dans les œufs est également possible lors d'administration de doses très élevées (AFSSA, 2009).

Concernant l'effet tératogène, celui-ci est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de développement, une microcéphalie, une anophthalmie, une fente palatine et une déformation des maxillaires (Vesely et al., 1983).

Chez les ruminants, les AFs sont responsables d'une diminution des quantités d'aliments ingérés et d'une baisse significative de la production de lait, la digestion ruminale et intestinale ainsi que le métabolisme sont également affectés. En conséquence la production animale sera affectée (AFSSA, 2009).

Il est généralement admis que les ruminants sont plus résistants aux effets des mycotoxines que les monogastriques. Ce phénomène peut être expliqué par la présence dans le rumen d'une population microbienne susceptible de dégrader ou de séquestrer certaines mycotoxines (Morgavi et Jouany, 2008). En effet, une des conditions nécessaires à cette détoxification est l'intégrité d'un écosystème microbien actif dans le rumen. Or, les ruminants à potentiel de production élevé reçoivent des régimes riches en concentrés, ce qui aura comme conséquence une acidification du contenu ruminal et une diminution du nombre de protozoaires (Brossard et al., 2004) impliqués dans la dégradation de certaines mycotoxines (Galtier et Alvinerie, 1976). L'ingestion d'aliments fermentescibles entraîne une diminution du temps de passage des aliments dans le rumen, il en résulte une diminution des capacités de détoxification du rumen (Boudra, 2009).

Bien que les ruminants soient globalement plus résistants aux mycotoxines que les monogastriques, il a été constaté qu'une consommation d'aliments contaminés par les AFs est responsable de troubles cliniques, d'une diminution de la fertilité, une prédisposition aux infections, des échecs de stratégies vaccinales et thérapeutiques (Fink-Gremmels et al., 2008b ; AFSSA, 2009).

II.2.2.Effets des aflatoxines sur la santé humaine

La propriété toxique majeure de l'AFB₁ est son pouvoir cancérigène. En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux (Autrup et al., 1991 ; Vainio et al., 1992).

Chez l'Homme, les cas d'aflatoxicoses aiguës sont rares de nos jours. L'apparition de cas de toxicité aiguë remonte à l'année 2004 au Kenya où une flambée d'aflatoxicose aiguë a été enregistrée. Au total 317 cas et 125 décès ont été attribués à l'ingestion de maïs contaminé

(Lewis et al., 2005 ; Probst et al., 2007). Une enquête menée au Kenya a révélé que 55% des échantillons de maïs présentaient des niveaux de contamination en AFs supérieurs aux LMR établi par la FDA (20 µg/kg), 7% des échantillons présentaient des teneurs supérieures à 1000 µg/kg. À l'heure actuelle, cette épidémie demeure une des formes les plus graves recensées dans le monde (Lewis et al., 2005 ; Probst et al., 2007). Les signes cliniques de cette intoxication aiguë se manifestent par des vomissements, douleurs abdominales, œdème pulmonaire, coma, convulsion et mort avec œdème cérébral et dégénérescence graisseuse du foie, une atteinte des reins, et du cœur (Strosnider et al., 2006) (**Figure.6**).

Il a été constaté que l'AF a un effet co-carcinogène avec le virus de l'hépatite B, en particulier dans les régions où l'infection par ce virus est endémique (Fung et Clark, 2004). Des individus qui sont séropositifs pour l'hépatite B (Ag HBs+) et qui sont exposés à des doses élevées d'AFB₁ sont 10 fois plus susceptibles de développer un carcinome hépatocellulaire que ceux habitant des régions à faible exposition aux AFs (Yeh et al., 1989).

Les cytochromes P450 sont des oxydases à fonction mixtes qui catalysent la biotransformation d'une grande variété de xénobiotiques. Pour exercer sa toxicité l'AFB₁ nécessite une métabolisation en AFB₁-8,9-époxyde par les cytochromes P450 (Rawal et al., 2010). L'AFB₁-8,9-époxyde va se lier de manière covalente à l'ADN, l'ARN et les protéines. Ce métabolite a une durée de vie très courte mais est particulièrement réactif, il peut induire des mutations *via* sa fixation à l'ADN. En effet, ce composé a une affinité particulière pour l'azote N7 de la guanine formant ainsi un adduit à l'ADN : le trans-8,9-dihydro-8 (7-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁. Cet adduit est alors considéré comme un bio-indicateur d'exposition et son dosage dans les urines constitue une méthode de détection d'une exposition récente à l'AFB₁ (Lin et al., 1977).

II.3.Toxicocinétique

Après ingestion les AFs sont absorbées par le tractus gastro-intestinal où elles vont subir soit une métabolisation ou une détoxification, grâce à un arsenal enzymatique, par la suite elles seront distribuées dans l'organisme et excrétées selon les mécanismes généraux communs à tous les xénobiotiques.

La distribution de l'AFB₁ s'effectue à partir du plasma sanguin vers les hépatocytes grâce à un processus de diffusion passive. Chez les ruminants, l'AFB₁ est détectée dans le sang 30 mn après son ingestion (Trucksess et al., 1983). Le passage de cette toxine s'effectue par la suite du rumen jusqu'au niveau intestinal (Blank et al., 2003).

Le métabolisme hépatique de l'AFB₁ se fait en deux étapes et donne lieu à huit métabolites : l'époxyde-AFB₁, l'AFM₁, l'AFB₂, l'AFQ₁, l'AFP₁, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H₁ et l'aflatoxicol M₁. La phase I correspond à l'étape des réactions d'oxydo-réduction, sous l'action du cytochrome P450 plus précisément le cytochrome P1A2. L'AFB₁ donne par hydroxylation l'AFM₁ et par époxydation l'AFB₁ 8,9-époxyde considéré comme le métabolite le plus toxique. La phase II concerne le devenir de l'AFB₁ 8,9-époxyde. Elle comporte la conjugaison de l'AFB₁ 8,9-époxyde par le biais de la glutathion-S-transférase aboutissant à la formation de glucurono-conjugués. Cette phase comporte aussi l'association de l'AFB₁ 8,9-époxyde aux acides nucléiques formant ainsi un métabolite le trans-8,9-dihydro-8 (7-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁ impliqué dans l'activité carcinogènes des AFs (AFSSA, 2009 ; voir Effets des aflatoxines sur la santé animale).

Cette conjugaison est généralement considérée comme une importante voie de détoxification à côté des autres mécanismes donnant naissance notamment à l'aflatoxicol et aux autres dérivés M1, P1, Q1 (Fink-Gremmels, 1998). Chez les ruminants l'AFB₁ est très peu dégradée par le microbiote du rumen (<10% de la dose ingérée), l'aflatoxicol un métabolite obtenu par réduction de l'AFB₁ peut être produit dans le rumen, ce métabolite est moins toxique que l'AFB₁ (Auerbach H. et al., 1998). La résistance des ruminants vis-à-vis de la toxicité de l'AFB₁ s'expliquerait par l'efficacité de ce système de détoxification hépatique (Guerre et al., 1996 ; Larsson et al., 1994) (**Figure 3 ; Figure 4 ; Figure 5**)

L'élimination des AFs de l'organisme se fait principalement par voie urinaire et fécale. L'excrétion urinaire peut représenter de 15 à 25 % de la dose ingérée d'AFB₁ chez les ruminants soit sous forme de dérivés conjugués ou sous forme inchangée (Pfohl-Leskowicz, 1999). L'élimination fécale se fait par excrétion biliaire des formes conjuguées d'AFB₁ (Guerre et al., 1996). La sécrétion biliaire représente 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales (Pfohl-Leskowicz, 1999). Ainsi les principaux métabolites retrouvés dans les fèces sont des aflatoxines conjuguées (Galtier, 1999).

Chez les ruminants laitiers l'AFB₁ absorbée par l'organisme est essentiellement excrétée dans le lait sous sa forme hydroxylée, l'AFM₁. L'élimination de l'AFM₁ par la glande mammaire des ruminants représente jusqu'à 0.1-2% de la dose ingérée chez la vache laitière (Fink-Gremmels, 2008). L'AFM₁ reste détectable dans le lait pendant 3 jours et la clairance est très rapide puisque les aflatoxines disparaissent du lait 4 jours après le retrait des aliments contaminés (Prandini et al, 2009).

Le passage de l'AFM₁ dans le lait constitue pour l'animal un moyen de se protéger contre les toxines. Chez les ruminants le niveau de transfert dans le lait dépend de plusieurs

facteurs physiologiques et métaboliques, comme la nature de la ration alimentaire, le niveau de contamination, l'état sanitaire et la capacité de détoxification de l'animal, ainsi que les niveaux de production (Fink-Gremmels, 2008a ; Duarte et al., 2013; Picinin et al., 2013). Des études de transfert conduites chez des vaches à haut rendement, consommant de grandes quantités d'aliments concentrés, ont démontré un niveau de transfert plus élevé comparativement aux animaux à faible production (proportionnellement 6.2 contre 0.5 %) (AFSSA, 2009).

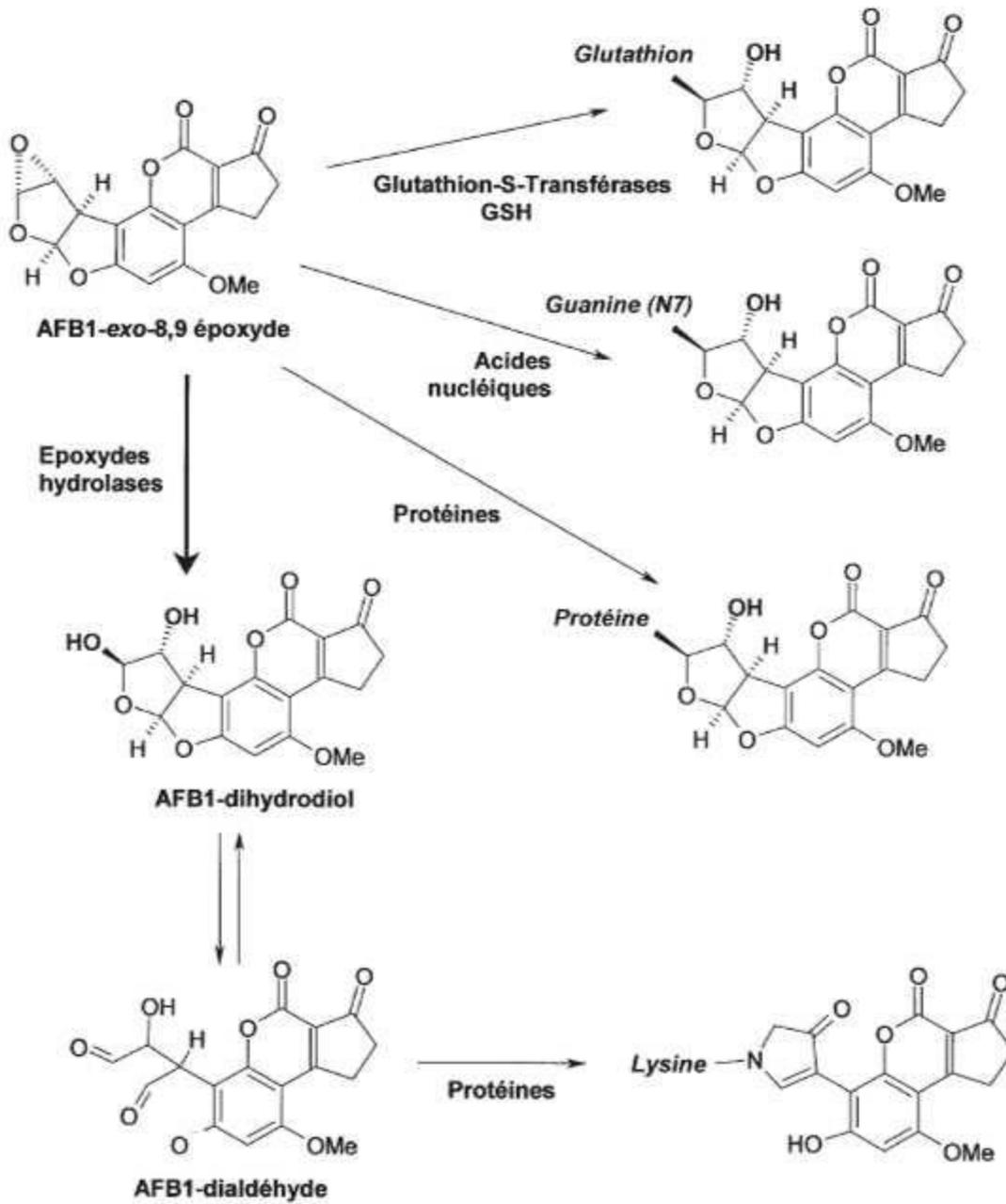


Figure 3. Bioconversion du 8,9-époxyde-AFB₁ (Guengerich et al., 1996).

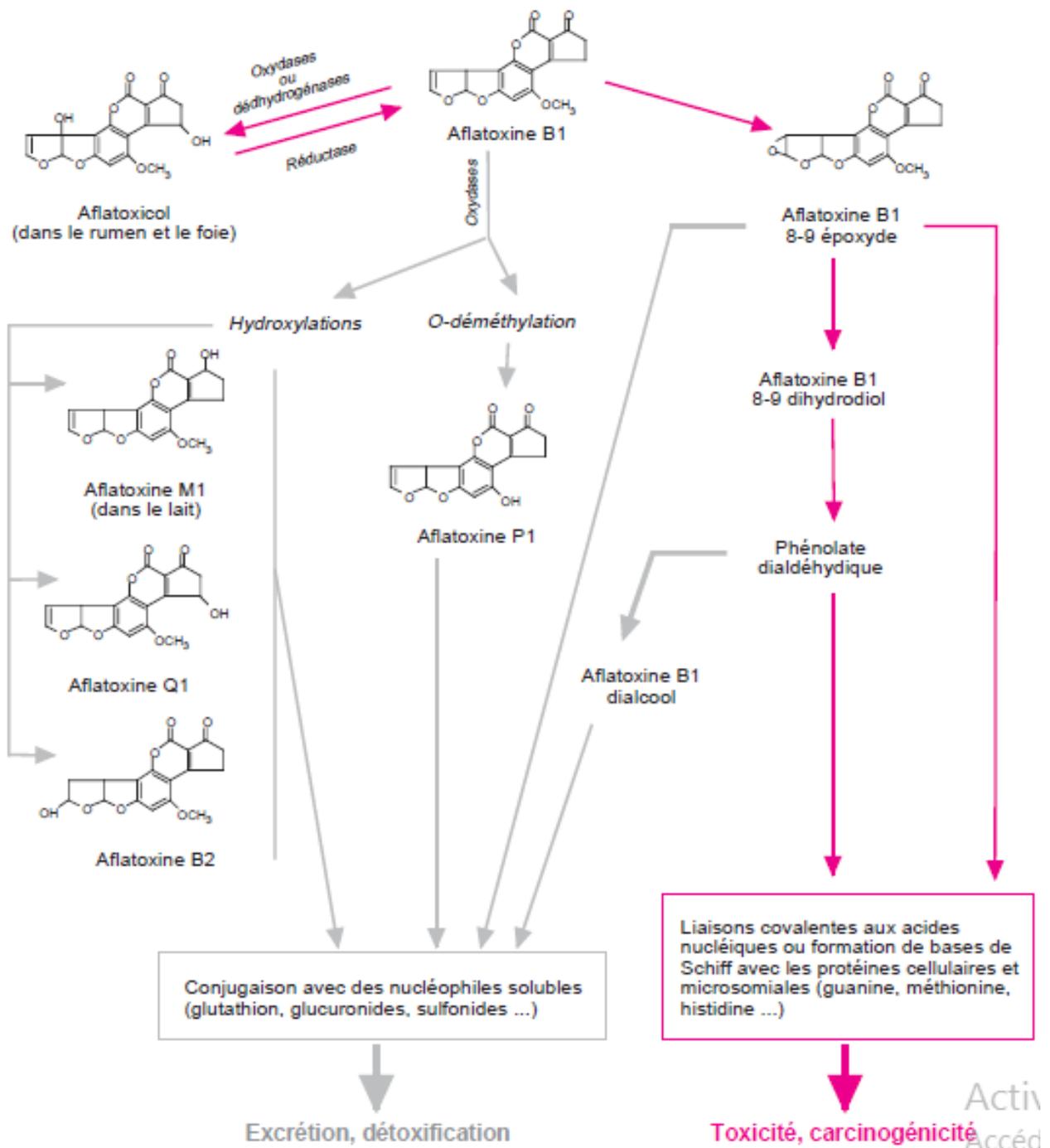


Figure 4. Métabolisme de l'aflatoxine B₁ dans le foie (Yiannikouri et Jouany, 2002).

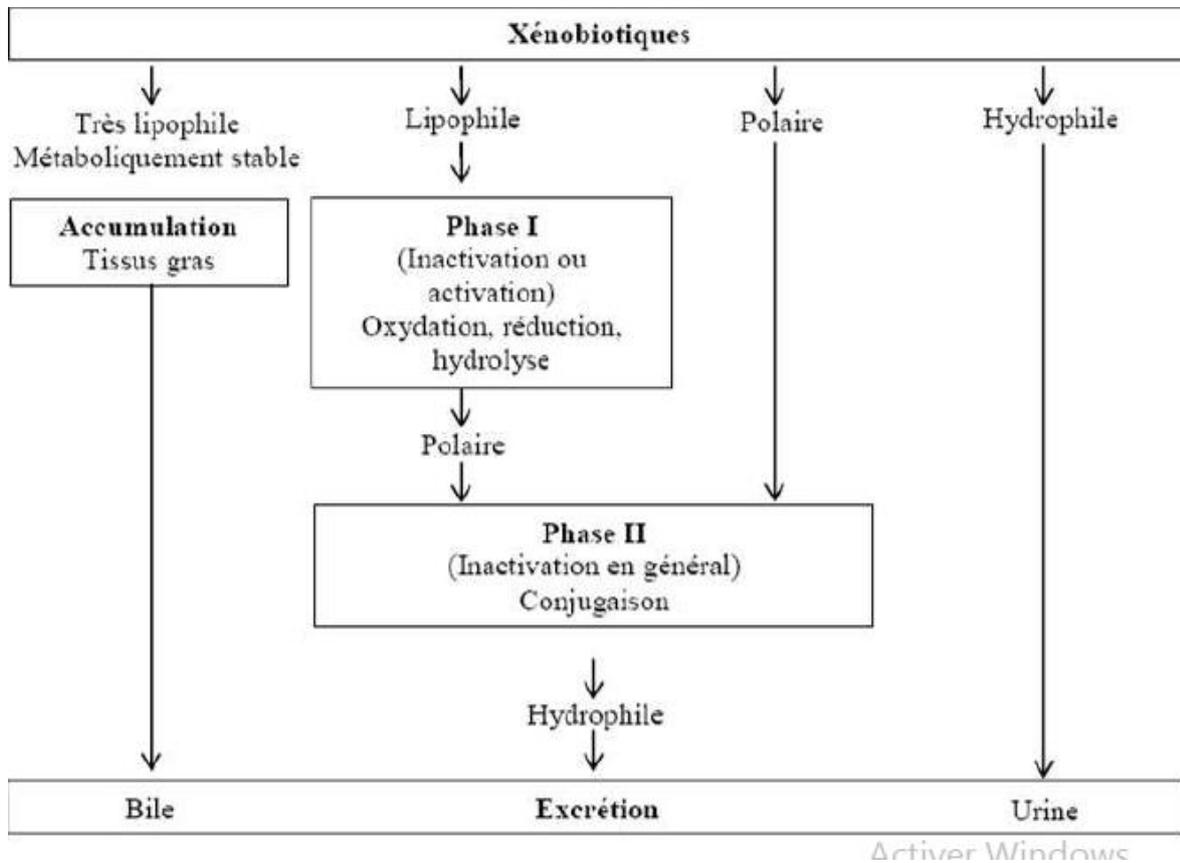


Figure 5. Toxicocinétique des xénobiotiques (Firmin, 2011).

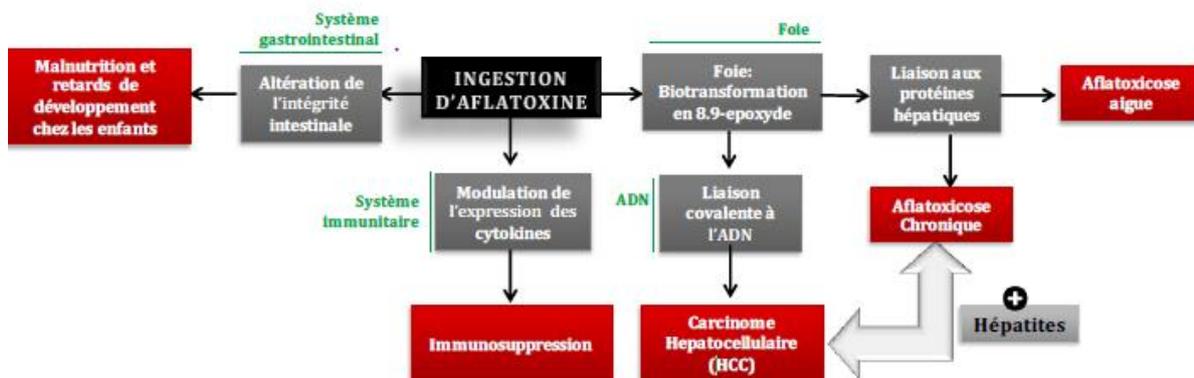


Figure 6. Différents niveaux physiologiques de la toxicité de l'AFB₁

Schéma adapté et modifié de USAID, 2012.

II.6.Méthodes de dosage des mycotoxines dans les aliments

La recherche des mycotoxines dans les aliments est une procédure assez complexe, car ces contaminants possèdent des structures chimiques différentes, et sont souvent retrouvés à des concentrations minimales dans une large variété d'aliments. Dans le cadre du contrôle réglementaire, le dosage des mycotoxines, exige l'utilisation de techniques aux performances analytiques reconnues. En effet, des méthodes suffisamment fiables, précises, sensibles et sélectives sont disponibles pour l'analyse qualitative et quantitative de ces métabolites secondaires. Cependant, aucune méthode analytique, aussi performante soit-elle, ne donne des résultats représentatifs du lot analysé sans une qualité satisfaisante de l'échantillonnage. L'échantillonnage est une étape cruciale dans le processus de recherche des mycotoxines, cette étape présente la plus grande source d'erreur puisque les toxines sont souvent réparties de manière inégale, et se trouvent à l'état de traces. En plus du respect des critères habituels de linéarité et de sensibilité, ces méthodes doivent présenter un degré de fiabilité élevé qui peut se mesurer par les paramètres fidélité (répétabilité et reproductibilité), et d'exactitude (mesurée par le taux de récupération). De même, il est important de vérifier l'adéquation entre le seuil de détection d'une méthode et les teneurs maximales tolérées qui sont définies par les textes réglementaires ou les recommandations de comités d'experts (Dragacci et Fremy, 1999).

Pour analyser les mycotoxines, habituellement présentes à l'état de traces dans les aliments, il existe toute une panoplie de méthodes, fondées essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules puis de leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Les méthodes physico-chimiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie gazeuse (GC), ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permettent toujours la quantification des molécules.

D'autres méthodes, de développement récent, utilisent le principe de l'immunoanalyse. Ainsi, les techniques immunochimiques de type ELISA autorisent, suivant leur configuration, soit une détection qualitative, soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine (Dragacci et Fremy, 1999). Les méthodes immunochimiques, telles que l'ELISA, sont définies comme étant un dépistage de routine qui pourrait être effectué avec des kits de tests disponibles dans le commerce. Les avantages de cette méthode sont une préparation minimale des échantillons et une procédure de mesure simple. Cependant, cette dernière présente des limites comme les réactions croisées avec des

composés similaires et une faible sensibilité par rapport aux méthodes chromatographiques (Murugesan et al., 2015 ; Streit et al., 2013b). Une étude comparative entre les techniques TLC, HPLC, LC-MS/MS et ELISA pour la détection des aflatoxines, a conclu que toutes ces méthodes analytiques fournissent des résultats précis, exacts et comparables aux seuils de concentrations testés (Iqbal et al., 2015).

Chapitre III : Contamination des aliments et moyens de prévention du risque mycotoxicologique

III.1. Contamination des céréales et des aliments de bétail

Les céréales représentent la source d'alimentation la plus importante dans le monde, soit par consommation humaine directe, soit indirectement par leur utilisation dans l'alimentation du bétail. Les mycotoxines sont présentes dans différentes denrées alimentaires tels que les aliments pour animaux, les céréales, les légumineuses et les denrées d'origine animale. La contamination des céréales par les mycotoxines est un problème mondial, en effet environ 25% de la production mondiale des céréales sont contaminés par des mycotoxines (CAST, 1989).

Toutes les cultures céréalières peuvent être contaminées par les aflatoxines. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'intensification des pratiques agricoles ainsi que la diminution de la diversité génétique des cultures céréalières contribuent probablement à l'augmentation des infestations par les champignons aflatoxinogènes avant la récolte. Alors que la contamination des cultures par les aflatoxines au niveau des champs se produit principalement dans les régions à climat tempéré et tropical (Amérique du Sud, Afrique, Asie). Cette infestation par les moisissures aflatoxinogènes est surtout rapportée sur les plantes soumises à un stress de croissance. Les facteurs de stress les plus courants sont la sécheresse, les dommages causés par les insectes et le moment de l'irrigation. La contamination post-récolte peut se produire partout dans le monde lorsque les conditions de croissance des champignons aflatoxigènes sont réunies au niveau des unités de stockage (Hendrickson et al ., 1999).

L'Algérie est un pays méditerranéen dont les conditions climatiques sont caractérisées par une humidité et une température élevées, ainsi que des pratiques de stockage inadéquates. Ceci contribue fortement à une exposition significative de la population algérienne aux aflatoxines. En plus de la production nationale, l'Algérie est un pays qui importe de grandes

quantités de céréales, leur éventuelle contamination par les mycotoxines est très peu connue (Riba et al., 2010).

Le **Tableau 2** et le **Tableau 3** récapitulent respectivement les résultats des publications de ces dernières années concernant l'occurrence et les taux de contamination par les mycotoxines dans des échantillons de céréales provenant des pays du Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie), ainsi que les niveaux de contamination par les aflatoxines dans l'alimentation animale et les matières en Europe, Asie et Afrique.

Les aflatoxines peuvent contaminer une grande variété de cultures agricoles, principalement le maïs, les arachides, les pistaches et les graines de coton. La contamination du maïs par les aflatoxines est un phénomène très préoccupant car cette culture joue un rôle majeur à la fois dans les filières alimentaires humaines et animales (CAST, 2003). En Algérie, le maïs importé constitue le principal ingrédient utilisé dans l'alimentation animale (USDA, 2018). Il semblerait que les longs itinéraires d'expédition nécessaires pour l'acheminement des céréales peuvent constituer un facteur de risque supplémentaire pour le développement des moisissures toxigènes, sachant que les contrôles au débarquement ne sont pas toujours effectués de manière rigoureuse (Tantaoui-Elaraki et al., 2018). De ce fait la contamination de l'alimentation animale par les aflatoxines semble être un risque majeur qu'il ne faut pas négliger, car cette toxine peut se retrouver dans l'alimentation humaine *via* son transfert dans le lait et les produits laitiers. Contrairement aux céréales destinées à l'alimentation animale, la contamination des fourrages et des ensilages par les mycotoxines a été très peu documentée. Ceci peut s'expliquer par l'absence de valeur marchande des fourrages, en effet, ces derniers sont produits et consommés à la ferme ce qui implique une insuffisance de leur contrôle, les fourrages peuvent également contenir plusieurs mycotoxines (Boudra, 2009). Il a été décrit que les aliments concentrés pour bétail contiennent des concentrations plus élevées en mycotoxines comparativement aux ensilages. Ainsi, une étude a rapporté un niveau de contamination par l'aflatoxine B₁ de 7 µg/kg dans les fourrages grossiers. Alors, que dans les aliments concentrés le niveau le plus élevé de contamination était d'environ 419 µg/kg (Gizachew et al., 2016).

La **Figure 7** schématise le cycle infectieux d'*A. flavus*, présent sous forme saprophyte dans le sol, et transporté par des insectes ou par le vent, pour atteindre les cultures de maïs et commencer le processus d'infestation.

En dépit des conditions climatiques et géographiques, l'affinité d'*A. flavus* aux différents substrats est due à leur composition particulière et au mode d'utilisation du carbone par cette espèce. Ainsi, dans les grains de maïs et de coton, *A. flavus* utilise d'abord les sucres libres, puis les lipides avant de commencer à dégrader l'amidon. Ainsi, une délipidation des graines de coton a permis de diminuer de 800 fois la production de l'aflatoxine B₁ dans ces grains (Klich, 2007). D'autres substrats sont aussi sensibles à une contamination par *A. flavus* et par les aflatoxines comme les cultures d'arachides. Les moisissures aflatoxinogènes peuvent croître dans les arachides stockées à une température supérieure à 25°C et une humidité dépassant 8%. Le stress hydrique peut diminuer la résistance naturelle des arachides aux infections causées par *A. flavus* (Wotton et Strange, 1987). Dans les arachides infestées par *A. flavus*, la phytoalexine produite par ces cultures augmenterait, ce qui a comme effet d'inhiber la croissance *A. flavus* tandis que les niveaux d'aflatoxines produits continuent d'augmenter (Hesseltine, 1976).

III.2. Contamination du lait et produits laitiers par les aflatoxines

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 sous étroite surveillance et encadrée par une réglementation stricte vis-à-vis des aflatoxines. Des enquêtes sont réalisées régulièrement et montrent que la fréquence de la contamination des laits peut varier géographiquement (exploitations, pays) et temporellement (saison, année). Les taux d'AFM₁ mesurés en Europe sont généralement conformes à la teneur réglementaire maximale de 50 ng/L (Boudra et al., 2007 ; Prandini et al., 2009). Depuis quelques années, une contamination fréquente et importante du lait produit en Serbie par l'AFM₁ semble aussi montrer une contamination des céréales produites dans cette région (Kos et al., 2014 ; Miocinovic et al., 2016). Des taux d'AFM₁ supérieurs aux taux réglementaires sont parfois retrouvés dans le lait brut provenant certains pays d'Europe du sud, comme l'Italie (RASFF, 2003).

Le **Tableau 4** présente une synthèse bibliographique concernant les niveaux de contamination de l'AFM₁ dans le lait en Afrique, Europe et en Asie.

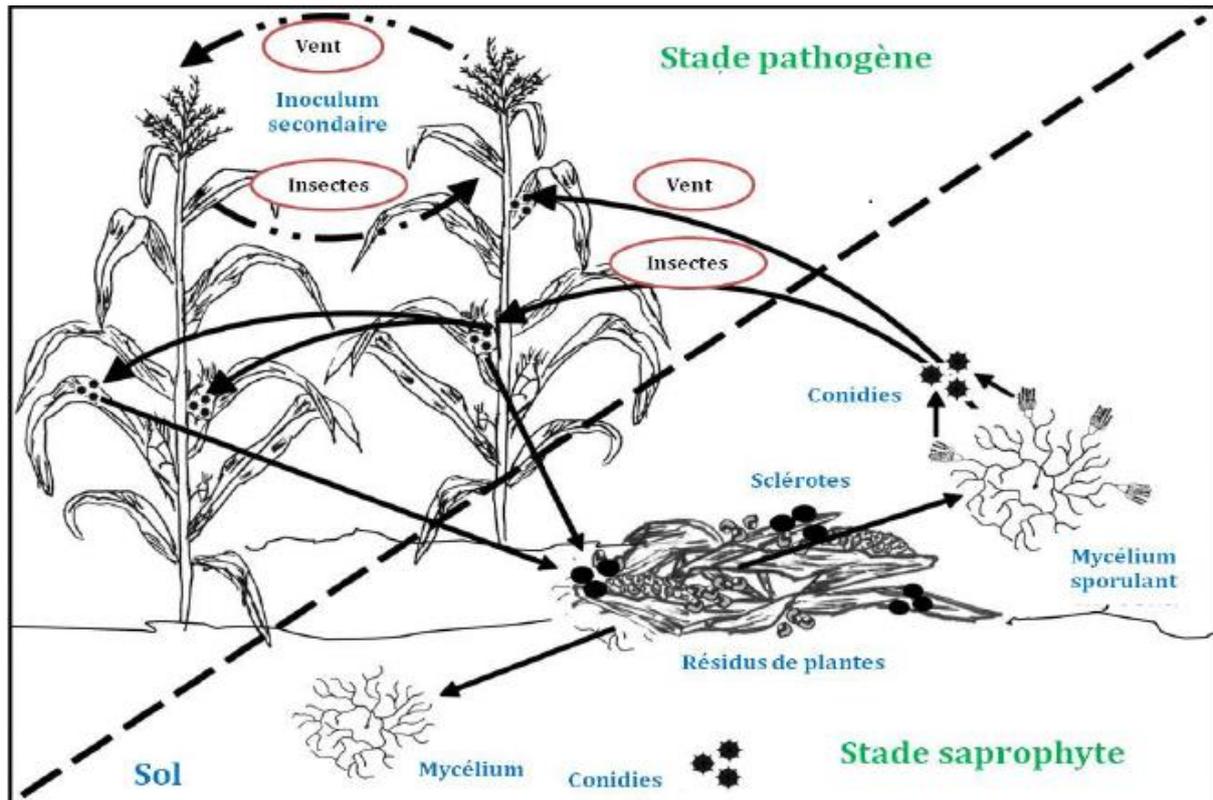


Figure 7. Cycle d'infestation d'*A. flavus*, saprophyte du sol, sur des cultures de maïs

Schéma adapté et modifié d'Abbas et al., 2009.

Tableau 2. Occurrence des mycotoxines dans les céréales et les produits dérivés des céréales en Algérie, Maroc et Tunisie (Tantaoui-Elaraki et al., 2018).

Pays	Mycotoxines	Denrée	Nb d'échantillons total (%) positifs)	Niveaux de contamination ($\mu\text{g/kg}$)	Moyenne ($\mu\text{g/kg}$)	Références
Maroc	AFB ₁	maïs	50 (2%)	18-18	18	Tantaoui-Elaraki et al., 1994.
		blé	20 (40%)	sup à 1.73	0.42	Zinedine et al., 2006.
	OTA	blé	17 (12%)	sup à 30.6	NR	Hajjaji et al., 2006.
		orge	75 (4%)	1.13-2.83	NR	Tantaoui-Elaraki et al., 1994.
		orge	20 (55%)	sup à 0.80	0.17	Zinedine et al., 2006.
	FB ₁	maïs	20 (40%)	sup à 7.22	1.08	Zinedine et al., 2006.
		riz	100 (26%)	0.08-47	3.5	Juan et al., 2008.
		pain	100 (48)	0.11-149	13	Zinedine et al., 2007.
		maïs, couscous, semoule	6 (83.3%)	253.3-847.9	464.7	Zinedine et al., 2017.
	ZEA	maïs	20 (15%)	sup à 17	14	Zinedine et al., 2006.
		pâtes	106 (51%)	0.5-3	NR	Bouafifsa et al., 2016.
		blé, couscous	84 (34.5%)	22.0-132.1	33.4	Zinedine et al., 2017.
	DON	orge, couscous	8 (25%)	7.6-543.3	68.9	Zinedine et al., 2017.
		pâtes	106 (40.5%)	16-900	NR	Bouafifsa et al. (2016)
blé		17 (41%)	sup 128	NR	Hajjaji et al., 2006.	
blé, couscous		84 (16.6%)	20.6-106.6	14.9	Zinedine et al., 2017.	
Algérie	AFB ₁	blé	25 (48%)	sup à 273,000	163,000	Zinedine et al., 2011.
		grain de blé stocké	17 (64.70%)	0.13-37.42	7.40±2.41	Riba et al., 2010.

		en silos				
		grain de blé avant la récolte	27 (60.71%)	0.21-13.96	3.86±1.12	Riba et al.,2010.
		semoule	12 (12%)	1.18	1.18	Riba et al., 2010.
		son	12 (12%)	3.37	3.37	Riba et al., 2010.
	OTA	grain de blé stocké en silos	17 (41.17%)	0.21-3.91	1.44±0.54	Riba et al., 2008.
		grain de blé avant récolte	5 (60%)	0.45-1.65	0.88±0.35	Riba et al., 2008.
		farine	8 (12.5%)	41.55	41.55	Riba et al., 2008.
		grain de blé local	39 (69.2%)	0.21-27.31	7.09±4.22	Riba et al., 2016.
		Semoule et sous-produits	29 (75.9%)	0.16-34.75	6.95±5.73	Riba et al., 2016.
		Farine et sous-produits	13 (100%)	0.36-18.18	6.77±5.52	Riba et al., 2016.
Tunisie	AFB ₁	blé et dérivés	51 (7.8%)	1.1-3.4	2.2±1.0	Ghali et al., 2008.
	AFT	blé et dérivés	51 (29.4%)	4.0-12.9	6.7±2.4	Ghali et al., 2008.
	OTA	blé et dérivés	51 (60.7%)	0.7-24.3	2.9±4.3	Ghali et al., 2008.
		blé et dérivés	46 (45.6%)	0.11-17.7	1.2±0	Ghali et al., 2009.
		blé	110 (38%)	11-250	55	Zaied et al., 2009.

Tableau 3 .Occurrence des aflatoxines dans l'alimentation animale, en Afrique, Asie et en Europe.

Pays	Denrée	Nb d'échantillons AFB+/ total	% d'échantillons ≥ normes EU	Moyenne de contamination (µg/kg)	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Tanzanie	tourteaux de tournesol	13/20 (65%)	61.53	NR	0.35-20.47	Mohammed et al., 2016.
Tunisie	aliments concentrés	49/58 (84.48%)	53.44	18.7	NR	Abbès et al., 2012.
Égypte	aliments concentrés	8/17 (47%)	NR	1.5	0.1–5.9	Abdallah et al., 2019.
	maïs	15/61 (25%)	NR	8.7	0.2–44.9	Abdallah et al., 2019.
Pakistan	aliments concentrés	NR	NR	43	NR	Akbar et al., 2019.
Pakistan	tourteaux de coton	88/110 (80%)	NR	41	NR	Shar et al., 2019.
Iran	aliments concentrés	40/40 (100%)	NR	26.4	NR	Eskandari et Pakfetrat, 2014.
Chine	maïs	78.3%	NR	44.5	NR	Liu et al., 2016.
		62.5%	NR	65.7	NR	
		60.0%	NR	28.4	NR	

Italie	aliments concentrés et matières premières destinées à l'alimentation animale	65.87%	0.76	NR	NR	Vita et al., 2016.
Serbie	maïs	137/200 (68.5%)	NR	36.3	NR	Kos et al., 2013.
Serbie	maïs	34.67%	32.24	NR	1.0-111.2	Kos et al., 2018.
Croatie	maïs	305 (972) (31.4%)	21.7%	NR	1-2072	Pleadin et al., 2015.
	maïs	103/ 180 (57.2%)	32.2%	NR	1.3- 91.4	Janić Hajnal et al. (2017)

NR : Non Rapporté.

Tableau 4. Occurrence d'AFM₁ dans le lait et les produits laitiers en Afrique, en Asie et Europe.

Pays	Denrée	Nb d'échantillons AFM₁+ / total	Echantillons dépassant les normes E.U > 50 ng/L	Niveaux de contamination ng/L	Moyenne de contamination ng/L	Références
Maroc	lait pasteurisé	48/54 (88.8%)	NR	0.001-117	18	Zinedine et al., 2007.
	lait en poudre	14/40 (35%)	0	NR	14.76±10.21	Alahlah et al., 2020.
	lait pasteurisé	7/46(15.2%)	1 (2.17%)	10-77	5.18±15.4	Mannani et al., 2021.
	lait UHT	2/21 (9.5%)	0	13-48	2.9±10.6	Mannani et al., 2021.
Tunisie	lait cru	60.7%	4.4%	NR	3620	Abbès et al., 2012
	lait cru	20/20 (70%)	14 (70%)	20-190	NR	Abdallah et al., 2019.
Egypte	lait UTH	0/15 (0%)	/	/	/	Zakaria et al., 2019.
	lait cru	37/75 (49%)	NR	53-207	100,3	Zakaria et al., 2019.
	lait cru, lait pasteurisé et lait en poudre	5/47 (11%)	1 (2.12%)	9-103	NR	Redouane-Salah et al.,2015.
Algérie	lait cru, lait pasteurisé et lait en poudre	5/47 (11%)	1 (2.12%)	9-103	NR	Redouane-Salah et al.,2015.
	lait de chamelle	5/32 (15.6%)	5(15.6%)	5-100	NR	Yousof et al., 2020.
Soudan	lait de vache	28/34 (82.4%)	28 (82.4%)	5-150	NR	Yousof et al., 2020.

Iran	lait cru provenant d'élevages intensifs	46/192 (23.9%)	1 (0.52%)	12-62	7±0.001	Fallah et al ., 2016.
	lait cru provenant d'élevages traditionnels	99/120 (82.5%)	47 (39.2%)	13-198	46±0.003	Fallah et al ., 2016.
	lait de brebis	45/208 (21.6%)	24 (11.5%)	11-109	11±0.002	Fallah et al ., 2016.
	lait de chèvre	33/164 (20.1%)	15 (9.15%)	11-126	9±0.001	Fallah et al ., 2016.
	lait de chamelle	5/124 (4.03%)	0	13-19	0.7±0.0003	Fallah et al ., 2016.
Turquie	lait de bufflonne	27% (n=126)	0	8-32	NR	Kara et al., 2014.
	Italie lait cru	51/416 (12.3%)	1 (0.24%)	NR	37	De Roma et al., 2017.
	lait de bufflonne	28/388 (7.2%)	0	4-31	NR	De Roma et al., 2017.
Serbie	lait cru	540/678 (79.7%)	56.3%	NR	282 ±0.358	Tomašević et al., 2015.
	lait pasteurisé	264/438 (72.3%)	32.6%	NR	90± 0.145	Tomašević et al., 2015.
Croatie	lait cru	2.7 (n= 1618)	18 (0.7%)	0.93-89.4	65.2±2.94	Bilandžić et al., 2017.
	lait chèvre	0/227 (0%)	0	0	0	Bilandžić et al., 2017.
	lait de brebis	0/120	0	0	0	Bilandžić et al., 2017.

NR : Non Rapporté.

III.3.Méthodes de prévention du risque aflatoxique

Les aflatoxines étant essentiellement produites durant la conservation des céréales, l'éleveur peut mettre en place des mesures préventives pour abaisser les teneurs des mycotoxines dans les denrées qu'il produit et stocke à la ferme.

III.3.1.Les bonnes pratiques agricoles

III.3.1.1. Mesures de prévention durant le stockage

La phase de toxicogénèse étant toujours précédée par la phase de croissance de la moisissure, la prévention consiste principalement à limiter l'apport de l'inoculum d'*Aspergillus* ainsi qu'éviter le développement des moisissures en appliquant des mesures ciblées sur les stades sensibles de la récolte et de la conservation des productions végétales.

Les conditions de stockage constituent des facteurs primordiaux pour limiter l'expansion du développement fongique et éviter la production de toxines pendant cette période, qui peut être prolongée. Ainsi les conditions physicochimiques telles que l'humidité, la température régnant au cours du stockage affecte la croissance et l'activité fongiques. L'accumulation des grains dans le silo immobilise de grands volumes d'air, ce qui représente un bon isolant thermique. La température au centre du silo reste proche de celle de la récolte, alors que les grains en contact avec les parois se refroidissent lorsque la température externe diminue. Par conséquent, des taches d'humidité se produisent dans le silo favorisant la prolifération des champignons. Des capteurs de températures distribués à différentes hauteurs dans le silo détectent tout changement de température et par la suite toute activité microbienne. Ainsi, des opérations de refroidissement couplées à des systèmes de ventilation doivent être installées dans le silo pour éviter toute aggravation de l'activité fongique. En outre, la rotation des grains de temps à l'autre peut diminuer la présence des taches d'humidité à l'intérieur du silo (Jouany, 2007).

La durée de stockage dans les silos devrait être la plus courte possible. Ainsi des études ont signalé que les taux d'aflatoxines peuvent être multipliés par 10 sur une période de 3 jours dans des conditions d'humidité favorables pendant le stockage (Hell et al., 2008)

III.3.1.2. L'usage des pesticides

L'efficacité évidente de certains pesticides pour contrôler le développement de différents pathogènes agricoles et augmenter ainsi la productivité a entraîné un usage massif de ces composés depuis les années 1950. Il apparaît désormais que cette stratégie atteint ses limites pour plusieurs raisons : contamination de l'environnement et effets néfastes sur la biodiversité animale et végétale ; perte d'efficacité par apparition de résistances chez les organismes cibles et enfin, toxicité propre de ces composés chez les mammifères lors d'exposition prolongée.

III.3.1.2.1. Les fongicides

Les fongicides ont été considérés pendant des années comme essentiels pour maintenir des cultures saines avec une bonne productivité (Brent et Hollomon, 2007). Il existe 6 catégories majeures de fongicides : (i) les dithiocarbamates, (ii) les organochlorés, (iii) les dicarboximides, (iv) les benzonitriles, (v) les carbamates et (vi) les inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol. Ces composés diffèrent par leurs structures chimiques et donc par leurs modes, sites et spectres d'action sur le pathogène, définissant ainsi les modalités de leurs usages.

Il a été également démontré que certains produits peuvent agir directement sur la voie de biosynthèse des aflatoxines et bloquer l'activité des enzymes intervenant dans la cascade enzymatique de cette voie. Néanmoins, ces effets restent peu documentés et souvent contradictoires. Ainsi, si certains pesticides sont capables de bloquer la production d'AFB₁ et d'AFG₁ chez *A. parasiticus*, ils pourraient inversement entraîner l'accumulation d'AFB₁ et d'AFG₁. Un dicarboximide, l'iprodione, agissant sur les oxydases et bloquant ainsi la transformation de la versicolorine, un intermédiaire dans la voie de biosynthèse d'aflatoxines, a pu bloquer la totalité de la voie de biosynthèse dans deux souches mutantes d'*A. parasiticus* (Hasan, 1999). Toutefois, des études ont montré que l'efficacité des fongicides est contradictoire et, dans plusieurs cas, les effets sont inattendus. Le Chlobenthiazole, un benzonitrile, se montre efficace pour bloquer leur production *in vitro* chez *A. flavus*. Cependant, l'effet opposé a été observé chez *A. parasiticus* où la synthèse d'aflatoxines a été stimulée (Wheeler et al., 1991). Des essais en laboratoire ont également montré qu'*A. parasiticus* produisait plus d'aflatoxines suite à des traitements par les fongicides miconazole et fenpropimorphe (D'Mello et al., 1998).

Cependant, une limite croissante à l'usage des fongicides est leur toxicité propre, surtout quand leur usage est inapproprié ou dépasse les normes recommandées. Ainsi une substance chimique modérément inoffensive à de faibles doses pourrait facilement devenir toxique et oncogène à de plus fortes doses (Blair, 1989). La toxicité aiguë des fongicides vis-à-vis des êtres humains est faible. Les effets les plus communs aux fongicides utilisés dans les procédés agricoles sont des dermatites allergiques et des irritations de la peau et des muqueuses (Schneider et Dickert, 1994). Cependant, une exposition prolongée pourrait avoir des conséquences néfastes plus graves et notamment des effets carcinogènes et/ou mutagènes. De plus, de nombreux résidus de fongicides différents peuvent être détectés dans le sérum, l'urine et le tissu adipeux des humains (Blair, 1989). Puisqu'il n'est pas possible de conduire des recherches de toxicité sur les humains, le potentiel toxique des fongicides a été extrapolé de tests effectués sur des modèles animaux (Schneider et Dickert, 1994).

III.3.1.2.2. Les insecticides

L'infestation des grains par les insectes propageant les spores de champignons toxigènes appartenant aux espèces *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* et *Aspergillus*, est fréquente (Khan et al., 2016 ; Lamboni et Hell, 2009). En empêchant les attaques d'insectes sur les cultures et ensuite au stockage, les insecticides peuvent réduire l'occurrence des spores des espèces aflatoxinogènes et par la suite la production des aflatoxines.

Plusieurs insecticides (Spinosad, Thiamethoxam, Imidacloprid, Indoxacarb) ont été utilisés pour protéger les cultures des insectes et la corrélation avec les taux d'aflatoxines produits a été évaluée. Dans les différentes combinaisons de traitements testées, la production d'aflatoxines a été directement corrélée aux taux de survie des insectes. Les insecticides Spinosad et Indoxacarb ont un effet indirect sur la contamination par l'aflatoxine B₁ en induisant la mortalité des insectes *Rhyzopertha dominica* (Khan et al., 2016 ; Vayias et al., 2010). À l'exception de Thiamethoxam, ces insecticides sont inefficaces pour contrôler *Sitophilus oryzae*, un vecteur fréquent des spores d'*A. flavus* (Sinha et Sinha, 1991). De plus, l'étude de Vayias et al., 2010, a montré que l'efficacité de Spinosad est moins importante sur le maïs que sur les autres productions testées (blé et orge). Ces études montrent les limites du spectre d'action de Spinosad. Son efficacité à long terme, est remise en question puisque ses effets diminuent avec la durée de stockage. Il semble donc nécessaire de considérer des combinaisons d'insecticides, surtout si plusieurs espèces d'insectes peuvent coexister dans une région, afin de pouvoir améliorer la protection des cultures. Cependant il se pose alors la

question de la toxicité combinée des différents composés utilisés. Il est, de même, essentiel de noter que la persistance de l'effet insecticide.

La toxicité des insecticides, comme celle des pesticides en général, est une problématique majeure à l'heure actuelle. Ces composés peuvent induire un stress oxydatif au niveau cellulaire. Ce dernier se définit par un déséquilibre entre les radicaux libres et les défenses anti-oxydantes de l'organisme, ce qui entraîne la peroxydation des lipides membranaires. Ceci peut entraîner, chez l'homme ou les mammifères, des lésions dans de nombreux tissus (nerveux, hépatique et rénal) (Abdollahi et al., 2004 ; Hasan, 1999).

La prise de conscience des possibles effets toxiques, du coût, et du risque environnemental représenté par l'usage intensif des pesticides, a justifié certaines mesures et limitations à l'usage de ces composés en Europe au profit des cultures plus biologiques et durables (The Council of the European Communities, 1991). Il semble donc important de trouver des alternatives à l'usage exclusif des pesticides pour contrôler la croissance fongique et la contamination mycotoxinique et ainsi garantir la sécurité des aliments tout en développant des pratiques agricoles durables et plus respectueuses de l'environnement.

III.3.2. Traitements physico-chimiques

Contrairement aux moisissures, les mycotoxines sont des molécules très résistantes à différents traitements (chaleur, pression, traitements chimiques, etc.) et elles ne peuvent pas être éliminées par une simple cuisson. La dénaturation de l'AFB₁, la plus résistante des aflatoxines, est atteinte à partir de 267°C et des températures supérieures à 150°C sont nécessaires pour atteindre une dénaturation partielle (Rustom, 1997). Toutefois, certains procédés physico-chimiques ont été testés pour réduire les taux de mycotoxines dans les aliments. Ces derniers incluent : le broyage, le brassage, la torréfaction, la nixtamalisation (procédé utilisé pour la fabrication des tortillas où les grains de maïs sont trempés et cuits dans une solution alcaline), l'extrusion, l'irradiation (lumière pulsée, UV, rayons γ , dégradation solaire), l'ozonation, etc. (Bullerman et Bianchini, 2007 ; Chen et al., 2014 ; Riley et Norred, 1999 ; Wang et al., 2016).

Les traitements chimiques visant la détoxification de l'AFB₁ présente dans les denrées alimentaires sont surtout appliqués pour les produits à destination de l'alimentation animale. Ces traitements consistent, par exemple, en l'ajout d'ammonium, de bisulfite de sodium, d'hydroxyde de calcium, de formaldéhyde ou d'hypochlorite de sodium, de permanganate de

potassium, de peroxyde d'hydrogène ou de borate de sodium.),ils peuvent agir en se liant à l'AFB1 et en altérant ainsi sa métabolisation et en limitant secondairement l'apparition d'adduits à l'ADN ou bien, au contraire, en favorisant la métabolisation de l'AFB₁ en des produits supposés moins toxiques. Pourtant la stabilité des métabolites formés n'est pas garantie, surtout aux pH acides rencontrés dans l'estomac des animaux monogastriques (Piva et al., 1995). Cependant ces méthodes sont en général corrosives et nécessitent des installations particulières et coûteuses (Piva et al., 1995 ; Rustom, 1997).

Bien que ces procédés de transformation soient capables, dans certaines conditions, de réduire les taux d'aflatoxines contaminant les aliments (Mendez-Albores et al., 2004), leur efficacité reste insuffisante pour garantir une protection efficace des consommateurs et ne peuvent être utilisés comme moyen unique de protection. On peut donc conclure que l'élimination «dénaturation» des aflatoxines dans la matrice alimentaire est très difficile à concilier avec la conservation de la qualité structurale et/ou organoleptique des aliments. Cette stratégie se heurte aussi au problème du coût lié à l'industrialisation de tels procédés, ce qui en limite l'utilisation.

III.3.3. L'utilisation des adsorbants

Un agent adsorbant est une substance qui est capable de séquestrer les mycotoxines dans le tube gastro de l'animal et de réduire leurs effets sur la santé de l'animal en facilitant leur élimination dans les fèces. Les agents adsorbants forment une famille hétérogène de composés d'origine minérale, microbienne, végétale, classés selon leur composition chimique en deux groupes : les adsorbants inorganiques et les adsorbants organiques (Firmin, 2011).

La Commission Européenne (EC), dans son règlement No 386/2009 du 12 mai 2009, a défini ces adsorbants comme un nouveau groupe fonctionnel d'additifs pour l'alimentation animale (European Commission, 2009).Il s'agit de substances ayant une grande affinité pour les aflatoxines et capables de diminuer leur disponibilité dans l'organisme. Les adsorbants sont en général des composés de poids moléculaire élevé et qui, dans l'intestin des animaux, sont capables de se lier aux aflatoxines empêchant donc leur absorption et entraînant leur excrétion fécale (Di Gregorio et al., 2014).

III.3.3.1. Les adsorbants inorganiques

Les adsorbants non organiques regroupent principalement les charbons actifs, les aluminosilicates (zéolites, bentonites, montmorillonites, aluminosilicates de sodium et de calcium (HSCAS)).

L'efficacité du mécanisme d'adsorption dépend largement des propriétés physiques et de la structure de l'agent adsorbant ainsi que de la molécule adsorbée (taille, solubilité, polarité, taille des pores pour l'adsorbant, surface accessible et le cas échéant, la distribution des charges) (Huwig et al., 2001). Les études réalisées chez le ruminant sont focalisées sur l'AFB₁. Les argiles et charbons actifs sont pour la plupart efficaces pour séquestrer l'AFB₁ *in vitro* et réduisent *in vivo* l'excrétion d'AFM₁ dans le lait (Kabak et al., 2006).

Les zéolites sont moins efficaces avec une capacité de fixation de 80% de la quantité initiale de toxine. Ce potentiel d'adsorption se traduit *in vivo*, chez des volailles, par une réduction des taux d'aflatoxines dans le foie et des lésions hépatiques associées, une amélioration du gain de poids et de la productivité générale pour des concentrations initiales de toxines pouvant atteindre 500 µg/kg (Di Gregorio et al., 2014). Cependant à des concentrations élevées proches de celles induisant des aflatoxicoses (2,5 mg/kg), les dommages hépatiques restent perceptibles malgré la réduction de la quantité de toxine absorbée dans l'organisme (Neeff et al., 2013). Les aluminosilicates (HSCAS) sont les adsorbants les plus efficaces pour réduire la disponibilité des aflatoxines. Ils ont aussi une certaine efficacité vis-à-vis d'autres mycotoxines. Cependant, dans le cas des multi-contaminations, il sera probablement nécessaire d'utiliser plusieurs d'adsorbants, chacun pouvant être plus ou moins efficace en fonction de la nature des toxines cibles (Di Gregorio et al., 2014).

D'une manière générale, les adsorbants inorganiques sont inadaptés à la détoxification de l'alimentation animale car des différences sont souvent rapportées entre les résultats des évaluations *in vitro* et *in vivo*. Ce sont des adsorbants de mycotoxines non spécifiques capables d'adsorber également les nutriments dans le tube digestif (minéraux, vitamines, acides aminés, antibiotiques). Une utilisation intensive de ces produits, notamment dans le cadre d'un usage prophylactique, peut causer des carences (Huwig et al., 2001). Sans oublier le coût financier généré par leur usage chez l'éleveur, car certains de ces agents adsorbants sont coûteux et peuvent être difficilement intégrés dans le cahier des charges des éleveurs (Firmin, 2011).

III.3.3.2. Les adsorbants organiques

L'utilisation d'adsorbants organiques capables de lier les mycotoxines présente un avantage pratique, économique et écologique en comparaison aux adsorbants inorganiques. Ce sont des agents biodégradables dans l'environnement et qui fixent une gamme plus large de mycotoxines à des taux d'inclusion relativement bas (Diaz et Smith, 2005).

Les bactéries fermentaires capables de séquestrer les mycotoxines sont représentées par certaines souches de bifidobactéries et de bactéries lactiques. La séquestration de l'AFB₁ par ces bactéries a été principalement étudiée *in vitro* en solution tampon. Plusieurs travaux ont étudié l'efficacité d'adsorption de l'AFB₁ par ces bactéries. Ainsi, *Lactobacillus crispatus* M247 et *Lactobacillus rhamnosus* GG fixent entre 5 et 86% d'AFB₁ (Haskard et al., 2000). La polarité des toxines joue aussi un rôle important dans le mécanisme de séquestration. C'est ainsi que le taux d'aflatoxines fixées diminue dans un ordre décroissant de polarité AFB₁>AFG₁>AFB₂>AFG₂ (Haskard et al., 2000) et l'AFM₁ est éliminée avec moins d'efficacité que l'AFB₁ (Pierides et al., 2000).

Le mécanisme de séquestration des extraits pariétaux de *Saccharomyces cerevisiae* a précédemment été évalué, les auteurs ont montré notamment que les b-D-glucanes qui constituent la fraction interne de la paroi des levures, assurent l'essentiel de l'adsorption des mycotoxines (Yiannikouris et al., 2004). À la différence des agents inorganiques, les préparations de parois de levures n'affectent pas la biodisponibilité des nutriments (minéraux, vitamines et acides aminés) et sont classés « Generally Regarded As Safe » (GRAS) pour une utilisation comme additif (**Figure 8**).

Concernant l'effet de la paroi de levure sur la réduction des niveaux d'excrétion d'AFM₁ dans le lait de brebis, l'étude de Firmin ,2011, a signalé que l'ajout de la paroi de levure dans la ration alimentaire des brebis en lactation n'a eu aucun effet sur les niveaux de contamination du lait par l'AFM₁, ces résultats sont en accord avec des observations antérieures faites chez la vache laitière, confirmant l'inefficacité de cette préparation à réduire la contamination de la production laitière chez le ruminant (Stroud , 2006).

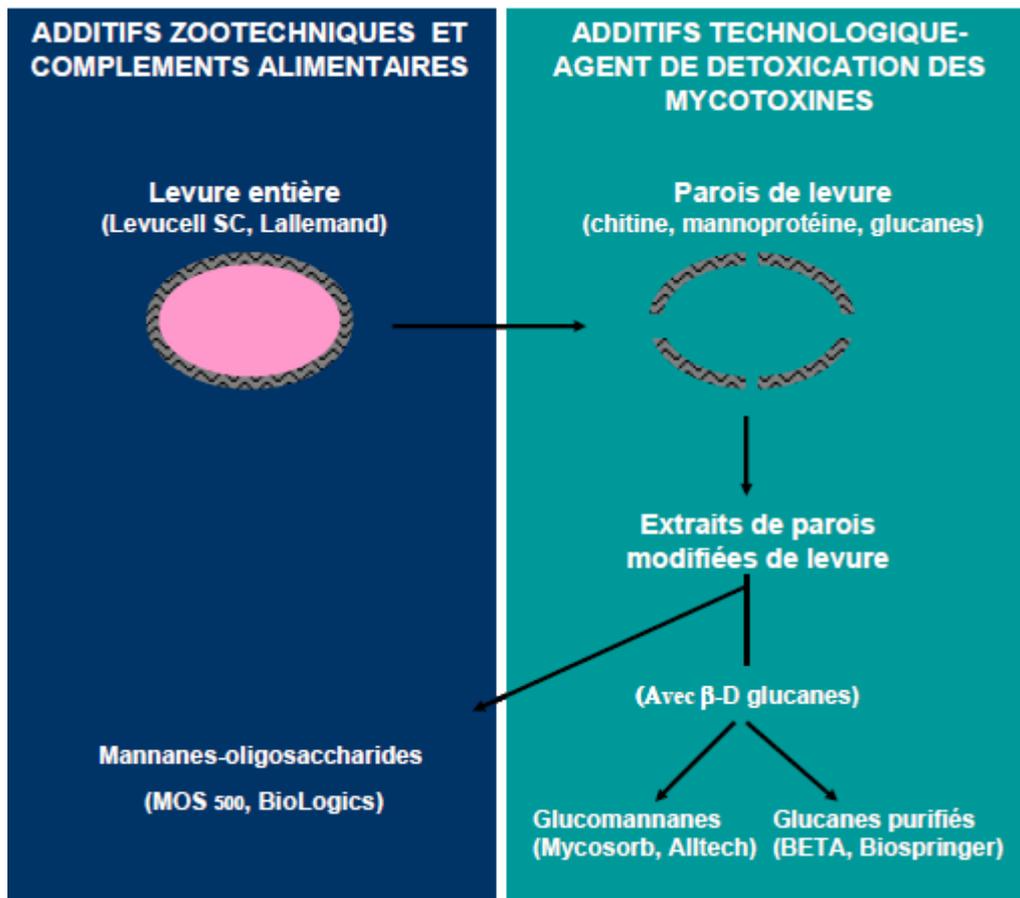


Figure 8. Exemples de préparations contenant des parois de levure et leur application en alimentation animale (Firmin, 2011).

III.3.3.4. Les stratégies de bio contrôle

Un agent de bio-contrôle est un antagoniste microbien qui permet la maîtrise de l'agent pathogène en : i) réduisant sa population et par conséquent son impact économique, ii) réduisant sa disponibilité vis-à-vis des organes/tissus cibles et iii) limitant l'incidence de la pathologie (Waliyar et al., 2013). Plusieurs agents antagonistes microbiens et fongiques ont été évalués pour leur effet antagoniste vis-à-vis d'*A. flavus*.

III.3.3.4.1. Bio-contrôle par des souches fongiques non toxiques

Des stratégies de bio-contrôle basées sur l'inoculation du sol par des souches non toxigènes d'*A. flavus* ou d'*A. parasiticus* ont été développées. Ces souches entrent en compétition avec les souches toxigènes. Ainsi, en se développant, elles limitent l'infection et le développement des souches toxigènes (Torres et al., 2014). De plus, leur effet pourrait être maintenu durant le stockage (Dorner et Cole, 2002). Plusieurs souches atoxigènes ont été approuvées aux Etats-Unis par l'Agence de Protection Environnementale (EPA) et sont désormais commercialisées comme biopesticides appliqués aux cultures d'arachides, de maïs et de graines de coton (Dorner, 2009).

Ces souches atoxigènes ont été isolées de sols aux Etats-Unis et possèdent des mutations qui les empêchent de produire l'aflatoxine et parfois d'autres métabolites tel l'acide cyclopiazonique (ACP) (également toxique) (Chang et al., 2012). Leur capacité à synthétiser de l'ACP et à produire des sclérotés permet de les classer dans des groupes de compatibilité végétative (VCG) selon le type de mutation qu'elles présentent (Chang et al., 2005). Ainsi, la souche ATCC 96045 ou AF36®, la première à avoir été approuvée par l'EPA, a été isolée à partir de cultures de graines de coton en Arizona (Cotty, 1990).

Cependant AF36 produit toujours de l'ACP, composé produit dans les mêmes conditions environnementales que l'AFB1. Ainsi il en résulte une accumulation de cette molécule lorsque des cultures de maïs sont inoculées avec cette souche (Abbas et al., 2011). La souche NRRL21882, composant actif du biopesticide Afla-Guard®, a, elle, été isolée d'arachides dans l'état de Georgie aux Etats-Unis. Cette souche est dépourvue de la totalité des clusters des aflatoxines et de l'ACP. Elle est utilisée comme agent de biocontrôle surtout dans les cultures d'arachides (Chang et al., 2005). Son utilisation a pu réduire les populations aflatoxinogènes de 71% dans le sol de ces cultures avant traitement à 4% après application.

Cela s'est accompagné d'une réduction du taux d'aflatoxines dans les arachides de 85 à 98% dans les produits égrenés destinés à la consommation (Dorner et Lamb, 2006 ; Dorner, 2009).

Cette approche d'exclusion par compétition a également démontré son efficacité pour réduire la contamination par les aflatoxines au champ en Afrique (Atehnkeng et al., 2008). Une formule regroupant 4 souches atoxinogènes originaires du Nigeria est commercialisée sous le nom d'Aflasafe™. Des souches candidates ont été également sélectionnées au Kenya, Sénégal, Zambie et Burkina Faso pour adapter Aflasafe™ à la microflore de ces pays (Hell et Mutegi, 2011 ; Marechera, 2015 ; Odhiambo et al., 2014). Dans ces pays, les essais aux champs ont démontré une grande efficacité de ces produits à réduire la contamination par les aflatoxines dans les cultures de maïs et d'arachides par 80-90% et même jusqu'à 99% (Bandyopadhyay et al., 2015). Cette stratégie est aussi appliquée en Australie et en Argentine et des études sont en cours en Thaïlande (Pitt et al., 2015).

La méthode et le taux d'inoculation ainsi que la période d'application des souches atoxinogènes d'*A. flavus* sont des facteurs influençant directement leur efficacité (Jane et al., 2014). La capacité d'une souche fongique à concurrencer une autre dépend aussi de plusieurs facteurs tels le pH, le type de sol et l'apport en azote, carbone, eau et minéraux. Les changements climatiques globaux observés depuis plusieurs années constituent également un vrai défi à l'utilisation de ces souches puisqu'ils peuvent altérer l'environnement du sol ainsi que son microbiome (Hell et Mutegi, 2011 ; Jane et al., 2014). Cependant cette stratégie de lutte présente une limite majeure. Elle est liée au fait qu'*A. flavus* soit capable de se reproduire de façon sexuée dans certaines conditions et donc d'échanger son matériel génétique par recombinaison. Cela pourrait ainsi changer le matériel génétique des souches d'intérêt par recombinaisons et entraîner, à terme, une récupération du pouvoir toxigène des souches atoxinogènes (Olarite et al., 2012). Par conséquent, l'utilisation de ces souches et leur efficacité à long terme méritent une évaluation plus approfondie.

III.3.3.5. Utilisation des huiles essentielles comme stratégie alternative de lutte contre les aflatoxines

Au vu de leurs différentes propriétés biologiques, les Huiles Essentielles (HE) ont été testées comme stratégie alternative pour lutter contre les mycotoxines, et surtout les aflatoxines (Paranagama et al., 2003 ; Bluma et al., 2008 ; Rasooli et al., 2008 ; Abd El- Aziz et al., 2015 ; Tian et al., 2012 ; Kedia et al., 2014).

La caractérisation de plusieurs HE a été effectuée par GC/MS et les composés actifs responsables de leur activité anti-toxinogène ont été identifiés et caractérisés. Les principaux composés communs à la plupart des HE anti-aflatoxinogènes incluent : l'eugénol, le thymol, le carvacrol, le menthol, l'eucalyptol, la carvone, le linalool, etc.

Les HE sont des molécules d'origine naturelle, biodégradables, et sont donc considérées comme une alternative possible aux pesticides (Kedia et al., 2015). Leur utilisation en tant qu'additifs ou arômes alimentaires a d'ailleurs été récemment autorisée aux Etats Unis (Food and Drug Administration, 2013). Comme leurs composants actifs sont hautement volatils, elles sont principalement utilisées comme agents de fumigation des produits agricoles après la récolte.

Le mécanisme d'action des HE au niveau cellulaire n'est toujours pas clairement élucidé. Cependant, plusieurs cibles cellulaires potentielles ont été identifiées. (**Figure 9**) Composées de plusieurs types de molécules bioactives, les huiles essentielles peuvent agir simultanément sur plusieurs cibles cellulaires. Cette action pourrait se situer au niveau de la membrane plasmique ou bien au niveau d'enzymes intracellulaires (Kedia et al., 2015 ; Kim et al., 2006 ; Prakash et al., 2012 ; Tatsadjieu et al., 2009).

Bien que l'utilisation des huiles essentielles en fumigation sur des grains en stockage puisse constituer une stratégie intéressante, elle se heurte à plusieurs contraintes comme i) la phytotoxicité : il a été rapporté que des concentrations légèrement plus élevées que celles induisant un effet fongicide pourraient induire une phytotoxicité (Isman et Machial, 2006), ii) la toxicité pour les mammifères : une exposition à des huiles essentielles ou bien à leurs composants peut-être toxique pour les mammifères. Hartnoll et al., 1993, ont reporté un cas d'ingestion de 5 ml d'huile essentielle de clou de girofle chez un enfant qui a entraîné une hépatotoxicité sévère et un coma, iii) la volatilisation rapide : Les composés des HE sont hautement volatils et peuvent également se dégrader par oxydation suite à une exposition à la lumière ou une élévation de température. Cette perte d'activité limite l'usage des HE sur les cultures (Kedia et al., 2015), iv) l'altération des qualités organoleptiques : Les HE sont riches en substances aromatiques et sont souvent utilisées en industrie cosmétique pour leur odeur agréable. Leur application sur des aliments pourrait en changer les qualités organoleptiques et altérer le goût de ces derniers (Kumar et al., 2010).

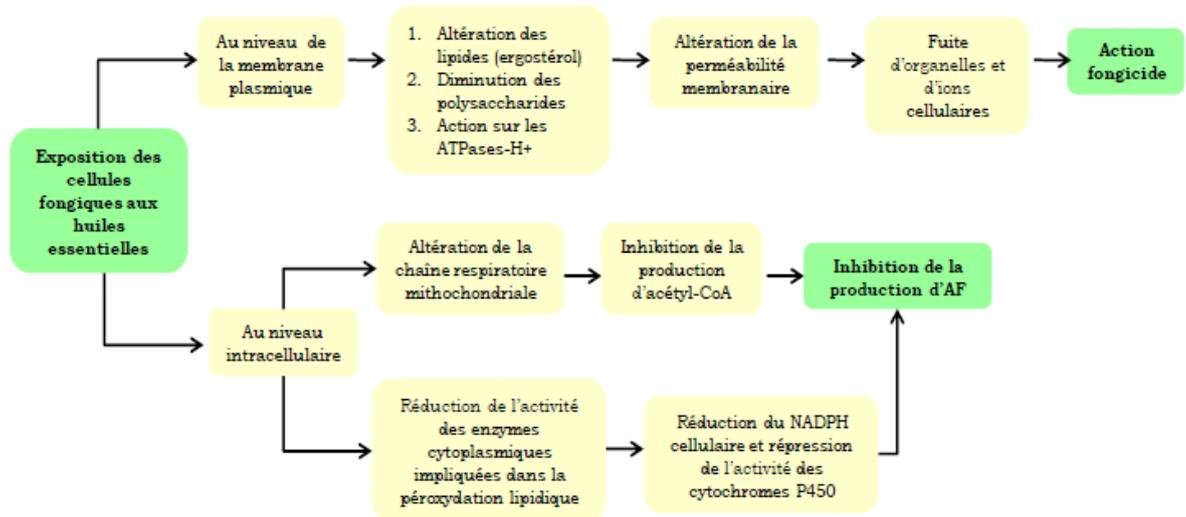


Figure 9. Diagramme représentant les modes d'action cellulaires hypothétiques des huiles essentielles (El Khoury, 2016).

Chapitre IV : Impact économique et réglementation

IV.1. Impact économique

Une contamination par l'aflatoxine des denrées alimentaires et des aliments pour animaux entraîne des pertes économiques et affecte la santé humaine et animale, directement ou indirectement.

Les AF ont également un impact significatif sur l'économie, en provoquant des pertes de productivité des animaux d'élevage ou en rendant les produits de base inacceptables pour le commerce ou la consommation.

Outre leur importance sanitaire, les aflatoxines ont également un impact économique significatif. Ces pertes économiques sont difficiles à mesurer car ces toxines sont responsables de baisse de la productivité chez les animaux d'élevage, ainsi que du déclassement des lots destinés au commerce ou à la consommation (Yazdanpanah ,2010). En raison des implications sanitaires et économiques des aflatoxines, plus de 100 pays ont adopté une réglementation fixant des valeurs maximales tolérables de ces contaminants dans les aliments. Ces réglementations destinées à protéger la santé des consommateurs, ont des conséquences

négatives sur la valeur marchande des lots identifiés comme contaminés par ces toxines. Elles en limitent en effet à la fois l'usage et la distribution.

Ces pertes sont ainsi estimées entre 52,1 millions et 1,68 milliard de dollars chaque année aux Etats-Unis. Elles sont positivement corrélées à la température et atteignent leur maximum les années considérées chaudes, telle l'année 2012 (Mitchell et al., 2016). Au niveau mondial, la FAO estime qu'environ le quart de la production agricole mondiale est contaminé par des mycotoxines. Selon l'Institut International d'Agriculture Tropicale (ITTA 2013), les pertes annuelles dues aux aflatoxines seules atteignent 1,2 milliards de dollars américains, les pays africains subissant 38% de ces pertes, soit 450 millions de dollars (Marechera, 2015). En outre, il existe aussi des pertes indirectes, plus difficiles à évaluer et qui sont liées à la diminution de productivité des animaux recevant une alimentation contenant des aflatoxines (CAST, 2003).

IV.2. Réglementation

Compte tenu de leur toxicité, le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), n'a pas fixé une dose maximale tolérable de consommation quotidienne d'aflatoxines. Selon ce comité, pour protéger les consommateurs des effets délétères des aflatoxines, l'objectif doit être de réduire l'exposition aux aflatoxines au plus faible niveau possible : c'est la règle ALARA « As Low As Reasonably Achievable ». Le principe ALARA est appliqué quand une substance ne peut être éliminée d'un aliment sans le rejet entier de ce dernier ou sans compromettre sévèrement la disponibilité de ses réserves nutritives majeures. Ce principe a été appliqué aux aflatoxines en 1998 (FAO/WHO, 1999).

Selon les directives de la FDA (« Food and Drug Administration ») aux Etats Unis, le niveau total d'aflatoxines dans les aliments destinés à la consommation humaine ne devrait pas dépasser 20 µg/kg. La dose maximale pour les aflatoxines dans les aliments destinés au bétail et aux volailles est de 100 µg/kg (Food and Drug Administration, 2016), alors que la limite maximale tolérée d'AFB1 dans l'alimentation de la vache laitière est fixée à 20 µg/kg par la FDA (Food and Drug Administration, 2019). L'AFM1 est réglementée dans le lait utilisé ou les produits dérivés 0.05-0.5 µg/kg aux Etats Unis, en Europe et en Chine (Hymery et al., 2014).

Les valeurs fixées par la Commission Européenne sont plus strictes en limitant les valeurs maximales d'aflatoxines dans les céréales destinées directement ou indirectement à la

consommation humaine et animale (**Tableau 5**). Ainsi, la Commission Européenne fixe une valeur de 5 µg/kg concernant la contamination des aliments destinés aux vaches laitières (Commission Européenne, 2006).

Contrairement à certains pays maghrébins voisins, comme le Maroc, qui possède une des réglementations les plus complètes sur la contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines au Maghreb (Bulletin officiel, 2016), l'Algérie n'a malheureusement établi aucune réglementation définissant les limites maximales des mycotoxines dans l'alimentation humaine ou animale (**Tableau 6**).

Tableau 5. Valeurs réglementaires en vigueur en UE pour les aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale ($\mu\text{g d'AF}$ par kg de matrice alimentaire) selon la Directive 2002/32/EC du 7 Mai 2002 et la Commission (EC) No 1881/2006 du 19 Décembre 2006.

Destination	Toxine	Matrice	Concentration maximale (ppb)
Alimentation Humaine	Aflatoxine B1	Céréales	2 ou 5 selon le produit et les procédés de transformation
		Arachides	2, 5 ou 8 selon le produit et les procédés de transformation
		Céréales	
		Fruits secs	
		Épices	5
	Aliments à base de céréales destinés aux enfants	0,1	
	Aflatoxines B1+B2+G1+G2	Céréales	4 ou 10 selon le produit et les procédés de transformation
		Arachides	4, 10 ou 15 selon le produit et les procédés de transformation
		Céréales	
		Fruits secs	
Épices	10		
Aflatoxine M1	Lait	0,05	
	Préparations pour les enfants	0,025	
Alimentation Animale	Aflatoxine B1	Matières premières	20
		Fourrage en mélange	5 pour les animaux laitiers 10 pour les veaux et agneaux 20 pour le bétail et autres animaux

At
Ac

Tableau 6. Teneurs maximales en mycotoxines dans divers aliments destinés à l'Homme dans quelques pays de l'Afrique du Nord (Lahouar et al., 2016 ;FAO, 2004 ;Bulletin Officiel,2016).

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Maroc	Tunisie	Algérie	Egypte
AFB1	Farine de blé	3			
	Céréales	10	2	10	5
	Maïs				10
	arachides, pistaches, noix et amandes	1			
	arachides et graines oléagineuses				5
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Céréales sauf maïs				10
	maïs				20
	arachides et graines oléagineuses				10
Aflatoxine M1	Lait destiné aux adultes	0,05			0,5
	Lait destiné aux enfants	0,03			
Ochratoxine A	Céréales	30			
	Café				5
Zéaralénone	Céréales	200			1000
Déoxynivalenol	Blé et farine de blé				700
	Orge et farine d'orge				1000

Partie II : Etude expérimentale

Objectifs et problématiques

Objectifs et problématiques

La contamination de l'alimentation animale par les aflatoxines est responsable de pertes économiques considérables, d'une diminution des performances zootechniques animales, ainsi que de graves conséquences sanitaires chez les ruminants. S'ajoute à cela une problématique de santé publique liée à la possibilité de transfert de l'AFB₁ sous sa forme hydroxylée AFM₁ dans le lait et les produits laitiers.

En Algérie, face au manque d'études sur la contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ et sur la présence de son métabolite hydroxylé l'AFM₁ dans le lait. Il nous semble impératif d'établir un bilan des connaissances concernant la prévalence de ces deux mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale.

Du fait de la toxicité avérée de ces deux mycotoxines (AFB₁ et AFM₁), et dans le but d'évaluer l'incidence de ces contaminants dans l'alimentation animale et humaine, les travaux de notre thèse se sont intéressés dans un premier temps à rechercher l'AFB₁ dans les aliments concentrés destinés à la vache laitière. Ensuite, la deuxième partie de notre travail a porté sur la quantification de l'AFM₁ dans le lait cru provenant d'exploitations laitières, dans différentes régions du nord algérien.

Pour cela, nous avons d'abord analysé les échantillons d'aliments de bétail et de lait cru à l'aide d'une technique immuno-enzymatique « ELISA », par la suite les échantillons qui se sont révélés négatifs à l'ELISA ont été confirmés par la technique HPLC-FLD.

Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes

I.1. Prévalence de l'AFB₁ dans les aliments de bétail

I.1.1. Echantillonnage

Quatre-vingt-trois (n=83) échantillons d'aliments de bétail ont été prélevés dans différentes régions du nord algérien, durant la période allant d'août 2016 à juillet 2017 (n= 30 nord -est, n= 22 centre, n= 31 nord-ouest).

L'échantillonnage a été effectué dans différentes fermes laitières et chez différents fournisseurs d'aliments de bétail, le but étant de prélever des échantillons de différentes origines et d'assurer l'hétérogénéité des prélèvements. Les échantillons d'aliments et de lait ne provenaient pas toujours des mêmes exploitations.

Les échantillons ont été prélevés au hasard, suivant les recommandations de l'union européenne portant sur les méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux (Commission Européenne, 2009).

L'échantillonnage a été effectué en respectant les précautions suivantes (Commission Européenne, 2009) :

- Les échantillons élémentaires ont été prélevés au hasard à l'aide d'une pelle dans l'ensemble du lot.

- Ces échantillons relatifs à chaque partie du lot ont été mélangés pour constituer des échantillons globaux contenant chacun 4 kg.

- Chaque échantillon global a été mélangé soigneusement et réduit pour obtenir au moins 3 échantillons finals, le poids de chaque échantillon final destiné à l'analyse était d'environ 500 g à 1000 g.

- Les échantillons finals ont été mis dans un récipient approprié scellés et étiquetés (sac en papier ou en polyéthylène).

- Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire Santé et Production Animale de l'ENSV et stockés dans un local aéré jusqu'à leur analyse.

Des questionnaires adressés aux éleveurs de bovins laitiers ont permis de recueillir des informations sur le nombre de bovins par ferme, le système d'alimentation, ainsi que les pratiques de stockage des aliments.

I.1.2. Recherche de l'AFB₁ par la méthode ELISA

Les échantillons d'aliments de bétail ont été analysés par la méthode ELISA, les kits (AgraQuant® Aflatoxin B₁ Assay « 2 - 50ppb ») fourni par Romer Labs®, utilisés durant notre étude sont validés par l'AOAC et par l'USDA-FGIS (Federal Grain Inspection Service) ce qui témoigne de la qualité et de l'exactitude analytique de ces kits.

I.1.2.1. Préparation des échantillons et extraction

Les échantillons représentatifs d'environ 500 à 1000 g ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique, puis mélangés soigneusement. Par la suite, 20 g d'échantillons broyés ont été pesés dans un bocal. 100 ml de solution d'extraction méthanol/eau 70/30 (v/v) ont été ajoutés, ensuite les bocaux ont été scellés. Les bocaux ont été agités pendant 3 minutes, puis filtrés à l'aide d'un filtre Whatman. Le filtrat a ensuite été récupéré et dilué à l'aide de la solution tampon fournie avec le kit en ajoutant 100 µL de filtrat à 100 µL de la solution tampon.

I.1.2.2. Analyse des échantillons

Tous les standards et les échantillons ont été analysés en duplicata, pour chaque standard (0, 2, 5, 20, 50 µg/l) ou échantillon, un micropuits contenant un anticorps spécifique d'AFB₁ a été utilisé. À l'aide d'une pipette multicanaux, 200 µL de conjugué ont été versé dans des puits de dilution. Ensuite, 100 µL de chaque solution standard ou échantillon ont été placés dans le puits de dilution correspondant et ont été soigneusement mélangés. 100 µL de chaque micropuits ont été transférés dans un micropuits correspondant contenant des anticorps, les microplaques ont par la suite été incubées à température ambiante (18-30°C) pendant 15 minutes. Le contenu des micropuits a été vidé, les puits ont été lavés 5 fois avec une solution tampon de lavage. Les micropuits ont été séchés en les tapotant sur du papier absorbant. Par la suite 100 µL de substrat ont été pipetés dans chaque puits et incubés à l'obscurité pendant 5 minutes. À la fin de l'incubation, 100 µL de la solution d'arrêt ont été ajoutés dans les puits contenant les antigènes. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration d'aflatoxine dans l'échantillon ou l'étalon. La concentration des échantillons en AFB₁ a été calculée à l'aide du logiciel Romer fourni par le fabricant. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Biotek Elx800, Winooski, Vermont, USA).

I.1.2.3. Validation de la méthode ELISA pour l'analyse de l'AFB₁

Selon les spécifications des Kits ELISA utilisés durant notre étude, la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) étaient de 2 µg/kg. Les échantillons étaient considérés comme positifs pour la présence de l'AFB₁, si leur niveau de concentration était supérieur à la LOD du test. La validation de la méthode ELISA utilisée durant notre étude, était conforme à la décision 2002/657/CE de la Commission Européenne (Commission Européenne, 2002)

Afin de vérifier les performances analytiques de la méthode ELISA, des solutions étalons d'AFB₁ à différentes concentrations (2, 10, 50 µg/kg) ont été ajoutées à des échantillons d'aliments. Ces échantillons surchargés (spiked) à l'AFB₁ ont par la suite été analysés. Aussi, afin de valider la répétabilité et la reproductibilité de la méthode, toutes les analyses ont été répétées 5 fois.

Le taux de Récupération (R) dans les échantillons d'aliments enrichis en AFB₁ (spiked) était de 80% (Coefficient de Variation : CV= 8%), 101.25% (CV= 14%), 99.22% (CV= 3%), pour respectivement les échantillons supplémentés avec 2, 10 et 50 µg/kg d'étalon d'AFB₁ (**Tableau 7**).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant les séries d'étalons d'AFB₁ fournies avec le kit. La courbe a montré une excellente linéarité avec une valeur R² de 0.998 (**Figure 10**).

Tableau 7. Paramètres de validation de la méthode ELISA utilisée pour la quantification de l'AFB₁ dans les aliments de bétail.

Niveau de supplémentation en AFB ₁ (µg/kg)	Coefficient de Variation (CV%)	Taux de Récupération (R%)
2	8	80
10	14	101.25
50	3	99.22

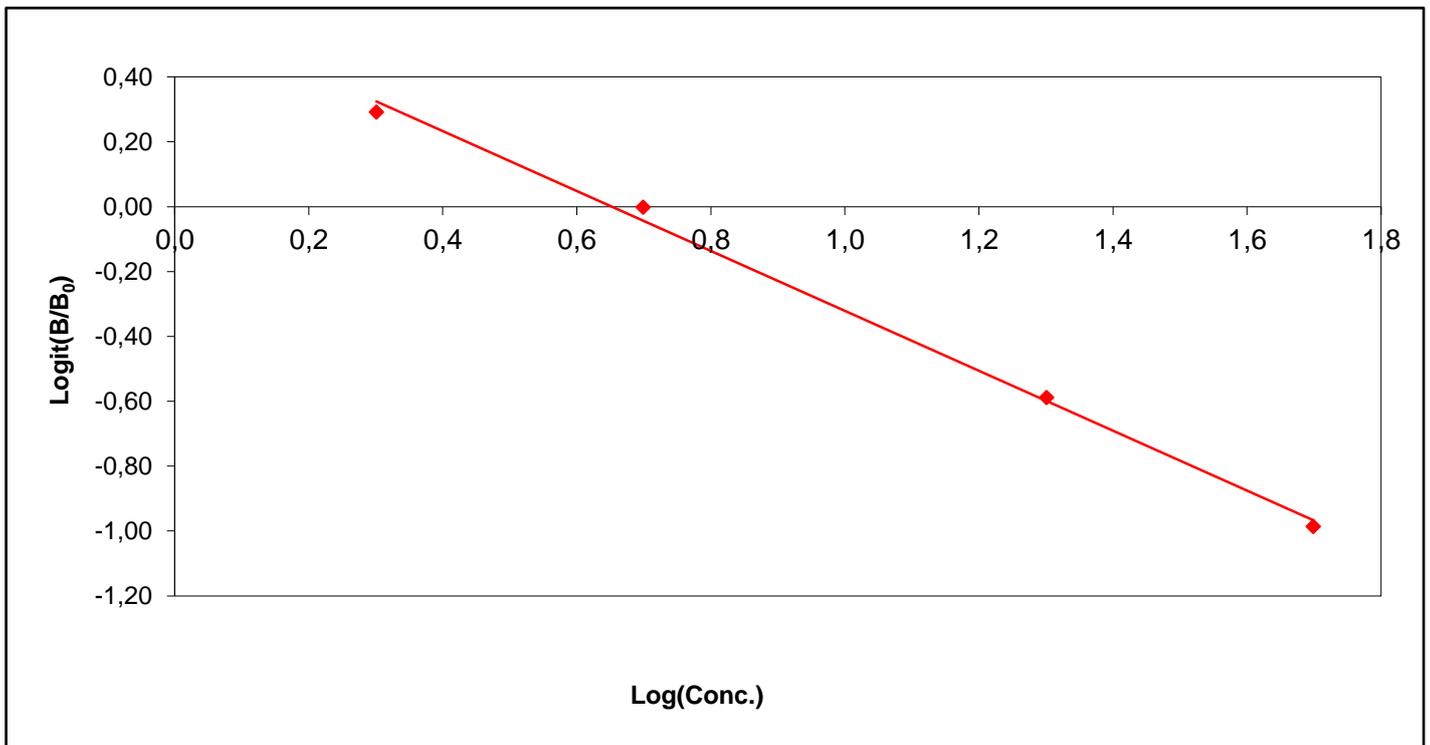


Figure .10 Courbe d'étalonnage de la technique ELISA des solutions étalons de l'AFB₁.

I.1.3. Recherche de l'AFB₁ par la méthode HPLC-FLD

L'analyse HPLC des échantillons d'aliments de bétail a été réalisée au niveau du laboratoire de référence pour les mycotoxines et les phycotoxines, Département de sécurité alimentaire, nutrition et santé publique vétérinaire à l'Institut Supérieur de Santé, Rome, Italie.

Pour des raisons pratiques et de coûts, seulement 17 échantillons d'aliments négatifs à l'ELISA ont été confirmés par l'HPLC-FLD. La LOD des Kit Elisa utilisés dans notre étude est considérée comme élevée (2µg/kg), ainsi les échantillons qui se sont révélés négatifs à la méthode ELISA, peuvent être éventuellement contaminés à l'AFB₁, à des teneurs inférieures à la LOD des kits, pour cette raison il nous a semblé important d'analyser ces échantillons à l'aide d'une technique de confirmation (HPLC). Ces échantillons ont été choisis de manière aléatoire indépendamment de la région.

I.1.3.1. Réactifs utilisés

Tous les réactifs : Chlorure de potassium, Chlorure de sodium, Méthanol pour analyse, Hydrogénophosphate disodique dihydraté, Acide chlorhydrique, Hydroxyde de sodium, Solution tampon saline (PBS) sont de qualité pour analyse. Les solvants organiques : le méthanol, l'acétonitrile sont de grade HPLC. Toutes les solutions aqueuses et la phase mobile utilisée en HPLC sont préparées avec de l'eau désionisée (bidistillée). Les solutions standards de l'AFB₁ ont été fournies par Romer Labs[®] diagnostic GmBh (Tulln, Autriche).

I.1.3.2. Equipements

La recherche de l'AFB₁ a été réalisée dans un laboratoire équipé en : spectrophotomètre, une hotte à flux laminaire, un agitateur magnétique, un vortex, un moulin à grains, une balance de précision, un système d'évaporation sous jet d'azote, un appareillage pour HPLC, des réfrigérateurs.

I.1.3.2.1. Verrerie :

Le laboratoire était équipé de toute la verrerie nécessaire à la recherche de l'AFB₁ (Erlenmeyers, tubes à vis, fioles jaugées, micropipettes, béchers, éprouvette graduée, ampoules de décantation, entonnoirs....).

I.1.3.3. Les conditions de l'HPLC

Les échantillons ont été analysés par un HPLC équipé d'un auto-injecteur (JASCO AS-950-10) et d'un détecteur de fluorescence JASCO FP-920 (Jasco Corporation, Tokyo Japon). La colonne analytique SIMMETRY, C18 (5µm, 4.6 mm x 250 mm) (Waters Corporation, Milford, USA) a été utilisée. La phase mobile contenait composée de 54% d'eau bidistillée, de 29% de méthanol et de 17% d'acétonitrile. La dérivation post-colonne a été réalisée avec une solution à 0,005% de perbromure de bromhydrate de pyridine (PBPB) en utilisant une pompe post-colonne Waters 510 avec un débit réglé à 0.4 ml/minute. Le détecteur de fluorescence a été manipulé à des longueurs d'excitation et d'émission respectivement de l'ordre de 365 nm et 440 nm. Le temps de rétention de l'AFB₁ était de 7,8 minutes.

I.1.3.4. Préparation des solutions d'étalonnage

La préparation des solutions standards est réalisée selon les procédures décrites par le journal international de l'AOAC (AOAC, 2000). A cause de la toxicité des Aflatoxines, la manipulation des standards s'est réalisée sous une hotte chimique en respectant toutes les précautions nécessaires (gants, masque....).

Les solutions diluées des aflatoxines sont peu stables, se dégradent à la lumière et doivent être renouvelées régulièrement. Ainsi, afin d'éviter la dégradation des mycotoxines, des solutions étalons diluées sont préparées immédiatement avant l'analyse par HPLC.

Les solutions étalons ont été préparées en mélangeant les solutions standards avec la solution d'injection composée de méthanol et d'eau bidistillée (40/60) (v/v). Par la suite une série d'étalon de 0.06 ng/ml, 0.12 ng/ml, 0.30 ng/ml, 0.45 ng/ml, 0.60 ng/ml d'AFB₁ a été préparée pour étalonner l'HPLC. En raison de la photosensibilité de l'AFB₁, les solutions standards ont été recouvertes de papier aluminium. Toutes les gammes étalons de travail ont été préparées immédiatement avant l'emploi. Les étalons ainsi protégés de la lumière peuvent être stockés à 4°C et utilisés pour une période de six mois.

I.1.3.5. Extraction de l'AFB₁

Les échantillons ont été analysés selon la méthode de Yazdanpanah et al., 2001. L'AFB₁ a été extraite des échantillons d'aliments de bétail par un mélange aqueux d'eau bidistillée et de méthanol. 50 g d'échantillon (auxquels on ajoute 5g de chlorure de sodium) ont été extraits par 250 ml du mélange méthanol : eau (80/20) (v/v). Le mélange a par la suite été homogénéisé en utilisant un blinder pendant 3 minutes, tout en évitant de surchauffer l'échantillon. Après filtration sur papier wattman N°4, 20 ml du filtrat ont été dilués par 20 ml d'une solution de tampon phosphate (PBS). Le mélange a par la suite été filtré une deuxième fois à l'aide d'un filtre en microfibre de verre. 20 ml du filtrat ont été appliqués à une colonne d'immuno-affinité (Easi-extract®, Aflatoxin, R-Biopharm, Rhône LTD, Glasgow, Royaume-Uni) reliée à un système de filtration sous vide, à un flux de 3 ml/minute. La colonne a été lavée avec 10 ml d'eau bidistillée et l'air dans la colonne a été chassé à l'aide d'une seringue en faisant passer au moins deux volumes d'air. L'AFB₁ a été éluée en suivant une procédure à deux étapes, 1 ml de méthanol a été ajouté en premier. Après une minute, 1 ml de méthanol a encore été appliqué à la colonne. Le solvant d'éluion a par la suite été recueilli en ajoutant 500 µl d'eau bidistillée. Après éluion, l'éluat a été dilué dans une fiole jaugée de 5ml, en complétant avec de l'eau bidistillée jusqu'au trait de jauge. L'éluat a par la suite été mélangé au vortex avec 3250 µl d'eau bidistillée et mélangé au vortex. 100 µl de l'éluat dilué ont été injectés à un HPLC en suivant les conditions HPLC décrites précédemment.

I.1.3.6. Méthode de validation de la technique HPLC-FLD pour la recherche de l'AFB₁ dans l'alimentation animale

La validation des performances analytiques de la méthode utilisée a été réalisée selon les recommandations de Brera et Miraglia (1996). Ainsi pour chaque série d'analyse (généralement 5 à 7), des échantillons enrichis (spiked) avec des concentrations bien déterminées en AFB₁ ont été testés. Ces échantillons supplémentés ont été homogénéisés, le solvant est laissé s'évaporer pendant au moins 2 h sous une hotte. Le pourcentage de recouvrement a été calculé. Ainsi 2 échantillons enrichis avec une solution d'AFB₁ ont été préparés à 2 niveaux de concentration (spk₁ à 0.06, spk₂ 1.53µg/l) (**Tableau 8**)

Le pourcentage de recouvrement (Rc) ou le taux de récupération permet de vérifier l'efficacité de la méthode d'analyse par addition de quantités bien déterminées des

mycotoxines étudiées à quelques échantillons afin d'obtenir une concentration connue de de mycotoxines dans les échantillons d'aliment de bétail.

A l'échelle internationale, les résultats doivent répondre aux exigences de la décision 2002/657/CE de l'Union Européenne (European Commission, 2002) qui stipule que pour des solutions de teneurs de toxines entre 1 et 10 ng/g, les récupérations de 70-110% sont acceptables. L'écart-type relatif doit être inférieur à 20%. Le taux de récupération de la technique est déterminé par l'évaluation du rapport entre la concentration finale de la mycotoxine après quantification par HPLC et la concentration initiale connue (contamination provoquée par l'enrichissement d'un aliment témoin par une quantité connue de la mycotoxine).

L'expression du taux de récupérations (Rc) est la suivante (Zinedine, 2004) :

$$Rc = \frac{(C_m \text{ (éch fortifié)} - C_m \text{ (éch témoin)})}{C \text{ (fortification)}} \times 100$$

C_m (éch. enrichi) : concentration moyenne de l'échantillon après enrichissement.

C_m (éch. témoin) : concentration initiale de l'échantillon avant enrichissement.

C (enrichissement) : quantité de mycotoxine ajoutée pour l'enrichissement de l'échantillon.

La linéarité est représentée par la courbe d'étalonnage déterminée avec des concentrations standards d'Aflatoxine injectées en triple.

La déviation standard (SD) ou l'écart-type des 5 mesures effectuées pour chaque échantillon enrichi permet d'évaluer la dispersion des mesures autour de la concentration moyenne (Zinedine, 2004).

$$SD = \frac{\sqrt{\sum(C_i - cm)^2}}{n - 1}$$

C_i : concentration de la mycotoxine déterminée après l'analyse i.

C_m : concentration moyenne de la mycotoxine calculée suite aux cinq essais effectués.

N : nombre d'essais réalisés.

Le coefficient de variation (CV) permet de vérifier la reproductibilité de la méthode pour les échantillons enrichis. Ce coefficient est calculé comme suit (Zinedine, 2004) :

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}_m} \times 100$$

Les paramètres de performances de la méthode utilisée sont résumés dans le **Tableau 8**. Les pourcentages de recouvrement (R_C) pour l'AFB₁ obtenus durant le présent travail, variaient entre 75.93 et 75.93%, et se situaient dans les limites acceptables à l'échelle européenne (70-110%) (Commission Européenne, 2002). Les coefficients de variation pour la reproductibilité des échantillons enrichis se situaient entre 4.90 et 10.77 %.

La courbe d'étalonnage pour l'AFB₁ était linéaire et fortement corrélée avec la quantité d'analytes injectée, le coefficient de détermination (R^2) était supérieur à 0,9999 (**Figure 11**).

Tableau 8. Validation des paramètres de la méthode HPLC-FLD pour la détermination de l'AFB₁ dans les aliments de bétail.

Niveaux de fortification en AFB ₁ (µg/kg)	Taux de récupération (Rc%)	Coefficient de variation (CV%)
0.06	72.96	10.77
1.53	75.93	4.90

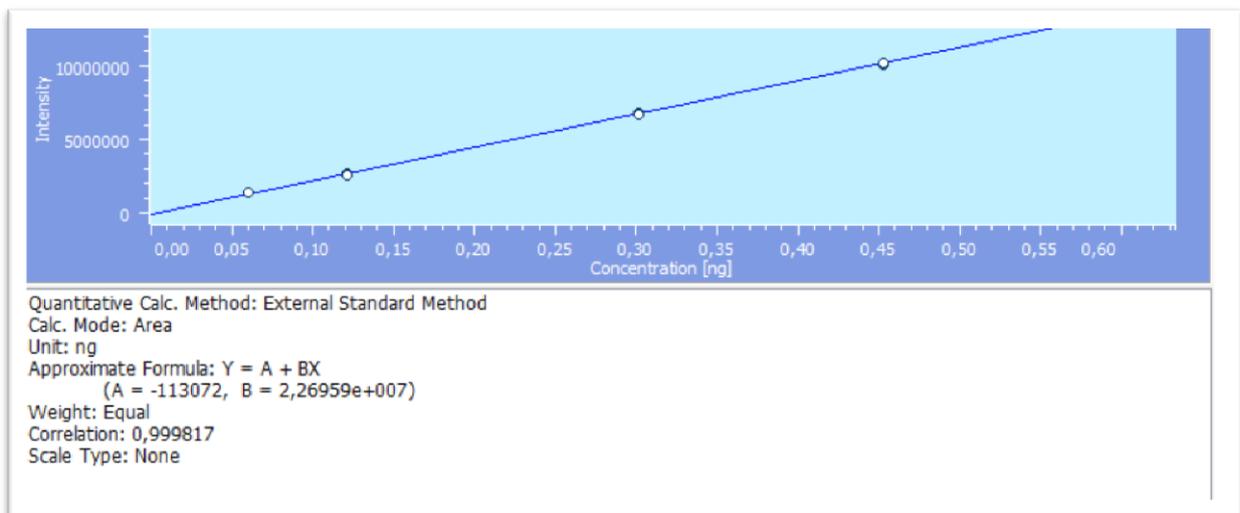


Figure 11. Courbe d'étalonnage de la technique HPLC-FLD des solutions étalons de l'AFB₁.

I.2. Prévalence de l'AFM₁ dans le lait cru

I.2.1. Echantillonnage

Quatre-vingt-quatre (84) échantillons de lait de vache cru ont été prélevés au hasard au niveau des exploitations laitières, pour la période allant d'août 2016 à juillet 2017 (n = 23 nord-est ; n = 22 nord et n = 39 nord-ouest). Les échantillons lait cru ont été collectés à partir du lait de mélange provenant des citernes de lait. La taille de chaque échantillon était d'environ 0,5 L. Les échantillons ont par la suite étaient transportés au laboratoire SPA dans des glacières et conservés à -18 °C jusqu'à leur analyse.

I.2.2. Recherche de l'AFM₁ par la méthode ELISA

Les kits AgraQuant® AFM₁ Plus Kit ELISA utilisés dans le présent travail, ont reçu une validation officielle par l'AOAC et l'USDA, confirmant ainsi l'exactitude analytique et la qualité des résultats obtenus.

I.2.2.1. Préparation des échantillons et techniques d'extraction

Les échantillons de lait cru ont été analysés par la technique immuno-enzymatique (ELISA), en utilisant les kits AgraQuant® AFM₁ Plus Kit ELISA (100/2000 ng/L) fournis par Romer Labs® Singapour.

La préparation des échantillons a été effectuée en suivant les instructions fournies par le fabricant, à cet effet, les échantillons de lait ont d'abord été décongelés à 4°C. Ensuite, 5 ml de chaque échantillon ont été centrifugés pendant 10 min à 3000/ tours à 4°C. Après centrifugation, la couche inférieure (sérum) a été collectée par aspiration à l'aide d'une pipette Pasteur. Enfin, 0,4 ml de sérum de lait ont été mélangés avec 0,1 ml de méthanol à 100 % (4:1) (v/v).

I.2.2.3. Analyse des échantillons

Tous les standards et les échantillons ont été analysés en *duplicata*, pour chaque standard (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 µl) ou échantillon, un micropuits contenant un anticorps spécifique d'AFM₁ a été utilisé. À l'aide d'une pipette multicanaux, 200 µL de conjugué ont été versés dans des micropuits. 100 µL de chaque étalon ou échantillon ont été rajoutés dans

les micropuits correspondants et mélangés délicatement. Par la suite, 100µL de cette solution ont été placés sur une microplaque revêtue d'anticorps et incubés à température ambiante (18-30°C) pendant 20 minutes. Le contenu des micropuits a été vidé, les puits ont été lavés 5 fois avec une solution tampon de lavage. Par la suite, les microplaques ont été séchées en les tapotant sur du papier absorbant. 100 µL de substrat ont ensuite été pipetés dans chaque micropuits et incubés à l'obscurité pendant 10 minutes. À la fin de l'incubation, 100 µL de la solution d'arrêt ont été ajoutés dans les micropuits contenant des anticorps. La concentration des échantillons en AFM₁ a été calculée à l'aide du logiciel Romer fourni par le fabricant. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Biotek Elx800, Winooski, Vermont, USA).

I.2.2.4. Validation de la méthode ELISA pour l'analyse de l'AFM₁

Selon les spécifications techniques des Kits ELISA utilisés durant notre étude, la limite de détection (LOD) dans les échantillons de lait cru était de 0.089 µg/kg. Les échantillons étaient considérés comme positifs pour la présence de l'AFM₁, si leur niveau de concentration était supérieur à la LOD du test. La méthode a été validée selon les critères fixés par les directives de la Commission Européenne 401/2006 (Commission Européenne, 2006).

Afin de valider mes performances analytiques du Kit utilisé, différentes solutions étalons d'AFM₁ (0.1, 0.250 et 0.500 µ/L) ont été ajoutées à des échantillons de lait, ces échantillons supplémentés à l'AFM₁, ont par la suite étaient analysés. Aussi, afin de vérifier la répétabilité et la reproductibilité de la méthode, toutes les analyses ont été répétées 5 fois.

Le taux de Récupération (R) et le Coefficient de Variation (CV) dans les échantillons de lait supplémentés en AFM₁ étaient de 95.6% (CV : 1,23 %), 94% (CV=1,11%) et 99 % (CV=1,06%), pour respectivement les échantillons enrichis avec les étalons d'AFM₁ suivants (0.1, 0.250 et 0.500 µ/L) (**Tableau 9**).

La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant les séries d'étalons d'AFM₁ et le logiciel Log/Logit fournis par Romer[®]. La courbe obtenue a montré une excellente linéarité avec une valeur R² de 0.999 (**Figure 12**).

Tableau 9 .Paramètres de validation de la méthode ELISA utilisée pour la quantification de l'AFM₁ dans le lait cru.

Niveau de supplémentation en AFM ₁ (µg/kg)	Coefficient de Variation (CV%)	Taux de Récupération (R%)
0.1	1.23	95.6
0.250	1.11	94
500	1.06	99

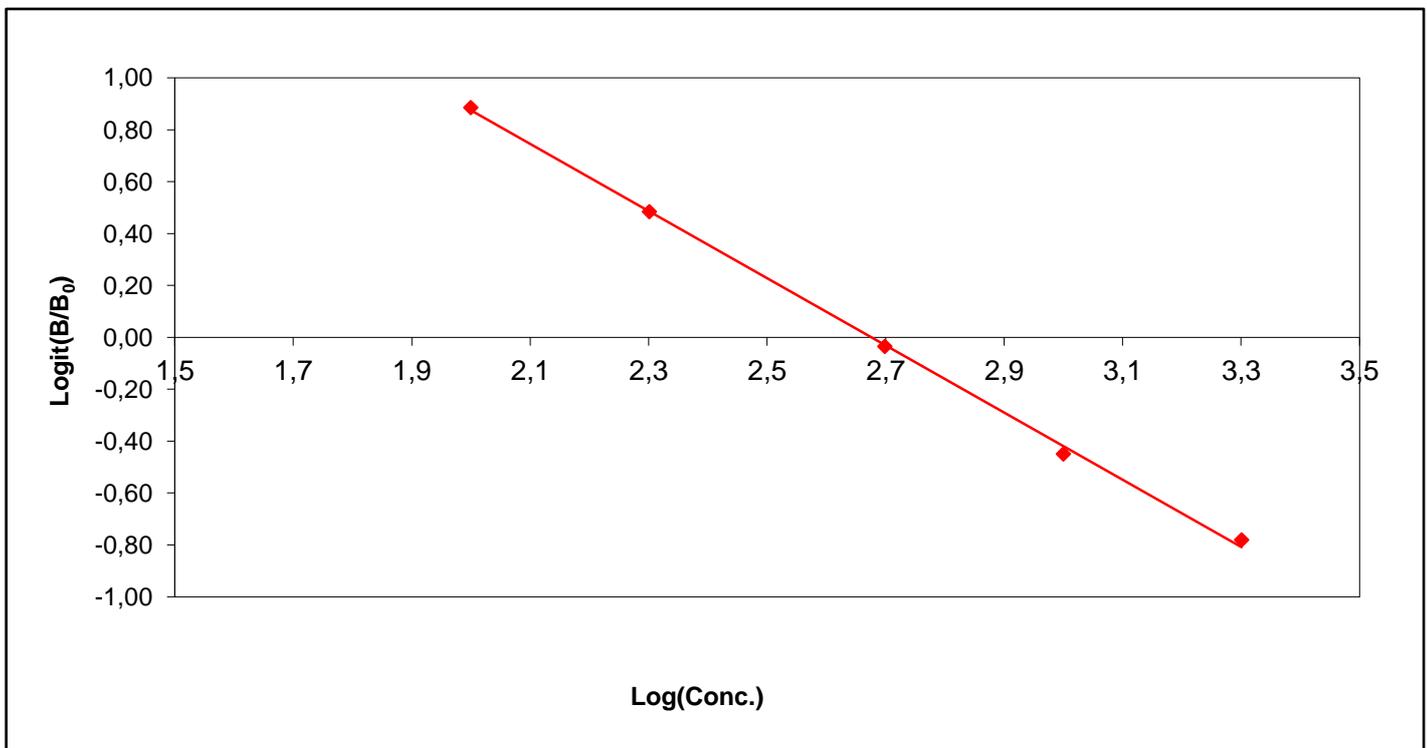


Figure .12 Courbe d'étalonnage de la technique ELISA des solutions étalons de l'AFM₁.

I.2.3. Recherche de l'AFM₁ par la méthode HPLC-FLD

L'analyse HPLC des échantillons de lait cru a été réalisée au niveau du laboratoire de référence pour les mycotoxines et les phycotoxines, Département de sécurité alimentaire, nutrition et santé publique vétérinaire à l'Institut Supérieur de Santé, Rome, Italie.

Pour des raisons pratiques et de coûts, seuls 12 échantillons de lait testés négatifs à l'ELISA ont été confirmés par l'HPLC-FLD. Aussi, la LOD des Kit Elisa utilisés dans notre étude est considéré comme élevée (0.089 µg/kg), car d'une part, cette valeur répond aux limites maximales de résidus établies par la FDA et le Codex Alimentarius (0.5µg/kg), et d'autre part, cette valeur n'est pas conforme aux LMR établies par la commission européenne (0.05 µg/kg). Par ailleurs, toutes ces raisons nous ont poussées à vouloir analyser, à l'aide d'une méthode de confirmation, la présence ou non de l'AFM₁ dans les échantillons testés négatifs à l'ELISA. Le choix de ces échantillons s'est fait de manière aléatoire indépendamment de la région.

I.2.3.1. Réactifs utilisés

Tous les solvants organiques utilisés durant notre expérimentation comme l'acétonitrile sont de grade HPLC. Toutes les solutions aqueuses et la phase mobile utilisées en HPLC sont préparées avec de l'eau désionisée (bidistillée). Les solutions standards de l'AFM₁ (solution stock ou solution mère) ont été fournies par Romer Labs ® diagnostic GmBh (Tulln, Autriche).

I.2.3.2. Equipements

L'analyse de l'AFM₁ a été réalisée dans un laboratoire équipé en : spectrophotomètre, une hotte à flux laminaire, un agitateur magnétique, un vortex, une centrifugeuse, une balance de précision, un système d'évaporation sous jet d'azote, un appareillage pour HPLC, un détecteur de fluorescence, un système de filtration sous vide, papier filtre Whatman N.4, des réfrigérateurs et toute la verrerie nécessaire (Erlenmeyers, tubes à vis, fioles jaugées, micropipettes, béchers, ampoules de décantation, entonnoirs...).

I.2.3.2.1. Verrerie :

Le laboratoire était équipé de toute la verrerie nécessaire à la recherche de l'AFB₁ (Erlenmeyers, tubes à vis, fioles jaugées, micropipettes, béchers, éprouvette graduée, ampoules de décantation, entonnoirs....).

I.2.3.3. Les conditions HPLC

Les échantillons de lait cru ont été analysés par un HPLC équipé d'un auto-injecteur (JASCO AS-950-10) et d'un détecteur de fluorescence JASCO FP-920 (Jasco Corporation, Tokyo Japon). La séparation a été effectuée sur une colonne analytique SIMMETRY, C18 à phase inverse (5µm, 4.6 mm x 250 mm) (Waters Corporation, Milford, USA). La phase mobile utilisée été constituée d'un mélange d'eau/ acétonitrile (30 : 10, v/v), le débit a été réglé à 1 ml/ minute. La détection a été faite à des longueurs d'excitation de 365 nm et 435 nm d'émission. Le temps de rétention de l'AFM₁ est de 6 mn et 57 secondes.

I.2.3.4. Préparation des solutions d'étalonnage

La préparation de la solution standard d'AFM₁ a été effectuée selon les procédures décrites dans la méthode officielle ISO 14501 : 2007 (ISO 14501, 2007). À partir d'une solution stock (solution mère) d'AFM₁ d'une concentration de 0.500 µg/ml (Biopure Aflatoxin M1, Romer Labs, Tulln, Autriche), une solution de travail d'AFM₁ (standard working solutions : SWS) d'une concentration de 0.005 µg/ kg a été préparée la veille de chaque analyse, en mélangeant 200 µl de la solution mère à 800 µl d'acétonitrile. En raison de la photosensibilité de l'AFM₁, cette solution a été recouverte de papier aluminium, et conservée au réfrigérateur à 4°C. Une gamme de solution étalon a été réalisée à partir de la SWS, en mélangeant 50 µl de la SWS à 450 µl de solvant d'injection (acétonitrile/eau : 1/9, v/v). Les étalons contenaient les concentrations suivantes d'AFM₁ : 0.05 ng/ml, 0.12 ng/ml, 0.24 ng/ml et 0.60 ng/ml et 1.2 ng/ml. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la série d'étalons précédemment préparée.

La concentration d'AFM₁ a été calculée à l'aide de la formule suivante

$$\text{Concentration ng/L} = \frac{M \times Vd}{V \times Vi}$$

Où :

M est la masse d'aflatoxine M_1 (ng) injectée dans le système HPLC ;

V est le volume de lait (ml) utilisé pour l'analyse ;

Vd est le volume (ml) utilisé pour dissoudre l'extrait sec ;

Vi est le volume (ml) injecté dans le système HPLC.

I.2.3.5. Extraction de l'AFM₁

L'AFM₁ a été analysée par la méthode officielle ISO 14501 : 2007 (ISO14501 : 2007), les échantillons de lait ont été décongelés la veille de l'analyse puis chauffés au bain-marie à une température comprise entre 30°C et 37°C. Les échantillons par la suite ont été centrifugés à froid (2000 tours pendant 15 minutes) et la couche de gras a été enlevée. 50 ml de lait ont été prélevés et chargés dans une colonne d'immuno-affinité (Easi-Extract® Aflatoxin) contenant un anticorps monoclonal spécifique d'AFM₁. Les colonnes d'immuno-affinité ont été fixées à un système de filtration sous vide, et lavées avec 10 ml d'eau bidistillée afin d'éliminer toute impureté, la colonne a été séchée en soufflant au moins 2 volumes d'air. L'AFM₁ a été ensuite lentement éluée avec 4 ml d'acétonitrile. L'éluat a été évaporé à sec sous un léger courant d'azote à 30°C, et reconstitué avec 1 ml de la solution d'injection (acétonitrile/eau, 10/90, v/v). À la fin, 150 µl de l'éluat ont été injectés dans le système HPLC.

I.2.3.6. Méthode de validation de la technique HPLC pour la recherche de l'AFM₁

Les performances analytiques de la méthode ont été validées selon les recommandations décrites par Brera et Miraglia (1996). Ainsi, pour chaque série d'analyse, des échantillons de lait cru enrichis (spiked) ont été préparés avec les concentrations suivantes d'AFM₁ (0.35, 0.80, 1.60 ng/ml). La validation de la méthode a été réalisée selon les critères de performance énoncés dans le règlement européen UE/519/2014 fixant les méthodes d'échantillonnage et d'analyse pour le contrôle officiel des niveaux de mycotoxines dans les denrées alimentaires (Commission Européenne, 2014). Durant notre étude des taux de Récupération (R%) allant de 83.3 à 110.7% ont été obtenus, ce qui est conforme aux exigences de la commission européenne, considérant qu'un pourcentage de Récupération (R%) allant de 60 à 120 % comme acceptable (**Tableau 10**). Le coefficient de détermination (R²) de la courbe d'étalonnage était supérieur à 0,999, montrant une bonne relation entre l'aire du pic et la concentration d'AFM₁ (**Figure 13**).

Tableau 10. Validation de la méthode HPLC-FLD pour la détermination des concentrations d'AFM₁ dans le lait cru.

Niveaux de supplémentation en AFM ₁ (µg/l)	Taux de récupération (R%)	Coefficient de variation (CV%)
0.35	110.7	2.57
0.80	83.3	2.49
1.60	93.3	11.2

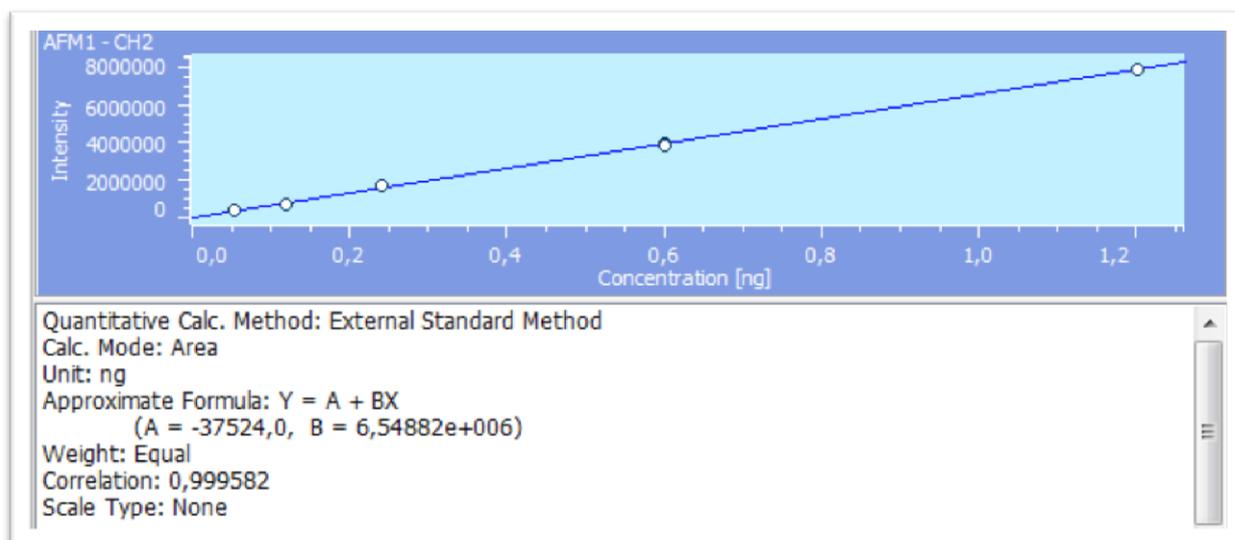


Figure .13 Courbe d'étalonnage de la technique HPLC-FLD des solutions étalons de l'AFM₁.

I.2.4 Procédure de décontamination des Aflatoxines

La décontamination de la verrerie ayant été en contact avec les Aflatoxines a été faite selon les procédures internationales de l'IARC décrite par Castegnaro et al., 1991. À la fin des analyses, tout le matériel utilisé pour l'extraction des Aflatoxines doit être décontaminé par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel dilué au 1/2) pendant toute la nuit sous une hotte de sécurité chimique. Un lavage normal par un détergent suivi par un rinçage avec de l'eau distillée ont été effectués après décontamination.

I.2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (IBM Corp., NY, USA), à un intervalle de confiance de 95 %. Les taux de positivité des échantillons ont été comparés à l'aide du test exact de Fisher ou du test du Khi carré. Les niveaux moyens d'AFM₁ ont été comparés à l'aide du test « t » de Student ou de l'ANOVA.

Pour l'analyse des facteurs de risque, une analyse de variance pour les variables sélectionnées a d'abord été réalisée à $p \leq 0,2$, en utilisant le test Khi carré « χ^2 » ou le test exact de Fisher. Les variables dépassant ce seuil ont ensuite été analysées par régression logistique (Hosmer et Lemeshow, 2013). Ces variables ont été considérées comme des facteurs de risque lorsque le ratio était >1 et $p \leq 0,05$.

Résultats et discussion

II. Résultats

II.1. Présence de l'Aflatoxine B₁ (AFB₁) dans l'alimentation animale

Le **Tableau 11** présente la répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ en fonction des régions. Sur un total de 83 (100%) échantillons d'aliments de bétail analysés, 42 (50.60%) ont présenté une valeur inférieure à la limite de détection du kit ($< 2 \mu\text{g/kg}$). Un niveau de contamination en AFB₁ de 2-5 $\mu\text{g/kg}$ a été retrouvé chez 23 (27.70%) échantillons, celui de 5-20 $\mu\text{g/kg}$ a été retrouvé dans 4 échantillons (4.80%) et celui de 20-50 $\mu\text{g/kg}$ a été retrouvé dans 3 échantillons (3.65%). Onze échantillons (13.25%) ont eu des teneurs qui dépassaient 50 $\mu\text{g/kg}$.

La répartition géographique des échantillons a montré que la moyenne de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ ($\mu\text{g/kg}$) est de 18.84 ± 16.57 , 14.19 ± 13.95 , 11.82 ± 10.27 , pour la région centre, nord-est, nord-ouest, respectivement (**Tableau 14**). Les analyses statistiques ont démontré une différence significative entre les régions ($p = 0.033$) avec le niveau de contamination le plus élevé 18.84 ± 16.57 ($\mu\text{g/kg}$), enregistré dans la région centre du pays.

Cette étude a révélé un taux de contamination en AFB₁ élevée (une moyenne de $17.59 \pm 17.11 \mu\text{g/kg}$) dans les aliments pour animaux (**Tableau 14**).

L'analyse statistique de la répartition des moyennes de contamination par l'AFB₁ en fonction des saisons a indiqué une différence significative dans la concentration moyenne d'AFB₁ ($p = 0,021$). Les niveaux moyens d'AFB₁ dans les échantillons prélevés en hiver ($30.78 \pm 21.44 \mu\text{g/kg}$) étaient significativement plus élevés que ceux prélevés en automne ($15.28 \pm 14.87 \mu\text{g/kg}$), au printemps ($12.98 \pm 12.38 \mu\text{g/kg}$) ou en été ($2.36 \pm 27.38 \mu\text{g/kg}$) (**Tableau 13 - 14**).

L'analyse statistique de la taille des exploitations a montré que le niveau moyen de la contamination en AFB₁ dans les petites exploitations ($17.32 \pm 14.57 \mu\text{g/kg}$) était plus élevé que les grandes exploitations ($12.89 \pm 11.26 \mu\text{g/kg}$) ($p=0.037$) (**Tableau 12 - 14**).

Le **Tableau 15** et **16** présentent les niveaux de concentration d'AFB₁ enregistrés après confirmation par la méthode HLPC/FLD, sur 21 (100%) échantillons analysés, 17 (80.85%) étaient contaminés par l'AFB₁, à des niveaux allant de 0.08 à 0.305 ($\mu\text{g/kg}$), une moyenne de $0.137 \pm 0.02 \mu\text{g/kg}$ a également été obtenue.

Tableau 11. Répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ par la méthode ELISA, en fonction des différentes régions en Algérie.

Région	Nombre d'échantillons	Répartition des niveaux d'AFB ₁ (µg/kg) (moyenne +/- écart type)				
		<LOD	2-5 µg/kg	5-20 µg/kg	20-50 µg/kg	> 50 µg/kg
Nord-Est	30	15 échantillons	9 (2.89 +/- 1.23)	1 (14.62)	2 (31.65 +/- 2.43)	3 (124.58 +/- 22.68)
Centre	22	12 échantillons	6 (2.31 +/- 0.89)	0 -	0 -	4 (102.49 +/- 12.79)
Nord - Ouest	31	15 échantillons	8 (2.57 +/- 0.71)	3 (9.57 +/- 1.52)	1 (31.84)	4 (61.35 +/- 1.85)
Total	83	42	23	4	3	11
%	100%	50.60%	27.70%	4.80%	3.65%	13.25 %

Tableau 12. Répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ par la méthode ELISA en fonction de la taille des exploitations en Algérie.

Taille des exploitations	Nombre d'échantillons	Répartition des niveaux d'AFB ₁ (µg/kg) (moyenne +/- écart type)				
		<LOD	2-5 µg/kg	5-20 µg/kg	20-50 µg/kg	>50 µg/kg
Petite	46	26	13 (2.47 +/- 0.54)	1 (8.18)	1 (28.54)	5 (89.24 +/- 7.65)
Grande	37	16	10 (2.41 +/- 1.11)	3 (12.58 +/- 4.31)	2 (24.58 +/- 3.47)	6 (95.36 +/- 9.24)
Total	83	42	23	4	3	11
%	100%	50.60%	27.70%	4.80%	3.65%	13.25

Tableau 13. Répartition des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ par la méthode ELISA en fonction des saisons en Algérie.

Saison	Nombres d'échantillons	Répartition des niveaux d'AFB ₁ (µg/kg) (moyenne +/- écart type)				
		<LOD	2-5 µg/kg	5-20 µg/kg	20-50 µg/kg	> 50 µg/kg
Hiver	18	6	4 (2.29 +/- 1.12)	3 (9.89 +/- 2.28)	1 32.57	4 (94.65 +/- 5.68)
Printemps	38	18	13 (2.18 +/- 1.05)	1 8.24	2 (25.89 +/- 3.23)	4 (91.57 +/- 2.23)
Été	7	6	1 (2.36)	0 -	0 -	0 -
Automne	20	12	5 (2.99 +/- 1.13)	0 -	0 -	3 (106.47 +/- 14.68)
Total	83	42	23	4	3	11
%	100%	50.60	27.70%	4.80%	3.65%	13.25

Tableau 14. Analyse des variances des facteurs de risque associés aux taux de positivité en AFB₁ en Algérie.

Variable	Catégorie	Nombre d'échantillons	Nb. d'échantillons positifs (%)	P (χ ² test)	Total des échantillons (µg/kg) (moyenne +/- écart type)	P (t/K-W test)
Régions	Nord –Est	30	15 (50)	0.271	14.19±13.95	0.033*
	Centre	22	10 (45.45)		18.84±16.57	
	Nord-Ouest	31	16 (51.61)		11.82±10.27	
Taille des exploitations	Petite	46	20 (43.47)	0.068	17.32±14.57	0.037*
	Grande	37	21 (56.57)		12.89±11.26	
Saison	Hiver	18	12 (66.66)	0.038*	30.78±21.44	0.021*
	Printemps	38	20 (52.65)		12.98±12.38	
	Été	7	1 (14.29)		2.36±27.38	
	Automne	20	8 (40)		15.28±14.87	
Total (%)		83 (100)	41 (49.40)	Moyenne totale	17.59±17.11	

Tableau 15. Concentration de l'AFB₁ dans les échantillons d'aliments de bétails déterminés par la méthode HPLC-FLD.

Echantillon d'aliments de bétail négatifs à la méthode l'ELISA	Taux d'AFB ₁ (µg/kg)
E1	0,08
E2	0,080
E3	< LOD
E4	< LOD
E5	0,127
E6	0,252
E7	0,303
E8	0,113
E9	< LOD
E10	0,305
E11	0,106
E12	< LOD
E13	0,234
E14	0,166
E15	0,121
E16	0,135
E17	0,132
E18	0,250
E19	0,118
E20	0,170
E21	0,179

Tableau 16 : Niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ déterminés par la méthode HPLC-FLD.

Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	Moyenne (µg/kg)	Ecart-type	Niveaux de concentration (µg/kg)
21	80.85	0,137±0,020	0,094	0.08-0.305

II.2. Présence de l'Aflatoxine M₁ (AFM₁) dans le lait cru collecté en Algérie.

L'enquête a révélé des niveaux élevés d'AFM₁ dans le lait cru collecté dans les différentes exploitations laitières en Algérie (moyenne globale de $71,92 \pm 28,48$ ng/L).

Le taux de positivité de l'AFM₁ dans les échantillons analysés était de 46,42%. De plus, sur 84 échantillons de lait cru (100%) testés, 45 échantillons (53,6%) ont présenté une concentration en AFM₁ inférieurs à la LOD (89 ng/L), 35 échantillons (41,7%) contenaient des niveaux d'AFM₁ entre 89 et 300 ng/L ; 3 échantillons (3,6%) ont présenté un taux de contamination par l'AFM₁ entre 301 et 500 ng/L , un seul échantillon (1,19%) a présenté un niveau d'AFM₁ supérieur à 500 ng/L (**Tableaux 17-20**).

Concernant la répartition géographique, les niveaux moyens d'AFM₁ dans les échantillons de lait cru (ng/L) étaient respectivement de $32,94 \pm 11,87$, $152,46 \pm 44,14$ et $57,05 \pm 21,67$, dans la région nord-est, centre et nord-ouest (**Tableau 17**). L'analyse statistique des résultats a révélé une différence significative dans les niveaux de contamination du lait entre les différentes régions étudiées ($p = 0,013$) (**Tableau 20**). La concentration moyenne d'AFM₁ était significativement plus élevée dans le centre ($152,46 \pm 44,14$ ng/L) que dans les autres régions.

L'analyse statistique de la répartition des résultats en fonction des saisons a indiqué une différence significative dans la concentration moyenne d'AFM₁ ($p = 0,025$). Les niveaux moyens d'AFM₁ dans les échantillons prélevés au printemps ($106,92 \pm 41,92$ ng/L) étaient significativement plus élevés que ceux prélevés en automne ($88,79 \pm 25,34$ ng/L), en été ($59,77 \pm 19,65$ ng/L) ou en hiver ($60,28 \pm 27,38$ ng/L) (**Tableau 19-20**).

Les résultats de notre étude ont révélé que les niveaux d'AFM₁ étaient significativement plus élevés dans les petites exploitations ($90,16 \pm 43,02$ ng/L) que dans les grandes ($58,59 \pm 27,44$ ng/L) ($p = 0,032$) (**Tableau 18-20**).

Les données concernant les niveaux de concentration d'AFM₁ obtenues après confirmation par la méthode HLPC/FLD sont présentées dans le **Tableau 21** et **22**, sur 12 (100%) échantillons de lait cru analysés, 11 (92,30%) étaient contaminés par l'AFM₁, à des niveaux allant de 3,56 - 60,4 (ng/L), une moyenne de 2,67 (ng/L) a également été obtenue.

Tableau 17. Répartition des niveaux de contamination par l'AFM₁ en fonction des différentes régions en Algérie.

Régions	Wilayas	Nombre d'échantillons	Répartition des niveaux d'AFM ₁ (ng/L)			
			Moyenne± écart type (intervalle)			
			<LOD*	89–300	301–500	>500
Nord-Est	Constantine, Mila	23	16	7	0	0
			–	112.42±19 (96.87–147.83)	–	–
Centre	Médéa, Tipaza, Djelfa	22	5	15	2	0
			–	154.94±45.15 (95.59–231.17)	453.49±6.66 (448.78–458.20)	–
Nord-ouest	Chlef, Tlemcen, Mascara	39	24	13	1	1
			–	125.35±21.28 (100.58–178.48)	344.99	557.22
Total		84	45	35	3	1
%		100	53.57	41.66	3.57	1.19

Tableau 18: Répartition des niveaux d'AFM₁ selon la taille des exploitations en Algérie.

Taille des exploitations	Nombre d'échantillons	Répartition des niveaux d'AFM ₁ (ng/L)			
		<LOD*	Moyenne ± écart type (intervalle)		
			89–300	301–500	>500
Petite	47	25	19 147.03±43.39 (95.59–231.17)	2 453.49±6.66 (448.78–458.20)	1 557.22 –
Grande	37	20	16 118.09±23.16 (96.87–183.91)	1 344.99 –	0 – –
Total	84	45	35	3	1
%	100	53.57	41.66	3.57	1.19

Tableau 19. Répartition des niveaux d'AFM₁ dans le lait cru en fonction de la saison.

Saison	No. d'échantillons	Répartition des niveaux d'AFM ₁ (ng/L)			
		Moyenne ±écart type (intervalle)			
		<LOD*	89–300	301–500	>500
Hiver	18	10	7 112.40±9.65 (103.91– 178.48)	1 344.69 –	0 – –
Printemps	7	3	2 119.08±5.31 (112.25– 125.67)	2 453.49±6.66 (448.78– 458.20)	0 – –
Été	39	22	17 139.15±23.87 (96.87– 231.17)	0 – –	0 – –
Automne	20	10	9 128.17±18.57 (95.59– 229.20)	0 – –	1 557.22 –
Total	84	45	35	3	1
%	100	53.57	41.66	3.57	1.19

Tableau 20. Analyse des variances des facteurs de risque associés aux taux de positivité de l'AFM₁ dans les élevages de bovins laitiers en Algérie.

Variable	Catégorie	Nb d'échantillo ns	Nb d'échantillo ns positifs (%)	P (χ^2 test)	Echantillons totaux (ng/L) (Moyenne \pm écart type)	P (t/K-W test)
Région	Nord -Est	23	7 (30.43)	0.017	32.94 \pm 11.87	0.013 [*]
	Centre	22	17 (77.27)		152.46 \pm 44.14	
	Nord-ouest	39	15 (38.64)		57.05 \pm 21.67	
Taille des exploitatio ns	Petite	47	22 (46.80)	0.473	90.16 \pm 43.02	0.032 [*]
	Grande	37	17 (45.94)		58.59 \pm 27.44	
Saison	Hiver	18	8 (44.44)	0.381	60.28 \pm 27.38	0.025 [*]
	Printemps	7	4 (57.14)		106.92 \pm 41.92	
	Été	39	17 (43.59)		59.77 \pm 19.65	
	Automne	20	10 (50)		88.79 \pm 25.34	
Total (%)		84 (100)	39 (46.42)	Moyenne Totale (ng/L)	71.92 \pm 28.48	
				Moyenne des échantillons positifs (ng/L)	156.71 \pm 43.15	

Tableau 21. Concentration de l'AFM₁ dans les échantillons de laits cru déterminés par la méthode HPLC-FLD.

Echantillon de lait négatifs à la méthode l'ELISA	Taux d'AFM ₁ (ng/L)
E1	7.32
E2	<LOD
E3	19.2
E4	5.6
E5	3.56
E6	6.4
E7	4
E8	60.4
E9	4.4
E10	4
E11	14.72
E12	15.6

Tableau 22. Niveaux de contamination du lait cru par l'AFM₁ déterminés par la méthode HPLC-FLD.

Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	Moyenne (ng/L)	Ecart-type	Niveaux de concentration (ng/L)
12	91.66	2,67	2,31	3.56-60 .4

III. Discussion

III.1. Présence de l'Aflatoxine B₁ (AFB₁) dans l'alimentation animale en Algérie

L'une des problématiques les plus préoccupantes affectant la sécurité sanitaire et la qualité des céréales et des produits céréaliers est leur contamination par les mycotoxines telles que les aflatoxines (AF: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) (Bennet et Klich, 2003). Cette préoccupation mondiale est directement liée à la présence d'AFM₁, métabolite hydroxylé de l'AFB₁, retrouvée dans le lait et les produits laitiers provenant d'animaux ayant consommé des aliments contaminés par l'AFB₁ (Hussain et al., 2010; Iqbal et al., 2015; Yunus et al., 2019). Du fait de leur toxicité, l'AFB₁ et l'AFM₁ sont classées comme cancérigènes du groupe I par le Centre International de Recherche contre le Cancer (IARC, 2002).

Par conséquent l'impact sanitaire de ces composés a justifié le choix de notre étude dont l'objectif de cette première partie était d'évaluer les niveaux de contamination par l'AFB₁ dans les aliments de bétail destinés aux vaches laitières, ceci au niveau des différentes régions du nord algérien, et d'analyser les facteurs de risques associés à cette contamination.

L'Algérie est un pays méditerranéen dont le climat est caractérisé par une humidité et des températures élevées, ces conditions semblent contribuer à la croissance des champignons toxigènes et à la production de mycotoxines. De plus, chaque année, de grandes quantités de céréales sont importées et aucun contrôle sur le niveau de contamination par ces toxines n'est effectué. Ainsi, afin d'évaluer les niveaux d'exposition à ces contaminants naturels, en Algérie, quelques études se sont intéressées à la recherche des mycotoxines et plus précisément, les aflatoxines, dans les céréales destinées à la consommation humaine. Dans l'étude de Riba et al., 2010, sur les 53 échantillons de blé analysés, 56.6% étaient contaminés à l'AFB₁, avec des concentrations allant de 0.13 à 37.42µg/kg. Ces résultats ont par ailleurs révélé des niveaux de contaminations élevés en aflatoxines et soulignent l'importance de mener davantage d'enquêtes sur la présence de ces toxines dans différentes denrées alimentaires, ceci afin de fournir des données sur l'exposition de la population algérienne aux mycotoxines (Riba et al., 2010).

Concernant l'alimentation animale, la synthèse de la littérature scientifique a révélé qu'aucune donnée sur la contamination de l'alimentation animale par les mycotoxines n'est disponible en Algérie à l'heure actuelle. Une seule étude sur la contamination de l'alimentation animale par *Aspergillus section flavi* a été menée par Bouti et al., 2019. Dans

cette étude 172 isolats (souches) appartenant à la section *Aspergillus flavi* ont été isolés à partir de 57 échantillons d'aliments pour animaux et identifiés sur la base des caractères macro et micro-morphologiques, de production de mycotoxines et de parenté (ressemblance, lien) génétique. Cette étude a démontré que plus de la moitié des isolats (66,3%) appartenaient au chémotype I caractérisé par une production d'AFB₁ et d'acide cyclopiazonique. Ce travail a révélé une fréquence élevée de moisissures toxigènes productrices d'aflatoxines dans les matières premières et dans les aliments pour animaux commercialisés en Algérie. Ceci semble être en concordance avec nos résultats et pourrait expliquer le niveau de contamination élevé par l'AFB₁ retrouvé dans notre travail, imposant ainsi la nécessité d'instaurer un programme national de surveillance de la contamination de l'alimentation animale par l'AFB₁ par les autorités compétentes.

Nos résultats ont montré que quarante et un échantillons d'aliments de bétail (49.4%, N =83) étaient contaminés par l'AFB₁, et que sur les 41 échantillons positifs, 18 (43.90%) ont présenté une concentration en AFB₁ supérieure aux LMR européennes (5µg/kg) (European Commission, 2010) et 14 échantillons (34.14%) ont révélé un niveau de contamination supérieur aux LMR de la FDA (20 µg/kg) (Food and Drug Administration, 2019).

La raison probable de ce niveau de contamination élevé par l'AFB₁ retrouvé dans la présente étude (moyenne totale : 17.59±17.11µg/kg) peut être liée à l'utilisation d'ingrédients alimentaires contaminés. En effet, en Algérie, le maïs est le principal intrant utilisé dans l'alimentation animale suivi du soja, du son de blé et de l'orge (USDA, 2018). Il a ainsi été rapporté que le maïs et les produits à base de maïs sont parmi les céréales les plus favorables à la prolifération des champignons toxigènes et à leur contamination ultérieure par les mycotoxines (Bryden, 2012). Par conséquent, la présence de mycotoxines dans les aliments pour animaux est généralement associée au niveau initial de contamination du maïs par ces toxines (Oliveira et al., 2006).

Contrairement à l'Algérie où les tourteaux de cotons ne sont pas intégrés à la ration alimentaire, d'autres pays, comme le Pakistan, où la culture de coton occupe une place importante dans l'économie du pays, représentant près de 60% de ses exportations (Malik et Ahsan, 2016), ces derniers constituent un ingrédient essentiel utilisé dans l'alimentation animale. En effet, les tourteaux de coton représentent une bonne source de protéines, leur consommation par les bovins laitiers augmenterait leur poids vif ainsi que leur production de lait. Malgré l'importance considérable des tourteaux de coton dans l'amélioration du

rendement des vaches laitières, leur utilisation demeure limitée en raison de leur forte contamination par les aflatoxines. En effet, les tourteaux de coton peuvent contenir des taux élevés d'aflatoxines. Chauhan et al., 2016 ont signalé un niveau de contamination élevé (68%) d'aflatoxine dans les tourteaux de coton. Plus récemment, Shar et al., 2019 ont rapporté que sur les 110 échantillons de tourteaux de coton analysés, 88 (80%) étaient contaminés à l'AFB₁ avec une moyenne de 41 (µg/kg). D'autres auteurs ont expliqué que les tourteaux de coton sont les plus sensibles aux attaques fongiques, en raison de leur richesse en protéines et en lipides, ce qui en fait des ingrédients fortement contaminés aux aflatoxines (Akbar et al., 2019)

D'autres auteurs se sont intéressés à la présence de l'AFB₁ dans les tourteaux de tournesol. En Tanzanie, Mohammed et al., 2016 ont recherché l'AFB₁ sur des échantillons d'aliments de bétails constitués de tourteaux de tournesol. Sur les 20 échantillons analysés, 65% étaient contaminés à l'AFB₁, avec 61,53% des échantillons contaminés dépassant les LMR établies par l'Union Européenne (5 µg/kg). Cette étude a révélé que les niveaux de contamination par l'AFB₁, différaient d'une région à une autre. En effet, la moyenne de contamination la plus basse ($2,34 \pm 0,47$ µg/kg) a été signalée dans une région où les bonnes pratiques de stockage étaient respectées. Alors que des niveaux de contamination plus élevés (8.48 ; 8.80 ; 11.19 ; 11.96 µg/kg) ont été rapportés dans les autres régions, les auteurs ont expliqué ces résultats par l'absence d'installations adéquates pour le stockage des aliments, en effet, les éleveurs s'approvisionnaient au niveau des marchés de gros, pendant la saison où le coût des aliments est bas, et les stockaient pendant de longues périodes. D'autres pratiques ont également été signalées par les auteurs, où les agriculteurs mélangeaient le son de maïs aux tourteaux d'arachides, sans se soucier de la qualité des aliments. Les auteurs ont également rapporté que la plupart des agriculteurs n'étaient pas sensibilisés au risque mycotoxique et de son impact sur la santé animale et humaine.

Cette moyenne de contamination élevée enregistrée durant la présente enquête pourrait avoir une influence directe sur la santé des animaux. En effet, plusieurs études ont signalé que l'ingestion d'aliments contaminés par l'AFB₁ entraînerait une diminution de la résistance aux maladies infectieuses chez les animaux, une baisse de la production de lait, une détérioration de la qualité du lait ainsi que des avortements (Whitlow et Heagler, 2004 ; Akande et al., 2006).

Les résultats de notre étude sont similaires à ceux obtenus en Tunisie, où une moyenne de contamination par l'AFB₁ de 18.98 +/- 16.30 (µg/kg) a été retrouvée, avec 85.7% (N=21) des échantillons de maïs analysés contaminés par les AFT (Aflatoxines Totales) et seulement 27.8% contenaient l'AFB₁ (Jedidi et al., 2016). De même, Une autre étude menée également en Tunisie, a enregistré un niveau moyen de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ de 18.66 +/- 1.4 (µg/kg). Aussi, 31 échantillons (53.44%) dépassaient les LMR établies par l'Union Européenne (5 µg/kg) (Abbès et al., 2012). Ces résultats similaires pourraient s'expliquer par le fait que la Tunisie et l'Algérie sont des pays méditerranéens dont le climat est caractérisé par des températures chaudes, une humidité élevée et une pluviométrie faible, ces conditions pourraient ainsi favoriser la croissance des moisissures toxigènes.

La concentration moyenne en AFB₁ dans les échantillons d'aliments pour animaux analysés dans la présente étude se rapproche de celle obtenue en Iran où une moyenne de 26.4 µg/kg et un niveau de contamination de 100% (N=40) des échantillons étudiés ont été rapportés. La raison probable de cette incidence élevée en aflatoxines est probablement due à l'utilisation du maïs contaminé dans l'alimentation animale, en effet, 80% du maïs produit en Iran est destiné à la consommation animale (Eskandari et Pakfetrat, 2014). Par ailleurs, plusieurs études menées dans les principales provinces d'Iran ont signalé une concentration élevée en AF dans des échantillons de maïs destinés à la consommation animale et humaine (Karami-Osboo et al., 2011 ; Ghiasian et al., 2011).

Nos résultats peuvent également s'expliquer par les observations faites sur le terrain, en effet, le manque d'installations appropriées pour le stockage des aliments, l'entreposage des sacs d'aliments ouverts à même le sol, l'insuffisance du contrôle par les autorités sanitaires, ont été constatés durant notre étude.

Malgré une moyenne élevée de contamination par l'AFB₁ enregistrée dans la présente étude, nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus au Brésil par Franco et al., 2019, où, une moyenne de 100 µg/kg a été rapportée, avec 13% d'échantillons d'aliments pour animaux contaminés par l'AFB₁ (N= 45) à des niveaux de concentration allant de 8.7 – 390 µg/kg. Par ailleurs, 4 échantillons d'aliments de volailles, et 2 échantillons d'aliments de vaches laitières avaient dépassé les LMR établies par la directive 2002/32 / CE. De même, plusieurs études réalisées dans d'autres pays d'Amérique latine, ont signalé une prévalence élevée d'aflatoxines dans le maïs fraîchement récolté et stocké (Garrido et al., 2003). Plus récemment Costamagna et al., 2019 ont rapporté que 81,3% des échantillons d'aliments de

bétail analysés étaient contaminés par l'AFB₁, avec 19% des échantillons dépassant les LMR établie par l'UE (5 µg/Kg). Il nous semble important de souligner que l'Argentine et le Brésil se sont placés parmi les deux premiers exportateurs de maïs vers l'Algérie pour les années 2015-2016-2017-2018-2019. En effet, l'Argentine et le Brésil représentent, respectivement, 88.4% et 7.1% de la quantité totale de maïs importé destiné à l'alimentation animale pour l'année 2019 (Direction Générale des Douanes, 2019). Ainsi, les concentrations élevées en AFB₁ retrouvées dans notre étude pourraient s'expliquer en partie, par les pays de provenance du maïs, ici l'Argentine et le Brésil, où plusieurs rapports, ont révélé que les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées dans cette céréale sont les aflatoxines (Jager et al., 2013; Souza et al., 2013). Il convient également de noter, que les longs itinéraires d'expédition peuvent constituer un risque de développement de champignons aflatoxinogènes, surtout dans les situations où les contrôles au débarquement sont insuffisants (Tantaoui-Elaraki et al., 2018).

En Chine les moyennes de contamination par l'AFB₁ dans le maïs destiné à l'alimentation animale étaient de 44.5-65.7-28.4 (µg/kg) respectivement pour les années 2012, 2013, 2014. Ces résultats sont nettement supérieurs aux nôtres, sauf pour l'année 2014 (28.4 µg/kg) et pourraient s'expliquer par le fait que la région centre de Chine est caractérisée par un climat chaud et humide avec de fortes précipitations propices à la croissance des moisissures toxigènes et à la formation de mycotoxines (Liu et al., 2016).

Des résultats nettement inférieurs aux nôtres ont été obtenus en Iran avec un niveau moyen de contamination par l'AFB₁ de 0.48 µg/kg et de 0.88 µg/kg respectivement dans l'orge et le son de blé destinés à l'alimentation animale (Beheshti et Asadi, 2014). Une telle différence pourrait être liée aux conditions de stockage des aliments plus appropriées que ce qui a été observé dans notre étude. Cependant, il convient de noter que, la contamination par l'AFB₁ dans le blé et l'orge semble se produire occasionnellement, toutefois cette constatation n'empêche pas d'instaurer un contrôle et une surveillance de l'AFB₁ dans ce type de céréale (Mateo et al., 2011 ; Jedidi et al., 2016).

À Taiwan, pays asiatique caractérisé à la fois par un climat tropical et subtropical, une récente enquête a été réalisée sur les niveaux de contamination de l'alimentation animale par les mycotoxines. Sur 820 échantillons d'aliments de bétail analysés, 58% étaient contaminés par l'AFB₁, une moyenne de 1.2 µg/kg a été enregistrée. Bien que ces résultats soient inférieurs à ceux de notre travail, les auteurs soulignent que 91,3% des échantillons étaient contaminés par plusieurs mycotoxines (aflatoxines, zéaralénone, fumonisines,

désoxynivalénol, ochratoxine A). Cette multi-contamination par les mycotoxines dans l'alimentation animale engendre des effets graves sur la santé des animaux en raison de l'action synergétique entre les mycotoxines (Pierron et al., 2016). Par ailleurs, les conditions météorologiques extrêmes telles que la sécheresse et les pluies excessives semble augmenter considérablement la prévalence de la contamination multiple par les mycotoxines en Asie (Yang et al., 2019).

Afin de mieux élucider les phénomènes de multi-contamination par les mycotoxines du maïs cultivé au nord de l'Italie, et de comprendre les phénomènes de croissance fongique en cas de la coprésence de plusieurs espèces de moisissures et leur impact sur la multi-contamination par les mycotoxines, une équipe de recherche a contaminé artificiellement des champs de maïs avec plusieurs souches toxigènes d'*Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* et *Fusarium graminearum*. Ce travail a révélé que l'incidence d'*Aspergillus flavus* et la production d'AFB₁ étaient plus élevées au cours de l'année 2017. En effet, en 2017 les températures enregistrées durant cette enquête étaient plus élevées qu'en 2016, aussi, l'année 2017 était considérée comme étant une année sèche (Giorni et al., 2019). Ceci a largement influencé l'apparition d'*Aspergillus flavus* en effet, la littérature rapporte que cette moisissure préférait les conditions climatiques chaudes et sèches (Obradovic et al., 2018). Cette étude a démontré que dans les cultures de maïs inoculées avec les souches de moisissures précédemment citées, l'incidence d'*A. flavus* a diminué de 10% lorsque ce dernier était inoculé avec *F. verticillioides*, alors que son incidence lors de l'inoculation avec *F. graminearum* n'a pas été affectée. Ces observations ont également été confirmées par un plus faible niveau de contamination par l'AFB₁ lors de la co-inoculation avec *F. verticillioides*. Dans les conditions météorologiques de cette étude, il est intéressant de noter qu'une augmentation des niveaux d'aflatoxines au niveau des champs de maïs a été enregistrée lors d'une $A_w \leq 0,95$, ce phénomène a été signalé dans les cultures co-inoculées avec *A. flavus* et *F. graminearum*. Les auteurs ont interprété ce phénomène par une bio-compétition entre les deux moisissures, où *F. graminearum* aurait engendré des conditions de stress augmentant considérablement la synthèse d'AFB₁ par *A. flavus* (Giorni et al., 2019).

Durant notre enquête, l'analyse des échantillons d'aliments dont la LOD était inférieure à celle de la méthode ELISA, a été confirmée par la méthode HPLC-FLD (LOD de la méthode HPLC est de 0.06 ng/ml), où des niveaux de contaminations très faibles allant de 0.08 à 0.30 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ont été obtenus, ainsi qu'une moyenne de $(0,137 \pm 0,020 \mu\text{g}/\text{kg})$ (**Tableau 15 et 16**). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la taille des échantillons finals

destinés à être confirmés par HPLC, a été réduite à 200 g, ceci pour des raisons de transport aérien. Ce qui a probablement impacté négativement la qualité de nos prélèvements, en effet, les mycotoxines se répartissent de manière inégale dans un échantillon et ont tendance à être concentrées dans certains endroits, que l'on appelle les «foyers sensibles» alors que le reste de l'échantillon est exempt de toxines. Ceci est probablement dû au fait que les moisissures toxigènes ne poussent pas uniformément au champ ou dans les silos de grains. Toutes ces constatations pourraient expliquer le fait que des niveaux de contaminations si bas ont été retrouvés dans les échantillons confirmés par la méthode HPLC-FLD (Richard, 2005).

Dans la présente étude, la répartition géographique des niveaux de contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ (**Tableau 11**) a montré que la moyenne de contamination était de 18.84±16.57, 14.19±13.95, 11.82±10.27, (µg/kg), respectivement pour la région centre, nord-est et nord-ouest, ceci pourrait s'expliquer par les conditions climatiques des différentes régions étudiées. En effet, l'Algérie est un pays méditerranéen dont le climat est caractérisé par des températures chaudes et une humidité élevée. Selon l'Office National de la Météorologie, les années 2016-2017 étaient caractérisées par un été très chaud, une sécheresse sévère, un automne chaud et un manque de pluies durant la saison hivernale dans la plupart des régions d'Algérie. Benbrook, 2005 a rapporté que les champignons produisent très souvent des mycotoxines en réponse au stress causé par des conditions environnementales extrêmes. De plus, il a été rapporté que la sécheresse sévère peut augmenter le risque de contamination par l'aflatoxine (Cotty et Jaime-Garcia, 2007). Ces informations doivent être considérées avec une attention particulière, car il semblerait que les conditions climatiques enregistrées en Algérie soient favorables à la croissance des moisissures toxigènes contaminant les graines de céréales et produisant leurs mycotoxines à la fois au champ et pendant le stockage.

Le changement climatique a été reconnu comme étant un événement accentuant les problèmes émergents liés à la sécurité sanitaire des denrées alimentaires et des aliments pour animaux à travers le monde (Lake et al., 2012 ; Wheeler et Von Braun, 2013). L'impact de ce changement climatique sur la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux est très préoccupant. Selon une étude, l'AFB₁ devrait constituer un danger pour la sécurité sanitaire du maïs européen, en particulier dans le scénario qui prévoit une augmentation de la température de +2°C au niveau du continent européen. Ce scénario de changement climatique semble être le plus probable et le plus attendu pour les prochaines années. De plus, cette étude a mis l'accent sur la possibilité d'augmentation des expositions

chroniques aux aflatoxines par les populations humaines et animales .De plus, différents auteurs ont signalé que le changement climatique est responsable de l'apparition d'aflatoxines dans des régions où ces dernières n'avaient pas été détectées auparavant (Kos et al., 2013 ; Pleadin et al., 2015 ; Vita et al., 2016)

D'après des scénarios prévus pour la région méditerranéenne, des températures supérieures à 30°C devraient être enregistrées, ce qui pourrait être favorable à la production d'AFB₁ par *Aspergillus flavus*. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont rapporté que les niveaux de contamination par l'AFB₁ dans les pays méditerranéens étaient souvent plus élevés par rapport à ceux des pays d'Europe centrale et septentrionale (Binder et al., 2007). Une étude menée en Tunisie a indiqué que 37°C était la température optimale pour la production d'AFB₁ par *Aspergillus flavus* (Lahouar et al., 2016). En effet, la situation en Algérie semble être compatible avec ces scénarios météorologiques. Il est ainsi intéressant de signaler que le risque de contamination des céréales par les mycotoxines pourrait s'accroître dans les années à venir en région méditerranéenne.

En Serbie, l'un des plus grands producteurs et exportateur de maïs en Europe, dont le climat est décrit comme continental modéré, des changements importants des conditions climatiques ont été enregistrés ces dernières années. Les années 2012 et 2013, ont été caractérisées par une prévalence élevée des aflatoxines dans le maïs, ceci a entraîné «une crise des aflatoxines» qui sévit toujours dans ce pays. Kos et al.; 2018, ont recherché les aflatoxines dans 3000 échantillons de maïs sur une période de cinq ans (2012-2016), les résultats de cette enquête ont montré un prévalence de contamination de 72.3%, 24.7%, 36.7%, 5%, respectivement pour les années 2012, 2013, 2015 et 2016. Alors que durant l'année 2014, aucun échantillon de maïs n'était contaminé aux aflatoxines. Des moyennes de contaminations par les aflatoxines de (37.4±26.2 ; 13.4±16.4 ; 9.9±14.3 ; 3.1±1.4 µg/kg) ont été obtenues, respectivement pour les années 2012, 2013, 2015, 2016. Ces moyennes élevées de contamination par les aflatoxines, pourraient s'expliquer par les conditions météorologiques enregistrées durant les années 2012-2016, en effet, des températures élevées (30-35°C) ainsi qu'un taux de pluviométrie faible, ont été signalés durant la période d'avril à septembre 2012, période de croissance du maïs. Des conditions particulièrement chaudes et sèches ont également été enregistrées durant la période de juin à août 2012, ce qui a endommagé plus de la moitié des cultures de maïs. De plus, la rareté des précipitations a engendré un stress hydrique aux cultures de maïs qui habituellement consomment de grandes quantités d'eau. Il est à noter que ces conditions météorologiques extrêmes, ont entraîné

l'apparition de divers ravageurs. En raison de la rareté de l'eau et de l'apparition d'insectes ravageurs, le maïs était particulièrement sensible à l'infection par différents champignons, augmentant ainsi la probabilité de contamination par les mycotoxines. Contrairement aux conditions météorologiques chaudes et sèches durant les années 2012 et 2013, l'année 2014 était marquée par un taux de précipitation élevé ainsi que des températures plus douces, ces paramètres ont été associés à une augmentation de la quantité d'humidité dans le grain. Ceci a entraîné des conditions défavorables pour la croissance des espèces d'*Aspergillus* et la synthèse des aflatoxines, ces observations expliqueraient que durant l'année 2014 aucun échantillon de maïs n'était contaminé aux aflatoxines (Kos et al., 2018). Selon d'autres auteurs, cette prévalence élevée des aflatoxines dans le maïs a été responsable du transfert de ces toxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale. Ainsi, la présence d'aflatoxines a été signalée dans 38,7% des échantillons d'ensilage de maïs et 37,0% des échantillons d'aliments concentrés (Lević et al., 2013). Par ailleurs, ce niveau de contamination élevé en aflatoxines a eu un impact direct sur l'occurrence de l'AFM₁ dans le lait et les produits laitiers, où Mioćinović et al., 2017 ont rapporté que 58,3% des échantillons de lait cru et 76,3% des échantillons de produits laitiers, analysés ont été contaminés par l'AFM₁. Cette «crise d'aflatoxines» a eu des conséquences directes sur l'économie du pays, où une baisse de la consommation du lait et des produits laitiers a été constatée, ainsi qu'une perte comprise entre 100 et 125 millions d'euros (Radović et Keković, 2014). Toute cette situation, a révélé les défaillances du système de contrôle alimentaire, ainsi que la faiblesse de la réglementation de ce pays (Brankov et al., 2013).

Tous les travaux précédemment cités s'accordent sur le fait que la synthèse des mycotoxines soit étroitement liée aux conditions climatiques. Une enquête récente conduite en Italie a étudié la corrélation entre les niveaux d'AFB₁ dans l'alimentation animale et les facteurs climatiques. Pour se faire, 919 échantillons d'aliments pour animaux ont été examinés pour la recherche de l'AFB₁ sur une période de 5 ans (2010 à 2014). Les résultats de cette étude ont démontré que seulement 0.76% des échantillons n'étaient pas conformes aux teneurs maximales fixées par la réglementation de l'Union européenne. Les auteurs ont également rapporté que ces niveaux de contamination bas pourraient être expliqués par le respect des bonnes conditions de stockage, surtout au niveau des exploitations animales où les aliments sont produits au sein même de ces fermes. Les moyennes annuelles de contamination par l'AFB₁ ont été classées selon l'ordre décroissant suivant : 2012 > 2010 > 2011 > 2013 > 2014. En effet, durant cette étude, une faible humidité combinée à une température élevée a

été observée pour les années 2011-2012, ce phénomène pourrait avoir exercé un stress pour les moisissures, ce stress a contribué potentiellement à l'augmentation de la production d'AFB₁ par rapport à 2014. Une variabilité saisonnière a également été observée pour la contamination en AFB₁ où une moyenne de contamination prédominante durant l'hiver 2013 a été observée par rapport aux autres saisons (Vita et al., 2016).

Dans notre étude, nous avons constaté que dans les petites exploitations (nombre de vaches laitières ≤ 40) les bonnes pratiques de stockage n'étaient pas respectées. En effet, dans ce type d'élevage, l'absence de salle de stockage ainsi que l'entreposage des sacs d'aliments ouverts à même le sol ont été observés, ceci pourrait expliquer les taux de contamination élevés enregistrés au niveau des petites exploitations ($17.32 \pm 14.57 \mu\text{g/kg}$) par rapport aux exploitations de plus grande taille ($12.89 \pm 11.26 \mu\text{g/kg}$). Nos observations sur le terrain sont confortées par celles d'une étude qui a révélé des niveaux de contamination en AFB₁ plus élevés dans les sacs d'aliments de vaches laitières ouverts (Mongkon et al., 2017). Ceci pourrait être lié aux conditions de stockage et à la composition physico-chimique des aliments telle que la teneur en humidité, mais aussi à une plus grande quantité d'air transféré dans les sacs ouverts par rapport aux sacs d'aliments fermés (Mongkon et al., 2017). En effet, l'AFB₁ peut être synthétisée par certaines moisissures aflatoxinogènes pouvant facilement se développer dans les aliments qui possèdent une Aw comprise entre 13% et 18% ainsi qu'une humidité environnante allant de 50% et 60% (Unusan, 2006).

Il a en effet été observé une augmentation des taux de contaminations par l'AFB₁ pendant le stockage, ceci pourrait être causé par la croissance de moisissures toxigènes dans les aliments pour animaux lorsque ceux-ci étaient conservés dans un endroit humide et à une température optimale au développement de l'AFB₁. De plus, des auteurs ont signalé que des échantillons de maïs stockés pendant plus de six mois contenaient un taux de contamination par l'AFB₁ supérieur à $20 \mu\text{g/kg}$ (Kaaya et Kyamuhangire, 2006). En Thaïlande, cinq différentes catégories d'aliments concentrés pour vaches laitières (CC1-CC2-CC3-CC4-CCD) ont été analysés pour la recherche de l'AFB₁ avant et après stockage, les niveaux moyens de contamination de CC1-CCD étaient respectivement avant stockage de 5.1, 4.1, 4.0, 4.2, 4.2 ($\mu\text{g/kg}$), après un mois de stockage la moyenne de contamination était de 9.7, 6.5, 9.8, 13.3, 20 ($\mu\text{g/kg}$). Cette étude a ainsi démontré une augmentation d'environ 2 à 3 fois les niveaux de concentrations initiaux en AFB₁ après seulement un mois de stockage (Mongkon et al., 2017).

La saison exerce un impact majeur sur la croissance fongique et la production d'aflatoxines. Notre étude a démontré que les niveaux de contamination en AFB₁ étaient plus élevés en hiver par rapport aux autres saisons (**Tableau 14**), des résultats similaires aux nôtres ont été obtenus par Ismail et al., 2017 au Pakistan, où des concentrations plus élevées en AFB₁ en hiver que pendant les autres saisons ont été enregistrées. Ceci pourrait être lié d'une part, aux conditions environnementales favorables à la production d'aflatoxines ainsi qu'à la durée de conservation des aliments qui semble être plus longue en hiver. D'autre part, pendant l'hiver les vaches laitières sont gardées à l'intérieur des étables et nourries avec des aliments concentrés ou de l'ensilage stockés dans des conditions inadéquates (Asi et al., 2012). En effet, plusieurs travaux ont démontré que les fourrages frais sont moins sujets à la contamination par l'AFB₁ que les aliments commerciaux (Ashraf et Asif ., 2013 ; Bilandžić et al., 2014).

Contrairement à nos résultats, l'enquête d'Akbar et al., 2020 conduite au Pakistan, a démontré que le niveau de contaminations des aliments destinés aux vaches laitières par l'AFB₁ était plus élevé au printemps comparé aux autres saisons. Ces auteurs ont également rapporté que sur 240 échantillons d'aliments, 94% avaient dépassés les LMR pour l'AFB₁ fixées par la FDA (20µg/kg), une moyenne de contamination par l'AFB₁ de 43 µg/kg a également été obtenue. Au Pakistan, la variation de la contamination des aliments par les aflatoxines est liée à l'humidité et à la saison des pluies (en particulier la mousson chaude). Ainsi, les données de cette étude ont montré que la saison des pluies (allant de juin à septembre) avait affecté le niveau de contamination des cultures par l'AFB₁, en particulier le maïs et le coton. En effet, il a été rapporté que le maïs récolté pendant la saison humide avait un niveau d'AFB₁ plus élevé (66,4 g/kg) que celui récolté en saison sèche (37 µg/kg). Pendant la période hivernale, les animaux sont gardés à l'étable et nourris avec le maïs déjà endommagé, récolté durant la saison des moussons et stocké pendant plusieurs mois, ce qui s'est traduit par une moyenne de contamination du lait par l'AFM₁ plus élevée durant l'hiver (Akbar et al., 2020).

Il convient de signaler que les différences entre les prévalences de contamination par l'AFB₁ dans l'alimentation animale, rapportées dans les différents travaux précédemment cités, dépendent d'un certain nombre de facteurs. Ces facteurs sont, les différences dans la composition des aliments, le type de matières premières utilisées, la présence d'insectes endommageant les céréales utilisées dans les préparation des aliments pour animaux, les conditions de stockage (Thompson et Henke, 2000 ; Moss, 2002), les zones géographiques et

les conditions climatiques (Dersjant-Li et al., 2003). Plus importants encore, le schéma d'échantillonnage et la préparation des échantillons sont un outil important qui joue un rôle essentiel dans l'intégrité des résultats (Rashid et al., 2012).

La prévalence mondiale des mycotoxines dans l'alimentation animale a fait l'objet de plusieurs enquêtes menées par différents groupes de recherche (Streit et al., 2013; Pinotti et al., 2016; Abudabos et al., 2017). Néanmoins, la prévalence des mycotoxines masquées dans l'alimentation animale demeure incertaine, en effet, des recherches récentes ont prouvé la coexistence de mycotoxines masquées avec les mycotoxines libres. Ces mycotoxines masquées ou modifiées sont produites par les moisissures ou font partie du mécanisme de défense des plantes infestées par les moisissures toxigènes. De plus ces mycotoxines masquées sont inactives et demeurent indétectables par les techniques analytiques conventionnelles. Toutefois, dans certains cas elles peuvent être reconverties en mycotoxines libres dans le tractus gastro-intestinal des animaux, ce qui représente un risque potentiel pour la santé humaine et animale (Berthiller et al., 2009, 2013; Vendl et al., 2009).

Bien que notre étude sur les niveaux de contamination de l'alimentation animale par l'AFB₁ demeure une enquête limitée, nos résultats mettent en évidence la nécessité d'instaurer un contrôle régulier des niveaux d'aflatoxines dans les céréales et les aliments pour animaux. Aussi, notre enquête souligne l'importance d'améliorer les conditions de stockage des aliments pour animaux et d'organiser des campagnes de sensibilisation auprès des producteurs laitiers sur les risques sanitaires des aflatoxines chez l'homme et l'animal. Une attention particulière doit également être accordée aux pratiques agronomiques, aux conditions climatiques, à la production et au stockage d'aliments pour animaux. En effet, le marché des céréales en Algérie est fortement dépendant des importations où pratiquement tout le maïs importé est destiné à la consommation animale. Ainsi, il nous semble important de signaler que la provenance des céréales de différents pays, et leur transformation et utilisation dans des pays aux conditions climatiques différentes peut influencer la production de mycotoxines.

Par ailleurs, notre travail souligne l'importance et la nécessité, pour les autorités sanitaires algériennes, d'établir une réglementation visant à définir les LMR des mycotoxines dans l'alimentation animale.

III. 2. Présence de l'AFM₁ dans le lait cru collecté en Algérie

Le lait joue un rôle central dans l'alimentation humaine, grâce à ses qualités nutritionnelles exceptionnelles qui couvrent les besoins quotidiens et apporte de nombreux nutriments essentiels tels que glucides, lipides, protéines, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments essentiels (Ellen et al., 2013) . Parmi les contaminants toxiques qui peuvent être présents dans le lait, L'AFM₁ est considérée comme la toxine naturelle la plus cancérigène qui contamine le lait et les produits laitiers.

À la suite de l'étude bibliographique, il est clairement apparu que l'AFM₁ constitue une menace sérieuse pour la santé humaine, partant de ces constats, l'objectif de cette partie de notre étude était d'évaluer les niveaux de contamination par l'AFM₁ dans le lait cru collecté dans différentes régions en Algérie.

En Algérie, à ce jour, peu d'informations sur la contamination du lait par l'AFM₁ sont disponibles, en effet, une seule étude a été publiée dans ce sens. Cette étude a concerné uniquement la wilaya de Constantine (dans le nord-est du pays), où, l'AFM₁ a été détectée dans 5 (11%) des 47 échantillons testés, à des niveaux allant de 9 à 103 ng/L, avec seulement un échantillon dépassant la limite de 0,050 µg/kg fixée par l'UE (Redouane-Salah et al.,2015). Les résultats de ce travail sont nettement inférieurs à ceux retrouvés dans la présente enquête, où un taux contamination par l'AFM₁ de 46,42% a été obtenu (niveaux d'AFM₁ supérieurs à 0,050 µg/kg limite UE), avec une moyenne totale de 71,92 ± 28,48 ng/L (**Tableau 17**). Cette différence entre les résultats des deux enquêtes peut s'expliquer par le nombre d'échantillons prélevés plus élevé dans notre travail (n=84), sur différentes régions et pendant plusieurs saisons.

De plus, cette moyenne de contamination élevée par l'AFM₁ obtenue dans notre étude, pourrait être due à la consommation par les vaches laitières, d'aliments contenant l'AFB₁. En effet, durant notre travail un niveau élevé de contamination par l'AFB₁ a été enregistré (17.59±17.11 µg/kg). Bien que les ruminants soient généralement plus résistants aux mycotoxines que la plupart des animaux monogastriques en raison de la capacité de détoxification partielle des microorganismes du rumen, une étude *in vitro* a montré que la dégradation des aflatoxines dans le rumen était inférieure à 10% pour les niveaux de contaminations en AFB₁ entre 1 et 10 µg/mL. Il a été démontré qu'environ 0,5 à 5% d'AFB₁ sont transférés dans le lait sous forme d'AFM₁ (Nachtmann et al., 2007 ; Prandini et al., 2009), par ailleurs l'AFM₁ reste détectable dans le lait pendant 3 jours jusqu'à sa disparition dans les 4 jours suivant le retrait des aliments contaminés.

Le taux de transfert de l'AFM₁ dans le lait dépend de différents facteurs nutritionnels et physiologiques, tels que le régime alimentaire, les niveaux d'ingestion et de digestion, l'état de santé des vaches laitières, la capacité de la biotransformation hépatique et la période de lactation. Il varie aussi d'un animal à l'autre et d'une traite à l'autre (Fink-Gremmels, 2008 ; Duarte et al., 2013; Picinin et al., 2013). Jouany et Diaz, 2005 ont rapporté que le transfert moyen d'AFB₁ de l'alimentation vers l'AFM₁ dans le lait est de 1,7%. Sur cette base, les auteurs ont calculé que seulement 30 µg/kg d'AFB₁ dans l'alimentation donneraient 0,5 µg/kg d'AFM₁. Certains auteurs ont également signalé que chez les vaches à haut rendement, consommant de grandes quantités d'aliments concentrés, ce niveau de transfert est plus élevé comparativement aux animaux à faible production (proportionnellement 3.8 contre 2.5%) (Veldman et al., 1992). En effet, il a été constaté que lorsque les vaches laitières recevaient une ration alimentaire hétérogène constituée de fourrages et de concentrés, ces dernières vont préférer les particules fines et consommeront donc moins de fibres. Ceci va influencer l'équilibre de la flore bactérienne du rumen entraînant des fluctuations du pH et un ralentissement de la multiplication des bactéries impliquées dans la détoxification des mycotoxines, ce qui va considérablement augmenter le taux de transfert de l'AFM₁ dans le lait (Costamagna et al., 2019).

L'analyse de confirmation par la méthode HPLC-FLD des échantillons présentant une LOD inférieure à celle des kits ELISA utilisés durant notre étude, a révélé que 93.30% (n=13) des échantillons de lait étaient contaminés par l'AFM₁ (LOD de la méthode HPLC pour la recherche de l'AFM₁ est de 0.05 ng/ml) avec une moyenne de 2,67 (ng/L), à des seuils allant de 3.56 à 60.4 (ng/L). Aussi, un seul échantillon a présenté un niveau de contamination supérieur aux LMR fixées par l'Union Européenne (50ng/L). Ces faibles niveaux de contamination retrouvés par la technique HPLC-FLD, peuvent être expliqués par une extraction plus difficile de cette mycotoxine suite à un contact prolongé de l'AFM₁ avec les protéines du lait. En effet, l'affinité de la toxine avec la caséine du lait augmente avec le temps (Khaddor et al., 2003). Nos échantillons de lait cru ont été collectés et congelés pendant une longue période (quelques mois) ce qui, selon nous, a pu affecter le taux de récupération de cette toxine lors de son extraction. Il est remarquable de noter que lorsque des concentrations élevées d'AFM₁ sont présentes dans le lait, la liaison de la toxine aux caséines devient plus forte, conduisant ainsi à une diminution de la récupération de l'AFM₁ pendant l'analyse (Brackett et Marth, 1982). De même, les conditions de contamination naturelles du lait par l'AFM₁ diffèrent des conditions de contaminations artificielles réalisées pendant les expérimentations. En effet, lorsque les échantillons de lait sont enrichis avec cette toxine, une

quantité partielle de l'AFM₁ peut se retrouver sous une forme libre donc facilement accessible aux solvants d'extraction, de ce fait le pourcentage de recouvrement dans ce type de contamination est supérieur à celui de la contamination naturelle (Manetta et al., 2009).

Afin d'évaluer les résultats de la présente étude, il est utile de comparer l'incidence et les niveaux de contamination d'AFM₁ obtenus à ceux rapportés dans d'autres enquêtes menées dans les pays voisins et méditerranéens. Ainsi, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus au Maroc voisin, où une enquête récente menée sur 4 régions différentes du Maroc a montré que sur 67 échantillons de lait (pasteurisés et UHT), 9 (13.4%) étaient contaminés par l'AFM₁, à des niveaux allant de 10 à 77 (ng/L), avec une valeur moyenne globale de $4,46 \pm 14,09$ (ng/L) (Mannani et al., 2021). Un autre travail réalisé également au Maroc, a révélé un taux de contamination par l'AFM₁ de 48 (88,8%) (n= 54) des échantillons de lait pasteurisé a été signalé, à des valeurs allant de 0,001 à 117 ng/L (valeur moyenne de 18 ng/L) (Zinedine et al., 2007). La présence d'AFM₁ dans des échantillons de lait de vache en provenance du sud de l'Italie a été détectée dans 12,3% (n=416) des échantillons testés, avec une valeur moyenne de 37 (ng/L), un seul échantillon présentant une valeur de 52 (ng/L) non conforme à la limite réglementaire établi par l'Union Européenne (De Roma et al., 2017). Une autre étude menée en Italie, a révélé que sur 58 échantillons de lait analysés (lait conventionnel, lait issu de fermes biologiques), l'AFM₁ a été détectée dans 35 échantillons (60.34%). Les niveaux de contamination enregistrés dans les échantillons positifs variaient de 9 à 26 ng/L, avec une moyenne de 16 (ng/L). Aussi, aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée dans les niveaux de concentration d'AFM₁ des deux catégories de produits. Par ailleurs, malgré un taux de positivité élevé, aucun échantillon n'a dépassé les LMR fixées par l'Union Européenne (50ng/L). Les auteurs ont finalement conclu que les données de cette étude ont démontré l'efficacité du processus de contrôle alimentaire réalisé avant la commercialisation du lait, prouvant ainsi que la crise d'aflatoxines qui a caractérisé l'été 2012, où des niveaux de contaminations importants en AFB₁, ont été signalés dans la zone méditerranéenne semble ne pas avoir affecté le niveau de contamination du lait par l'AFM₁ (précédemment discuté dans la première partie de la discussion) (Armorini et al., 2016).

En Macédoine du Nord, l'AFM₁ a été retrouvée dans 42,4% des échantillons de lait, avec un niveau moyen de 14,3 (ng/L). Environ 2,9% des échantillons avaient une concentration en AFM₁ supérieure aux LMR européennes (Dimitrieska-Stojkovi et al., 2016). De même, dans un précédent travail réalisé en Grèce, 91 échantillons de lait (46,5%) ont été contaminés à l'AFM₁ avec une valeur moyenne de 10 (ng/L), seuls 2 échantillons présentaient des niveaux de résidus d'AFM₁ supérieurs aux LMR de l'UE (Tsakiris et al., 2013).

Par ailleurs, notre enquête a révélé une incidence similaire d'AFM₁ à celle rapportée par Bahrami et al., 2016 en Iran, où 54 (84,3%) échantillons de lait cru étaient contaminés par l'AFM₁, avec une moyenne de 59,3 (ng/L). Ainsi, 23 échantillons (35,9%) avaient une concentration en AFM₁ supérieure aux LMR établies par l'UE. Au Liban, une étude a rapporté que 28 (73,6%) (n=38) des échantillons de lait cru examinés, étaient contaminés par l'AFM₁ à un niveau compris entre 2,63 et 126 (ng/L), avec une valeur moyenne de 60,4 (ng/L). Aussi, 21 (60,7%) des échantillons de lait cru ont dépassé les LMR établies par l'UE (Assem et al., 2011).

Dans la présente enquête, les niveaux d'AFM₁ dans 38 des 39 échantillons étaient inférieurs à la limite maximale de résidus établie par la FDA et le Codex Alimentarius (500 ng/L), cette limite a été dépassée dans un seul échantillon (1,19%). Il est cependant intéressant de noter, que le niveau moyen de contamination par l'AFM₁ rapporté dans la présente étude était inférieur à celui retrouvé dans d'autres pays voisins. En effet, en Tunisie, pays méditerranéen qui partage les mêmes conditions climatiques que l'Algérie, sur 112 échantillons de lait cru analysés, l'AFM₁ a été détectée dans 60,7 % des échantillons avec une moyenne de $1,362 \times 10^4$ ng/L, 4,4 % des échantillons avaient un niveau de contamination supérieur à la limite maximale établie par l'Union européenne. Ces niveaux élevés de contamination par l'AFM₁ sont probablement dus aux conditions climatiques de la région qui sont favorables à la contamination de l'alimentation animale par les champignons aflatoxinogènes, ce qui s'est traduit par un transfert d'aflatoxines dans le lait cru (Abbès et al., 2012).

Nos résultats sont également inférieurs à ceux obtenus en Serbie par Tomašević et al., 2015, qui ont analysé 678 échantillons de lait cru durant les années 2013-2014 et ont montré que les niveaux d'AFM₁ dans 56,3% et 24,6% des échantillons dépassaient respectivement les limites maximales fixées par l'UE et les États-Unis, avec une moyenne de contamination par l'AFM₁ de 282 ng/L. Ces résultats peuvent être la conséquence des conditions météorologiques enregistrées durant l'année 2012 en Serbie, caractérisée par des températures élevées, un manque de pluie et une sécheresse prolongée, en particulier pendant la période de croissance et de récolte du maïs de mai à août. Par conséquent, une contamination par l'AFB₁ a été détectée dans 68.5% des échantillons de maïs avec des concentrations extrêmement élevées dans 29.5% des échantillons collectés en 2012, une moyenne de 36.3 µg/kg a été signalée (Kos et al., 2013).

La moyenne de contamination par l'AFM₁ obtenue dans certains pays asiatiques comme le Pakistan, semble être nettement plus élevée que les résultats de la présente étude.

Une étude récente menée au Pakistan a révélé que 53% des échantillons lait prélevés (n=240) au niveau des fermes laitières étaient contaminés à des valeurs supérieures aux LMR fixées par les États-Unis (500ng/L). Une moyenne de contamination de 590 (ng/L) a également été rapportée. Ces niveaux de contamination élevés sont directement liés à la présence d'AFB₁ dans l'alimentation animale, en effet, durant cette étude une moyenne de contamination par l'AFB₁ de 43 µg/kg dans les aliments de bétail a été signalée. Les auteurs ont aussi rapporté que durant leur enquête, et dans le but d'augmenter la production laitière, les éleveurs nourrissaient leur animaux avec du pain ranci, des concentrés, du maïs et des tourteaux de graines de coton, ces aliments sont stockés pendant de longs mois et donnés aux animaux afin de pallier le manque de fourrage pendant la période hivernale (Akbar et al., 2020). Un autre rapport du Pakistan a signalé que l'AFM₁ a été détectée dans 143 (91,7%) des 156 échantillons de lait frais analysés, avec un niveau moyen de 342,2 (ng/L). Dans 125 (80,1%) et 51 (32,7%) prélèvements, la concentration en AFM₁ était supérieure à la limite maximale fixée respectivement par l'Union Européenne et les États-Unis (Asghar et al., 2018).

À l'instar des autres pays asiatiques, l'Inde possède un climat tropical propice au développement des moisissures toxigènes et à la production d'aflatoxines. Dans une récente étude réalisée dans ce pays, des concentrations d'AFM₁ nettement supérieures aux nôtres ont été obtenues. Ainsi, 58% (n= 189) des échantillons de lait cru analysés étaient contaminés par l'AFM₁, avec respectivement 50,8% et 36,5% des échantillons testés avec des teneurs en AFM₁ supérieures aux LMR de l'Union Européenne (50 ng/L) et des États-Unis (500 ng/L). La moyenne des échantillons positifs était de 917 ng/L. Le taux de contamination élevé par l'AFM₁ révélé dans cette enquête est probablement lié à l'alimentation reçue par les bovins laitiers, en effet, plus de 70% de la ration alimentaire de ces animaux est constituée de céréales (maïs, blé) et de tourteaux (arachides, soja, etc.), ces aliments sont sensibles à la synthèse d'aflatoxines par les moisissures toxigènes. Un autre élément important signalé par ces auteurs est que les conditions climatiques chaudes et humides des régions concernées par ce travail sont propices à l'invasion fongique, à la production de mycotoxines, comme les aflatoxines. Par conséquent, si les animaux reçoivent des aliments fortement contaminés par les aflatoxines, la possibilité d'apparition de l'AFM₁ dans le lait sera plus importante. Les facteurs de risques associés à une prévalence élevée par l'AFM₁ ont également été évoqués dans cette étude. Ainsi, l'analyse invariable des facteurs de risque a démontré que les niveaux de contaminations élevés par l'AFM₁ étaient significativement augmentés lorsque les animaux recevaient des aliments concentrés. De même, ces taux de contaminations élevés

étaient associés à un stockage d'aliments concentrés pendant de longues périodes et dans de mauvaises conditions (Patyal et al., 2020).

Dans les pays africains voisins, comme l'Égypte, une étude récente a enregistré des niveaux de contamination du lait cru par l'AFM₁ nettement supérieurs aux nôtres. Tous les échantillons de lait étaient contaminés par l'AFM₁, à des concentrations allant de 20 à 190 (ng/L), avec 70% des échantillons contenant des teneurs en AFM₁ supérieures aux LMR fixées par l'Union Européenne (50 ng/L). Cette enquête a révélé que la population égyptienne, vivant dans la région d'Assiout est exposée à un grave problème de santé publique, surtout en absence d'une réglementation officielle sur la présence de l'AFM₁ dans le lait et les produits laitiers dans ce pays (Abdallah et al., 2019). Une autre étude conduite dans la province d'Aswan en Égypte, a révélé que 49% des échantillons de lait contenaient des niveaux d'AFM₁ allant de 53 à 207 (ng/L), une moyenne de 100,3 (ng/L) a également été enregistrée. Les auteurs ont conclu que les températures élevées (39°C-41°C) et l'humidité élevée (58%-61%) enregistrées dans le sud de l'Égypte, ont probablement augmenté les quantités d'AFB₁ dans l'alimentation animale. Ainsi, l'augmentation de la consommation d'aliments contaminés par l'AFB₁ par les bovins laitiers s'est répercutée par une incidence élevée d'AFM₁ dans le lait. Ces résultats prouvent également que l'AFM₁ peut être considérée comme un danger possible pour les consommateurs des régions sus mentionnées (Zakaria et al., 2019).

La synthèse des différentes enquêtes précédemment citées, nous a permis de constater que les niveaux de contamination par l'AFM₁ dans les pays européens étaient considérablement inférieurs à ceux observés au Moyen-Orient et en Afrique. Ceci pourrait s'expliquer par la mise en œuvre, dans les pays européens, de réglementations spécifiques concernant les niveaux maximaux de contamination par les aflatoxines (Commission européenne, 2010), de procédures d'échantillonnage et de méthodes d'analyses pour le contrôle officiel (Commission européenne, 2006), de contrôle interne des niveaux d'AFM₁ au niveau des laiteries, des mesures de prévention afin d'éviter la contamination de l'alimentation animale par les aflatoxines, ainsi que la production d'aliments pour les bovins laitiers dans le respect des bonnes pratiques de stockage (Tomasevic et al., 2015).

Ces observations indiquent également que les niveaux de contamination par l'AFM₁ dans le lait diffèrent d'un pays à l'autre. Ces variations pourraient être associées aux différentes méthodes analytiques de détection des toxines, à des différences dans la qualité du fourrage et des aliments, au régime alimentaire des vaches, à la situation géographique, au climat et aux variations saisonnières, aux variations génétiques des vaches laitières, aux

systèmes d'élevage et aux conditions de stockage des aliments (Eskandari et Pakfetrat, 2014, Iqbal et Asi, 2013). De plus, la grande variation de la contamination du lait par l'AFM₁ pourrait aussi être liée d'autres facteurs, comme l'espèce animale, le moment de la traite, le niveau de consommation d'AFB₁ et la quantité de lait produite par les mammifères (Assaf et al., 2019).

La présente étude a révélé des variations considérables du taux de contamination par l'AFM₁ dans les échantillons de lait provenant des différentes régions algériennes. Le taux de positivité des échantillons était de 30,43% dans le nord-est, 77,27% dans le centre et 38,64% dans le nord-ouest. Ces variations peuvent être liées à des différences géographiques et climatiques (Rama et al., 2015). Il a été signalé que les températures élevées associées au changement climatique favorisent la contamination par les mycotoxines (Paterson et Lima, 2010). En effet, il semblerait que les variations de température et d'humidité d'un pays à l'autre ou d'une région à une autre d'un même pays influencent les niveaux de contamination par les mycotoxines (Prandini et al., 2009)

De plus, dans la présente étude, les niveaux moyens d'AFM₁ les plus élevés ont été enregistrés au printemps ($106,92 \pm 41,92$ ng/L) et en automne ($88,79 \pm 25,34$ ng / L) (**Tableau 19**). Ces données peuvent être confirmées par le fait que les années 2016-2017 étaient caractérisées par une sécheresse sévère durant l'été, un manque de pluies durant la saison hivernale ainsi qu'un automne chaud dans la plupart des régions algériennes (Office National de la Météorologie, 2017 ; Office National de la Météorologie, 2018). Ces conditions climatiques sont favorables à la croissance des moisissures toxigènes et donc à l'altération des aliments pour animaux (Cotty et Jaime-Garcia , 2007). En effet, selon des études réalisées en Croatie, 33% des échantillons de lait de vache collectés pendant le printemps (Bilandžić et al., 2014) et 9,32% des échantillons recueillis pendant l'automne (Bilandžić et al., 2015) dépassaient les niveaux d'AFM₁ établis par l'UE. De même, notre étude a démontré qu'en automne, les niveaux d'AFM₁ dans un seul échantillon de lait (1,19%) dépassaient la limite maximale fixée par le Codex Alimentarius et les États-Unis (500 ng/L).

Contrairement à nos résultats sur la saisonnalité , Akbar et al., 2020 dans une récente étude menée au Pakistan, ont rapporté que la saison hivernale était plus critique à la contamination du lait par l'AFM₁, avec une moyenne de 680 (ng/L), entraînant une contamination plus élevée à l'AFM₁ durant l'hiver et ainsi qu'un nombre maximal d'échantillons dépassant les LMR des États-Unis (500ng/L). Durant l'hiver, afin de pallier le manque de fourrages verts, les bovins laitiers sont nourris avec des aliments concentrés et des tourteaux de coton achetés durant l'été et stockés durant des mois jusqu'en hiver. Ainsi,

comme expliqué durant la première partie de notre discussion, ces mauvaises conditions de stockage semblent être favorables au développement de moisissures aflatoxinogènes et à la contamination par les aflatoxines. Des résultats contradictoires aux nôtres ont également été retrouvés dans d'autres travaux, en effet, une autre étude conduite également au Pakistan a signalé une moyenne de contamination par l'AFM₁ plus élevée en été que pendant la période hivernale, avec respectivement une moyenne d'AFM₁ dans les échantillons de lait, de 375 ± 15.3 (ng/L) et 253 ± 10.3 (ng/L), durant l'été et la période hivernale. Fait intéressant à rapporter, au Pakistan l'été débute de mai à août, cette saison de mousson est marquée par de fortes pluies ainsi que des températures très élevées pouvant parfois atteindre 45.3°C. Ces conditions climatiques posent évidemment de graves problèmes pour la production d'aliments pour animaux. Par ailleurs, plusieurs auteurs rapportent que les climats chauds et humides sont favorables à la croissance fongique et à l'altération des céréales et des aliments pour animaux, en effet, les variations saisonnières enregistrées dans cette étude avaient tendance à accroître la contamination par les aflatoxines durant l'été (Asghar et al., 2018).

Plusieurs études s'accordent sur le fait que l'AFM₁ résiste aux différents traitements thermiques utilisés dans les procédés de transformation du lait telle que la pasteurisation et l'ultra- haute température (Galvano et al., 1996; Martins et Martins , 2000; Park, 2002). De plus, l'étude d'Oruc et al., 2006 a démontré que le niveau de contamination par l'AFM₁ est resté constant pendant la période d'affinage du fromage. Le fromage pourrait être considéré comme l'un des produits laitiers les plus concernés par la contamination à l'AFM₁ (Bahrami et al., 2016). En effet, cette mycotoxine a une faible affinité pour la fraction lipidique et une forte affinité pour la caséine du lait, ce qui favorise son passage dans le caillé plutôt que dans le lactosérum (Galvano et al., 1996; Hassan et Kassaify, 2014). Cette hypothèse est soutenue par plusieurs études comme celle d'Ismail et al., 2020 qui ont enregistré une concentration d'AFM₁ plus élevée dans les échantillons de fromage (Karish) par rapport aux échantillons lait cru, ce qui indique clairement l'affinité de l'AFM₁ pour la fraction caséique du lait. L'augmentation des niveaux de concentration d'AFM₁ dans le fromage dépend de plusieurs paramètres comme le type de fromage, le degré de contamination initial du lait, les procédés de fabrication et la quantité d'eau éliminée pendant le processus de fabrication (Iqbal et Asi, 2013).

D'autres travaux ont obtenu des résultats contradictoires concernant le taux de distribution de l'AFM₁ entre le lactosérum et le caillé. En effet, ces auteurs ont enregistré un pourcentage plus élevé d'AFM₁ transféré dans le lactosérum que le caillé lors de la fabrication du fromage (Pietri et al., 2016). Cette différence pourrait être due à un facteur important qui

est l'utilisation de lait naturellement ou artificiellement contaminé par l'AFM₁ en fromagerie. En effet, lors d'une contamination naturelle, ce critère permet de reproduire fidèlement l'action de l'AFM₁ sur les différents types de fromage. Par ailleurs, le taux de transfert de l'AFM₁ du lait vers le fromage est plus élevé dans les fromages à pâte dure que dans les fromages à pâte moelle (Pecorelli et al., 2020).

Dans le but d'étudier la distribution et la stabilité de l'AFM₁ dans un fromage frais traditionnel brésilien, Fernandes et al., 2012 ont contaminé artificiellement 40 L de lait cru avec une solution standard d'AFM₁, à différentes concentrations. Chaque 10 L de lait ont été enrichis avec une solution d'AFM₁ de 0,250 ng/ml, 0,500 ng/ml, 0,250 ng/ml inoculés avec une culture de *Lactococcus lactis spp. lactis* et *Lactococcus lactis spp. cremoris* et, 0,500 ng/mlensemencés par ces mêmes bactéries lactiques. Le fromage frais a par la suite été fabriqué et les niveaux d'AFM₁ ont été quantifiés dans tous les fromages obtenus. Les résultats de cette étude ont montré que le pourcentage de transfert de l'AFM₁ du lait vers le fromage était respectivement de 42,26 % et 38,51% dans le lait traité avec 0,250 et 0,500 (ng/ml) d'AFM₁. Dans les autres lots de lait enrichis avec 0,250 et 0,500 ng/ml d'AFM₁ etensemencés de ferments lactiques, des taux de transfert d'AFM₁ du lait au fromage étaient respectivement de 30,64 % et 34,91%. Ainsi, l'utilisation de ferments lactiques n'a pas influencé le transfert d'AFM₁ du lait au fromage. Au 30^{ème} jour du stockage, le niveau de contamination par l'AFM₁ était 2,14 à 2,60 fois plus élevé que les niveaux d'AFM₁ dans le lait initialement contaminés. Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène de concentration de la toxine dans le fromage.

Il est important de noter que la réglementation européenne n'a fixé aucune LMR pour la présence de l'AFM₁ dans les produits laitiers. Cependant, l'article 2 du règlement de la commission européenne N° 1881/2006 (Commission européenne, 2006) définit un facteur spécifique de concentration ou de dilution, ce facteur est un paramètre important qui doit être établi afin d'évaluer le niveau maximal de contaminants dans les denrées alimentaires séchées, diluées, transformées et/ou composées ceci dans le but d'assurer une protection maximale de la santé humaine. Les données recueillies à partir de nombreuses études, ont démontré que les facteurs de concentration différaient selon le type de fromage (pâte molle, pâte dure), ces études s'accordent sur le fait que les facteurs de concentration étaient plus élevés dans les fromages à pâte dure que dans les fromages à pâte molle. Ces travaux suggèrent que la classification des fromages dans les deux grandes catégories précédemment mentionnées et l'attribution conséquente d'un facteur de concentration, peut ne pas être précise en raison de preuves expérimentales montrant que les fromages appartenant à la même

catégorie de dureté sont caractérisés par différents facteurs de concentration (Pecorelli et al., 2018).

Contrairement aux concentrations élevées d'AFM₁ dans le fromage rapportées dans les études précédemment citées, un récent travail a été mené sur les niveaux de contamination par l'AFM₁ dans le «Zabady» qui est un yaourt traditionnel populaire en Égypte fabriqué à partir d'un mélange de lait de vache et de buffle. Cette étude a révélé une concentration moyenne d'AFM₁ dans les échantillons de Zabady inférieure à celles trouvées dans les échantillons de lait et de fromage (Ismaiel et al., 2020). Ceci pourrait être expliqué d'une part par la liaison de l'AFM₁ à la paroi de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* utilisés pour la fabrication de ce yaourt et son élimination par la suite par ces bactéries (Mohajeri et al., 2013). D'autre part, les bactéries lactiques du yaourt convertissent le lactose du lait en acide lactique, il en résulte un abaissement du pH à 4,0-4,5, ce qui dénature ou coagule la caséine affectant ainsi l'adsorption de l'AFM₁ dans le coagulum du yaourt (Fallah et al., 2011).

Plusieurs méthodes de décontamination microbiologique des produits laitiers naturellement contaminés par l'AFM₁ ont été étudiées par différents groupes de chercheurs, parmi eux Shigute et Washe (2018) qui se sont intéressés à la réduction des niveaux d'AFM₁ au cours de la production d'un lait fermenté traditionnel couramment consommé en Ethiopie. Pour ce faire, des bactéries lactiques précédemment isolées du lait fermenté ont été utilisées : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* spp. *casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, et *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris*. Les résultats de cette étude ont montré une diminution de plus de 50% dans la concentration d'AFM₁ au niveau des échantillons de laitensemencés avec les bactéries lactiques précédemment citées, cette observation a été constatée après cinq jours d'incubation. Cette étude a également révélé que la température ambiante (25-30°C) joue un rôle important dans la réduction des niveaux d'AFM₁ dans ce type de produit laitier, en effet, ce phénomène peut être expliqué par la prolifération des bactéries lactiques dans cette gamme de température. Bien qu'aucun consensus concernant le mécanisme de réduction de l'AFM₁ par les bactéries lactiques n'ait été établi, deux mécanismes possibles peuvent être envisagés. Le premier mécanisme évoqué est celui d'une adhésion de la toxine aux composants de la paroi cellulaire bactérienne (polysaccharides et peptidoglycanes). Le second mécanisme est celui d'une dégradation de la toxine par hydrolyse du cycle lactone grâce à l'augmentation de la concentration de l'acide lactique produit au cours de la fermentation (Mishra et Das, 2003).

Les niveaux de contamination par l'aflatoxine M₁ dans le lait de chèvre et de brebis sont généralement inférieurs à ceux du lait de vache (Viridis et al., 2008). Ces animaux pâturent principalement sur les prairies et ont une consommation plus faible en aliments concentrés, ce qui réduit leur exposition aux aflatoxines. Ces constatations ont été confirmées par l'étude de Bilandžić et al., 2017 qui ont signalé des niveaux de contamination par l'AFM₁ dans le lait de chèvre et de brebis nettement inférieurs à ceux du lait de vache. Aussi, aucun échantillon de lait de chèvre et de brebis n'a dépassé les LMR de l'Union européenne, alors que 0.3% des échantillons de lait de vache avaient des valeurs supérieures aux LMR européennes.

Une autre étude menée en Iran vient appuyer ces hypothèses, où 84.3% (n=64) des échantillons de lait de vache, et 44.6% (n=56) des échantillons de lait de chèvre étaient contaminés à l'AFM₁, avec une contamination plus élevée par l'AFM₁ dans le lait de vache par rapport au lait de chèvre. Cette différence significative peut être associée à des variations dans les pratiques alimentaires pour chaque espèce. En effet, la concentration élevée de l'AFM₁ dans le lait de vache est peut être due au fait que les vaches soient élevées dans des exploitations laitières et nourries avec des aliments concentrés ou de l'ensilage stocké dans des conditions inadéquates. Alors que les faibles niveaux de contamination par l'AFM₁ peuvent être attribués au fait que les chèvres sont souvent nourries aux pâturages (Bahrami et al., 2016).

Peu de données sur la présence de l'AFM₁ dans le lait de bufflonne sont disponibles dans la bibliographie, ceci est dû à localisation géographique limitée de cette espèce dans le monde. En dépit de ce constat, quelques études se sont intéressées au lait de bufflonne. De Roma et al., 2017 dans une étude réalisée dans le sud de l'Italie, ont recherché l'AFM₁ dans des échantillons de lait de bufflonne (n=388) et de vache (416). Ce travail a révélé une incidence de contamination par l'AFM₁ de 7.2% et de 12.3% respectivement pour le lait de bufflonne et de vache. Ces résultats ont démontré que le lait de bufflonne et de vache provenant de cette région présenteraient un faible niveau de contamination par l'AFM₁. Ce qui témoigne des bonnes pratiques de stockage et de la qualité des aliments reçus par ces animaux. En Turquie, la contamination du lait de bufflonne a également été étudiée, 27% (n=126) des échantillons de lait de bufflonne contenaient des concentrations d'AFM₁ allant de 8 à 32 (ng/l). Aucun échantillon analysé ne présentait un niveau de contamination par l'AFM₁ supérieure aux LMR fixées par l'Union Européenne (50 ng/l). Malgré les faibles niveaux de contamination par l'AFM₁ obtenus dans cette étude, les auteurs soulignent l'importance du maintien d'une surveillance continue du lait de bufflonne (Kara et al., 2014).

Quelques travaux sur la contamination du lait de chameaux par l'AFM₁, ont eu lieu dans les pays qui pratiquent ce type d'élevage comme le Soudan où une récente étude a révélé que (15,6%) des échantillons de lait de chameaux provenant de système d'élevage semi-intensif (n=32) ont montré un seuil de contamination par l'AFM₁ de 50 à 100 (ng/l). Tous les échantillons positifs ont dépassés les LMR fixées par la commission européenne (50 ng/l), néanmoins, aucun de ces échantillons n'a dépassé les limites du Codex Alimentarius (500 ng/l). Contrairement aux données obtenues des élevages intensifs, aucun échantillon prélevé du système nomade traditionnel (n= 34), ne s'est révélé positif à une éventuelle contamination par l'AFM₁ (Yousof et al., 2020). Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les troupeaux de chameaux pâturent dans des régions désertiques où les conditions climatiques sont inappropriées pour la croissance des moisissures aflatoxinogènes. De plus, les aliments concentrés stockés sont rarement utilisés pour l'alimentation des chameaux (Fallah et al ., 2016).

D'autres études ont rapporté une plus faible contamination par l'AFM₁ dans le lait de chamelle collecté en Iran. En effet, les résultats rapportés dans cette étude n'ont pas dépassé les limites établies par la commission européenne (50 ng/l) (Fallah et al ., 2016). Contrairement à ces faibles niveaux de contamination rapportés dans le lait de chamelle, Asi et al., 2012, dans une enquête menée au Pakistan ont détecté des niveaux d'AFM₁ supérieurs aux LMR européennes. Les auteurs ont expliqué ces teneurs élevées par la ration alimentaire des chameaux composée d'aliments concentrés stockés qui sont sensibles à la croissance de moisissures et à la production d'aflatoxines.

Selon Prandini et al., 2009, les laits en poudre ou les laits concentrés présentent des niveaux de contamination par l'AFM₁ plus élevés que les autres variétés de lait, ceci résulte d'une élimination totale ou partielle de l'eau, avec ou sans chauffage, ce procédé conduit à une concentration des éléments solides du lait et des contaminants tels que l'AFM₁. Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs études récentes comme celle d'Alahlah et al., 2020 qui ont enregistré un niveau de contamination par l'AFM₁ de 35% (n=40) dans les échantillons de lait UHT, et de 100% 14 (n=7) dans les échantillons de lait en poudre. Une moyenne de contamination par l'AFM₁ plus élevée ($25,50 \pm 12,06$ ng/kg) a été retrouvée dans le lait en poudre, alors qu'un niveau moyen de contamination par l'AFM₁ de $14,76 \pm 10,21$ (ng/kg) a été rapporté dans le lait UHT. Moreira et al., 2018 ont également rapporté une incidence de 76% (n= 50) dans les échantillons de lait en poudre, avec des concentrations allant de 32 à 2896 ng/l. En outre, cette étude a signalé que le lait en poudre contenait des niveaux de toxines plus élevées que le lait UHT. Cette contamination plus importante du lait

en poudre pourrait s'expliquer par l'élimination de l'eau dans ce type de lait, ce qui se traduit par un phénomène de concentration de l'AFM₁ (Oliveira et al., 2007 ; Viridis et al., 2008). Il est intéressant de noter que la réglementation européenne n'établit aucune LMR concernant ce type de lait, cependant la forte concentration de l'AFM₁ dans le lait en poudre nécessiterait la fixation de limite spécifique pour ce produit.

Enfin, notre enquête a révélé que les niveaux d'AFM₁ dans les échantillons de lait provenant de petites exploitations étaient plus élevés que ceux des fermes industrielles (**Tableau 18**). Cela était cohérent avec nos observations sur le terrain et pourrait s'expliquer par le fait que les bonnes pratiques de stockage, les mauvaises connaissances agricoles, les contraintes économiques liées au coût élevé de l'alimentation animale ainsi que les normes d'hygiène, ne sont pas correctement observées dans les exploitations traditionnelles. Tous ces paramètres ont entraîné une contamination élevée par l'AFB₁ dans l'alimentation animale (**Tableau 12,14**) comme rapportée dans notre étude, ainsi qu'un niveau de transfert important de l'AFM₁ dans le lait cru collecté au niveau des petits élevages (**Tableau 12**). Contrairement à nos résultats, d'autres travaux ont signalé que les niveaux de contamination par l'AFM₁ n'étaient pas influencés par la taille des exploitations (Hashemi et al., 2016; Patyal et al., 2020).

L'évaluation de l'intérêt prophylactique de l'addition de paroi de levure à l'alimentation animale comme agent de détoxification des mycotoxines n'a pas pu être réalisée durant notre étude. Au début de notre expérimentation, nous pensions étudier les effets d'une préparation commerciale d'extraits de parois modifiées de levures sur les niveaux d'excrétion d'AFM₁. En effet, afin de pouvoir mesurer l'efficacité réelle d'un adsorbant à réduire la biodisponibilité des mycotoxines chez le ruminant, il est indispensable de porter les efforts d'évaluation sur l'analyse toxicocinétique des mycotoxines (EFSA, 2009). Ainsi, la première difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés était la difficulté d'utiliser un modèle expérimental animal en l'occurrence ici un ruminant (bovin ou brebis laitière), en l'absence d'une station expérimentale animale équipée à cet effet. D'autres obstacles se sont dressés à nous, comme l'impossibilité de réaliser des études de toxicocinétique, en effet, dans ce genre de travail, il est d'un intérêt capital de réaliser les différents dosages d'AFB₁ en comparant les taux de mycotoxines circulantes et excrétées dans l'urine et les fèces d'animaux exposés avec et sans adsorbant. Malheureusement, l'absence d'un laboratoire spécialisé et équipé pour la recherche des mycotoxines en Algérie était une contrainte majeure dans la conduite de cette étude. Toutes ces contraintes économiques et humaines, ne nous ont malheureusement pas

permis de réaliser cette partie de notre étude. Cependant, une synthèse bibliographique récente a déjà été abordée dans la partie bibliographique.

Sur la base des résultats obtenus durant notre étude, nous pouvons conclure que la moyenne élevée de contamination du lait par l'AFM₁ était en parfaite corrélation avec les niveaux élevés d'AFB₁ retrouvés dans l'alimentation des bovins laitiers, ce qui témoigne du transfert de l'AFB₁ sous sa forme hydroxylée (AFM₁) dans le lait. Ainsi, la consommation du lait pourrait constituer un réel danger pour la santé publique algérienne, surtout pour les nourrissons et les enfants qui en raison de la quantité importante de lait consommée par rapport à leur poids, et de l'immaturation de leur mécanismes de détoxification biochimiques, seraient plus sensibles aux effets toxiques de cette toxine.

Notre étude a également mis l'accent sur la nécessité pour les autorités sanitaires d'organiser des programmes de formation destinés aux producteurs laitiers et aux opérateurs de l'agroalimentaire sur le risque lié à la contamination par les aflatoxines et leurs conséquences sanitaires potentielles. Nous recommandons aussi qu'un dépistage régulier de cette toxine au niveau des laiteries à l'aide de techniques immuno-enzymatiques telle que l'ELISA ait lieu, ceci permettra d'établir une base de données sur la prévalence de cette mycotoxine. Enfin, il nous semble urgent d'établir des LMR pour la présence d'AFM₁ dans le lait et les produits laitiers afin de protéger la santé du consommateur algérien.

Conclusion et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs principaux de ces travaux de thèse étaient de déterminer l'occurrence de l'AFB₁ dans l'alimentation des vaches laitières et de rechercher son métabolite hydroxylé l'AFM₁ dans le lait cru provenant de plusieurs exploitations laitières réparties sur différentes régions du nord algérien. Ceci dans le but d'évaluer l'impact de l'Aflatoxine M₁ sur la santé publique algérienne tout en évaluant l'exposition au risque du consommateur algérien.

Notre travail de thèse est le premier à avoir évalué la prévalence de l'AFB₁ dans l'alimentation animale, ainsi l'étude de la contamination des aliments de bétail par l'AFB₁ a révélé des concentrations élevées dépassant les LMR établies par l'Union Européenne, ceci vient appuyer nos résultats sur la prévalence élevée de l'AFM₁ retrouvée dans le lait cru provenant des différentes exploitations laitières. Ces niveaux élevés d'AFB₁ dans les échantillons d'aliments, ainsi que les données limitées sur la contamination de l'alimentation animale par les mycotoxines en Algérie, impliquent la nécessité de l'intensification des inspections de routines et l'amélioration des conditions de stockage de l'alimentation animale.

Le moyen le plus efficace pour limiter les niveaux d'AFM₁ dans le lait repose sur la surveillance des niveaux d'AFB₁ dans l'alimentation animale, cela peut en effet, être réalisé en adoptant une démarche basée sur l'analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise (HACCP), afin de garantir une alimentation saine et de qualité aux bovins laitiers.

Il faut souligner que les résultats de cette thèse n'étaient qu'une enquête centrée sur les régions nord du pays et que le nombre réduit d'échantillons ne nous permet pas de tirer des conclusions générales. Toutefois, à la lumière de ces résultats on peut conclure, que l'incidence élevée de l'AFM₁ dans le lait semble constituer un grave problème de santé publique en Algérie, en particulier pour les enfants qui sont plus sensibles aux effets de l'AFM₁ que les adultes, cette situation peut en effet créer un risque sanitaire majeur pour la population algérienne.

Compte tenu de la difficulté de prévenir la contamination par les moisissures aflatoxinogènes ou du maintien de faibles niveaux d'aflatoxines dans les cultures conventionnelles, il nous semble évident de miser sur la formation et la sensibilisation des agriculteurs, des éleveurs et des industriels sur le risque mycotoxicologique. Ainsi, tous ces acteurs de la chaîne alimentaire devront œuvrer pour l'amélioration des pratiques de stockage des aliments, et pour la mise en place d'autocontrôles intensifs pour la recherche de l'AFM₁

dans l'industrie laitière. Aussi, dans un souci d'atteindre de faibles niveaux d'AFM₁ dans le lait, les échantillons d'aliments pour animaux et de lait provenant de plusieurs fermes laitières devront être évalués systématiquement pour la recherche d'aflatoxines, ceci afin de protéger la santé du consommateur.

En perspectives, il serait intéressant d'élargir cette étude à d'autres régions du pays, en incluant un plus grand nombre d'échantillons d'aliments de bétail et de céréales, et en ciblant d'autres produits laitiers (lait en poudre, lait infantile, yaourt, fromages, etc.). Des enquêtes sur la multi-contamination par les mycotoxines dans l'alimentation animale et humaine devraient aussi être réalisées dans le futur, ces études devraient prendre en considération les effets toxiques synergétiques causés par la présence simultanée de plusieurs mycotoxines dans un même aliment. Ainsi, il est important de garder à l'esprit que l'apport quotidien total d'aflatoxines avec celui des autres mycotoxines provenant d'autres types d'aliments pourrait être un facteur de risque important pour la santé animale et humaine.

En Algérie, la raison probable du manque de données concernant la présence de l'AFB₁ et AFM₁ dans les denrées alimentaires est liée au manque de laboratoires analytiques hautement équipés pour la recherche des mycotoxines. Pour cela nous proposons la mise au point et la validation de techniques analytiques de routine, précises et fiables, ces techniques pourront ainsi être utilisées dans des laboratoires peu équipés, nous pensons que la technique immuno-enzymatique ELISA, qui semble réunir tous ces critères, pourra être utilisée dans un premier temps afin de dépister un grand nombre d'échantillons qui pourront par la suite être confirmés à l'aide de techniques chromatographiques (HPLC/FLD, UHPLC-MS/MS ...).

Un programme de surveillance national, large et fréquent visant à établir un bilan des connaissances approfondies sur la contamination des céréales, du lait, et des produits laitiers par les mycotoxines devrait être instauré par les instances gouvernementales algériennes. Ceci permettrait de fournir des informations scientifiques sur les dangers pour la population algérienne d'une exposition à de faibles niveaux d'aflatoxines sur le long court. Ces résultats constitueront ainsi une base de données pour les institutions gouvernementales concernées qui pourront par la suite, proposer une réglementation algérienne définissant les limites maximales de ces contaminants dans l'alimentation humaine et animale.

Bien qu'il soit prématuré de s'avancer sur la prévalence élevée en Algérie de ces deux mycotoxines dans l'alimentation animale et humaine, les résultats de notre travail soulignent l'urgence pour les autorités sanitaires de définir une réglementation nationale sur les contaminants alimentaires et de fixer des LMR sur la présence des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale. Certains pays maghrébins voisins tel que le Maroc, disposent déjà d'une réglementation nationale (Bulletin Officiel, 2016) fixant un seuil d'alerte au-delà duquel il existe un risque pour la santé humaine.

En perspective, il serait également intéressant d'évaluer le risque d'exposition de la population algérienne et la probabilité d'apparition de cancer du foie suite à la consommation de lait et de produits laitiers contaminés par l'AFM₁, de même, l'estimation de la dose journalière admissible pour l'AFM₁ devrait être prise en considération dans les travaux futurs.

Références bibliographique

Références bibliographiques**A**

ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLA, G., *et al.* Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and environmental microbiology*, 1994, vol. 60, no 7, p. 2650-2652.

ABBAS, H. K., WILKINSON, J. R., ZABLOTOWICZ, R. M., *et al.* Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin reviews*, 2009, vol. 28, no 2-3, p. 142-153.

ABBAS, H.K., WEAVER, M.A., HORN, B.W., *et al.* Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*, 2011, vol. 30, no 2-3, p. 59-70.

ABBÈS, S, SALAH-ABBÈS, J.B, BOURAOUI, Y, *et al.* Natural occurrence of aflatoxins (B1 and M1) in feed, plasma and raw milk of lactating dairy cows in Beja, Tunisia, using ELISA. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2012, vol. 5, no 1, p. 11-15.

ABDALLAH, F M, GIRGIN, G, et BAYDAR, T. Mycotoxin detection in maize, commercial feed, and raw dairy milk samples from Assiut City, Egypt. *Veterinary sciences*, 2019, vol. 6, no 2, p. 57.

ABDOLLAHI, M, RANJBAR, A, SHADNIA, S, *et al.* Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, 2004, vol. 10, no 6, p. 141-147.

ABUDABOS, A. M., AL-ATYAT, R. M., et KHAN, R. U. A survey of mycotoxin contamination and chemical composition of distiller's dried grains with solubles (DDGS) imported from the USA into Saudi Arabia. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, vol. 24, no 18, p. 15401-15405.

AFSSA (2009) Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final.

AKANDE, K. E., ABUBAKAR, M. M., ADEGBOLA, T. A., *et al.* Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2006, vol. 5, no 5, p. 398-403.

AKBAR, N, NASIR, M, NAEEM, N, *et al.* Assessment of aflatoxin in milk and feed samples and impact of seasonal variations in the Punjab, Pakistan. *Food science & nutrition*, 2020, vol. 8, no 6, p. 2699-2709.

ALAHLAH, N, EL MAADOUDI, M, BOUCHRITI, N, *et al.* Aflatoxin M1 in UHT and powder milk marketed in the northern area of Morocco. *Food control*, 2020, vol. 114, p. 107262.

ALONSO, V. A., GONZÁLEZ PEREYRA, M. L., ARMANDO, M. R., *et al.* Silage contribution to aflatoxin B1 contamination of dairy cattle feed. *Aflatoxin, Detection, Measurement and Control ed. Torres-Pacheco, I*, 2011, p. 37-52.

ALONSO, V.A, PEREYRA, C. M, KELLER, L, MOURA A, *et al.* Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, vol. 115, no 3, p. 637-643.

AMAIKE, S et KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 2011, vol. 49, p. 107-133.

ARAFI, A. S., BLOOMER, R. J., WILSON, H. R., *et al.* Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxin. *British Poultry Science*, 1981, vol. 22, no 5, p. 431-436.

ARMORINI, S, ALTAFINI, A, ZAGHINI, A. and RONCADA, P. Occurrence of aflatoxin M1 in conventional and organic milk offered for sale in Italy. *Mycotoxin Res*, 2016, 32(4): 237-246.

ASGHAR, M.S, AHMED, A. and ASGHAR, M.A. Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food Addit. Contam. Part B Surveill*, 2018, 11(3): 167-174.

ASHRAF, N.M et ASIF, A. Current scenario of aflatoxin burden: a review of Pakistani food chain. *J. Public Health Biol. Sci*, 2013, vol. 2, p. 324-329.

ASI, M.R, IQBAL, S. Z, ARIÑO, A, *et al.* Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 2012, vol. 25, no 1, p. 34-38.

ASSAF, J.CI, NAHLE, S, CHOKR, A, *et al.* Assorted methods for decontamination of aflatoxin M1 in milk using microbial adsorbents. *Toxins*, 2019, vol. 11, no 6, p. 304.

ASSEM, E, MOHAMAD, A, *et al.* A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, 2011, vol. 22, no 12, p. 1856-1858.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS AOAC (2000). Preparation of standards for mycotoxins. AOAC International Official Methods of analysis. Chapter 49. Natural Toxins, p 4-5

ATEHNKENG, J, OJIAMBO, P. S., IKOTUN, T., *et al.* Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food additives and Contaminants*, 2008, vol. 25, no 10, p. 1264-1271.

ATEHNKENG, J, OJIAMBO, P.S., DONNER, M, *et al.* Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 122, no 1-2, p. 74-84.

AUERBACH, H., MAAS, R. F. M., OP DEN CAMP, H. J. M., *et al.* Biodegradation of aflatoxin B₁ by bovine rumen microorganisms in vitro and its effects on rumen fermentation. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*, 1998.

AUTRUP, J.L., SCHMIDT, J, SEREMET, T, *et al.* Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B₁ adducts to serum albumin. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 1991, p. 436-440.

AYALEW, A. Mycotoxins and surface and internal fungi of maize from Ethiopia. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 2010, vol. 10, no 9.

AZIZ, N.H., EL-FOULY, M. Z., ABU-SHADY, M. R., *et al.* Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal floras contaminating medicinal plants. *Applied Radiation and Isotopes*, 1997, vol. 48, no 1, p. 71-76.

B

BADILLET, G, DE BIÈVRE, C, et GUÉHO, É. *Champignons contaminants des cultures; Champignons opportunistes: atlas clinique et biologique.* Varia, 1994.

BAHRAMI, R., SHAHBAZI, Y ., et NIKOUSEFAT, Z. Aflatoxin M₁ in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Control*, 2016, 62: 250-256.

BANDYOPADHYAY, R., ATEHNKENG, J., ADEBOWALE, A., LAWRENCE, K., MUTEGI, C., SENHOR, L. & COTTY, P.J.(2015) Developing Measurement Approaches and Intervention Strategies for Smallholders. In *The First International Congress on Postharvest Loss Prevention* Rome, Italy

BARANYI, N. Current trends in aflatoxin research. *Acta Biologica Szegediensis*, 2013, vol. 57, no 2, p. 95-107.

BARUG, D., BHATNAGAR, D., VAN EGMOND, H. P., VAN DER KAMP, J. W., VAN OSENBRUGGEN, W. A., VISCONTI, A. (Eds.). (2006). *The mycotoxin factbook: food & feed topics.* Wageningen Academic Publishers.

BATTILANI, P, LEGGIERI, M. C, ROSSI, V, *et al.* AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B₁ contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2013, vol. 94, p. 38-46.

BATTILANI, P, TOSCANO, P., VAN DER FELS-KLERX, H. J., *et al.* Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, no 1, p. 1-7.

BEHESHTI, H.R et ASADI, Mo. Aflatoxins in animal feed in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2014, vol. 7, no 1, p. 40-42.

BELLIL, K, BOUKRIF, M. Les réformes de la filière lait en Algérie : bilan et perspectives. *Les Cahiers du Cread* 2021, vol. 37 - n° 02 .

BENBROOK, C. 2005. Breaking the mold—impacts of organic and conventional farming systems on mycotoxins in food and livestock feed. *Org Cent State Sci Rev*. 58 .Available from: <https://organiccenter.org/reportfiles/MycotoxinReport.pdf>.

BENNETT, J.W., Klich M, 2003. *Mycotoxins Clinical Microbiology Reviews*, vol. 16, p. 497-516.

BERTHILLER, F, CREWS, C, DALL'ASTA, C, *et al.* Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research*, 2013, vol. 57, no 1, p. 165-186.

BERTHILLER, F, SCHUHMACHER, R, ADAM, G, *et al.* Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, vol. 395, no 5, p. 1243-1252.

BHAT, R.V. et VASANTHI, S. *Mycotoxin food safety risk in developing countries*. 2003.

BILANDŽIĆ, N, BOŽIĆ, Đ, ĐOKIĆ, M, *et al.* Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food control*, 2014, vol. 43, p. 18-

BILANDŽIĆ, N, VARENINA, I, KOLANOVIĆ, B. S, *et al.* Monitoring of aflatoxin M1 in raw milk during four seasons in Croatia. *Food Control*, 2015, vol. 54, p. 331-337.

BILANDŽIĆ, N, VARENINA, I, SOLOMUN KOLANOVIĆ, B, *et al.* Occurrence of aflatoxin M1 in raw cow, goat and sheep milk during spring and autumn in Croatia during 2016. *Toxin Reviews*, 2017, vol. 36, no 4, p. 290-296.

BINDER, E. M., TAN, L. M., CHIN, L. J., *et al.* Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal feed science and technology*, 2007, vol. 137, no 3-4, p. 265-282.

BLACKWELL, B.A., MILLER, J. D, et SAVARD, M.E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. *Journal of AOAC International*, 1994, vol. 77, no 2, p. 506-511.

BLAIR, D. Uncertainties in pesticide risk estimation and consumer concern. *Nutrition Today*, 1989, vol. 24, no 6, p. 13-19.

BLANK, R, ROLFS, J.P SÜDEKUM, K-H, *et al.* Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no 23, p. 6899-6905.

BLUMENTHAL, C.Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme

preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004, vol. 39, no 2, p. 214-228.

BOTTON, B, BRETON, A., FÈVRE, M, *et al.* Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 1990.

BOUAFIFSSA, Y., ZINEDINE, A., RAHOUTI, M., MAÑES, J. and BERRADA. H.,2016. Occurrence and multi-mycotoxin analysis in Moroccan pastasamples using a modified QuEChERS-based extraction and GC/MS/MS. International Congress on Mycotoxins and Cancer. March 24-25, 2016. Marrakech, Morocco

BOUDRA, H, BARNOUIN, J, DRAGACCI, S., *et al.* Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of dairy science*, 2007, vol. 90, no 7, p. 3197-3201.

BOUDRA, H., *et al.* Mycotoxins: an insidiously menacing factor for the quality of forages and the performances of the ruminants. *Fourrages*, 2009, no 199, p. 265-280.

BOUTI, K, VERHEECKE-VAESSEN, C, MOKRANE, S, MEKLAT, A, DJEMOUAI, N, SABAOU, N, MATHIEU, F, RIBA, A. Polyphasic characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from animal feeds in Algeria. *J Food Saf.* 2019,12743. <https://doi.org/10.1111/jfs.12743>.

BRACKETT, R.E. et MARTH, E. H. Association of aflatoxin M 1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1982, vol. 174, no 6, p. 439-441.

BRANKOV, T.P, JOVANOVIC, M, GRUJIC, B. Aflatoxin standards and maize trade. *Ekonomika Poljoprivrede*, 2013,60(3):595.

BRENT, K. J., et HOLLOMON, D. W. (2007). Fungicide resistance: the assessment of the risk. *Fungicide Resistance Action Committee*, FRAC Monograph 53.

BRERA, C. et MIRAGLIA, M. Quality assurance in mycotoxin analysis. *MicrochemJ*, 1996) 54: 465-471.

BROCHARD, G. et LE BACLE, C. Mycotoxines en milieu de travail. *Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. Document pour le médecin du travail, DMT*, 2009, no 129.

BROSSARD, L, MARTIN, C, CHAUCHEYRAS-DURAND, F, *et al.* Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 2004, vol. 44, no 3, p. 195-206.

BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, vol. 173, no 1-2, p. 134-158.

BULLERMAN, L.B. et BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. *International journal of food microbiology*, 2007, vol. 119, no 1-2, p. 140-146.

BULLETIN OFFICIEL.. Arrêté conjoint du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche Maritime et du Ministre de la Santé n°1643-16 du 30 mai 2016 fixant les limites maximales de contaminants autorisées dans ou sur les produits primaires et les produits alimentaires,2016.

C

CAIRNS-FULLER, V., ALDRED, D., et MAGAN, N. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of applied microbiology*, 2005, vol. 99, no 5, p. 1215-1221.

CASTEGNARO, M. et PFOHL-LESZKOWICZ, A. Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine dans la sécurité alimentaire. *Lavoisier. Tec & Doc*, 5p, 2002.

CHABASSE, D, PIHET, M, et BOUCHARA, J.P. Les moisissures opportunistes: émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine revue générale. *Revue francophone des laboratoires*, 2005, vol. 2005, no 373, p. 21-34.

CHANG, P.K, HORN, B.W., et DORNER, J.W. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, vol. 42, no 11, p. 914-923.

CHANG, P-K, ABBAS, H. K., WEAVER, M.A., *et al.* Identification of genetic defects in the atoxigenic biocontrol strain *Aspergillus flavus* K49 reveals the presence of a competitive recombinant group in field populations. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, vol. 154, no 3, p. 192-196.

CHATELLIER, V. La planète laitière et la place de l'Afrique de l'Ouest dans la consommation, la production et les échanges de produits laitiers. In : 3. *Rencontres internationales: " Le lait, vecteur de développement"*. 2019. p. 32 p.

CHAUHAN, N.M., WASHE, A.P., et MINOTA, T. Fungal infection and aflatoxin contamination in maize collected from Gedeo zone, Ethiopia. *SpringerPlus*, 2016, vol. 5, no 1, p. 1-8.

CHEN, C, MITCHELL, N0.J., GRATZ, J, *et al.* Exposure to aflatoxin and fumonisin in children at risk for growth impairment in rural Tanzania. *Environment international*, 2018, vol. 115, p. 29-37.

CHEN, R, MA, F, LI, P.W, *et al.* Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. *Food chemistry*, 2014, vol. 146, p. 284-288.

COLE, R. and R. Cox: Handbook of Toxic Matoblites. 1981.

- COLE, R.J., JARVIS, B.B., SCHWEIKERT, M.A. Handbook of secondary fungal metabolites, 2003. New York.
- COMMISSION EUROPÉENNE, 2002. Décision de la Commission du 12 août 2002 portant sur les modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. *Journal officiel des Communautés européennes*. L 221(8):1–29.
- COMMISSION EUROPÉENNE, 2006. Règlement (CE) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*.
- COMMISSION EUROPÉENNE, 2014. RÈGLEMENT (UE) No 519/2014 de la commission du 16 mai 2014 modifiant le règlement (CE) no 401/2006 en ce qui concerne les méthodes d'échantillonnage des grands lots, des épices et des compléments alimentaires, les critères de performance pour les toxines T-2 et HT-2 et pour la citrinine ainsi que les méthodes analytiques de dépistage. denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*.
- COSTAMAGNA, D., GAGGIOTTI, M., CHERICATTI, C. A., *et al.* Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese. *Toxicology reports*, 2019, vol. 6, p. 782-787.
- COTTY, P. J., *et al.* Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed. *Plant Disease*, 1990, vol. 74, no 3, p. 233-235.
- COTTY, P.J. and JAIME-GARCIA, R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int. J. Food. Microbiol*, 2007,119(1-2): 109-115.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. *Task Force Report*, 2003, no. 139. Ames, Iowa, USA.
- COUNCIL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). Mycotoxins, economic and health risks. , *Task force Rep.*, 1989, vol. 116. Ames, Iowa, USA.
- CREPPY, E. E. Mise en évidence de la contamination des céréales par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Bénin. In : *Human Ochratoxicosis and Its Pathologies: Proceedings of the International Symposium: Human Ochratoxicosis and Associated Pathologies in Africa and Developing Countries, Held in Bordeaux (France) on July 4-6, 1993*. John Libbey Eurotext, 1993. p. 101.
- CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 2002, vol. 127, no 1-3, p. 19-28.
-

D

DE ROMA, A, ROSSINI, C, RITIENI, A, *et al.* A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. *Food Control*, 2017, vol. 81, p. 30-33.

DERSJANT-LI, Y, VERSTEGEN, M.W0A, et GERRITS, W.J.J. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition research reviews*, 2003, vol. 16, no 2, p. 223-239.

DI GREGORIO, M.Ca, NEEFF, D. V, JAGER, A.V, *et al.* Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews*, 2014, vol. 33, no 3, p. 125-135.

DIAZ, D. E., *et al.* *The mycotoxin blue book*. Nottingham University Press, 2005.

DIMITRIESKA-STOJKOVIC ,E, STOJANOVSKA-DIMZOSKA, B, ILIEVSKA ,G, UZUNOV, R, STOJKOVIC ,G, HAJRULAI-MUSLIU, Z, JANKULOSKI, D. Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. *Food Control*, 2016,59:201–206.

DIRECTION GÉNÉRALE DES DOUANES, 2019.Données sur l'importation du maïs de 2015 à 2019.

DORNER, J. W. Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 2009, vol. 72, no 4, p. 801-804.

DORNER, J. W. et LAMB, M. C. Development and commercial use of afla-Guard®, an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotoxin Research*, 2006, vol. 22, no 1, p. 33-38.

DORNER, J.W. et COLE, R.J. Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research*, 2002, vol. 38, no 4, p. 329-339.

DUARTE, S. C., ALMEIDA, A. M., TEIXEIRA, A. S., *et al.* Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 2013, vol. 30, no 2, p. 411-417.

E

EUROPEAN COMMISSION. Implementing Council. 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities*, 2002, vol. 221, p. 8-36.

EUROPEAN COMMISSION (2002a) Directive (EC) 2002/32 of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Off J Eur Union L* 140:10–22.

EFSA. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety, 2009, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/22e.pdf>.

EL KHOURY R. 2016. *Maitrise du risque aflatoxique: utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

EL KHOURY, A, ATOUI, A, RIZK, T, *et al.* Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of food science*, 2011, vol. 76, no 4, p. M247-M253.

EL KHOURY, A. *Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et Origine*. 2007. Thèse de doctorat.

EL-AZIZ, A, ABEER, R. M., MAHMOUD, M. A., *et al.* Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. *The Scientific World Journal*, 2015, vol. 2015.

ELLEN, M., ANTHONY, B., & DEIRDRE, M. (2013). Chapter 1. Introduction. In E. Muehlhoff, A. Bennett, & D. McMahon (Eds.), *Milk and dairy products in human nutrition* (pp.1–10). Rome: FAO. FAO.

EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S, *et al.* Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and chemical toxicology*, 1998, vol. 36, no 4, p. 321-326.

EMARA, H.A. Production of Aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* and its Control. 1996.

ESKANDARI, M. H. et PAKFETRAT, S. Aflatoxins and heavy metals in animal feed in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2014, vol. 7, no 3, p. 202-207.

EUROPEAN COMMISSION. 2010. Commission Regulation (EC) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official J.Eur. Union*, 50: 8-11.

EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation (EC) No. 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. *Off. J. EU. L*, 2009, no 118, p. 66.

F

FALLAH, A. A, RAHNAMA, M, JAFARI, T, and SAEI-DEHKORDI, S. S..Seasonal variation of aflatoxin M 1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*. 2011,22, 1653–1656. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.024>

FAO, 2020. Dairy market Review, FAO, Rome, Italy, 13 p

FAYJALOUN, S, NASSAR, M, SAHAKIAN, J, *et al.* Updates on the effect of mycotoxins on male reproductive efficiency in mammals. *Toxins*, 2019, vol. 11, no 9, p. 515.

FERNANDES,A.M, Corrêa ,B, Rosim ,R.E, Kobashigawa ,E, and Oliveira, C.A.F. Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 2012, 24:104–108.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Asses*, 2008, 25(2):172-180.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 2008, vol. 176, no 1, p. 84-92.

FIRMIN, S. *Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique: évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière.* 2011. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2016) Guidance for Industry - Ensuring Safety of Animal Feed Maintained and Fed On-Farm #203

FOX, E.M et HOWLETT, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current opinion in microbiology*, 2008, vol. 11, no 6, p. 481-487.

FRANCO, L.T., PETTA, T, ROTTINGHAUS, G.E., *et al.* Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: a pilot study. *Mycotoxin research*, 2019, vol. 35, no 1, p. 65-73.

FREIRE, L et SANT'ANA, A.S. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, vol. 111, p. 189-205.

FUNG, F et CLARK, R. F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 2004, vol.

G

- GALLO, A, SOLFRIZZO, M, EPIFANI, F, *et al.* Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International journal of food microbiology*, 2016, vol. 217, p. 162-169.
- GALTIER, P. Biotransformation and fate of mycotoxins. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 1999, vol. 18, no 3-4, p. 295-312.
- GALTIER, P. et ALVINERIE, M. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. In : *Annales de Recherches Vétérinaires*. 1976. p. 91-98.
- GALVANO, F, GALOFARO, V, et GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *Journal of Food protection*, 1996, vol. 59, no 10, p. 1079-1090.
- GARRIDO, N. S., IHA, M. H., SANTOS ORTOLANI, M. R., *et al.* Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Additives & Contaminants*, 2003, vol. 20, no 1, p. 70-73.
- GHALI, R., HMAISSIA-KHLIFA, K., GHORBEL, H., *et al.* Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. *Food control*, 2008, vol. 19, no 9, p. 921-924.
- GHIASIAN, S. A., SHEPHARD, G. S., et YAZDANPANA, H. Natural occurrence of aflatoxins from maize in Iran. *Mycopathologia*, 2011, vol. 172, no 2, p. 153-160.
- GIBSON, A.M., BARANYI, J, PITT, J.I., *et al.* Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International journal of food microbiology*, 1994, vol. 23, no 3-4, p. 419-431.
- GIORNI, P, BERTUZZI, T, BATTILANI, P.. Impact of fungi co-occurrence on mycotoxin contamination in maize during the growing season. *Frontiers in Microbiology*, 2019,10 : 1265. doi: 10.3389/fmicb.2019.01265.
- GIZACHEW, D, SZONYI, B, TEGEGNE, A, *et al.* Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food control*, 2016, vol. 59, p. 773-779.
- GOURAMA, H et BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food protection*, 1995, vol. 58, no 12, p. 1395-1404.
- GUENGERICH, F. P, GILLAM, Elizabeth MJ, et SHIMADA, Tsutomu. New applications of bacterial systems to problems in toxicology. *Critical reviews in toxicology*, 1996, vol. 26, no 5, p. 551-583.
-

GUERRE, P., GALTIER, Pierre, et BURGAT, V. Le métabolisme: un facteur de susceptibilité à la toxicité des aflatoxines. *Revue de médecine vétérinaire*, 1996, vol. 147, no 12, p. 879-892.

H

HAJAJI, A, EL OTMANI, M, BOUYA, D, *et al.* Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006, vol. 50, no 6, p. 494-499.

HARTNOLL, G, MOORE, D, et DOUEK, D. Near fatal ingestion of oil of cloves. *Archives of disease in childhood*, 1993, vol. 69, no 3, p. 392-393.

HARVEY, R. B., EDRINGTON, T. S., KUBENA, L. F., *et al.* Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *American journal of veterinary research*, 1996, vol. 57, no 12, p. 1790-1794.

HASAN, H. A. H. Mode of action of pesticides on aflatoxin biosynthesis and oxidase system activity. *Microbiological research*, 1999, vol. 154, no 1, p. 95-102.

HASHEMI, M. A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran. *J. Food Drug Anal*, 2016, 24(4): 888-893.

HASKARD, C, BINNION, C, et AHOKAS, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-biological interactions*, 2000, vol. 128, no 1, p. 39-49.

HASSAN, H.F. et KASSAIFY, Z. The risks associated with aflatoxins M1 occurrence in Lebanese dairy products. *Food Control*, 2014, vol. 37, p. 68-72.

HELL, K et MUTEGI, C. Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, vol. 5, no 5, p. 459-466.

HELL, K, FANDOCHAN, P, BANDYOPADHYAY, R, *et al.* Pre-and postharvest management of aflatoxin in maize: an African perspective. *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*, 2008, p. 219-229.

HENDRICKSON, L, DAVIS, C. R, ROACH, C, *et al.* Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chemistry & biology*, 1999, vol. 6, no 7, p. 429-439.

HESSELTINE, C.W. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In: *Mycotoxins and other fungal related food problems* (edited by Rodricks, J.V.), *Advances in Chemistry Series No. 149.*, American Chemical Society, Washington DC, USA.

HOCKING, A. D., *et al.* Aspergillus and related teleomorphs. *Food spoilage microorganisms*, 2006, p. 451-487.

HOLMQUIST, G. U., WALKER, H. W., et STAHR, H. M. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, 1983, vol. 48, no 3, p. 778-782.

HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*, 1995, vol. 36, p. 73-76.

HORN, B. W. et WICKLOW, D. T. Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Canadian journal of Microbiology*, 1983, vol. 29, no 9, p. 1087-1091.

HOSMER, D.W. and LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons, Hoboken, New York. 2013 .p375.

HSIEH, D. P., CULLEN, J. M., HSIEH, L. S., *et al.* Cancer risks posed by aflatoxin M1. In : *Princess Takamatsu Symposia*. 1985. p. 57-65.

HUSSAIN, I, ANWAR, J, ASI, M.R, *et al.* Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food control*, 2010, vol. 21, no 2, p. 122-124.

HUWIG, A, FREIMUND, S, KÄPPELI, O, *et al.* Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology letters*, 2001, vol. 122, no 2, p. 179-188.

HYMERY, N, VASSEUR, V, COTON, M, *et al.* Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, vol. 13, no 4, p. 437-456.

I

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum., 82: 1-556.

IQBAL, S.Z et ASI, M.R. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 2013, vol. 30, no 1, p. 235-239.

IQBAL, S.Z, JINAP, S., PIROUZ, A. A., *et al.* Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, vol. 46, no 1, p. 110-119.

ISMAIEL, A.A., THARWAT, N.A., SAYED, M.A., *et al.* Two-year survey on the seasonal incidence of aflatoxin M1 in traditional dairy products in Egypt. *Journal of food science and technology*, 2020, p. 1-8.

ISMAN, M. B. et MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in phytomedicine*, 2006, vol. 3, p. 29-44.

J

JAGER, A. V., TEDESCO, M. P., SOUTO, P. C. M. C., *et al.* Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 2013, vol. 33, no 1, p. 87-92.

JANE, C, KIPROP, E., et MWAMBURI, L. Biocontrol of aflatoxins in corn using atoxigenic *Aspergillus flavus*. *Int. J. Sci. Res*, 2012, vol. 3, p. 2319-7064.

JANIĆ HAJNAL, E, KOS, J, KRULJ, J, *et al.* Aflatoxins contamination of maize in Serbia: The impact of weather conditions in 2015. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2017, vol. 34, no 11, p. 1999-2010.

JEDIDI, I, CRUZ, A, GONZÁLEZ-JAÉN, M.T, *et al.* Aflatoxins and ochratoxin A and their *Aspergillus* causal species in Tunisian cereals. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2017, vol. 10, no 1, p. 51-58.

JOUANY, J. P., DIAZ, D. E., *et al.* Effects of mycotoxins in ruminants. *The mycotoxin blue book*, 2005, p. 295-321.

JOUANY, J. P., YIANNIKOURIS, A., BERTIN, G., *et al.* Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options méditerranéennes, A*, 2009, vol. 85, p. 205-224.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, vol. 137, no 3-4, p. 342-362.

JUAN, C., ZINEDINE, A., IDRISSE, L., *et al.* Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *International journal of food microbiology*, 2008, vol. 126, no 1-2, p. 83-85.

K

KAAYA, A.N et KYAMUHANGIRE, W. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. *International Journal of food microbiology*, 2006, vol. 110, no 3, p. 217-223.

KABAK, B, DOBSON, A.D.W, et VAR, IL . Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2006, vol. 46, no 8, p. 593-619.

KARA, R et INCE, S. Aflatoxin M1 in buffalo and cow milk in Afyonkarahisar, Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2014, vol. 7, no 1, p. 7-10.

KARAMI-OSBOO, R, MIRABOLFATHY, M, KAMRAN, R, *et al.* Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control*, 2012, vol. 23, no 1, p. 271-274.

KEDIA, A, PRAKASH, B, MISHRA, P. K, *et al.* Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, vol. 89, p. 29-36.

KEDIA, A., JHA, D. K., et DUBEY, N. K. Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Badajoz: Formatex Research Center, 2015, p. 208-214.

KELLER, S. E., SULLIVAN, T. M., et CHIRTEL, S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, vol. 19, no 4, p. 305-309.

KHADDOR, M., TANTAOUI-ELARAKI, A., BEHAJIBA, A., *et al.* Destruction de l'aflatoxine M1 par les bactéries lactiques du lben Marocain et du yaourt. *Bulletin de la Société Pharmaceutique de Bordeaux*, 2003, vol. 142, p. 101-112.

KHAN, T, SHAHID, A. A, et KHAN, H.A. A. Could biorational insecticides be used in the management of aflatoxicogenic *Aspergillus parasiticus* and its insect vectors in stored wheat?. *PeerJ*, 2016, vol. 4, p. e1665.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 2007, vol. 8, no 6, p. 713-722.

KOS, J, JANIĆ HAJNAL, E, ŠARIĆ, B, *et al.* Aflatoxins in maize harvested in the Republic of Serbia over the period 2012–2016. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2018, vol. 11, no 4, p. 246-255.

KOS, J, LEVIĆ, J, ĐURAGIĆ, O, *et al.* Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*, 2014, vol. 38, p. 41-46.

KOS, J, MASTILOVIĆ, J, HAJNAL, E.J, *et al.* Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009–2012. *Food Control*, 2013, vol. 34, no 1, p. 31-34.

KUMAR, A, SHUKLA, R, SINGH, P, *et al.* Chemical composition, antifungal and antiaflatoxicogenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and chemical toxicology*, 2010, vol. 48, no 2, p. 539-543.

L

LACEY, J. 1986. Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vlegaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.

- LAHOUAR, A, MARIN, S, CRESPO-SEMPERE, A, *et al.* Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de microbiologia*, 2016, vol. 48, no 1, p. 78-85.
- LAKE, I.R., HOOPER, L, ABDELHAMID, A, *et al.* Climate change and food security: health impacts in developed countries. *Environmental health perspectives*, 2012, vol. 120, no 11, p. 1520-1526.
- LAMBONI, Yendouban et HELL, Kerstin. Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2009, vol. 29, no 1, p. 31-39.
- LAPRADE, J. C. et MANWILLER, A. Relation of insect damage, vector, and hybrid reaction to aflatoxin B1 recovery from field corn. *Phytopathology*, 1977, vol. 67, p. 544-547.
- LARSSON, P, BUSK, L, et TJÄLVE, H. Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH conjugation of aflatoxin B1 in sheep. *Carcinogenesis*, 1994, vol. 15, no 5, p. 947-955.
- LAVARDE, V. et HENNEQUIN, C. Infections à penicillium. *Encyclopédie médico-chirurgicale: maladies infectieuses*, 2006, p. 8-580.
- LE BARS, J. Toxigenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms system. 1988.
- LEE, L. S., DUNN, J. J., DELUCCA, A. J., *et al.* Role of lactone ring of aflatoxin B 1 in toxicity and mutagenicity. *Experientia*, 1981, vol. 37, no 1, p. 16-17.
- LEREAU, Myriam, GOUAS, Doriane, VILLAR, Stéphanie, *et al.* Interactions between hepatitis B virus and aflatoxin B1: effects on p53 induction in HepaRG cells. *Journal of general virology*, 2012, vol. 93, no 3, p. 640-650.
- LESLIE, J. F., & SUMMERELL, B. A. (2006). Techniques for recovering *Fusarium*. In *The Fusarium laboratory manual* (pp. 15-20). Wiley-Blackwell, Ames, IA.
- LEVIĆ, J, ĐURAGIĆ, O., KOS, J, *et al.* The occurrence of aflatoxins in Serbia-from feed to food. In : *The second North and East European Congress on Food, Kiev, Ukraine*. 2013. p. 77.
- LEVIĆ, J, GOŠIĆ-DONDO, S, IVANOVIĆ, D, *et al.* An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine/Pesticidi i fitomedicina*, 2013, vol. 28, no 3.
- LEWIS, L, ONSONGO, M, NJAPAU, H, *et al.* Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental health perspectives*, 2005, vol. 113, no 12, p. 1763-1767.
- LIN, J.K, MILLER, J.A., et MILLER, E C. 2, 3-Dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B1, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B1-DNA or-ribosomal RNA adducts formed
-

in hepatic microsomal-mediated reactions and in rat liver in vivo. *Cancer Research*, 1977, vol. 37, no 12, p. 4430-4438.

LIU, J, SUN, L, ZHANG, J, *et al.* Aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from central China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2016, vol. 9, no 2, p. 91-97.

LOZANO, M. C. et DIAZ, G. J. Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species. *British Poultry Science*, 2006, vol. 47, no 6, p. 734-741.

LUCHESE, R.H. et HARRIGAN, W.F. Biosynthesis of aflatoxin the role of nutritional factors. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, vol. 74, no 1, p. 5-14.

LUND, F et FRISVAD, J.C. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, vol. 95, no 5, p. 1117-1123.

M

MAHLİ, A, COŞKUN, D, AKÇABAY, M, *et al.* Süksinilkolin Verilmesinden Sonra Görülen Uzamış Apne ile Psödokolinesteraz Düzeyinin İlişkisi: İki Sezaryen Olgusu. *Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology*, 2001, vol. 11, no 4, p. 239-242.

MAMINE, F, FARES, M, DUTEURTRE, G, MADANI, T. Regulation of the dairy sector in Algeria between food security and development of local production: Review. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 2021, 74 (2): 73-81, doi: 10.19182/remvt.36362

MANETTA, A.C, GIAMMARCO, M, DI GIUSEPPE, L, *et al.* Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 2009, vol. 113, no 2, p. 595-599.

MANNANI, N, TABARANI, A, EL ADLOUNI, C, *et al.* Aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk marketed in Morocco. *Food Control*, 2021, vol. 124, p. 107893.

MANSFIELD, M. A., JONES, A. D., et KULDAU, G. A. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology*, 2008, vol. 98, no 3, p. 330-336.

MARECHERA, G et NDWIGA, J. Estimation of the potential adoption of Aflasafe among smallholder maize farmers in lower eastern Kenya. *African Journal of Agricultural and Resource Economics*, 2015, vol. 10, no 311-2016-5622.

MARIN, S, SANCHIS, V, RAMOS, A.J., *et al.* Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 1998, vol. 102, no 7, p. 831-837.

MARÍN, S, SANCHIS, V., SÁENZ, R., *et al.* Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, vol. 84, no 1, p. 25-36.

- MARIN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G., *et al.* Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 2013, vol. 60, p. 218-237.
- MARTINS, M.L et MARTINS, H.M. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food additives & contaminants*, 2000, vol. 17, no 10, p. 871-874.
- MATEO, E.M., GIL-SERNA, J, PATIÑO, B, *et al.* Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *International journal of food microbiology*, 2011, vol. 149, no 2, p. 118-126.
- MELLO, J.F, MACDONALD, A.M.C, POSTEL, D, *et al.* Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, vol. 104, no 8, p. 741-751.
- MÉNDEZ-ALBORES, A., DE JESÚS-FLORES, F., CASTANEDA-ROLDAN, E., *et al.* The effect of toasting and boiling on the fate of B-aflatoxins during pinole preparation. *Journal of food engineering*, 2004, vol. 65, no 4, p. 585-589.
- MIOCINOVIC, J, KESKIC, T, MILORADOVIC, Z, *et al.* The aflatoxin M1 crisis in the Serbian dairy sector: the year after. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2017, vol. 10, no 1, p. 1-4.
- MIRAGLIA, M, MARVIN, H. J. P., KLETER, G. A., *et al.* Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and chemical toxicology*, 2009, vol. 47, no 5, p. 1009-1021.
- MISHRA, H. N. et DAS, C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. 2003.
- MISLIVEC, P.B., TRUCKSESS, M.W., et STOLOFF, L. Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture. *Journal of Food Protection*, 1988, vol. 51, no 6, p. 449-451.
- MITCHELL, D., ALDRED, D., et MAGAN, N. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. *Aspects of Applied Biology*, 2003, vol. 68, p. 109-116.
- MITCHELL, N. J., BOWERS, E, HURBURGH, C, *et al.* Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2016, vol. 33, no 3, p. 540-550.
- MOHAJERI, F. A, GHALEBI, S. R, REZAEIAN, M, GHEISARI, H. R, AZAD, H. K., ZOLFAGHARI, A, FALLAH, A. A.. Aflatoxin M 1 contamination in white and Lighvan cheese marketed in Rafsanjan, Iran. *Food Control*, 2013, 33(2), 525-527.
-

MOHAMMED, S, MUNISSI, J.J.E, et NYANDORO, S.S. Aflatoxin M1 in raw milk and aflatoxin B1 in feed from household cows in Singida, Tanzania. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2016, vol. 9, no 2, p. 85-90.

MONGKON, W, SUGITA-KONISHI, Y, CHAISRI, W, SURIYASATHAPORN, W.. Aflatoxin B1 Contamination of Dairy Feeds after Storage in Farm Practice ,2017,*Tropical Environment. Biocontrol Science*, 22 : 1 : 41-45.

MOREAU, C. *Moisissures toxiques dans l'alimentation*. Pologne : Masson Et Cie, 1994. 322p.

MOREIRA, K. D. G, SIBAJA, M. K. V, ANA FELTRIN, P. C, REMEDI, D. R, OLIVEIRA, G. S., and GARDA-BUFFON, J. . Occurrence of aflatoxins B and M in milk powder and UHT consumed in the city 1 1 of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. *Food Control*, 2018,93, 260–264 2018.

MORGAVI, D. P., BOUDRA, H, JOUANY, J.P, *et al.* Consequences of mycotoxins in ruminant production. *Mycotoxins in farm animals*, 2008, p. 29-46.

MORIN, O. Aspergillus et aspergilloses: biologie, Ed. *Techniques Encyl. Med. Chir.(Elsevier, Paris), Maladies infectieuses*, 1994, p. 8-600.

MOSS, M.O. Mycotoxin review-1. aspergillus and penicillium. *Mycologist*, 2002, vol. 16, no 3, p. 116-119.

MURUGESAN, G. R., LEDOUX, D. R., NAEHRER, K., *et al.* Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry science*, 2015, vol. 94, no 6, p. 1298-1315.

N

NACHTMANN, C, GALLINA, S, RASTELLI, M, *et al.* Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk in Italy. *Food Control*, 2007, vol. 18, no 6, p. 623-629.

NEEFF, D. V., LEDOUX, D. R., ROTTINGHAUS, G. E., *et al.* In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. *Poultry Science*, 2013, vol. 92, no 1, p. 131-137.

NORTHOLT, M. D., VAN EGMOND, H. P., et PAULSCH, W. E. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 1979, vol. 42, no 6, p. 485-490.

O

- OBERHEU, D.G. et DABBERT, C.B. Aflatoxin production in supplemental feeders provided for northern bobwhite in Texas and Oklahoma. *Journal of wildlife diseases*, 2001, vol. 37, no 3, p. 475-480.
- OBRADOVIC, A, KRNJAJA, V, NIKOLIC, M, DELIBASIC, G, FILIPOVIC, M, STANKOVIC, G, et al. Impacts of climate conditions on aflatoxin B1 and fumonisins contamination of maize kernels and their co-occurrence. *Biotechnol Anim*, 2018, Husbandry. 34, 469–480. doi: 10.2298/bah1804469o.
- ODHIAMBO, B., MURAGE, H., et WAGARA, I.N. Screening for atoxigenic *Aspergillus* species and evaluating their inhibitory potential against growth and sporulation of aflatoxigenic *Aspergillus* species. *Egerton Journal of Science & Technology*, 2014, vol. 14.
- OECD-FAO. (2018). Chapter 7 . Dairy and dairy products (Vols. 2018–2027) pp. 163–174). OECD-FAO Agricultural Outlook.
- OLARTE, R.A., HORN, B.W., DORNER, J.W., et al. Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Molecular Ecology*, 2012, vol. 21, no 6, p. 1453-1476.
- OLIVEIRA, C. A. F., et FERRAZ, J. C. O. Occurrence of Aflatoxin M1 in pasteurized, UHT and milk powder from goat origin. *Food Control*, 2007, 18, 375–378 2007.
- OLIVEIRA, G.R., RIBEIRO, J.M., FRAGA, M.E., et al. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 2006, vol. 162, no 5, p. 355-362.
- OLSEN, M., JONSSON, N., MAGAN, N., et al. *Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433*, 2003.
- ORUC, H.H, Cibik, R, Yilmaz, E, and Kalkanli, O Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Addit Contam*, 2006, 23:190-5.
- OUESLATI, S, BLESA, J, MOLTÓ, J.C, et al. Presence of mycotoxins in sorghum and intake estimation in Tunisia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, vol. 31, no 2, p. 307-318.
- OUESLATI, S., BERRADA, H., MAÑES, J., et al. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. *Food Control*, 2018, vol. 84, p. 362-369.
-

P

PARANAGAMA, P. A., ABEYSEKERA, K. H. T., ABEYWICKRAMA, K., *et al.* Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.(lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, vol. 37, no 1, p. 86-90.

PARENT-M, FICHEUX, and Galtier (2013). Mycotoxines et sécurité alimentaire. EMC - Pathologie Professionnelle et de L'environnement 8, 1-14

PARK, D.L. Effect of processing on aflatoxin. *Mycotoxins and food safety*, 2002, p. 173-179.

PASTER, N et BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, 1988, vol. 7, no 3, p. 257-265.

PATERSON, R. R.M. et LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food research international*, 2010, vol. 43, no 7, p. 1902-1914.

PATERSON, R. R.M. Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological research*, 2006, vol. 110, no 9, p. 1003-1010.

PATTERSON, D. S. P., GLANCY, E. M., et ROBERTS, B. A. The 'carry over' of aflatoxin M1 into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B1. *Food and cosmetics toxicology*, 1980, vol. 18, no 1, p. 35-37.

PATYAL, A, Gill, J.P. S, BEDI, J.B and AULAKH, R.S. Potential risk factors associated with the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced under different farm conditions, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2020, DOI: 10.1080/03601234.2020.1787019

PAYNE, GARY A. et HAGLER JR, WINSTON M. Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, vol. 46, no 4, p. 805-812.

PECORELLI, I, BRANCIARI, R, ORTENZI, R, M. CIRIACI, M., CHECCARELLI, S, ROILA, R, CAPOTORTI, A, SPACCINI, G, VALIANI, A, Evaluation of the concentration factor of aflatoxin M1 in a semi-hard Pecorino cheese obtained from naturally contaminated milk. *Food Control*, 2018, 85:194-8.

PECORELLI, I, BRANCIARI, R, ROILA, R, RANUCCI, D, BIBI, R, ASSELT, M, VALIANI, A. Evaluation of Aflatoxin M1 enrichment factor in different cow milk cheese hardness category. *Italian Journal of Food Safety*, 2020.9:8419.

PELTONEN, K.D., EL-NEZAMI, H.S., SALMINEN, S.J., *et al.* Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, no 13, p. 1942-1945.

PERRONE, G, GALLO, A, et LOGRIECO, A.F. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology*, 2014, vol. 5, p. 377.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. Définition et origines des mycotoxines in Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. *Tec & Doc*, 2001, p. 3-14.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. Les Mycotoxines dans l'alimentation évaluation et gestion du risque. 1999.

PICININ, L.C.A, CERQUEIRA, M.M.O.P, VARGAS, E. A, *et al.* Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, 2013, vol. 31, no 2, p. 419-424.

PIERIDES, M, EL-NEZAMI, H, PELTONEN, K, *et al.* Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal of Food Protection*, 2000, vol. 63, no 5, p. 645-650.

PIERRON, A, ALASSANE-KPEMBI, I, OSWALD, I.P. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Manag*, 2016,2(21):21. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0041-2>.

PIETRI, A, MULAZZI, A, PIVA G, BERTUZZI, T. Fate of aflatoxin M1 during production and storage of parmesan cheese. *Food Control*, 2016, 60:478-83.

PINOTTI, L, OTTOBONI, M, GIROMINI, C, *et al.* Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts. *Toxins*, 2016, vol. 8, no 2, p. 45.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British medical bulletin*, 2000, vol. 56, no 1, p. 184-192.

PITT, J. I., BASILICO, J. C., ABARCA, M. L., *et al.* Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical mycology*, 2000, vol. 38, no sup1, p. 41-46.

PITT, J. I., MANTHONG, C., SIRIACHA, P, *et al.* Studies on the biocontrol of aflatoxin in maize in Thailand. *Biocontrol Science and Technology*, 2015, vol. 25, no 9, p. 1070-1091.

PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. *CSI Res. Org. Div. Food Processing*, 1988

PITT, J.I., HOCKING, A.D, *et al.* *Fungi and food spoilage*. New York : Springer, 2009.

PITT .E.T, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: An update review. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*, 1998.

PIVA, G., GALVANO, F., PIETRI, A., *et al.* Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition research*, 1995, vol. 15, no 5, p. 767-776.

PLEADIN, J, VULIĆ, A, PERŠI, N, *et al.* Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, 2015, vol. 47, p. 221-225.

PRAKASH, B, SINGH, P, KEDIA, A, *et al.* Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 2012, vol. 49, no 1, p. 201-208.

PRANDINI, A, TANSINI, G. I. N. O., SIGOLO, S, *et al.* On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and chemical toxicology*, 2009, vol. 47, no 5, p. 984-991.

PROBST, C, NJAPAU, H, et COTTY, P.J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol. 73, no 8, p. 2762-2764.

R

RAMA, A., LATIFI, F., BAJRAKTARI, D., *et al.* Assessment of aflatoxin M1 levels in pasteurized and UHT milk consumed in Prishtina, Kosovo. *Food Control*, 2015, vol. 57, p. 351-354.

RAMOS, A. J., LABERNIA, N., MARIN, S., *et al.* Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International journal of food microbiology*, 1998, vol. 44, no 1-2, p. 133-140.

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED (RASFF) (2003). Annual report on the functioning of the RASFF. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General.

RASHID, N., BAJWA, M. A., RAFEEQ, M., *et al.* Prevalence of aflatoxin B1 in finished commercial broiler feed from west central Pakistan. *J Anim Plant Sci*, 2012, vol. 22, no 1, p. 6-10.

RASOOLI, I, FAKOOR, M. H, YADEGARINIA, D, *et al.* Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International journal of food microbiology*, 2008, vol. 122, no 1-2, p. 135-139.

RAWAL, S, KIM, J.E, et COULOMBE J.R.R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in veterinary science*, 2010, vol. 89, no 3, p. 325-331.

REBOUX, G. Mycotoxines: effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 2006, vol. 46, no 3, p. 208-212.

REDOUANE-SALAH, S, MORGAVI, D. P., ARHAB, R, *et al.* Presence of aflatoxin M 1 in raw, reconstituted, and powdered milk samples collected in Algeria. *Environmental monitoring and assessment*, 2015, vol. 187, no 6, p. 1-4.

REPUSSARD, C., ZBIB, N., TARDIEU, D., *et al.* Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines: généralités et problématique française. *Rev. Méd. Vét.*, 2013, vol. 164, p. 583-606.

RIBA, A, BOURAS, N, MOKRANE, S, *et al.* *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, vol. 48, no 10, p. 2772-2777.

RIBA, A., MOKRANE, S., MATHIEU, F., *et al.* Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International journal of food microbiology*, 2008, vol. 122, no 1-2, p. 85-92.

RIBA, A., ZEBIRI, S., MOKRANE, S. and SABAOU, N., 2016. Occurrence of toxigenic fungi, aflatoxins and ochratoxin A in wheat and dried fruits commercialized in Algeria. International Congress of Mycotoxins and Cancer. March 24-25, 2016. Marrakech, Morocco

RICHARD, J. L. Discovery of aflatoxins and significant historical features. *Toxin Reviews*, 2008, vol. 27, no 3-4, p. 171-201.

RILEY, R. T. et NORRED, W. P. Mycotoxin prevention and decontamination: A case study on maize. *food, nutrition and agriculture*, 1999, no 23, p. 25-32.

ROSENTHAL, E., MARTY, P., FERRERO, C., *et al.* Infection à *Penicillium marneffei* évoquant une leishmaniose viscérale chez un patient infecté par le VIH. *La Presse médicale (1983)*, 2000, vol. 29, no 7, p. 363-364.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*, 1997, vol. 59, no 1, p. 57-67.

S

SAHIN, H.Z, CELIK, M, KOTAY, S, *et al.* Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2016, vol. 9, no 2, p. 152-158.

SCHMIDT-HEYDT, M, RÜFER, C.E., ABDEL-HADI, A, *et al.* The production of aflatoxin B 1 or G 1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*, 2010, vol. 26, no 4, p. 241-246.

SCHNEIDER, E.P. et DICKERT, K. J. Health Costs and Benefits of Fungicide Use in Agriculture: A Literature Review. *Journal of Agromedicine*, 1994, vol. 1, no 1, p. 19-37.

- SETAMOU, M, CARDWELL, K.F, SCHULTHESS, F, *et al.* Aspergillus flavus infection and aflatoxin contamination of preharvest maize in Benin. *Plant Disease*, 1997, vol. 81, no 11, p. 1323-1327.
- SHAR, Z. H., PIRKASH, Om, SHAR, H. H., *et al.* Aflatoxins in cotton seeds and cotton seed cake from Pakistan. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2020, vol. 13, no 1, p. 72-76.
- SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and contaminants*, 2008, vol. 25, no 2, p. 146-151.
- SINHA, K. K. et SINHA, A.K. Effect of Sitophilus oryzae infestation on Aspergillus flavus infection and aflatoxin contamination in stored wheat. *Journal of Stored Products Research*, 1991, vol. 27, no 1, p. 65-68.
- SMITH JR, ROBERT B., GRIFFIN, JOHN M., et HAMILTON, P. B. Survey of aflatoxicosis in farm animals. *Applied and environmental microbiology*, 1976, vol. 31, no 3, p. 385-388.
- SMITH, J.E., et MOSS, M.O. (1985). Mycotoxins: formation, analysis and significance (Chichester, Royaume-Uni, Etats-Unis: Wiley
- SMITH, T.K., MCMILLAN, E. G., et CASTILLO, J. B. Effect of feeding blends of Fusarium mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *Journal of animal science*, 1997, vol. 75, no 8, p. 2184-2191.
- SOUZA, M.D.L.M, SULYOK, M, FREITAS-SILVA, O, *et al.* Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *The Scientific World Journal*, 2013, vol. 2013.
- STEYN, P S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology letters*, 1995, vol. 82, p. 843-851.
- STOREY E, DANGMAN K.H, SCHENCK P, *et al.* Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. Formington, University of Connecticut Health Center, 2004
- STREIT, E, NAEHRER, K, RODRIGUES, I, *et al.* Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, vol. 93, no 12, p. 2892-2899.
- STROSNIDER, H, AZZIZ-BAUMGARTNER, E, BANZIGER, M, *et al.* Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental health perspectives*, 2006, vol. 114, no 12, p. 1898-1903.
- STROUD, J.S, *et al.* The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. 2007.
-

T

TABUC, C. *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*. 2007. Thèse de doctorat.

TANTAOUI-ELARAKI, A. et BARTINE, H. Fungal load of selected spices and their contamination by toxigenic *Aspergillus* species. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition*, 1994, vol. 12, no 2, p. 231-236.

TANTAOUI-ELARAKI, A. et KHABBAZI, N. Contamination éventuelle des fromages par les mycotoxines: une revue. *Le Lait*, 1984, vol. 64, no 635-637, p. 46-71.

TANTAOUI-ELARAKI, A., RIBA, A., OUESLATI, S., *et al.* Toxigenic fungi and mycotoxin occurrence and prevention in food and feed in northern Africa—a review. *World Mycotoxin Journal*, 2018, vol. 11, no 3, p. 385-400.

TATSADJIEU, N. L., DONGMO, PM J, NGASSOUM, M. B., *et al.* Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food control*, 2009, vol. 20, no 2, p. 161-166.

THE COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES .council directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91 /414/EEC). *Official Journal of the European Communities*, 1991.

THOMPSON, C et HENKE, S.E. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. *Journal of Wildlife Diseases*, 2000, vol. 36, no 1, p. 172-179.

TIAN, J, HUANG, B, LUO, X, *et al.* The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, 2012, vol. 130, no 3, p. 520-527.

TOLA, M et KEBEDE, B. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2016, vol. 2, no 1, p. 1191103.

TOMAŠEVIĆ, I, PETROVIĆ, J, JOVETIĆ, M, *et al.* Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food control*, 2015, vol. 56, p. 64-70.

TORRES, A.M, BARROS, G.G, PALACIOS, S.A, *et al.* Review on pre-and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International*, 2014, vol. 62, p. 11-19.

TRENHOLM, H. L., PRELUSKY, D. B., YOUNG, J. C., *et al.* *Reducing Mycotoxins in Animal Feeds*. Publication-Agriculture Canada 1827E, Cat. No. A63-1827, 1988.

TROLLER, J. A. Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technology (USA)*, 1980.

TRUCKSESS, M. W., STOLOFF, L., YOUNG, K., *et al.* Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poultry Science*, 1983, vol. 62, no 11, p. 2176-2182.

TSAKIRIS, I.N, TZATZARAKIS, M.N, ALEGAKIS, A,K, VLACHOU, M.I, RENIERI, E.A. and TSATSAKIS, A.M. Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food Chem. Toxicol*, 2013, 56: 261-265.

U

UNUSAN, N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, vol. 44, no 11, p. 1897-1900.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CFR-code of federal regulations title 21 Part 556 tolerances for residues of new animal drugs in food. *US Food and Drug Administration: Rockville, MD, USA*, 2014.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Levels for aflatoxins in animal food, compliance policy guide. 2019.

USAID (2012) Aflatoxin: A synthesis of the research in health, agriculture, and trade.

USDA. (2018). Grain and feed update crop and policy update.

V

VAINIO H., MAGEE P., MCGREGOR D., MCMICHAEL A., (1992), Mechanisms of Carcinogens in Risk Identification, IARC Scientific Publications No 116, IARC, Lyon

VAN EGMOND, H.P. et JONKER, M. A. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Food and Agriculture organization of the United Nations, 2004.

VAN EGMOND, H.P., SCHOTHORST, R.C., et JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007, vol. 389, no 1, p. 147-157.

VARGA, J, BARANYI, N, CHANDRASEKARAN, M, *et al.* Mycotoxin producers in the in the *Aspergillus* genus. *Acta Biol. Szeged.* 2015, 59, p.151–167.

VAYIAS, B.J., ATHANASSIOU, C.G., MILONAS, D.N., *et al.* Persistence and efficacy of spinosad on wheat, maize and barley grains against four major stored product pests. *Crop Protection*, 2010, vol. 29, no 5, p. 496-505.

VELDMAN, A., MEIJS, J. A. C., BORGGREVE, G. J., *et al.* Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Science*, 1992, vol. 55, no 2, p. 163-168.

VENDL, O., BERTHILLER, F., CREWS, C., *et al.* Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, vol. 395, no 5, p. 1347-1354.

VESELÝ, D., VESELÁ, D., et JELINEK, R. Comparative assessment of the aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 embryotoxicity in the chick embryo. *Toxicology letters*, 1983, vol. 15, no 4, p. 297-300.

VIQUEZ, O.M., CASTELL-PEREZ, M. E., et SHELBY, R. A. Occurrence of fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, vol. 44, no 9, p. 2789-2791.

VIRDIS, S., CORGIOLU, G., SCARANO, C., PILO, A. L., and DE SANTIS, E. P. L.. Occurrence of Aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 2008,19, 44-49 2008.

VITA, V., CLAUSI, M. T., FRANCHINO, C., *et al.* Aflatoxin B 1 contamination in feed from Puglia and Basilicata regions (Italy): 5 years monitoring data. *Mycotoxin research*, 2016, vol. 32, no 4, p. 229-236.

W

WALIYAR, F., OSIRU, M., SUDINI, H., *et al.* Reducing aflatoxins in groundnuts through integrated management and biocontrol. 2013.

WANG, B., MAHONEY, N.E., PAN, Z., *et al.* Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. *Food Control*, 2016, vol. 59, p. 461-467.

WHEELER, M. H., BHATNAGAR, D., et KLICH, M. A. Effects of chlobenthiazole on aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1991, vol. 41, no 2, p. 190-197.

WHEELER, T et VON BRAUN, J. Climate change impacts on global food security. *Science*, 2013, vol. 341, no 6145, p. 508-513.

WHITLOW, L. W., HAGLER JR, W. M., *et al.* The top ten most frequently-asked questions about mycotoxins, cattle and dairy food products. In : *Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: re-imagining the feed industry, Lexington, Kentucky, USA, 23-26 May 2004.* Alltech UK, 2004. p. 231-253.

WILLIAMS, A. P., SMITH, R. A., GAZE, R., *et al.* An international future for standards of HACCP training. *Food Control*, 2003, vol. 14, no 2, p. 111-121.

WOGAN, G.N. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer research*, 1992, vol. 52, no 7 Supplement, p. 2114s-2118s.

WORLD HEALTH ORGANIZATION,. *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. World Health Organization, 2015.

WOTTON, H. R. et STRANGE, R. N. Increased susceptibility and reduced phytoalexin accumulation in drought-stressed peanut kernels challenged with *Aspergillus flavus*. *Applied and environmental microbiology*, 1987, vol. 53, no 2, p. 270-273.

Y

YANG, C-K, CHENG, Y-H, TSAI, W-T, *et al.* Prevalence of mycotoxins in feed and feed ingredients between 2015 and 2017 in Taiwan. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, vol. 26, no 23, p. 23798-23806.

YAZDANPANA, H, MIRAGLIA, M, CALFAPIETRA, FR, BRERA, C. Natural occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in corn and barley from Mazandaran and Golestan in north provinces of Iran. *Mycotoxin Research*, 2001, 17: 21-30.

YAZDANPANA, H. Mycotoxin contamination of foodstuffs and feedstuffs in Iran. *Iran J Pharma Res.* 1:9–16.2006.

YEH, F-S, C. Yu, M.C, *et al.* Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer research*, 1989, vol. 49, no 9, p. 2506-2509.

YIANNIKOURIS, A. et JOUANY, J. P. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Prod. Anim.*, 15 (1), 3-16.2002.

YIANNIKOURIS, A., FRANCOIS, J. E. A. N., POUGHON, L., *et al.* Adsorption of zearalenone by β -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of food protection*, 2004, vol. 67, no 6, p. 1195-1200.

YOUSOF, S. S. M. et EL ZUBEIR, I. E. M. Chemical composition and detection of Aflatoxin M1 in camels and cows milk in Sudan. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2020, vol. 13, no 4, p. 298-304.

YUNUS, A. W, IMTIAZ, N, KHAN, H, *et al.* Aflatoxin contamination of milk marketed in Pakistan: A longitudinal study. *Toxins*, 2019, vol. 11, no 2, p. 110.

Z

ZAIED, C, ABID, S, ZORGUI, L, *et al.* Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food control*, 2009, vol. 20, no 3, p. 218-222.

ZAKARIA, A. M, AMIN, Y. A, KHALIL, O. S. F, *et al.* Rapid detection of aflatoxin M1 residues in market milk in Aswan Province, Egypt and effect of probiotics on its residues concentration. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 2019, vol. 6, no 2, p. 197.

ZBIB, N., REPUSSARD, C., TARDIEU, D., *et al.* Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Rev. Méd. Vét.*, 2014, vol. 165, p. 116-135.

ZINEDINE, A., FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M., MAÑES, J, *et al.* Multi-mycotoxin contamination of couscous semolina commercialized in Morocco. *Food Chemistry*, 2017, vol. 214, p. 440-446.

ZINEDINE, A, MECA, G, MAÑES, J, *et al.* Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in Morocco. *Food Control*, 2011, vol. 22, no 1, p. 1-5.

ZINEDINE, A., GONZÁLEZ-OSNAYA, L., SORIANO, J. M., *et al.* Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International journal of food microbiology*, 2007, vol. 114, no 1, p. 25-29.

ZINEDINE, A., JUAN, C., IDRISSE, L., *et al.* Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Microchemical journal*, 2007, vol. 87, no 2, p. 154-158.

ZUMMO, N. et SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. *Plant disease*, 1992, vol. 76, no 8, p. 771-773.

Résumé

Résumé

La contamination de l'alimentation animale par les aflatoxines est responsable de pertes économiques considérables, d'une diminution des performances zootechniques, ainsi que de graves conséquences sanitaires. S'ajoute à cela une problématique de santé publique liée à la possibilité de transfert de l'AFB₁ sous sa forme hydroxylée AFM₁ dans le lait et les produits laitiers.

Du fait de la toxicité avérée de ces deux mycotoxines (AFB₁ et AFM₁), et dans le but d'évaluer l'incidence de ces contaminants dans l'alimentation animale et humaine, les travaux de notre thèse ont porté sur la recherche de l'AFB₁ dans les aliments concentrés destinés à la vache laitière, et de son métabolite hydroxylé l'AFM₁ dans le lait cru. Les prélèvements provenaient d'exploitations laitières, au niveau de différentes régions du nord algérien, ont été analysés à l'aide de la technique immunoenzymatique ELISA suivie d'une analyse de confirmation par la technique HPLC-FLD.

Nos résultats ont montré que 41 échantillons d'aliments de bétail (49.4%, N =83) étaient contaminés par l'AFB₁, et que sur les 41 échantillons positifs, 18 (43.90%) ont présenté une concentration en AFB₁ supérieure aux LMR européennes (5µg/kg) et 14 échantillons (34.14%) ont révélé un niveau de contamination supérieur aux LMR de la FDA (20 µg/kg). Concernant la présence de l'AFM₁ dans les échantillons de lait vache, notre enquête a révélé un taux de positivité de l'AFM₁ de 46,42% (N=84) (46,42% des échantillons de lait cru ont enregistré un niveau d'AFM₁ supérieur aux LMR de l'U.E), avec une moyenne totale de 71,92 ± 28,48 ng/L. Bien que notre étude sur les niveaux de contamination de l'alimentation animale par l'AFB₁ et la contamination du lait cru par l'AFM₁, demeure une enquête limitée, nos résultats démontrent que la moyenne élevée de l'AFM₁ dans le lait était en parfaite corrélation avec les niveaux élevés d'AFB₁ retrouvés dans l'alimentation des bovins laitiers. Ainsi, la consommation du lait pourrait constituer un réel danger pour la santé publique algérienne, surtout pour les nourrissons et les enfants qui en raison de la quantité importante de lait consommée par rapport à leur poids, et de l'immaturation de leur mécanismes de détoxification biochimiques, seraient plus sensibles aux effets toxiques de cette toxine. Notre travail souligne également l'importance et la nécessité, pour les autorités sanitaires algériennes, d'instaurer une réglementation visant à définir les LMR des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale.

Mots clés : AFB₁, AFM₁, aliments de bétail, ELISA, HPLC-FLD, lait cru, mycotoxines.

Abstract

Aflatoxin contamination of animal feed is responsible for significant economic losses, reduced zootechnical performance, and serious health consequences. In addition, there is a public health issue related to the possibility of transfer of AFB₁ in its hydroxylated form AFM₁ in milk and milk products.

Due to the demonstrated toxicity of these two mycotoxins (AFB₁ and AFM₁), and in order to assess the impact of these contaminants in animal and human nutrition, the work of our thesis focused on the research of AFB₁ in concentrated feed for dairy cows, and its hydroxylated metabolite AFM₁ in raw milk. The samples analysed came from dairy farms, in different regions of northern Algeria, using the enzyme-linked immunosorbent technique ELISA followed by a confirmation analysis using the technique HPLC-FLD.

Our results showed that 41 feed samples (49.4%, N =83) were contaminated with AFB₁, and that of the 41 positive samples, 18 (43.90%) had an AFB₁ concentration higher than the European MRLs (5 µg/kg) and 14 samples (34.14%) revealed a level of contamination above the FDA MRLs (20 µg/kg). Regarding the presence of AFM₁ in cow's milk samples, our survey revealed a AFM₁ positivity rate of 46.42% (N=84) (46.42% of raw milk samples recorded an AFM₁ level above the EU MRLs), with a total average of 71,92 ±28.48 ng/L.

Although our study on levels of AFB₁ contamination of animal feed and raw milk contamination of AFM₁ remains a limited investigation, our results show that the high average of AFM₁ in milk was in perfect correlation with the high levels of AFB₁ found in dairy cattle feed. Thus, the consumption of milk could constitute a real danger for Algerian public health, especially for infants and children who due to the large quantity of milk consumed in relation to their weight, and immaturity of their biochemical detoxification mechanisms, would be more sensitive to the toxic effects of this toxin. Our work also highlights the importance and need for the Algerian health authorities to introduce regulations to define the MRLs for mycotoxins in food and feed.

Keywords: AFB₁, AFM₁, feed, ELISA, HPLC-FLD, raw milk, mycotoxins.

ملخص

إن تلوث الأعلاف الحيوانية بالأفلاتوكسين مسؤول عن الخسائر الاقتصادية الكبيرة ، وانخفاض الأداء التكنولوجي الحيواني وعواقب صحية. وبالإضافة إلى ذلك ، هناك مسألة تتعلق بالصحة العامة تتعلق بإمكانية نقل AFB_1 في شكلها الهيدروكسيلي AFM_1 في الحليب ومنتجاته. ونظراً للسمية الواضحة لهذين المايكوتوكسين (AFM_1 و AFB_1) ، ومن أجل تقييم تأثير هذه الملوثات في التغذية الحيوانية والإنسانية ، فقد ركز عمل أطروحتنا على بحث AFB_1 في العلف المركز الموجه إلى أبقار الألبان ، وأيضها الهيدروكسيلي AFM_1 في الحليب الخام. وجاءت العينات التي تم تحليلها من مزارع الألبان ، في مناطق مختلفة من شمال الجزائر ، باستخدام تقنية المنع المرتبط بالإنزيم ELISA ثم تحليل تأكيد باستخدام تقنية HPLC-FLD.

وأظهرت نتائجنا أن 41 عينة تغذية (49.4% ، $N = 83$) ملوثة AFB_1 ، وأن 18 عينة (43.90%) من أصل 41 عينة إيجابية لديها تركيز AFB_1 أعلى من تركيز MRL الأوروبي (5 ميكروغرام/كغ) ، وأن 14 عينة (34.14%) كشفت عن مستوى من التلوث أعلى من MRL هيئة FDA (20 ميكروغرام/كغ). وفيما يتصل بوجود AFM_1 في عينات لبن البقر ، فقد كشفت دراستنا الاستقصائية عن معدل موجب AFM_1 بلغ 46.42% ($N = 84$) (سجل 46.42% من عينات الحليب الخام مستوى AFM_1 أعلى من MRL الاتحاد الأوروبي)، بمتوسط إجمالي بلغ 28.48 ± 71.92 نانوغرام/لتر.

وعلى الرغم من أن دراستنا لمستويات التلوث AFB_1 للأعلاف الحيوانية وتلوث AFM_1 بالألبان الخام لا تزال تحقيقاً محدوداً ، فإن نتائجنا تبين أن المتوسط المرتفع AFM_1 في الحليب كان مترابطاً تماماً مع المستويات العالية AFB_1 الموجودة في علف الماشية. وبالتالي ، فإن استهلاك الحليب يمكن أن يشكل خطراً حقيقياً على الصحة العامة الجزائرية ، لا سيما بالنسبة للرضع والأطفال الذين يكونون أكثر حساسية للأثار السمية لهذا السم بسبب الكمية الكبيرة من الحليب المستهلك بالنسبة لوزنهم ، وعدم نضج آلياتهم الكيميائية الحيوية لإزالة السمية. ويبرز عملنا أيضاً أهمية ضرورة قيام السلطات الصحية الجزائرية بوضع لوائح لتحديد MRL الميكوتوكسينات في الأغذية والأعلاف.

الكلمات الرئيسية: AFB_1 ، AFM_1 ، علف الماشية ، ELISA ، HPLC-FLD ، الحليب الخام ، الميكوتوكسين.

Article

Occurrence and seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw cow milk collected from different regions of Algeria

Sarah Mohammadi-Ameur^{1,2}, Mohammadi Dahmane¹, Carlo Brera³, Moustafa Kardjadj^{1,2} and Meriem Hind Ben-Mahdi¹

1. Laboratory of Animal Health and Productions, Higher National Veterinary School, Algiers, Algeria; 2. High School of Food Sciences and Food Industries (ESSAIA), Algiers, Algeria; 3. Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health, Food Chemistry Unit, Italian National Institute of Health (ISS), Viale Regina Elena, 299, Rome, Italy.

Corresponding author: Sarah Mohammadi-Ameur, e-mail: sarahmohammadi.ameur@gmail.com

Co-authors: MD: mohammedidahmane@yahoo.fr, CB: carlo.brera@iss.it, MK: drkardjadj@live.fr,

MHB: mhbenmahdi1@gmail.com

Received: 07-11-2019, **Accepted:** 21-01-2020; **Published online:** 09-03-2020

doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.433-439 **How to cite this article:** Mohammadi-Ameur S, Dahmane M, Brera C, Kardjadj M, Ben-Mahdi MH (2020) Occurrence and seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw cow milk collected from different regions of Algeria, *Veterinary World*, 13(3): 433-439.

Abstract

Background and Aim: Aflatoxins are metabolites of molds that exert potentially toxic effect on animals and humans. This study aimed to investigate the occurrence of aflatoxin M₁ (AFM₁) in raw cow milk collected during 1 year (2016-2017) from different regions of Algeria and risk factors associated with the contamination.

Materials and Methods: During the survey period, 84 samples of raw milk were collected in three regions of Algeria (northeast, north center, and northwest) during four seasons. AFM₁ levels were analyzed by competitive enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: AFM₁ was detected in 39 (46.43%) samples (total mean concentration, 71.92 ng/L; range, 95.59-557.22 ng/L). However, the AFM₁ levels exceeded the maximum tolerance limit set by the Food and Drug Administration in the USA (500 ng/L) in only 1 sample (1.19%). Statistical analysis revealed significant differences ($p < 0.005$) between AFM₁ levels in milk samples collected in the spring and autumn. The mean AFM₁ levels in samples collected in the spring were significantly higher than those in samples collected in autumn.

Conclusion: The survey indicates that farmers involved in milk production should be made aware of the adverse effects of aflatoxin contamination in animal feed. A systematic control program of supplementary feedstuff for lactating cows should be introduced by the public health authorities.

Keywords: aflatoxin M₁, Algeria, cow milk, enzyme-linked immunosorbent assay.

Introduction

Aflatoxins are secondary metabolites of molds, mainly produced by *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, and *Aspergillus nomius* [1,2]. They contaminate a wide variety of food and agricultural products, such as cereals, seeds, grain, and silage [3]. Aflatoxins are one of the most widely studied groups of mycotoxins due to their recognized toxicity, and hepatotoxic, mutagenic, teratogenic, immunosuppressive, and neoplastic effects [4]. Although 17 aflatoxins have been isolated to date [5], only five of them are well known and studied extensively from the toxicological point of view. These are aflatoxin B₁ (AFB₁), B₂, G₁, G₂ and M₁. AFB₁ is the most important and potent natural carcinogen and has been classified by the International Agency for Research on Cancer in Group 1 of human cancer-causing compounds [5,6]. The most rapidly formed metabolite of AFB₁ is

aflatoxin M₁ (AFM₁) produced by the liver in cattle following ingestion of the parental toxin in contaminated feed [7]. Similar to other aflatoxins, AFM₁ has been classified in Group 1 as carcinogenic to humans since sufficient evidence exists for its hepatocarcinogenicity in humans [5]. Approximately 0.5-5% of AFB₁ is transferred in milk as AFM₁. After ingestion of cattle feed contaminated with AFB₁, AFM₁ is detectable in milk within 3 d and becomes undetectable within 4 d after the contaminated feed is withdrawn [8,9].

Milk is considered a staple food for humans of all age groups due to its high nutritional value [10]. It plays a central role in human diet and therefore holds a great economical significance on the global nutritional level [11]. The rate of AFM₁ excretion in milk (carryover) depends on different nutritional and physiological factors, such as feeding regimen, ingestion and digestion rates, animal health, hepatic biotransformation capacity, and lactation period [12-14]. Furthermore, AFM₁ is heat stable in raw processed milk and dairy products and is not completely destroyed by pasteurization, sterilization, and other food processing procedures [15].

Recently, several surveys concerning AFM₁ contamination and its presence in milk and dairy products have been conducted in Croatia [16-18], Serbia [19],

Copyright: Mohammadi-Ameur, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Italy [20-22], France [23], Spain [24], Greece [25], Iran [26-28], Pakistan [29-31], and Turkey [32,33]. Due to the potential toxicity of AFM₁, most countries have set maximum permissible levels for AFM₁ in milk and milk products. In the European Union (EU), the maximum legal level of AFM₁ is 0.050 µg/kg for milk and dairy products [34]. The Food and Drug Administration (FDA) in the USA and the Codex Alimentarius set an action level for AFM₁ in milk is 500 ng/L [35,36]. Unfortunately, the maximum permissible level of AFM₁ in milk has not been established in Algeria. To the best of our knowledge, only one preliminary study of AFM₁ milk contamination has been performed, and in only one district, in Algeria [37].

This study aimed to evaluate the concentration of AFM₁ in raw cow milk collected during a 1-year period (2016-2017) in different regions in Algeria and to investigate the risk factors associated with such contamination.

Materials and Methods

Ethical approval and informed consent

Raw milk was collected from bulk tanks on the farms, which did not need contact with animals. The present study did not require ethics approval. Informed consent was obtained from all cattle farm owners.

Study area

Algeria has a surface area of 2,147,570 km² and is inhabited by more than 42 million people. It is positioned between the latitude 19°S and 37°N and longitude 9°W and 12°E. More than 60% of the Algerian population lives in the northern hilly areas. Algeria is divided into 48 administrative districts. For the purposes of the current study, the country was divided into five regions (Figure-1): North region (35.3°N-36.8°N and 1°E-4.7°E), with 10 districts; northwestern region (35°N-36.3°N and 2°W-1°E), with 10 districts; northeastern region (35.3°N-37°N and 4.7°E-8.5°E), with 9 districts; steppe region (33°N-35.3°N and 2°W-8.5°E), with 11 districts; and south (Sahara) region (19°N-33°N and 8.8°W-12°E), with 11 districts. The steppe and Sahara regions were excluded from the study because they are not cattle-breeding areas (sheep and goat farming predominates in these two regions).

Sample collection and preparation

For the study, 84 samples of raw fresh cow milk were randomly collected from dairy cattle farms from

August 2016 to July 2017 (n=23, northeast; n=22, center north; and n=39, northwest). Raw milk was collected from bulk tanks on the farms. The individual sample size was approximately 0.5 L. Samples were transported to the laboratory in iceboxes and stored frozen at -18°C until analysis. Personal interviews of the cattle farm owners enabled the collection of information (in the form of a questionnaire) about the number of cattle per farm, feeding system, feed storage practices, and sample collection date.

We have considered that on smallholder farms, a number of cows were ≤40, and on large farm, the number of dairy cows was ≥41.

Season-wise distribution was done as follows:

- Winter: December 2016-January 2017-February 2017
- Spring: March 2017-April 2017-May 2017
- Summer: August 2016-June 2017-July 2017
- Autumn: September 2017-October 2017- November 2017.

Sample analysis

Milk samples were analyzed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Before the analysis, milk samples were thawed at 4°C for 30 min. Then, 5 mL of the sample was centrifuged for 10 min at 3000× g at 4°C. After centrifugation, the lower (serum) layer was collected by aspiration with a Pasteur pipette. Next, 0.4 mL of milk serum was mixed with 0.1 mL of 100% methanol (4:1) and used for ELISA. AFM₁ levels were determined by direct competitive ELISA using the AgraQuant[®] AFM₁ Plus ELISA (100/2000 ng/L) kit supplied by Romer Labs[®] Singapore Pte. Ltd. (Singapore), following the manufacturer's instructions.

All standards and samples were analyzed in duplicate. One well coated with an AFM₁-specific antibody was used for each standard (0, 100, 200, 500, 1000, and 2000 ng/L) or sample. For the analysis, 200 µL of conjugate solution was dispensed into wells. Then, 100 µL of each standard solution or sample were placed in the appropriate dilution well and carefully mixed. The solutions (100 µL) were then placed in individual antibody-coated microwells and incubated at room temperature (18-30°C) for 20 min. Then, the liquid was poured out, and the microwell holder was tapped upside down against an absorbent paper to ensure removal of liquid from the wells. The liquid was decanted and wells

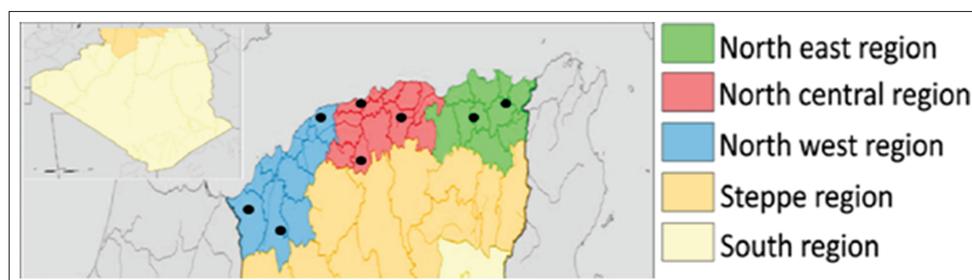


Figure-1: Study area map showing the sample collection regions [Source: Map prepared by the authors].

were washed 5 times with a diluted wash buffer. Then, 100 μ L of the substrate were pipetted into each well and incubated for 10 min in the dark. At the end of incubation, 100 μ L of stop solution was dispensed into the antibody-coated wells. Sample absorbance was measured at 450 nm using a microwell plate reader (Biotek Elx800, Winooski, Vermont, USA).

Method validation

According to the AgraQuant[®] AFM₁ Plus ELISA kit, the limit of detection (LOD) of AFM₁ in fresh milk is 89 ng/L. The LOD of the method satisfied the maximum tolerance limit set by the FDA in the US (500 ng/L) [38]. Samples were considered to be positive for AFM₁ if the levels exceeded the LOD of the assay.

To determine the efficiency of the assay, a standard solution of AFM₁ was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Validation of ELISA was performed by determining the recovery and mean variation coefficient in raw milk spiked with different concentrations of AFM₁ (100, 250 and 500 ng/L) and analyzing AFM₁ in raw milk. The recovery of AFM₁ in spiked milk samples was 95.6% (coefficient of variation: CV=1.23), 94% (CV=1.11), and 99% (CV=1.06) for spiked concentrations of 100, 250 and 500 ng/L AFM₁, respectively. All experiments were repeated 5 times. The recovery rates satisfied the guidelines for recoveries set by the Codex Alimentarius

Standard [39]. The standard calibration showed excellent linearity, with R² value of 0.999.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software 20.0 (IBM Corp., NY, USA), at 95% significance level. The positivity rates in samples were compared using Fisher's exact test or Chi-square test. The mean AFM₁ levels were compared using Student's t-test or ANOVA.

For the risk factor analysis, a univariable analysis for variable selection was first performed at $p \leq 0.2$, using the χ^2 test or Fisher's exact test. The variables that passed this cutoff were then analyzed by logistic regression [40]. The variables were ruled as risk factors when the odds ratio was >1 and $p \leq 0.05$.

Results

The survey revealed high AFM₁ levels in the raw cow milk collected in Algeria (overall mean of 71.92 \pm 28.48 ng/L). The positivity rate of AFM₁ contamination was 46.42%. Further, from 84 (100%) tested raw milk samples, AFM₁ levels were below LOD (89 ng/L) in 45 (53.6 %) samples; between 89 and 300 ng/L in 35 (41.7%) samples; between 301 and 500 ng/L in 3 (3.6%) samples and over 500 ng/L in 1 (1.19%) sample (Tables-1-3).

Based on the region of origin, the mean AFM₁ levels in raw milk samples (ng/L) were 32.94 \pm 11.87,

Table-1: Distribution of AFM₁ levels according to the region in Algeria.

Region	Districts	Number of samples	Distribution of AFM ₁ level (ng/L)			
			Mean \pm SE (range)			
			<LOD*	89-300	301-500	>500
Northeast	Constantine, Mila	23	16	7	0	0
			-	112.42 \pm 19 (96.87-147.83)	-	-
North center	Médéa, Tipaza, Djelfa	22	5	15	2	0
			-	154.94 \pm 45.15 (95.59-231.17)	453.49 \pm 6.66 (448.78-458.20)	-
Northwest	Chlef, Tlemcen, Mascara	39	24	13	1	1
			-	125.35 \pm 21.28 (100.58-178.48)	344.99	557.22
Overall %		84 100	45 53.57	35 41.66	3 3.57	1 1.19

*LOD=Limit of detection, AFM₁=Aflatoxin M₁, SE=Standard error

Table-2: Distribution of AFM₁ levels according to the farm size in Algeria.

Farm size	Number of samples	Distribution of AFM ₁ levels (ng/L)			
		Mean \pm SE (range)			
		<LOD*	89-300	301-500	>500
Small	47	25	19	2	1
			-	147.03 \pm 43.39 (95.59-231.17)	453.49 \pm 6.66 (448.78-458.20)
Large	37	20	16	1	0
			-	118.09 \pm 23.16 (96.87-183.91)	344.99
Overall %	84 100	45 53.57	35 41.66	3 3.57	1 1.19

*LOD=Limit of detection, AFM₁=Aflatoxin M₁, SE=Standard error

152.46±44.14, and 57.05±21.67, in the northeast, center north, and northwest, respectively (Table-4). Statistical analysis revealed a significant difference in the contamination levels of milk between regions ($p=0.013$) (Table-4). The mean concentration of AFM₁ was significantly higher in the center north (152.46±44.14 ng/L) than in other regions.

Analysis of season wide distribution indicated a significant difference in the mean concentration of AFM₁ between seasons ($p=0.025$). The mean AFM₁ levels in samples collected in the spring (106.92±41.92 ng/L) were significantly higher than those in samples collected in the autumn (88.79±25.34 ng/L), summer (59.77±19.65 ng/L), or winter (60.28±27.38 ng/L) (Table-4).

Considering the farm size, AFM₁ levels were significantly higher on smallholder farms (90.16±43.02 ng/L) than on large farms (58.59±27.44 ng/L) ($p=0.032$) (Table-4).

Discussion

Mycotoxins pose a serious health threat to humans and animals. In the current study, we aimed to evaluate the distribution of AFM₁ contamination

levels in raw milk across Algerian and to investigate the risk factors associated with such contamination.

To the best of our knowledge, only one study on milk contamination by AFM₁ in Algeria has been published, concerning the city of Constantine (in the northeast of the country) [37]. In the study, AFM₁ was detected in 5 (11%) out of 47 samples, at levels ranging from 9 to 103 ng/L, with one sample exceeding the limit of 0.050 µg/kg set by the EU. In the current study, we observed 46.42% positivity rate of AFM₁ contamination (toxin levels exceeding 0.050 µg/kg EU limit) (Table-1), with the total positive mean of 71.92±28.48 ng/L, considering only the positive samples (containing 95.59-557.22 ng/L) (Table-1). The high occurrence of AFM₁ in the investigated cow milk samples may be associated with the notion that cows are kept in local dairy farms and fed compound rations or silage stored under inadequate conditions. This can lead to areas highly contaminated with toxigenic *Aspergillus* fungi and a consequent aflatoxin formation [41]. However, the incidence of AFM₁ contamination reported in the current study was lower than the incidence in the neighboring Morocco, where AFM₁ contamination of 48 (88.8%) out of 54 pasteurized milk

Table-3: Distribution of AFM₁ levels according to the season in Algeria.

Season	Number of samples	Distribution of AFM ₁ levels (ng/L)			
		Mean±SE (range)			
		<LOD*	89-300	301-500	>500
Winter	18	10	7 112.40±9.65 (103.91-178.48)	1 344.69	0
Spring	7	3	2 119.08±5.31 (112.25-125.67)	2 453.49±6.66 (448.78-458.20)	0
Summer	39	22	17 139.15±23.87 (96.87-231.17)	0	0
Autumn	20	10	9 128.17±18.57 (95.59-229.20)	0	1 557.22
Overall	84	45	35	3	1
%	100	53.57	41.66	3.57	1.19

*LOD=Limit of detection, AFM₁=Aflatoxin M₁, SE=Standard error

Table-4: Univariable analysis of risk factors associated with AFM₁ positivity in cattle farm milk in Algeria.

Variable	Category	Number of samples	Number of positive samples (%)	p (χ^2 test)	Total samples (ng/L) (mean±SD)	p (t/K-W test)
Region	Northeast	23	7 (30.43)	0.017	32.94±11.87	0.013*
	Center north	22	17 (77.27)		152.46±44.14	
	Northwest	39	15 (38.64)		57.05±21.67	
Farm size	Small	47	22 (46.80)	0.473	90.16±43.02	0.032*
	Large	37	17 (45.94)		58.59±27.44	
Season	Winter	18	8 (44.44)	0.381	60.28±27.38	0.025*
	Spring	7	4 (57.14)		106.92±41.92	
	Summer	39	17 (43.59)		59.77±19.65	
	Autumn	20	10 (50)		88.79±25.34	
Overall (%)		84 (100)	39 (46.42)	Total	71.92±28.48	
			Positive samples (ng/L) (mean±SD)	mean (ng/L)	156.71±43.15	

*Significant difference between means ($p<0.005$). SD=Standard deviation, AFM₁=Aflatoxin M₁

samples and ranging from 0.001 to 117 ng/L (mean value of 18 ng/L) was reported [42].

In the present study, AFM₁ levels in 38 out of 39 samples were below the maximum action limit established by the FDA and Codex Alimentarius (500 ng/L); the limit was exceeded in only 1 sample (1.19%). Further, the detected AFM₁ contamination in milk samples collected in Algeria in the current study was relatively lower than that in milk produced in other countries. Tomašević *et al.* [19] analyzed 678 raw milk samples in Serbia during the years 2013-2014 and showed that AFM₁ levels in 56.3% and 24.6% samples exceeded the maximum EU and USA set limits, respectively, with the mean AFM₁ levels of 282 ng/L. More recently, in a study from Pakistan, AFM₁ was detected in 143 (91.7%) out of 156 fresh milk samples analyzed, with the mean level of 342.2 ng/L, and with 125 (80.1%) and 51 (32.7%) samples containing more AFM₁ than the maximum EU and USA set limits, respectively [29]. Collectively, these observations indicate that AFM₁ contamination levels in milk vary among countries. These variations could be associated with different methods for toxin detection and differences in the forage and feed quality, cow diet, geographical location, climate and seasonal variations, genetic variation in dairy cows, farming systems, and feed storage [31,43,44].

The current study revealed considerable variations in AFM₁ contamination rate in raw milk samples from different regions in Algeria. The detected sample positivity was 30.43% in the northeast, 77.27% in the center north, and 38.64% in the northwest. These variations may be linked to geographic and climatic differences [45]. It has been reported that the high temperature associated with climate change supports mycotoxin contamination [46].

Further, in the current study, the highest AFM₁ mean levels were recorded in the spring (106.92±41.92 ng/L) and autumn (88.79±25.34 ng/L) (Table-4) that could be explained by very hot summer, severe drought, warm autumn, and a lack of rain during the winter season recorded in most parts of Algeria in the years 2016-2017 [47,48]. Severe drought may increase the risk of aflatoxin contamination [49]. Indeed, according to the studies from Croatia, 33% of cow milk samples collected in the eastern region during spring [18] and 9.32% samples in autumn [17] exceeded AFM₁ levels established by the EU. We here showed that, in the autumn, AFM₁ levels in only 1 milk sample (1.19%) exceeded the Codex Alimentarius and USA set maximum (500 ng/L).

Finally, the survey conducted in the current study revealed that AFM₁ levels in milk samples from small farms were higher than those from industrial farms (Table-2). That was consistent with the observations in the field and could be explained by the notion that good storage practices and hygiene standards are not properly observed on traditional farms. In addition, farmers are not aware of the risk of contamination of animal feed by mycotoxins. Ideally, the study

should be repeated in the regions in later years as well, and more farms should be sampled and on different periods.

Conclusion

The incidence of AFM₁ in milk is a serious public health concern in Algeria, especially for children who are more susceptible to the effects of AFM₁ than adults. This creates a major health risk to the Algerian population. The levels of contamination found in samples tested in the current study exceeded the maximum tolerable levels set by the EU and the USA. However, the high AFM₁ levels were probably a consequence of the usage of AFB₁ contaminated feed of dairy cows. The most effective way of controlling AFM₁ in milk is monitoring AFB₁ presence in the feed. The potential health risks of AFM₁ may be reduced by increasing farmer awareness, improving feed storage practices, and intensive self-controls in the dairy industry. Further studies should be conducted to obtain more data regarding AFM₁ contamination of milk in Algeria. It is also important that the competent authorities establish the maximum permissible levels of AFM₁ in milk and milk products in Algeria.

Authors' Contributions

SM and MD designed this study and analysis in the laboratory. SM and MD collected samples. SM, MD, CB, MK, and MHB drafted, revised the manuscript, analyzed the data, and approved the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We express our gratitude to Romer Labs Diagnostic GmbH, Marseille, for technical assistance. This study did not receive any funding.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published map and institutional affiliation.

References

- Hernández-Martínez, R. and Navarro-Blasco, I. (2010) Aflatoxin levels and exposure assessment of Spanish infant cereals. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 3(4): 275-288.
- Tam, J., Mankotia, M., Mably, M., Pantazopoulos, P., Neil, R.J., Calway, P. and Scott, P.M. (2006) Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1, B2, G1 and G2. *Food Addit. Contam.*, 23(7): 693-699.
- Mahmoudi, R. and Norian, R. (2015) Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food Agric. Immunol.*, 26(1): 131-137.
- Lereau, M., Gouas, D., Villar, S., Besaratinia, A., Hautefeuille, A., Berthillon, P., Martel-Planche, G.,

- Nogueira da Costa, A., Ortiz-Cuaran, S., Hantz, O., Pfeife, G.P., Hainaut, P. and Chemin, I. (2012) Interactions between hepatitis B virus and aflatoxin B1: Effects on p53 induction in HepaRG cells. *J. Gen. Virol.*, 93(3): 640-650.
5. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 82: 1-556.
 6. Gourama, H. and Bullerman, L.B. (1995) *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *J. Food Prot.*, 58(12): 1395-1404.
 7. Patterson, D.S., Glancy, E.M. and Roberts, B.A. (1980) The 'carry-over' of aflatoxin M1 into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B1. *Food Cosmet. Toxicol.*, 18(1): 35-37.
 8. Nachtmann, C., Gallina, S., Rastelli, M., Ferro, G.L. and Decastelli, L. (2007) Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk in Italy. *Food Control*, 18(6): 623-629.
 9. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. and Piva, G. (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.*, 47(5): 984-991.
 10. Zeluta, A., Maurizi, A., Frigola, A., Esteve, M.J., Coli, R. and Burini, G. (2009) Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.*, 19(6-7): 380-385.
 11. Tsakiris, I.N., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Vlachou, M.I., Renieri, E.A. and Tsatsakis, A.M. (2013) Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food Chem. Toxicol.*, 56: 261-265.
 12. Duarte, S.C., Almeida, A.M., Teixeira, A.S., Pereira, A.L., Falcão, A.C., Pena, A. and Lino, C.M. (2013) Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 30(2): 411-417.
 13. Fink-Gremmels, J. (2008) Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, 25(2): 172-180.
 14. Picinin, L.C.A., Cerqueira, M.M.O., Vargas, E.A., Lana, A.M.Q., Toaldo, I.M. and Bordignon-Luiz, M.T. (2013) Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais state, Brazil. *Food Control*, 31(2): 419-424.
 15. Oruc, H.H., Cibik, R., Yilmaz, E. and Kalkanli, O. (2006) Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Addit. Contam.*, 23(2): 190-195.
 16. Bilandžić, N., Varenina, I., Kolanović, B.S., Luburić, D.B., Varga, I., Želježić, B., Cvetnić, L., Benić, M., Tanković, S. and Cvetnić, Ž. (2017) Occurrence of aflatoxin M1 in raw cow, goat and sheep milk during spring and autumn in Croatia during. *Toxin Rev.*, 36(4): 290-296.
 17. Bilandžić, N., Varenina, I., Kolanović, B.S., Božić, D., Đokić, M., Sedak, M., Tanković, S., Potočnjak, D. and Cvetnić, Ž. (2015) Monitoring of aflatoxin M1 in raw milk during four seasons in Croatia. *Food Control*, 54: 331-337.
 18. Bilandžić, N., Božić, D., Đokić, M., Sedak, M., Kolanović, B.S., Varenina, I., Tanković, S. and Cvetnić, Ž. (2014) Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control*, 40: 260-264.
 19. Tomašević, I., Petrović, J., Jovetić, M., Raičević, S., Milojević, M. and Miočinović, J. (2015) Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food Control*, 56: 64-70.
 20. De Roma, A., Rossini, C., Ritieni, A., Gallo, P. and Esposito, M. (2017) A survey on the aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. *Food Control*, 81: 30-33.
 21. Santini, A., Raiola, A., Ferrantelli, V., Giangrosso, G., Macaluso, A., Bognanno, M., Galvano, F. and Ritieni, A. (2013) Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 6(3): 181-186.
 22. Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A. and Roncada P. (2016) Occurrence of aflatoxin M1 in conventional and organic milk offered for sale in Italy. *Mycotoxin Res.*, 32(4): 237-246.
 23. Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S. and Morgavi, D.P. (2007) Aflatoxin M1 and ochratoxin a in rawbulk milk from French dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 90(7): 3197-3201.
 24. Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Peris-Vicente, J. and Sanchis, V. (2010) Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Rev. Iberoam. Micol.*, 27(3): 130-135.
 25. Dimitrieska-Stojković, E., Stojanovska-Dimzoska, B., Ilievska, G., Uzunov, R., Stojković, G., Hajrulai-Musliu, Z. and Jankuloski, D. (2016) Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. *Food Control*, 59: 201-206.
 26. Hashemi, M. (2016) A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran. *J. Food Drug Anal.*, 24(4): 888-893.
 27. Bahrami, R., Shahbazi, Y. and Nikousefat, Z. (2016) Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Control*, 62: 250-256.
 28. Fallah, A.A., Rahnama, M., Jafari, T. and Saei-Dehkordi, S.S. (2011) Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*, 22(10): 1653-1656.
 29. Asghar, M.S., Ahmed, A. and Asghar, M.A. (2018) Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 11(3): 167-174.
 30. Aslam, N., Tipu, M.Y., Ishaq, M., Cowling, A., McGill, D., Warriach, H.M. and Wynn, P. (2016) Higher levels of aflatoxin M1 contamination and poorer composition of milk supplied by informal milk marketing chains in Pakistan. *Toxins (Basel)*, 8(12): 347-359.
 31. Iqbal, S.Z. and Asi, M.R. (2013) Assessment of aflatoxin M-1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 30(1): 235-239.
 32. Unusan, N. (2006) Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food Chem. Toxicol.*, 44(11): 1897-1900.
 33. Golge, O. (2014) A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. *Food Control*, 45: 150-155.
 34. European Commission. (2010) Commission Regulation (EC) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official J. Eur. Union*, 50: 8-11.
 35. Food and Drug Administration. (2005) Sec. 527. 400 Whole Milk, Low Fat Milk, Skim Milk Aflatoxin M1 (CPG 7106.10) FDA/ORR Compliance Policy Guides.
 36. Codex Alimentarius Commissions. (2001) Comments Submitted on the Draft Maximum Level for Aflatoxin M1 in Milk. 33rd ed. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Hague, The Netherlands.
 37. Redouane-Salah, S., Morgavi, D.P., Arhab, R., Messai, A. and Boudra, H. (2015) Presence of aflatoxin M1 in raw, reconstituted, and powdered milk samples collected in Algeria. *Environ. Monit. Assess.*, 187(6): 375.
 38. Food and Drug Administration. (2000) Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. Available from: <http://www.fda.gov>. Retrieved on 05-07-2018.
 39. Codex Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed. (1995) Codex Standard 1993-1995. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/l_cxs_193e.pdf. Retrieved on 10-06-2018.

40. Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. (2013) Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons, Hoboken, New York. p375.
41. Asi, R.M., Iqbal, S.Z., Ariño, A. and Hussain, A. (2012) Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 25(1): 34-38.
42. Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Idrissi, L. and Mañes, J. (2007) Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int. J. Food Microbiol.*, 114(1): 25-29.
43. Eskandari, M.H. and Pakfetrat, S. (2014) Aflatoxins and heavy metals in animal feed in Iran. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 7(3): 202-207.
44. Sahin, H.Z., Celik, M., Kotay, S. and Kabak, B. (2016) Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 9(2): 152-158.
45. Rama, A., Latifi, F., Bajraktari, D. and Ramadani, N. (2015) Assessment of aflatoxin M1 levels in pasteurized and UHT milk consumed in Prishtina, Kosovo. *Food Control*, 57: 351-354.
46. Paterson, R.R.M. and Lima, N. (2010) How will climate change affect mycotoxins in food. *Food Res. Int.*, 43(7): 1902-1914.
47. Algerian National Meteorological Office. (2017) Bilan climatique de l'année 2017. Algerian National Meteorological Office. Available from: http://www.meteo.dz/climat_2017_sas.pdf. Retrieved on 09-07-2018.
48. Algerian National Meteorological Office. (2018) Division Veille Climatologique: Bilan Climatologique La Saison d'Hiver de L'année 2017-2018. Algerian National Meteorological Office. Available from: <http://www.meteo.dz/bilan-climatique.pdf>. Retrieved on 09-07-2018.
49. Cotty, P.J. and Jaime-Garcia, R. (2007) Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int. J. Food. Microbiol.*, 119(1-2): 109-115.
