

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master complémentaire en Science Vétérinaire

Recherche d'aflatoxine M1 dans le lait cru dans la région de l'ouest de l'Algérie par la méthode ELISA

Présenté par : AID Cylia

Soutenu le 21 décembre 2017

Devant le jury composé de:

- Président : Zaouani M. Maître Assistant A à ENSV
- Promoteur : Mohammedi D. Maître de Conférences A à ENSV
- Examineur 1: Yahiaoui F. Maître Assistante A à ENSV
- Examineur 2 : Mohammedi S. Maître Assistante A à ESSAIA

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

A Monsieur Mohammedi, enseignant à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger ce mémoire. Qu'il soit assuré de ma vive reconnaissance.

A l'ensemble de mes enseignants, plus particulièrement à Madame Mohammedi et Madame Yahiaoui pour leur aide qui m'ont permis de mener à bien mon étude.

A Monsieur Zaouani pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et avoir fait l'honneur de présider le jury.

A Madame Yahiaoui et Madame Mohammedi pour avoir accepté de prendre en charge l'examen de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma mère, ma MAMOUNETTE, qui m'a comblée avec sa tendresse et affection tout au long de mon parcours, qui n'a cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, qui a tant sacrifié pour moi et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, qui a toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand tout allait de travers. Puisse le Tout Puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

Mon père, mon PAPOUNET, que je ne remercierais jamais assez pour sa gentillesse, sa douceur, sa compréhension, sa patience, sa foi en moi, son soutien permanent et ses bons conseils et j'en passe. Aucun mot ne pourra exprimer l'amour, le respect, l'estime que j'ai pour lui.

Mes deux frères avec qui j'ai passé les plus beaux et agréables moments de mon enfance et pour toute la complicité et l'entente que nous avons.

Ma petite sœur, ma petite princesse, à la joie de vivre et la tendresse qu'elle apporte à toute la famille.

Ma meilleure amie ; Océane ; ma sœur de cœur, qui a partagé avec moi tous les bons et mauvais moments de ma vie, qui a su être là quand j'en avais besoin. A toute les folies qu'on a partagées ensemble et dont on garde de très beaux souvenirs.

Djef ; mon confident ; mon conseiller ; qui m'a toujours assisté dans les moments les plus difficiles et qui a supporté mes crises et mes sautes d'humeur. Que Dieu Le Tout Puissant protège notre relation.

Nesnoussa, NINE, avec qui j'ai partagé les fous rires et les crises de larmes surtout en période d'examens.

A toute la famille : **AID et CHAFA** (grands parents, oncles, tantes, cousins et cousines) : merci pour votre soutien et vos encouragements.

A la famille **ZEGGANE** : qui a été ma deuxième famille, et qui a toujours été là pour moi, mille mercis.

A tou(te)s mes amis(es) : Doria ; Tefsouth ; Sarra ; Fahima ; Kahina ; Zouhir ; Manar ; Nawal ; Ikram ; Hanane....

Liste des figures

Figure 1. L'ergot de seigle (Goux-Les-Usiers (Doubs - France) le 22/07/2005).	3
Figure 2. Biosynthèse de quelques mycotoxines dans les aliments (Zinedine A., 2004).	7
Figure 3. Structure générale des Aflatoxines (Gauthier A., 2016).	13
Figure 4. Métabolisme de l'aflatoxine M1 (Portelli C., 2005).	15
Figure 5. Réactifs fournis avec le kit de l'ELISA.	21
Figure 6. Carte géographique des deux régions NDGDC World Coast Line.	22
Figure 7. Etapes de préparation des échantillons.	25
Figure 8. Etapes du test d'ELISA.	27
Figure 9. Courbe d'étalonnage.	28

Liste des tableaux

Tableau 1. Mycotoxines et champignons responsables de leur production (El Khouri A., 2007).	5
Tableau 2. Exemples de produits contaminés par des moisissures toxigéniques (El Khoury A., 2007).	10
Tableau 3. Structure des principales aflatoxines (Gauthier A., 2016).	13
Tableau 4 . La limite maximale de l'aflatoxine M1 dans le lait et ses dérivés dans certains pays (Redouane-Salah S., 2016).	19
Tableau 5. Nombre d'échantillons provenant de chaque région.	22
Tableau 6. Différentes concentrations de l'AFM1 dans les échantillons de lait.	29

Liste des abréviations

% : Pourcentage

< : Inferieur

°C : Degré Celsius

µg : microgramme

µg : microgramme

µl : microlitre

Abs : absorbance

AF : Aflatoxine

AFB1 : Aflatoxine B1

AFM1 : Aflatoxine M1

Aw : Activité en eau

Ech : échantillon

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

G : Gramme

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

II aires : Secondaire

kg : kilogramme

L : litre

LOD : Limite Of Detection (Limite de Détection)

LOQ : Limite Of Quantification (Limite de Quantification)

ml : millilitre

mn : Minute

N° : Numéro

ng : nanogramme

Liste des abréviations

nm : nanomètre

PPT : Parti Par Trillion (correspond à ng/kilogramme)

T° : Température

tr/min : tour par minutes

Introduction	1
Partie bibliographique	
I. Mycotoxines	2
I.1 Histoire	2
I.2 Définition	4
I.3 Origine des mycotoxines	5
I.3.1 Mycotoxines issues du métabolisme fongique	5
I.3.2 Phytotoxines dont la synthèse est augmentée en réponse à une agression fongique	6
I.3.3 Mycotoxines obtenues par biotransformation de toxines végétales	6
I.4 Biosynthèse des mycotoxines	6
I.5 Condition de production des mycotoxines dans les aliments	7
I.6 Mycotoxines en alimentation humaine et animale	9
II. Aflatoxines	12
II.1 Aflatoxine M1	12
II.2 Structure et nomenclature	12
II.3 Propriétés physico-chimique	14
II.4 Métabolisme de l'AFB1 et formation de AFM1	14
II.5 Aflatoxine M1 dans le lait et les produits laitiers	15
II.6 Effets de l'AFM1 sur la santé humaine	16
II.7 Méthodes de dosage de l'aflatoxine M1	16
II.7.1 Chromatographie liquide à haute performance HPLC	17
II.7.2 Dosage immuno-enzymatique - Test ELISA	17
II.8 Décontamination	17
II.9 Réglementation et la législation	18
II.9.1 A l'échelle nationale	18
II.9.2 A l'échelle internationale	19

Partie expérimentale

I.	Objectifs	20
II.	Matériels et méthodes	20
II.1	Matériels	20
II.1.1	Matériels de laboratoire	20
II.1.2	Appareillage	20
II.1.3	Réactifs	20
II.1.4	Matériaux fournis avec le kit de test d'ELISA	20
II.2	Echantillonnage	21
II.3	Méthode	23
II.3.1	Description de l'ELISA	23
II.3.2	Préparation de l'échantillon pour l'analyse AFM1	23
II.3.3	Procédure du test de l'ELISA	25
III.	Résultats et discussion	28
III.1	Résultats	29
III.2	Discussion	30
	Conclusion	31

Introduction

Introduction

Les maladies d'origine alimentaire sont à l'heure actuelle un des problèmes le plus répandu à l'échelle internationale.

En dehors des virus et des bactéries pathogènes existant, les champignons toxigènes sont un danger gravissime pour la santé de l'homme et des animaux du fait de la sécrétion de substances toxiques, appelées mycotoxines. Ces dernières sont répandues à toutes les étapes de la chaîne alimentaire.

La composition chimique variable de ces mycotoxines diversifie leurs nombreuses propriétés physico-chimiques et toxicologiques. La plupart sont hépatotoxiques, néphrotoxiques, génotoxiques ou immuno-modulatrices.

L'aflatoxine M1 est le métabolite dérivé de l'AFB1. C'est la résultante de l'hydroxylation de cette dernière qui se retrouve par la suite dans le lait. Elle présente un effet hépatotoxique, cancérigène, immunotoxique (Redouane-Salah S., 2016).

La présence de l'AFM1 dans le lait constitue un problème de santé publique à propos duquel l'inquiétude des hygiénistes ne cesse de croître.

Dans ce contexte, un grand intérêt est actuellement attribué à travers le monde à cette substance pour que chaque pays ou chaque région se doive d'adopter une législation spécifique pour chaque aliment susceptible d'héberger cette mycotoxine, d'où cette étude (Zinedine A. , 2004).

Dans cette étude, notre travail est élaboré en deux parties : la première est bibliographique, consacrée aux mycotoxines et particulièrement l'aflatoxine M1, la deuxième est la partie expérimentale dans laquelle nous avons évalué la présence et les concentrations de l'aflatoxine M1 dans le lait cru de vache provenant des régions de l'ouest de l'Algérie par la méthode de l'ELISA.

Partie bibliographiques

I : Mycotoxines

I : Mycotoxines

I. Mycotoxines

I.1 Histoire

Dès le moyen âge, les effets mortels de l'ergot du seigle (figure 1) causés par *Claviceps purpurea* responsable de l'élaboration d'une toxine mortelle : l'ergotamine ont été décrit par des chroniques (Abdellah Z., 2004).

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

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

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

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



Figure 1. L'ergot de seigle (Goux-Les-Usiers (Doubs - France) le 22/07/2005).

I.2 Définition

Le terme mycotoxine vient du grec «mycos» qui signifie champignon, et du latin «toxicum» qui signifie poison (Yiannikouris A. et Jouany J-P, 2002). Les mycotoxines sont donc des substances toxiques, sécrétées essentiellement par les micromycètes qui se développent sur divers produits agricoles (au champ ou en cours de stockage) dans des conditions environnementales particulières. Ce sont plus précisément des métabolites dits secondaires, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas indispensables au fonctionnement des champignons (Peraica *et al.*, 1999 ; Yiannikouris A. et Jouany J-P., 2002 ; Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

Elles sont de nature chimique : ce ne sont ni des protéines ni des macromolécules. Elles sont de faible poids moléculaire, et par conséquent ne sont pas directement antigéniques, et ne provoquent pas de phénomènes d'immunisation. Ces métabolites résistent aux phénomènes d'oxydation et aux processus de cuisson (thermostables), et ont une durée de vie bien plus longue que celle des champignons les ayant synthétisés (Gallot J. *et al.*, 2000).

Comme leur nom l'indique, les mycotoxines sont douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 mycotoxines ont été identifiées mais seule une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes (Fremy J-M. et Thomann C., 2009).

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

I : Mycotoxines

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

Champignons	Toxines
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ochratoxine A Stérigmatocystine
<i>Penicillium</i>	Citrinine, Patuline, Pénitrem A Acide cyclopiazonique Ochratoxine A
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes, Zéaralénone Fumonisines, Fusarine Moniliformine
<i>Alternaria</i>	Acide ténuazonique Alternariol
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot.

I.3 Origine des mycotoxines

Pris dans son sens le plus large, le terme de "mycotoxines" regroupe tous les composés toxiques susceptibles d'être présents dans les aliments suite à leur contamination par des moisissures. Trois grands modes de synthèse des toxines peuvent intervenir :

- une synthèse complète par les cellules fongiques,
- une synthèse anormalement élevée de toxines végétales en réponse à l'agression fongique.
- une biotransformation par les moisissures de composés synthétisés par les végétaux (Guerre P. *et al.*, 2000).

I.3.1 Mycotoxines issues du métabolisme fongique

Le plus souvent les mycotoxines sont issues du métabolisme "secondaire" des moisissures. Ce métabolisme diffère du "primaire" par la nature des composés formés et la spécificité des souches impliquées (Steyn P., 1998). En effet le métabolisme primaire est commun à toutes les espèces fongiques et permet la synthèse glucidique, protéique, lipidique alors que le métabolisme secondaire est spécifique à une espèce voire à une souche fongique. Ce dernier est très complexe, faisant intervenir de nombreux intermédiaires synthèse pouvant ou non être

doués de propriétés toxiques. Des familles de mycotoxines sont ainsi obtenues (Guerre P. *et al.*, 2000).

I.3.2 Phytotoxines dont la synthèse est augmentée en réponse à une agression fongique

Certaines souches fongiques sont phytopathogènes et susceptibles d'entraîner, lorsqu'elles se développent sur des végétaux vivants, une synthèse anormalement élevée de phytotoxines. Ces composés résultant de l'agression fongique sont à ce titre regroupés dans la catégorie des mycotoxines. Cette production de toxines correspond en général à une défense non spécifique du végétal, qui réagit de la même manière à une agression par des insectes ou des coupes répétées. La mise en évidence d'une cause fongique n'est donc pas toujours évidente (Guerre P. *et al.*, 2000).

I.3.3 Mycotoxines obtenues par biotransformation de toxines végétales

Un dernier mode de production de toxines, occasionné par la présence de moisissures dans les aliments, consiste en la biotransformation par le micromycète d'un métabolite végétal. Bien que ce phénomène soit sans doute assez commun, il n'est révélé que lorsque le métabolite obtenu est plus toxique que le produit de départ. Un exemple bien connu en est la maladie du mélilot gâté. Cette affection, connue depuis le début du siècle, fait suite à la consommation de fourrages de mélilot moisi, sans qu'une espèce fongique bien déterminée puisse être incriminée (Guerre P. *et al.*, 2000).

I.4 Biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés pendant la phase stationnaire après les stades de multiplication et de croissance. Elles sont classées en polyacétoacides, terpènes et métabolites azotés selon leur origine biologique (figure 2) (Zinedine A., 2004).

- **La voie des acides aminés :** ce sont les unités constituant les protéines. Leur caractéristique commune est la présence des groupes -COOH et -NH dans leur structure chimique. Font partie des dérivés des acides aminés : les alcaloïdes de l'ergot du seigle, l'Acide aspergillique, la Roquefortine, les Sporidesmines, l'Acide cyclopiazonique, la Slaframmine, la Tryptoquivaline, la Gliotoxine... (Gauthier A., 2016).
- **La voie des polycétoacides :** (polyacétates) : ce sont des composés indispensables au métabolisme énergétique des cellules de tous les organismes vivants. Les Ochratoxines, les Aflatoxines, la Zéaralénone, la Stérigmatocystine, la Citrinine, la Patuline et les Rubratoxines sont issues de la métabolisation des polycétoacides (Gauthier A., 2016).

- **La voie des terpènes** : ce sont des composés organiques principalement issus des résines produites par les végétaux. La Toxine T2, le Déoxynivalénol, la Fusarénone, les Roridines ou encore les Verrucarines sont des dérivés des terpènes (Gauthier A., 2016).

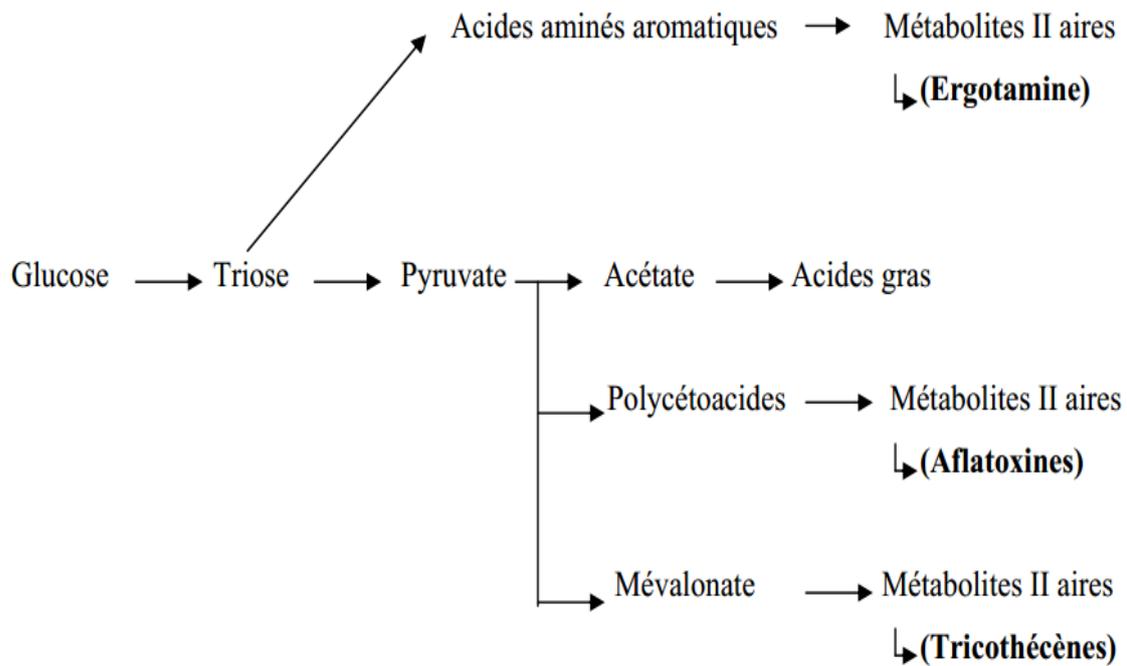


Figure 2. Biosynthèse de quelques mycotoxines dans les aliments (Zinedine A., 2004).

I.5 Condition de production des mycotoxines dans les aliments

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (Pfohl Leszkowicz A., 1999). Quelques moisissures sont capables de produire plusieurs mycotoxines et quelques mycotoxines sont produites par différentes espèces fongiques (Hussein S. *et al.*, 2001).

La sécrétion des mycotoxines est un phénomène d'une grande complexité qui dépend d'une combinaison de plusieurs facteurs (Yiannikouris A. et Jouany J-P., 2002).

- a. **Facteurs intrinsèques** : Concernant la nature de la souche, 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 toxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindres.

La toxinogénèse d'une moisissure peut dépendre du stade de développement de la souche productrice.

- b. **Facteurs extrinsèques** : Les facteurs de l'environnement qui contrôlent le développement de la toxinogénèse des moisissures sont nombreux à savoir la teneur en eau, l'humidité relative, le pH, la température ambiante, la composition du substrat en éléments nutritifs, la composition gazeuse et la compétition entre les différents micro-organismes :

- ✓ **L'activité en eau (Aw)** : elle exprime la quantité d'eau libre disponible dans l'aliment pour la croissance des micro-organismes, ce paramètre peut varier de 0 (pour des substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (dans toute l'eau est disponible).

La majorité des moisissures se forme à partir d'une Aw de 0.85, une Aw <0.65 n'est pas compatible avec la croissance fongique. la quantité des toxines produites par les moisissures augmente avec la Aw (Pfohl-Leszkowicz A., 2002).

- ✓ **Substrat** : La présence de quelques substances dans les aliments stimule la croissance des moisissures et la production des mycotoxines comme le saccharose (source de carbone le plus utilisé par les moisissures) et les acides aminés. La contamination d'une denrée alimentaire par les moisissures dépend de la nature du substrat en particulier de la nature des glucides disponibles (Castegnaro M. et Pfohl-Leszkowicz A., 2002).
- ✓ **La température** : La température agit sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La température optimale pour la croissance des moisissures se situe entre 20 et 30 °C, cependant elles peuvent croître dans un vaste intervalle de T° allant de 4 à 40 °C. Les spores des moisissures sont thermorésistantes et supportent la température de stérilisation (120°C pendant 20 mn). En général, la température optimale pour la production des mycotoxines est inférieure à celle requise pour la croissance des moisissures les produisant (Zinedine A., 2004).
- ✓ **Le pH** : Le pH du milieu est un facteur important dans la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses (Zinedine A., 2004).

- ✓ **La composition gazeuse :** la plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet inhibiteur important sur la toxinogénèse.
- ✓ **Interactions entre les micro-organismes :** La présence simultanée de micro-organismes (bactéries ou moisissures) module la production de mycotoxine ainsi que la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet inhibiteur sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Nguyen M. T., 2007).

I.6 Mycotoxines en alimentation humaine et animale

L'alimentation animale est essentiellement constituée de tourteaux oléagineux, de céréales, de fourrages ensilés, etc., tous substrats particulièrement propices au développement des moisissures. En élevages industriels, les animaux reçoivent une ration équilibrée et relativement identique chaque jour, ce qui favoriserait chez des animaux, génétiquement très proches, des intoxications chroniques si l'alimentation renferme des mycotoxines (Zinedine A., 2004). Cependant, l'entrée des mycotoxines dans l'alimentation humaine s'effectue soit directement par la consommation de denrées végétales contaminées (arachides, pistaches, amandes...), soit indirectement par des produits dérivés à partir desquels sont élaborés les produits finis, par exemple la farine de céréales. Les mycotoxines peuvent également se transmettre dans la chaîne alimentaire de l'homme par l'ingestion de denrées d'origine animale (laits, produits laitiers, abats, charcuterie...) si l'animal a été nourri avec des végétaux eux-mêmes contaminés (Kaniou-Grigoriadou I. *et al.*, 2005). Néanmoins la grande diversification de notre alimentation nous empêche l'absorption régulière de doses suffisantes de mycotoxines pour être réellement dangereuses à court terme. Cela n'empêche pas la présence d'un danger à long terme (Zinedine A., 2004).

I : Mycotoxines

Tableau 2. Exemples de produits contaminés par des moisissures toxigéniques (El Khoury A., 2007).

Denrées	Espèces toxiques contaminantes	Mycotoxines probables
Blé, Farine, pain, maïs, chips	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>ochraceus</i> , <i>versicolor</i> <i>Penicillium citrinum</i> , <i>citréoviride</i> , <i>cyclopium</i> , <i>P. martensii</i> , <i>patulum</i> , <i>pubertum</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, désoxynivalénol, zéaralénone, fumonisine
Arachide, noix	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>ochraceus</i> , <i>versicolor</i> ; <i>Penicillium</i> <i>citrinum</i> , <i>cyclopium</i> , <i>expansum</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, trichothécènes, cytochalasines
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao, houblon	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium</i> <i>viridicatum</i> , <i>roqueforti</i> , <i>patulum</i> , <i>commune</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique
Viandes, porc salé,fromage	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>ochraceus</i> , <i>versicolor</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>cyclopium</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, pénitrem
Poivre noir et rouge, pâtes	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>ochraceus</i>	Aflatoxines, Ochratoxine
Fèves, orge, maïs, sorgho, soja	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>ochraceus</i> , <i>versicolor</i> <i>Alternaria</i> ,	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine,

I : Mycotoxines

	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>viridicatum</i> , <i>citrinum</i> , <i>expansum</i> , <i>islandicum</i> , <i>urticae</i>	griséofulvine, alternario
Pâtisserie réfrigérée ou congelée	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>versicolor</i> , <i>Penicillium</i> <i>cyclopium</i> , <i>viridicatum</i> , <i>citrinum</i> , <i>martensii</i> , <i>citreo-viride</i> , <i>palitans</i> , <i>puberulum</i> , <i>roquefort</i> , <i>urticae</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, penitrem
Denrée alimentaire (stockage domestique)	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	Aflatoxine, acide kojique, ochratoxine, pénitrem, patuline, acide pénicillique, trichothécènes
Pomme et produits dérivés de pomme	<i>Penicillium expansum</i>	Patuline

II : Aflatoxines

II. Aflatoxines

Les aflatoxines (AF) sont principalement produites par les champignons du genre *Aspergillus* (en particulier *A. flavus*, *A. parasiticus* et rarement *A. nomius*) (Bellio A. *et al.*, 2016). Elles sont largement abondantes dans les oléagineux, les récoltes du coton et des céréales notamment le blé et le maïs. Le stockage de ces aliments dans des conditions humides ou chaudes peut augmenter la synthèse d'aflatoxines (Zinedine A., 2004).

Selon Diener *et al.*, 1987, l'écologie des moisissures productrices des aflatoxines est très complexe. En effet, *A. parasiticus* est un champignon mieux adapté au sol et prédominant chez l'arachide, alors que *A. flavus* est adapté à la vie aérienne des plantes (fleurs) et il est dominant en particulier dans les cultures de maïs. Une distinction biochimique entre les souches productrices d'aflatoxines est que *A. flavus* produit seulement les aflatoxines B, alors que *A. nomius* et *A. parasiticus* produisent les aflatoxines B et G (Creppy E., 2002).

Les aflatoxines identifiées à partir des aliments ont été classées et répertoriées sur la base de leur toxicité : B1>G1>B2>G2 (Ismail A. *et al.*, 2016). Les aflatoxines M1 et M2 sont les dérivés respectifs des aflatoxines B1 et B2 et elles apparaissent dans le lait et ses dérivés. Ces toxines ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait "Milk" des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Jaquet J. *et al.*, 1982).

II.1 Aflatoxine M1

Elle est le dérivé de l'aflatoxine B1. Elle est excrétée par le lait. Cette aflatoxine est, par la suite, présente dans les produits laitiers : le lait écrémé et les produits obtenus par précipitation lactique comme les yaourts, le fromage blanc, les crèmes lactées. Le beurre n'en contient pas, car elle se trouve concentrée dans la phase aqueuse du babeurre en raison d'interactions hydrophobes avec les caséines du lait (Portelli C., 2005).

II.2 Structure et nomenclature

La structure générale des AF est constituée d'un cycle coumarinique et de deux furanes (figure 3), auxquels peuvent être accolés un cycle pentone (Aflatoxines B et M) ou un cycle lactone hexagonal (Aflatoxines G). Les structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur le squelette de base (tableau 3). Ce groupe de toxines est issu de la voie des polycétoacides (Gauthier A., 2016).

II : Aflatoxines

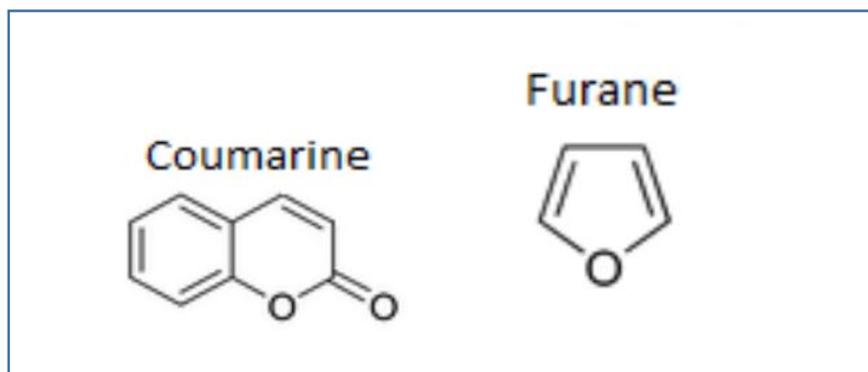


Figure 3. Structure générale des Aflatoxines (Gauthier A., 2016).

Tableau 3. Structure des principales aflatoxines (Gauthier A., 2016).

Dénomination	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure chimique
Aflatoxine B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	
Aflatoxine B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	
Aflatoxine M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	
Aflatoxine M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	
Aflatoxine G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	
Aflatoxine G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	

II : Aflatoxines

II.3 Propriétés physico-chimique

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique), elles sont assez facilement extraites (AFSSA., 2006).

Sous une lumière ultra-violette, les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour *Blue* et G pour *Green*). L'aflatoxine M1 présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette (Pfohl-Leszkowicz A., 1999).

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

II.4 Métabolisme de l'AFB1 et formation de AFM1

- a. **L'absorption** de l'AFB1 est possible par voie orale et trachéale. Elle est relativement rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle, plus précisément au niveau du duodénum. La toxine est ensuite transportée dans l'organisme grâce au phénomène de fixation aux protéines plasmatiques, notamment à l'albumine (Gauthier A., 2016).
- b. **La distribution** de l'AFB1 a lieu principalement au niveau du foie via la veine porte. Elle s'effectue à partir du plasma sanguin vers les hépatocytes, par un processus de diffusion passive à travers les membranes cellulaires. La distribution au sein même de la cellule se fait essentiellement au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique, du cytosol et des mitochondries (Gauthier A., 2016).
- c. **Le métabolisme** est essentiellement hépatique. Il se produit en deux étapes :
 - **La phase I** s'effectue par l'intermédiaire des cytochromes hépatiques P450 (CYP450). Sous l'action des CYP450, notamment le cytochrome P1A2 (CYP1A2), l'AFB1 donne par hydroxylation l'AFM1 et par époxydation l'AFB1-8,9-époxyde, le métabolite le plus toxique. L'Aflatoxicol, l'AFM1, l'AFQ1 et l'AFP1 sont d'autres composés qui résultent du métabolisme de l'AFB1 (Brochard G. et Le Bacle C., 2009).

II : Aflatoxines

➤ **La phase II** concerne le devenir de l'AFB1-8,9-époxyde (développé plus loin). L'AFB1 n'est pas directement néfaste, c'est sa métabolisation qui active sa toxicité. Bien que le métabolisme hépatique soit prédominant, un métabolisme pulmonaire est possible par l'intermédiaire d'enzymes oxydantes : la lipo-oxygénase et la prostaglandine-H-synthétase (Brochard G. et Le Bacle C., 2009).

d. L'élimination : Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile, conjuguée au glutathion ou à l'acide glucuronique. Elle peut être excrétée dans les urines sous forme inchangée ou sous forme métabolisée. 1 à 10 % de l'AFB1 restent liés de façon covalente aux protéines hépatiques plusieurs jours après l'ingestion. Environ 1,5% de l'AFB1 est excrétée sous forme de métabolite M1 dans le lait (Gauthier A., 2016).

Chez certains animaux, il semblerait que les Aflatoxines persistent dans le foie et le rein sous forme liée et non métabolisée (Gauthier A., 2016).

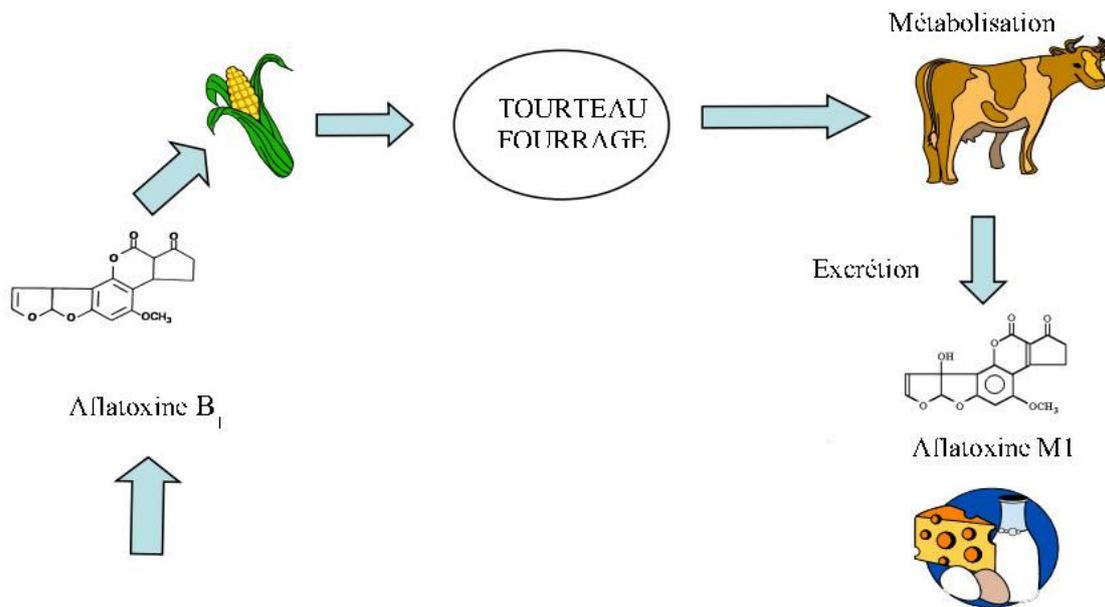


Figure 4. Métabolisme de l'aflatoxine M1 (Portelli C., 2005).

II.5 Aflatoxine M1 dans le lait et les produits laitiers

La forte affinité de l'AFM1 pour les protéines du lait en particulier la caséine ainsi que sa stabilité aux traitements thermiques expliquent le fait qu'elle peut être retrouvée dans le lait et ses dérivés (Ismail A. *et al.*, 2016 ; Guerre P. *et al.*, 2000).

II : Aflatoxines

La déshydratation du lait cru est à l'origine d'une "concentration" de l'AFM1 dans le lait en poudre, en effet ceci correspond à la "perte" de la phase aqueuse qui représente environ 90 % du lait. Au cours de l'écémage, 10 % de la teneur en AFM1 passe dans la crème, le reste passe dans le lait écrémé. Ces résultats sont à mettre en relation avec le fait que la quantité de crème ainsi obtenue représente environ 10% du poids du lait cru (Guerre P. *et al.*, 2000). Le beurre n'en contient pas, car elle se trouve concentrée dans la phase aqueuse du babeurre en raison d'interactions hydrophobes avec les caséines du lait (Portelli C., 2005). L'AFM1 ne se concentre donc pas dans les gouttelettes de graisse (Guerre P. *et al.*, 2000).

II.6 Effets de l'AFM1 sur la santé humaine

Initialement AFM1 a été classé comme cancérigène humain du groupe 2B mais plus tard, avec l'accumulation de connaissances scientifiques liées à la toxicité de l'AFM1, elle a été reclassifiée comme cancérigène humain du groupe 1. L'organe cible majeur de l'AFM1 chez l'homme est le foie (Ismail A. *et al.*, 2016).

Dans une perspective plus large, AFM1 a été documentée être cancérigène pour les humains, une cytotoxique, tératogène et un agent génotoxique (Ismail A. *et al.*, 2016).

Bien qu'elle est moins toxique que son composé apparenté, c'est-à-dire AFB1, il s'agit d'un grave problème de santé pour les consommateurs des laits, de faibles niveau d'immunité, plus spécifiquement pour les enfants de moins de 6 ans et les personnes âgées (Ismail A. *et al.*, 2016).

II.7 Méthodes de dosage de l'aflatoxine M1

Plusieurs approches ont été développées pour la détermination de l'AFM1, mais la méthode de choix est dictée par le type de matrice (lait frais, stocké, pasteurisé, lait liquide ou en poudre, fromage) (Bellio A. *et al.*, 2016). Qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, ces méthodes reposent le plus souvent sur le principe de séparation chromatographique, couplée à des procédés de détection comme la fluorimétrie, la spectrophotométrie ou la radiodétection (Pfohl-Leskowicz A., 1999).

Les méthodes pour déterminer L'AFM1 peut être classée en deux groupes principaux : chromatographique (HPLC) et immunochimique (ELISA) (Bellio A. *et al.*, 2016).

En général, les deux méthodes les plus utilisées dans ce but est le HPLC (utilisé en tant qu'approche quantitative c'est-à-dire confirmatoire) et le test de l'ELISA (utilisé en tant qu'approche qualitative ou de dépistage) (Bellio A. *et al.*, 2016).

II : Aflatoxines

II.7.1 Chromatographie liquide à haute performance HPLC

Dans ce procédé, l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire de faible granulométrie. L'augmentation de la pression dans le système est due au fort débit d'écoulement de l'éluant (Pohland A.E. *et al.*, 1992).

II.7.2 Dosage immuno-enzymatique - Test ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA est principalement employée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon (Gauthier A., 2016).

Le test ELISA est une technique utilisant un ou deux anticorps. Un de ces anticorps est spécifique de l'antigène recherché (par exemple une toxine fongique), tandis que l'autre réagit aux complexes immuns formés (complexes antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cette enzyme permet de catalyser une réaction qui libère un substrat chromogène ou fluorogène, capable de colorer le milieu. Cette coloration, proportionnelle à la quantité de toxines contenues dans l'échantillon, pourra ensuite être appréciée par fluorimétrie ou colorimétrie (Molinie A., 2004).

II.8 Décontamination

Les travaux de recherches effectuées récemment ont permis d'établir quelque solution pour la décontamination de l'AFM1 (Ismail A. *et al.*, 2016).

Étant un composé toxique, l'AFM1 est très surveillée La décontamination des AFM1 a été révélée par des travaux de recherche récemment effectués néanmoins ces dernier sont en perpétuelle évolution afin de sélectionner les méthodes les plus applicables et efficaces (Ismail A. *et al.*, 2016).

Le chauffage par micro-ondes du lait artificiellement contaminé par l'AFM1 s'est avéré inefficace après l'échec d'une série d'expériences de décontamination de l'AFM1 en employant de la chaleur (Ismail A. *et al.*, 2016).

La décontamination de l'AFM1 avec des particules d'argile sans affecter les propriétés nutritionnelles du lait a été étudiée plus récemment. La bentonite riche en saponite a été jugée efficace pour l'élimination de l'AFM1 en dessous de la limite standard. Il a été révélé que l'argile conservait la composition nutritionnelle du lait tandis que ses résidus dans le lait étaient en quantité tellement faible (0,4%) qu'ils n'avaient pas un effet significatif sur la santé humaine (Carraro A. *et al.*, 2014).

II : Aflatoxines

La bio-décontamination de l'AFM1 a été fréquemment étudiée pour identifier le rôle des micro-organismes dans la protection des aliments. La liaison microbienne de l'AFM1 empêche l'absorption de cette toxine dans l'intestin grêle et elle va directement dans le gros intestin qui sera excrétée par la suite (Ismail A. *et al.*, 2016).

De nombreuses études menées à travers le monde ont validé la décontamination microbienne de l'AFM1 comme la stratégie la plus prometteuse en raison de leur efficacité, spécificité et comportement respectueux de l'environnement. Elle réduit ou élimine la contamination possible de la nourriture par les aflatoxines. En outre, l'application de filtres à membrane pourrait également être évaluée comme une stratégie sûre pour enlever l'AFM1 liée aux cellules microbiennes mortes à partir du lait décontaminé. De nombreuses bactéries ont été étudiées pour déterminer leur potentiels de liaison à l'aflatoxine, mais les scientifiques sont incapables d'exécuter une méthode entièrement fiable et commercialement réalisable pour la décontamination AFM1 dans le lait jusqu'à présent (Ismail A. *et al.*, 2016).

Cependant La liaison de AFM1 avec des cellules microbiennes a été rapportée comme un processus rapide de décontamination, mais Le mécanisme exact de liaison entre AFM1 et les cellules microbiennes n'est pas complètement établi. Toutefois ; l'hypothèse la plus acceptée en ce qui concerne ce dernier est l'adhésion de molécules de toxines avec les composants cellulaires tels que les protéines et les polysaccharides ou les peptidoglycane présents dans la paroi cellulaire (Ismail A. *et al.*, 2016).

Les bactéries lactiques sont les plus utilisées dans la décontamination microbienne, en raison de leurs capacités de liaison optimale et leur large distribution dans la nature. Les souches de *Lactobacillus* et *Streptococcus* sont les plus utilisées pour réduire et détoxifier l'AFM1 dans le lait (Ismail A. *et al.*, 2016).

II.9 Réglementation et la législation

En raison de son potentiel hépato-cancérogène élevé, le niveau d'AFM1 autorisé dans le lait et les produits laitiers sont strictement réglementés (Bellio A. *et al.*, 2016).

II.9.1 A l'échelle nationale

Actuellement en Algérie, à notre connaissance, il n'existe pas de normes ou de limites réglementaires, fixant les teneurs maximales en mycotoxines dans l'alimentation humaine ou animale (Redouane-Salah S., 2016).

II : Aflatoxines

II.9.2 A l'échelle internationale

Plusieurs pays ont établi, ou proposé des limites réglementaires concernant l'aflatoxine M1 dans les aliments. Le tableau 4 donne un aperçu sur les limites fixées par certains pays Européens et les USA (Redouane-Salah S., 2016).

Tableau 4 . La limite maximale de l'aflatoxine M1 dans le lait et ses dérivés dans certains pays (Redouane-Salah S., 2016).

Mycotoxine	Pays	Limite Maximale (µg/kg ou µg/l)	Aliment
AFM₁	- Suède.	0,05	Dérivés laitiers liquides
	- Autriche.	0,05	Lait
	- Allemagne.	0,05	Lait
	- Pays-bas.	0,05	Lait
		0,02	Beurre
		0,02	Fromages
	- Suisse.	0,02	Aliments pour enfants
		0,05	Lait et dérivés
		0,25	Fromages
	- Belgique.	0,05	Lait
	- USA.	0,5	Lait
	-Rép.Tchèque.	0,1	Lait pour enfants
		0,5	Lait pour adultes
	- France.	0,03	Lait pour enfants
	0,05	Lait pour adultes	

Partie expérimentale

Objectifs & Matériels et méthodes

I. Objectifs

Le but de ce travail est de déterminer la présence et les concentrations de l'aflatoxine M1 dans le lait cru de vache en utilisant une méthode immuno-enzymatique : l'ELISA.

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Matériels de laboratoire

- Tubes à essai
- Portoir tubes à essai
- Tubes coniques
- Portoir tubes coniques
- Erlenmeyers
- Micropipette et cônes
- Micropipette multicanaux
- Pipette graduée
- Pipette type pip-lab
- papier essuie-tout

II.1.2 Appareillage

- Centrifugeuse
- Lecteur ELISA
- Vortex

II.1.3 Réactifs

- Méthanol
- Eau distillée

II.1.4 Matériaux fournis avec le kit de test d'ELISA

- 96 micro-puits enrobés d'anticorps (12 bandelettes à huit puits) dans un porte-micro-puits (scellé dans une pochette à fermeture à glissière).
- 96 micro-puits de dilution non revêtus (12 barrettes de huit puits bordé de vert au sommet).
- 6 flacons de 1,5 ml de chaque standard d'aflatoxine (0, 100, 200,500, 1000, 2000ppt), prêt à l'emploi.

Objectifs & Matériels et méthodes

- 1 flacon de 25mL de d'aflatoxine conjuguée, prêt à l'emploi (bouteille au bouchon vert).
- 1 flacon de 15 ml de solution de substrat, prêt à l'emploi (bouteille au bouchon bleu).
- 1 flacon de 15 ml de solution d'arrêt, prêt à l'emploi (bouteille au bouchon rouge).
- 1 flacon de 10 ml de diluant d'échantillon, prêt à l'emploi (bouteille au bouchon bleu).
- 1 flacon de 25 ml de solution de lavage avec 20 fois concentré. Il doit être dilué (1 + 19 avec de l'eau distillée).

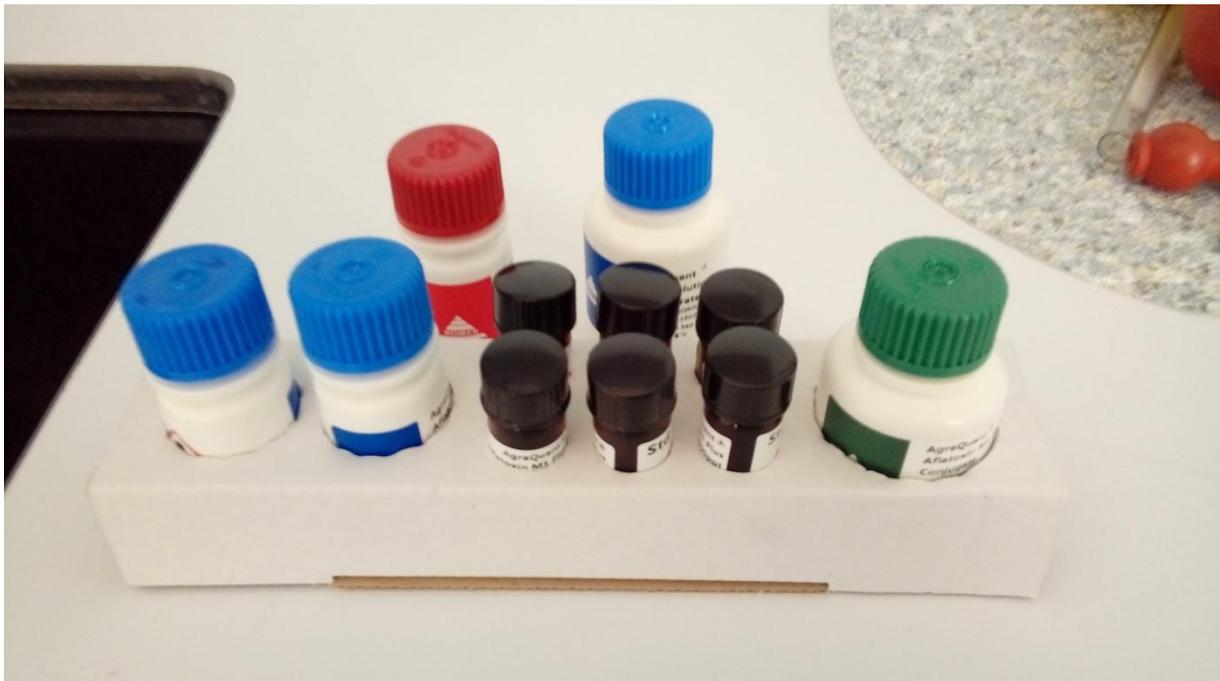


Figure 5. Réactifs fournis avec le kit de l'ELISA.

II.2 Echantillonnage

Un total de 20 échantillons provenant des régions de Tlemcen et de Chlef ont été récoltés en mois de novembre 2017 (Tableau n° 05). Les échantillons ont été alors stockés au congélateur en attendant leur analyse.

Objectifs & Matériels et méthodes

Tableau 5. Nombre d'échantillons provenant de chaque région.

Région	Nombre d'échantillons
Chlef	12
Tlemcen	8

La carte géographique (Figure 6) permet de visualiser les deux régions dont sont issus les échantillons.



Figure 6. Carte géographique des deux régions NDGDC World Coast Line (domaine public)

Objectifs & Matériels et méthodes

L'analyse des échantillons a été réalisée au niveau du laboratoire de Santé et Production Animales (SPA) de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger (ENSV).

II.3 Méthode

II.3.1 Description de l'ELISA

L'analyse quantitative d'AFM1 a été réalisée par l'ELISA direct et compétitif en utilisant le kit de test « AFM1 plus d'AgraQuant® » (Romer Lab).

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

AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

GIPSA (Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration).

Le kit ELISA utilisé, ELISA compétitive, a un seuil de détection de **89 ppt et une gamme de détection de 100 à 2.000 ppt**, fourni par **Lbvet** et fabriqué par **Romer Labs**. Le test d'ELISA a été réalisé selon le protocole suivant :

Les étalons ou échantillons d'aflatoxine M1 sont mélangés à de l'aflatoxine M1 conjuguée aux puits de dilution, puis transféré dans le micropuit sensibilisé avec l'Aflatoxine M1.

L'aflatoxine M1 dans les étalons ou les échantillons rentre en compétition avec l'aflatoxine conjuguée à une enzyme pour la liaison aux sites des anticorps. Après l'étape de lavage, un substrat d'enzyme est ajouté, on observe donc une coloration bleue qui se développe.

L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration d'aflatoxine M1 dans l'échantillon. Une solution d'arrêt est alors ajoutée qui fait virer la couleur du bleu au jaune. Les micro-puits sont mesurés optiquement à l'aide d'un lecteur ELISA avec une densité optique de 450 nm et 630 nm. Les densités optiques (DO) des échantillons sont comparées aux DO des solutions standards, les résultats sont déterminés en les extrapolant par rapport à la courbe.

II.3.2 Préparation de l'échantillon pour l'analyse AFM1

Tous les échantillons de lait ont été décongelés la veille de l'analyse.

La préparation des échantillons s'est déroulé en suivant les indications fournies par le Kit Elisa.

5 ml d'échantillon de lait frais sont transférés dans un tube à essais. Ces derniers ont d'abord été incubés pendant 30 minutes à 4°C puis centrifugés à 300tr/min pendant 10 minutes.

Objectifs & Matériels et méthodes

Une quantité de 0.4 ml de sérum de lait (prise sous la couche de graisse) est mélangée avec 0.1 ml de méthanol à 100% dans des tubes coniques. Pour finir, ces deux derniers sont bien mélangés à l'aide d'un vortex (Figure 7).



1. Préparation des tubes à essais.



2. Centrifugation après incubation.



3. Lait après centrifugation.



4. Transfert du méthanol.



5. Prélèvement du sérum.



6. Transfer du sérum.



7. Vortex.

Figure 7. Etapes de préparation des échantillons.

II.3.3 Procédure du test de l'ELISA

Le test se fait en plusieurs étapes :

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

2-Ajouter 100 μ L de chaque étalon ou échantillon dans les puits de dilution.

3-Bien mélanger et transférer 100 μ L des puits de dilution dans les puits enduits d'anticorps et incuber à température ambiante pendant 20 minutes.

4-Laver 5 fois avec la solution de lavage et bien sécher.

5-Pipeter 100 μ L de solution de substrat dans les puits sensibilisés et incuber à température ambiante pendant 10 minutes dans l'obscurité.

6-Ajouter 100 μ L de solution d'arrêt dans les puits sensibilisés.

7-Lire les bandes avec un lecteur ELISA en utilisant une densité optique de 450 nm et 630 nm.

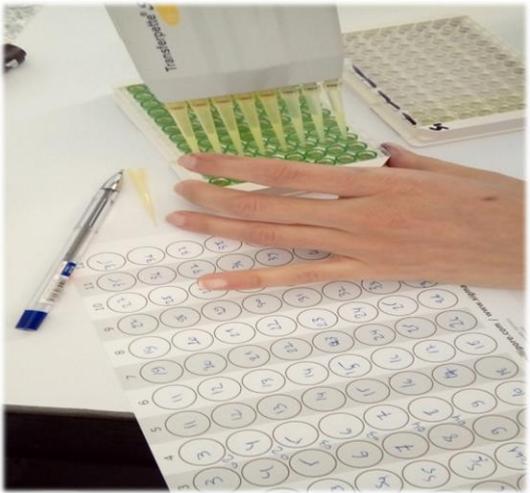
Objectifs & Matériels et méthodes



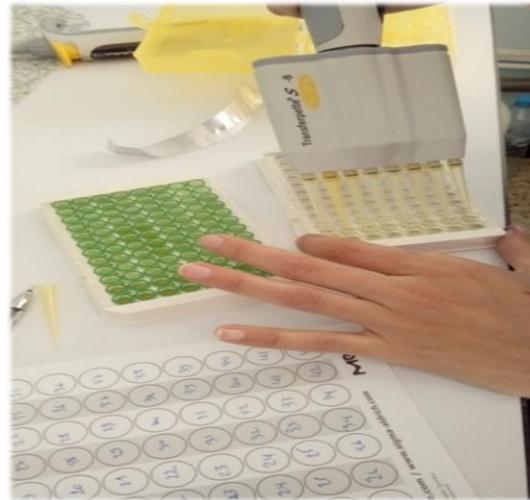
1. Distribution du conjugué.



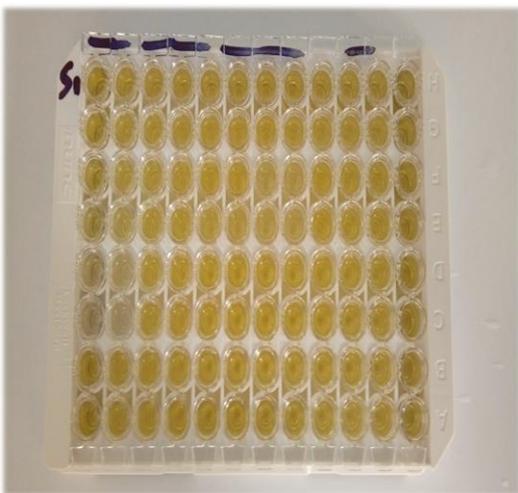
2. Ajout des standards et échantillons.



3. Mélange



4. Transfert dans les puits sensibilisés



5. Incubation



6. Rinçage

Objectifs & Matériels et méthodes



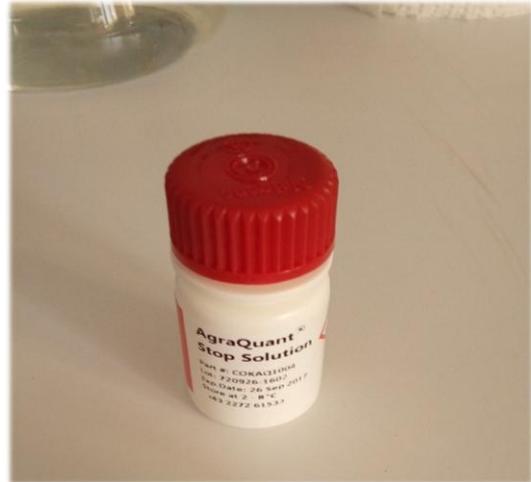
7. Ajout du substrat.



8. Incubation à l'obscurité



9. Virage de couleur



10. Ajout de la solution d'arrêt.



11. Lecture des résultats

Figure 8. Etapes du test ELISA.

Résultats et discussions

III. Résultats et discussion

La limite de détection (LOD) est 89 ppt, l'intervalle de quantification (LOQ) est 100-2000 ppt. Les densités optiques ont été obtenues par le lecteur ELISA. Ces dernières sont introduites dans un logiciel livré par le laboratoire Romer Lab, ce qui nous a permis d'obtenir les concentrations de l'AFM1 en ppt (ng/l). Les concentrations en AFM1 ont été obtenues plus précisément par extrapolation à partir de la courbe d'étalonnage (figure 9).

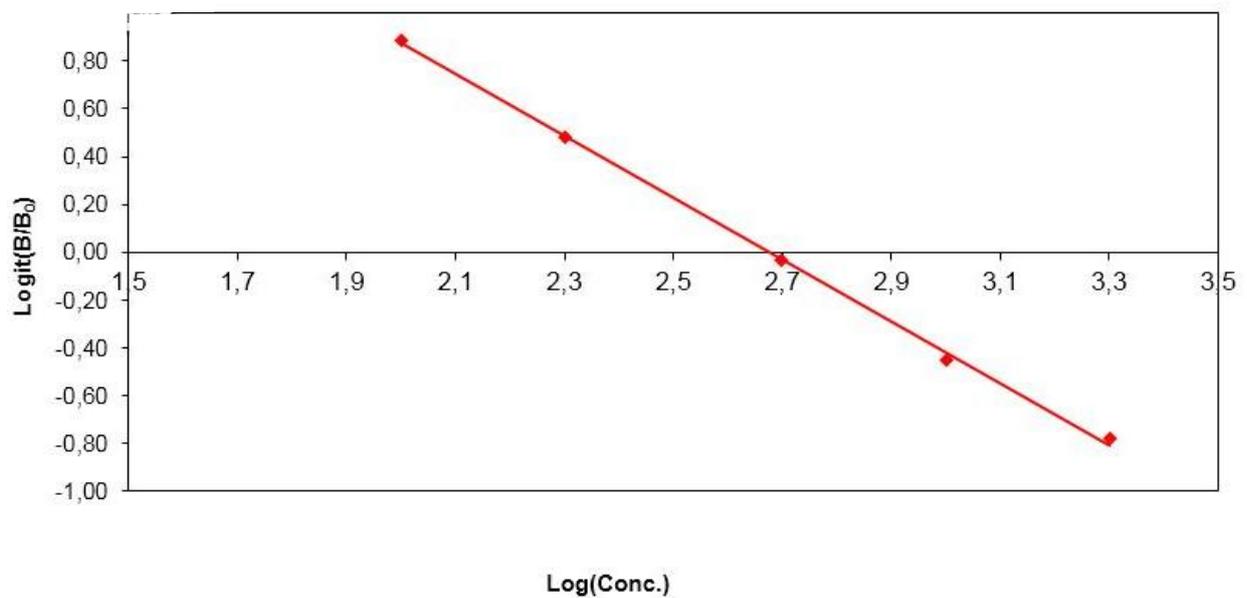


Figure 9. Courbe d'étalonnage.

Résultats et discussions

III.1 Résultats

Sur les 20 échantillons analysés 50% sont considérés comme négatifs dans la limite de détection du Kit (< LOD 89 ppt). Dans les 50% restants, la concentration de l'AFM1 est nettement supérieure à la LOD et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 6 :

Tableau 6. Différentes concentrations de l'AFM1 dans les échantillons de lait.

N.	Ech.	Abs.	AFM1 [ppt]
1	E1 Chlef	0,780	107,24
2	E2 Chlef	0,745	136,67
3	E3 Chlef	0,887	<LOD (89ppt)
4	E4 Chlef	0,843	<LOD (89ppt)
5	E5 Chlef	0,780	107,24
6	E6 Chlef	0,765	119,78
7	E7 Chlef	0,859	<LOD (89ppt)
8	E8 Chlef	0,811	<LOD (89ppt)
9	E9 Chlef	0,876	<LOD (89ppt)
10	E10 Chlef	0,784	103,91
11	E11 Chlef	0,815	<LOD (89ppt)
12	E12 Chlef	0,810	<LOD (89ppt)
13	E13 Tlemcen	0,843	<LOD (89ppt)
14	E14 Tlemcen	0,538	344,69
15	E15 Tlemcen	0,857	<LOD (89ppt)
16	E16 Tlemcen	0,804	<LOD (89ppt)
17	E17 Tlemcen	0,775	111,41
18	E18 Tlemcen	0,788	100,58
19	E19 Tlemcen	0,758	125,67
20	E20 Tlemcen	0,774	112,25

N : numéro Ech : Echantillon Abs : Absorbance ppt : Partie par trillion

III.2 Discussion

Une seule étude a été effectuée en Algérie pour la recherche et l'évaluation du niveau d'AFM1 dans le lait (le lait cru, pasteurisé produit en Algérie, et lyophilisé importé).

Selon cette dernière, Redouane-salah S., 2016, sur les 22 échantillons de lait cru analysés, un seul était contaminé par l'AFM1 à faible taux. Ces échantillons ont tous été prélevés dans la période froide (automne/hiver).

En ce qui concerne nos échantillons, 50% d'entre eux sont hautement contaminés par l'AFM1 dépassant largement la norme internationale fixée par la réglementation européenne qui est de 50 ppt. Ces échantillons sont tous prélevés en automne (novembre 2017) lorsque les régimes alimentaires sont supplémentés avec de l'orge, du son de blé et du pain sec. De plus, ils proviennent de régions à climat méditerranéen selon Redouane-salah S., 2016, *Aspergillus* (producteurs d'AFB1) est le genre le plus fréquent et le plus rencontré dans le concentré, le son de blé, la luzerne, le pain et l'orge. Une concentration plus élevée en saison froide a été observée.

Les raisons possibles des concentrations élevées d'AFM1 en hiver sont dues à une température et une humidité favorables pour la production de l'AFB1 dans les aliments récoltés et entreposés (Ismail A. *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus par Tsakiris, I. N *et al.*, 2013, révèlent que 46,5% (91 échantillons) étaient positifs à l'AFM1 sur un total de 196 échantillons et seulement 1,02% (2 échantillons) dépassaient la limite maximale tolérable acceptée par l'Union européenne.

Une autre étude récente, réalisée par Mahmoudi et Norien, 2014, a révélé une incidence de contamination du lait cru de 56,59% (163/288 des échantillons analysés). Les niveaux d'AFM1 dans 69,32% des échantillons contaminés (113/163) se sont avérés être plus élevés que la limite maximale tolérable acceptée par l'Union européenne et la Commission du Codex Alimentarius.

Une autre étude plus récente, menée par Bellio A. *et al.*, 2016, au nord-ouest de l'Italie, a montré que sur un total de 1668 échantillons de lait analysé 36 (2.2%) étaient positifs à l'AFM1 dont 8 dépassent la limite maximale fixée par la législation européenne.

Résultats et discussions

Contrairement à nos résultats. 50% de nos échantillons sont positifs à l'AFM1 dont 100% (10/10) dépassent largement la limite maximale fixée par la législation européenne allant de 100 ppt jusqu'à 344ppt.

Le passage de l'AFM1 dans le lait constitue pour l'animal un moyen de se protéger contre les toxines (AFSSA, 2009). En effet l'AFB1 est hydroxylée en AFM1 au niveau du foie. Environ 1,5% de l'AFB1 est excrétée sous forme de métabolite M1 dans le lait (Krivobok S., 1983 ; Brochard G. Le Bacle C., 2009).

Les teneurs en AFM1 dans le lait varient considérablement selon la saison, la race animale, la contamination de l'aliment et le moment de la traite (Ismail A. *et al.*, 2016).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La consommation de lait contaminé par l'aflatoxine M1 pourrait avoir des conséquences néfastes sur la santé du consommateur.

La détection et la quantification de l'AFM1 par la technique de l'ELISA nous a permis de constater que la moitié des échantillons de lait sont contaminés.

La concentration de l'AFM1 dans ces échantillons est considérablement élevée par rapport à la limite maximale fixée par la législation européenne.

Les concentrations élevées observées dans cette étude montrent que la présence de l'AFM1 dans le lait en Algérie est alarmante et constitue un sérieux problème de santé publique.

L'étude de recherche de l'AFM1 dans le lait devrait être généralisée sur tout le territoire national. Ainsi des programmes de décontamination des mycotoxines devraient être envisagés sur les aliments de bétail, étant donné que la décontamination sur les produits alimentaires destinés à la consommation humaine est impossible à réaliser.

Références bibliographiques

AFSSA, 2006 : Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.p.13.

Bellio A., Bianchi D. M., Gramaglia M., Loria, A., Nucera D., Gallina S., & Decastelli L., 2016 : Aflatoxin M1 in Cow's Milk: Method Validation for Milk Sampled in Northern Italy. *Toxins*, 8(3), p.57.

Brochard G. et Le Bacle C., 2009 : Mycotoxines en milieu de travail. Origine et Propriétés Toxiques des Principales Mycotoxines. INRS, Documents pour le Médecin Du Travail, p.119.

Carraro A., De Giacomo A., Giannossi M. L., Medici L., Muscarella M., Palazzo L. et Tateo F., 2014 : Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M 1 from contaminated milk and effects on milk

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

Creppy E.E., 2002 : Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1), 19-28.

El Khoury A., 2007 : Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et Origine (thèse de doctorat),p.51..

Fremy J-M., Thomann C., 2009 : Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments. p 8-10, 13, 14, 23, 47, 79, 127, 149, 179.

Gallot J., Abenhaim L., Guillou M., 2000 : Guide de bonnes pratiques d'hygiène dans l'industrie de semoulerie de blé dur. Édition : Les journaux officiels, 105- 108 p.

GAUTHIER A., 2016 : Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé.thèse.Thèse de doctorat.p,34-60.

Guerre P., Bailly J. D., Benard G. et Burgat V., 2000 : Excrétion lactée des mycotoxines: quels risques pour le consommateur. *Rev. Med. Vet*, vol 151,p,7-22.

Guerre P., Bailly J. D., Benard G. et Burgat V., 2000 : Excrétion lactée des mycotoxines: quels risques pour le consommateur. *Rev. Med. Vet*, 151, 7-22.

Références bibliographiques

Hussein H. S. et Brasel J. M., 2001: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, vol 167 ,no 2,p.101-134..

Ismail A., Akhtar S., Levin R.E., Ismail T., Riaz M. et Amir M., 2016: Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. *Critical reviews in microbiology*, 42(3), 418-427.

Jaquet J., Lafont J., Lafont P., 1982 : Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française*, 42, 63-67.

Kaniou-Grigoriadou I., Eleftheriadou A., Mouratidou T. et Katikou P., 2005 : Determination of aflatoxin M 1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food control*, 16(3), 257-261.

Mahmoudi R. et Norian R., 2015 : Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food and agricultural immunology*, 26(1), 131-137.

Molinié A., 2004 : Qualité sanitaire des blés en région Midi-Pyrénées: suivi du taux de contamination en mycotoxines de stockage (ochratoxine A et citrinine): étude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT).

Nguyen M. T., 2007 : Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines (these de doctorat).p 20-24.

Peraica M., Radic B., Lucic A., et Pavlovic M., 1999 : Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754-766.

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

Pohland A. E., Nesheim S., Friedman L., 1992 : Ochratoxin A: a review (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 64(7), 1029-1046.

Portelli C., 2005 : Mycotoxines. *BULLETIN VETERINAIRE BIMESTRIEL-SOCIETE VETERINAIRE PRATIQUE DE FRANCE*, 2005, vol. 89, no 1, p. 47.

Rosjean F., Leuillet M., Berhaut P., 2002 : Dossiers mycotoxines. *Perspectives Agricoles*, 278,

Références bibliographiques

Redouane-Salah S., 2016 : Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache: étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé(thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba),p 14-37.

Tantaoui-Elaraki A., 1977 : Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* du Maroc. Homme Terre et Eau. p. 79-86.

Tsakiris I.N., Tzatzarakis M.N., Alegakis A.K., Vlachou M.I., Renieri, E.A. & Tsatsakis A.M., 2013 : Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. Food and chemical toxicology, 56, 261-265.

Yiannikouris A., Jouany J.P., 2002 : Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. Productions Animales 1 (15), 3-16.

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

Résumé :

Les mycotoxines représentent une menace pour la santé humaine et animale, certaines d'entre elles se retrouvent sous forme de métabolites dans les produits laitiers et doivent par conséquent être recherchées. Une partie de l'aflatoxine B1 ingérée est métabolisée et excrétée dans le lait sous forme d'aflatoxine M1 qui est hépatotoxique et cancérigène, ce qui constitue un problème de santé publique.

Dans le but d'évaluer la contamination du lait de vache, un total de 20 échantillons de lait cru de vache provenant des régions de Chlef et de Tlemcen ont été analysés par la méthode de l'ELISA afin d'évaluer la présence et les concentrations de l'aflatoxine M1. Les résultats ont révélé que 50% des échantillons étaient contaminés et ceci à des concentrations hautement élevées dépassant les teneurs autorisées par la réglementation Européenne et qui sont de 50 ppt.

Mots clés : Aflatoxine M1, Lait, ELISA, cancérigène, concentration.

ملخص :

السموم الفطرية تشكل خطرا على صحة الإنسان والحيوان، وبعضها يتم العثور عليها في الحليب ومشتقاته، وبالتالي لا بد من التحقيق فيها. جزء من الأفلاتوكسين B1 التي يتم تناولها واستخلاصها في الحليب في شكل الأفلاتوكسين M1 يؤدي الى امراض سرطان الكبد و مسرطنة , الذي يشكل مشكلة صحية عامة.

من أجل تقييم تلوث حليب البقر، تم تحليل مجموعة من عينات مقدرة ب 20 من حليب البقر الخام الاتي من منطقتي الشلف وتلمسان تم تحليلها بواسطة طريقة إيسا، من أجل تقييم نسبة وجود أفلاتوكسين M1، حيث كشفت النتائج أن 50 % من العينات كانت معدية وهذا بنسبة عالية جدا تتجاوز المستويات المادون بها في التنظيم الأوروبي والتي هي 50 جزيئة في المليار.

الكلمات الرئيسية : الأفلاتوكسين M1, حليب, إيسا, مسرطنة, التركيز.

Abstract :

Mycotoxins pose a threat to human and animal health, some of which are found as metabolites in dairy products and should therefore be sought. Part of the aflatoxin B1 ingested is metabolized and excreted in the milk as aflatoxin M1 which is hepatotoxic and carcinogenic, which constitutes a public health problem.

In order to assess cow's milk contamination, a total of 20 raw cow milk samples from the Chlef and Tlemcen regions were analyzed by ELISA to assess presence and concentrations. Aflatoxin M1 results. The results revealed that 50% of the samples were contaminated and this at very high concentrations exceeding the levels authorized by the European regulation and which are 50 ppt.

Keywords: Aflatoxin M1, milk, ELISA, carcinogen, concentration