

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du
Master complémentaire en Sciences Vétérinaires

**Recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru dans la région de l'Est et
l'Ouest de l'Algérie par la méthode ELISA**

Présenté par : KENOUNI Aida

Soutenu le : 28 Février 2019

Devant le jury composé de:

- Président : Mme. YAHIAOUI Fatima Maitre de Conférences B
- Promoteur : M. MOHAMMEDI Dahmane Maitre de Conférences A
- Examineur 1: M.ZAOUANI Mohammed Maitre de Conférences B
- Examineur 2 : Mme. MOHAMMEDI Sarah Maitre Assistante

Remerciements

Je souhaite manifester mes sincères remerciements à :

DIEU Le Tout Puissant qui m'a donné la force et la patience, ainsi que le courage pour aller jusqu'au bout de mon travail. J'exprime mon profond remerciement et ma vive reconnaissance à Dr **MOHAMMEDI Dahmane**, qui avait accepté d'encadrer et de diriger ce travail avec rigueur scientifique et pragmatisme. J'ai été fasciné par votre abord facile et votre simplicité, vos qualités scientifiques et humaines. Ainsi de ceux de **Dr MOHAMMEDI Sarah** qui m'a profondément aidé et encouragé. Je remercie aussi l'honorable **jury** qui a consenti à juger ce travail

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. Sans oublier bien sur l'aide précieuse, la gentillesse et la compréhension de ma famille qui grâce à leur soutien moral et financier, ce travail a vu le jour.

Table des matières

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre 1 : Les champignons et les mycotoxines 3

1. Les champignons : 3

2. Les mycotoxines : 4

2.1. Définition : 4

2.2. Classification : 4

2.3. Mécanismes de synthèse : 5

3. Les aflatoxines : 6

3.1. Définition : 6

3.2. Classification : 6

3.3. L'aflatoxine M1 8

3.4. Propriété physico-chimique : 8

3.5. Métabolisme des aflatoxines : 9

3.6. Effets des aflatoxines : 11

3.6.1. Effet chronique: 11

3.6.2. Effet aiguë : 11

4. La réglementation : 13

Chapitre 2 : Les techniques d'analyse15

1. Les différentes techniques d'analyse : 15

1.1. Technique d'échantillonnage : 15

1.2. Techniques d'extraction: 17

1.3.	Techniques de dosage :.....	19
1.3.1.	Techniques chromatographiques :.....	19
1.3.1.1.	Méthode CCM :	20
1.3.1.2.	Méthode CG :	21
1.3.1.3.	Méthode CLHP :	22
1.3.1.4.	Méthode LC- MS :	23
1.3.2.	Techniques non chromatographiques :	24
1.3.2.1.	Les bioessais et l'évaluation visuelle :.....	24
1.3.2.2.	La fluorométrie :	24
1.3.2.3.	Tests rapides :	24
1.3.2.3.1.	Les FPIA :	25
1.3.2.3.2.	Les tests à bandelette réactive et à flux latéral :	25
1.3.2.3.3.	ELISA :	28
Chapitre 3 : Matériel et méthode		31
1.	Matériel :.....	31
1.1.	Kit ELISA AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus par Romerlabs® :.....	31
1.2.	Matériel de laboratoire :	32
2.	Méthode :.....	32
2.1.	Echantillonnage du lait :.....	32
2.2.	Préparation / extraction des échantillons :.....	33
2.3.	Préparation de la solution de lavage :.....	33
2.4.	Procédure de dosage en détail :	33
2.5.	Calcul des résultats :.....	34
3.	Principe de dosage AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus :.....	37
Chapitre 4 : Résultats et discussion		39
Conclusion		44
Perspectives.....		45

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les genres : *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicilium* respectivement

Figure 2 : Représentation schématique du métabolisme de l'AFB1 et de l'AFM1

Figure 3 : Schéma représentant la dispersion hétérogène des mycotoxines (en points rouge) dans l'aliment

Figure 4 : Technique d'extraction liquide-liquide

Figure 5 : Technique de la chromatographie sur couche mince

Figure 6 : Technique de chromatographie gazeuse

Figure 7 : Représentation schématique simplifiée de fonctionnement de CLHP

Figure 8 : Test bandelette

Figure 9 : Schéma représentant le principe d'une bandelette avec interprétation des résultats possibles

Figure 10: ELISA « compétitive »

Figure 11 : ELISA « sandwich »

Figure 12 : Schéma représentant la technique ELISA « indirecte »

Figure 13 : Kit ELISA AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus

Figure 14 : Lecteur ELISA

Figure 15 : Courbe de calibration via Excel

Figure 16 : Etapes de dosage des AFM1 ainsi que leur principe avec ELISA « directe »

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales mycotoxines retrouvées en alimentation humaine et/ou animale et leur classification

Tableau 2: Toxicité aiguë de l'AF B1 exprimée par une seule dose orale chez plusieurs espèces

Tableau 3: Limites d'aflatoxine autorisées par US FDA et EU dans l'alimentation humaine

Tableau 4: Nombre d'échantillons élémentaires à prélever en fonction du poids du lot de céréales et de produits céréaliers

Tableau 5: Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever sur le lot

Tableau 6: Résultats de l'analyse des AFM1 dans les échantillons de lait cru

Tableau 7: Les différents paramètres du kit et résultat des analyses mycotoxicologiques

Tableau 8: Incidence de l'AFM1 dans le lait cru des vaches laitières de différents pays

INTRODUCTION

Introduction

De nos jours, les mycotoxines posent un réel problème sanitaire à l'échelle mondiale notamment les aflatoxines pour leur pouvoir hépatotoxique et cancérigène.

En Algérie, le manque de contrôles sanitaires, le mauvais conditionnement des aliments ainsi que l'absence d'une réglementation stricte augmentent le risque de contamination par ces métabolites. La fréquence de contamination des aliments mis à la disposition du public et la teneur des aflatoxines deviennent une menace sérieuse si d'une part une sensibilisation de la population n'est pas faite sur les méthodes de conservation qui permettent une inhibition de la croissance de ces moisissures. D'autre part, si la recherche et le développement ne coordonnent pas des approches stratégiques et globales de lutte contre les mycotoxines et des acteurs pluridisciplinaires (épidémiologistes végétaux, écologues microbiens, médecins, vétérinaires, généticiens, microbiologistes, responsables d'organismes partenaires importateurs ou grands fournisseurs du marché et agriculteurs), pour la mise en route des programmes "Contrôle et Assurance Qualité Alimentaire" dans notre pays [105].

Outre les effets sanitaires délétères, certaines aflatoxines intoxiquent les animaux de ferme consommant des aliments infectés, causant des pertes agricoles qui ont été estimées à 270 millions de dollars par an rien que pour les États-Unis. Le coût en est bien plus élevé dans les pays en développement dont l'Afrique où la santé infantile est directement affectée [17].

En Algérie, La situation reste actuellement mal connue et sous estimée, aussi bien chez les animaux que chez l'homme malgré la grande consommation rapportée en 2018 par l'office national interprofessionnel du lait (ONIL). Effectivement, la consommation annuelle des algériens de ce produit est estimée à 145L/an, alors que, la moyenne mondiale fixée par la FAO est de 90L/an/citoyen. Ainsi, nous devons accorder plus d'attention à cet aliment. Bien sur, les techniques de détection des AFM1 sont nombreuses, nous avons toutefois opté pour l'ELISA, l'un des kits les plus rapides, sensibles et spécifiques sur le terrain.

Dans notre travail nous avons abordé dans une première partie (partie bibliographique), un rappel sur les champignons, les mycotoxines et en particulier les Aflatoxines puis on a expliqué les différentes techniques qui existent pour la détection de ces dernières. Dans la partie expérimentale, nous avons quantifié le taux d'AFM1 (par la technique ELISA) dans des échantillons de lait cru, collectés de plusieurs fermes situées dans l'Est et l'Ouest du pays. Puis on a interprété nos résultats par rapport aux normes Européennes et Américaines tout en les comparant avec d'autres études dans différentes régions du monde.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

Les champignons et les mycotoxines

Chapitre 1 : Les champignons et les mycotoxines

1. Les champignons

Un champignon est un organisme eucaryote uni ou pluricellulaire, dépourvu de chlorophylle, il est constitué d'un thalle unicellulaire (comme pour certaines levures) ou pluricellulaire (mycélium) comme la plupart des micromycètes ou des macromycètes. C'est le thalle ou le filament mycélien qui assure la nutrition, celle-ci se fait par absorption et non par phagocytose [73].

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, vivant principalement en saprophyte aux dépens de matières organiques en décomposition. Certains champignons vivent aussi en symbiose avec bien des espèces appartenant au règne végétal (les Lichens), mais aussi parfois en parasite avec tous les composants du monde vivant. Les champignons sont des êtres immobiles qui vont à l'instar du règne végétal compenser ce handicap par la production d'un nombre considérable de spores. Les champignons sont capables de produire d'énormes quantités de spores leur assurant ainsi un pouvoir de dispersion très important [73].

Ces spores peuvent renfermer des toxines mais ces dernières se diffusent surtout dans le substrat qu'elles contaminent, ces dites toxines sont élaborées principalement par 3 genres de champignon qui sont illustrés dans la figure 1: *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium*. Et sont appelées "mycotoxines".

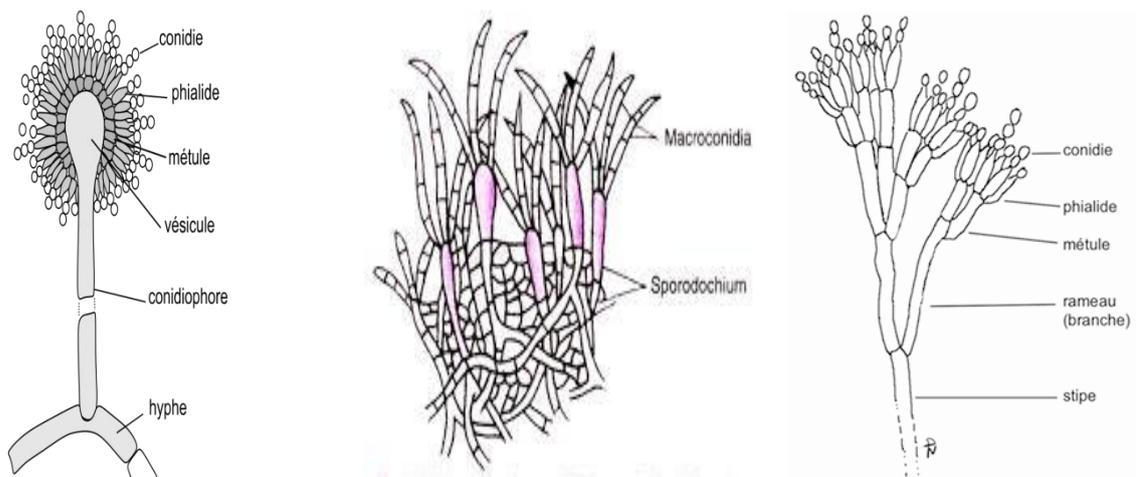


Figure 1 : Schéma représentant les genres : *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* respectivement [56]

2. Les mycotoxines

2.1. Définition

Du grec mukos (champignon) et du latin toxicum (poison), le terme mycotoxines désigne des substances naturelles produites par des moisissures tout en exerçant un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) une fois ingérées même en faibles concentrations [38].

Les mycotoxines sont dites métabolites secondaires (ou idiolites) car dans la plupart des cas, leur synthèse démarre durant la fin de la période de croissance et le début de la phase stationnaire (idiophase). Elles ne sont pas directement nécessaires à la vie du champignon producteur. Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, généralement non dégradables par les organismes vivants et très stables à la chaleur (jusqu'à 250°C) puisque nous pouvons les retrouver dans les aliments après cuisson ou même après stérilisation. Leur durée de vie dans l'aliment est plus longue que celles des moisissures les ayant synthétisées tout en sachant que les métabolites secondaires des moisissures ne sont pas tous des mycotoxines [38].

2.2. Classification

Plus de 2500 mycotoxines ont été répertoriées, mais seule une trentaine possèderait des propriétés toxiques réellement préoccupantes pour l'homme ou l'animal, on cite ci-dessous quelques unes des plus importantes avec leur impact sur la santé ainsi que leur appartenance au groupe des mycotoxines de champs, de stockage ou les deux simultanément [17]:

Tableau 1 : Principales mycotoxines retrouvées en alimentation humaine et/ou animale et leur classification [17]

Aflatoxine	Cancérogène: cancer du foie (hépatocarcinome) et des voies biliaires, cancer broncho-pulmonaire et bronchique. Mutagène: anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN.	Arachides, céréales, graines de coton, épices, fruits, etc.	Mycotoxine de champs et de stockage
-------------------	---	---	-------------------------------------

Ochratoxine A (OTA)	Cancérogène: cancer du rein. Mutagène: anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN Immunosuppresseur. Néphrotoxique: néphropathie endémique (Balkans), néphropathie interstitielle chronique.	Légumes, céréales et graines de café, fromages, poissons, viandes, etc.	Mycotoxine de stockage
Patuline	Immunosuppresseur: diminution du nombre de lymphocytes du sang (lymphopénie) si intoxication chronique. Neurotoxique: troubles nerveux (action anti acétylcholinestérase).	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).	Mycotoxine de stockage
Fumonisines	Cancérogène: association avec des cancers de l'œsophage.	Maïs et autres céréales.	Mycotoxine de champs
Trichotécènes	Mutagène: anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN (toxine T2). Immunodépresseur: altération de la phagocytose, inhibition de la synthèse protéique (Toxine T2 et désoxynivalénol). Respiratoire: pneumopathie interstitielle.	Maïs et blé.	Mycotoxine de champs
Zéaralénone	Ostrogénique: puberté précoce et gynécomastie.	Maïs, blé, orge, etc.	Mycotoxine de champs

Pour la plupart, elles sont fortement absorbées ou fixées au niveau de la paroi des conidies (comme les aflatoxines). D'autres sont uniquement excrétées dans le milieu extérieur (comme la gliotoxine). Elles peuvent être présentes alors que l'agent responsable (producteur) a disparu, soit du fait de l'évolution de la flore soit du fait des traitements technologiques, ce qui leur confère un caractère pervers.

2.3. Mécanismes de synthèse

La synthèse des toxines peut se faire selon trois mécanismes [81]:

- La toxine est issue du métabolisme du champignon, cas le plus fréquent.

- Un constituant du végétal peut être activé par la moisissure. C'est le cas dans l'intoxication par le mélilot gâté, où la moisissure induit la transformation de l'acide O-coumarique en dicoumarol.
- La production d'une substance toxique est induite par la moisissure (ex : phyto-oestrogènes produits par la luzerne « tâchée »)

En 1960, des élevages industriels de volailles de la région de Londres furent décimés à la suite de la consommation de tourteaux d'arachide en provenance du Brésil "Turkey X disease" ou Maladie X de la dinde. Un an plus tard, la relation est faite entre cette intoxication et la présence d'*Aspergillus flavus* et on isole la première aflatoxine révélée être la substance la plus cancérigène que l'on connaisse [140].

3. Les aflatoxines

3.1. Définition

L'acronyme d'Aflatoxine est formé à partir des combinaisons suivantes : première lettre 'A' pour le genre *Aspergillus*, les 3 lettres suivantes 'FLA' pour les espèces *flavus* [117].

Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proches (un assemblage d'une coumarine et de 3 furannes) ; certaines sont toxiques tant pour l'homme que chez l'animal ; métabolites fongiques non antigéniques, elles peuvent à hautes doses entraîner la mort en quelques heures ou à quelques jours selon la dose et la sensibilité de l'animal comme c'est démontré dans le Tableau 2. A plus faibles doses, elles inhibent le métabolisme (et donc la croissance) et possèdent un pouvoir cancérigène élevé [117].

De très nombreux produits alimentaires destinés à l'homme ou aux animaux peuvent en contenir, en quantité parfois importante : graines d'arachides, maïs, blé...etc.

3.2. Classification

Quatre souches d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser les aflatoxines [121] :

- *Aspergillus flavus*, qui produit principalement l'AFB1 et l'AFB2 ;
- *Aspergillus parasiticus*, qui produit les quatre aflatoxines (B1, B2, G1, G2) ;

- *Aspergillus nomius*, une espèce rare proche d'*Aspergillus flavus*, qui est capable de produire des AFs ;

- *Aspergillus pseudotamarii*

Parmi ces quatre espèces, seuls *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sont d'un point de vue économique importants, car elles peuvent produire les aflatoxines sur la plupart des substrats mal stockés [103]. *Aspergillus flavus* peut être subdivisé en deux souches S et L. La première souche produit plus d'aflatoxines que la deuxième [31].

Les aflatoxines dites B1 et B2 (AFB1 et AFB2) sont les plus couramment rencontrées dans les denrées alimentaires. Elles sont aussi un fardeau économique important en étant à l'origine de 25 % ou plus des destructions de cultures alimentaires dans le monde chaque année [90].

Des estimations nationales de l'exposition alimentaire aux aflatoxines font apparaître des différences entre pays développés et en développement. L'exposition alimentaire à l'AFM1 a rarement été estimée à plus de 1 ng/kg de poids corporel et par jour (bien que des valeurs allant jusqu'à 6,5 et 8,8 ng/kg de poids corporel et par jour aient été signalées chez des jeunes enfants et des nourrissons).

De plus, l'aflatoxine M1 (AFM1) un produit de métabolisation de l'aflatoxine B1 (AFB1), et sur laquelle notre étude sera concentrée, peut aussi se retrouver dans le lait dans les zones de forte exposition aux aflatoxines. Par la suite, les humains peuvent être exposés à cette aflatoxine par le biais du lait et des produits laitiers, y compris le lait maternel, notamment dans les régions où les animaux sont nourris avec des graines de piètre qualité.

Les cultures alimentaires peuvent être contaminées avant comme après la récolte comme cela été démontré dans le tableau plus haut. La contamination par des aflatoxines avant la récolte est assez limitée pour le maïs, les graines de coton, les arachides et les noix. Après la récolte, cette contamination peut affecter diverses autres cultures comme le café, le riz et les épices. Le stockage dans des conditions inappropriées favorisant la croissance des moisissures (environnements de conservation chauds et humides) peut typiquement conduire à des niveaux de contamination bien plus élevés que ceux observés dans les champs [90].

3.3. L'aflatoxine M1

Quand l'Aflatoxine B1 (AFB1), la plus toxique, est ingérée par les vaches à travers des aliments contaminés [129], elle est transformée en aflatoxine M1 (AFM1) grâce à une hydroxylation enzymatique de l'AFB1 à la 9a-position (figure 2) et a un taux de conversion global approximatif égal à 0.3 jusqu'à 6.2% [32,10,25].

AFM1 est secrétée dans le lait par la glande mammaire des vaches laitières [25,126]. Ce passage dans le lait constitue pour l'animal un moyen de se protéger contre les toxines [2]. Plusieurs travaux ont démontré que l'AFM1 a une affinité à la caséine, protéine principale de lait, et que par conséquent elle est plus concentrée dans le fromage que dans le lait utilisé pour le produire [8,94].

Même si il est moins toxique que son composé parent, l'AFM1 a un effet hépatotoxique et carcinogène [96,58]. Cette toxine, initialement classifiée comme un agent du groupe 2B [59], a maintenant une classification dans le groupe 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) [60].

L'AFM1 est relativement stable durant la pasteurisation, stockage et préparation de divers produits laitiers [96,119] et donc, la contamination par l'AFM1 représente une menace importante pour la santé humaine, en particulier pour les enfants, qui sont les principaux consommateurs de lait.

3.4. Propriété physico-chimique

Les deux toxines (AFB1 et AFM1) ont des propriétés chimiques similaires: elles sont légèrement solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires et librement solubles dans les solvants organiques polaires [79]. Elles ont une forte stabilité thermique, même à haute température (> 100 ° C), qui les empêche de se dégrader thermiquement lors de la fabrication des aliments. Cela représente un obstacle majeur à la réduction de la contamination des aliments par les aflatoxines, en particulier dans le lait et les produits laitiers, car la pasteurisation et d'autres traitements thermiques à eux seuls se sont révélés peu efficaces [61,95]. D'autres propriétés chimiques telles que l'instabilité à la lumière UV ou les conditions de pH extrêmes (10) et la réactivité de la fraction lactone en présence d'ammoniac ou d'hypochlorite ont conduit à la mise au point d'autres méthodes de décontamination des

aliments pour animaux et des denrées alimentaires.

Cependant, plusieurs traitements physiques tels que les micro-ondes, les rayons gamma, les rayons X et la lumière ultraviolette ont été étudiés, mais des résultats controversés ont découragé l'utilisation de ces méthodes, en particulier pour les échantillons fortement contaminés [108].

Actuellement, l'ammoniation [91] et l'adsorption sur des argiles ou des adsorbants organiques [61] sont couramment utilisées pour assurer un bon niveau de décontamination sans perturber les propriétés nutritionnelles ni l'innocuité des aliments pour animaux. En se concentrant sur l'AFM1 dans le lait, certains chercheurs se sont récemment intéressés à la capacité de liaison à l'AFM1 de différentes souches de lactobacilles [46,62].

3.5. Métabolisme des aflatoxines

Pour comprendre le mécanisme par lequel les aflatoxines exercent leurs effets toxiques, il est important de comprendre comment elles sont métabolisées. Les aflatoxines ont déjà été examinées en 1994 par Eaton [33].

En détail, l'AFB1 est principalement métabolisée dans le foie sous l'action des enzymes oxydase microsomale à fonction mixte (MFO) appartenant à la superfamille du CYP450.

Lors de l'action de ces oxydases, AFB1 est converti en 8,9-époxyde réactif, existant sous la forme de deux stéréo-isomères, exo et endo, ce dernier étant le toxique responsable des propriétés génotoxiques d'AFB1 [87]. L'exo-8,9-époxyde a une forte affinité de liaison avec l'ADN, formant l'adduit 8,9-dihydro-8- (N7-guanyl) -9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Gua), conduisant ainsi aux mutations de l'ADN [127].

Cette forme d'époxyde est également impliquée dans d'autres voies:

- (i) la conjugaison avec le glutathion (GSH) catalysée par la glutathion-S-transférase (GST) avec excrétion ultérieure sous forme de mercapturate d'AFB; cette voie est vitale pour la détoxification de l'AFB1 en tant que cancérogène, même si un épuisement du SGH pourrait entraîner des taux élevés d'espèces oxygène réactives (ROS) provoquant des dommages oxydatifs [16];
- (ii) conversion enzymatique et non enzymatique dans AFB 1-8,9-dihydroxydiol, qui peut être convertie davantage sous forme de dialdéhyde; le dialdéhyde d'aflatoxine peut être excrété dans l'urine sous forme de dialcool après l'action de l'aflatoxine

aldéhyde réductase (AFAR) ou peut se lier à des protéines, comme l'albumine [136];

- (iii) se liant à d'autres macromolécules comme les protéines ou l'ARN, provoquant une dérégulation des fonctions cellulaires normales et l'inhibition des protéines, la synthèse de l'ADN et de l'ARN [1

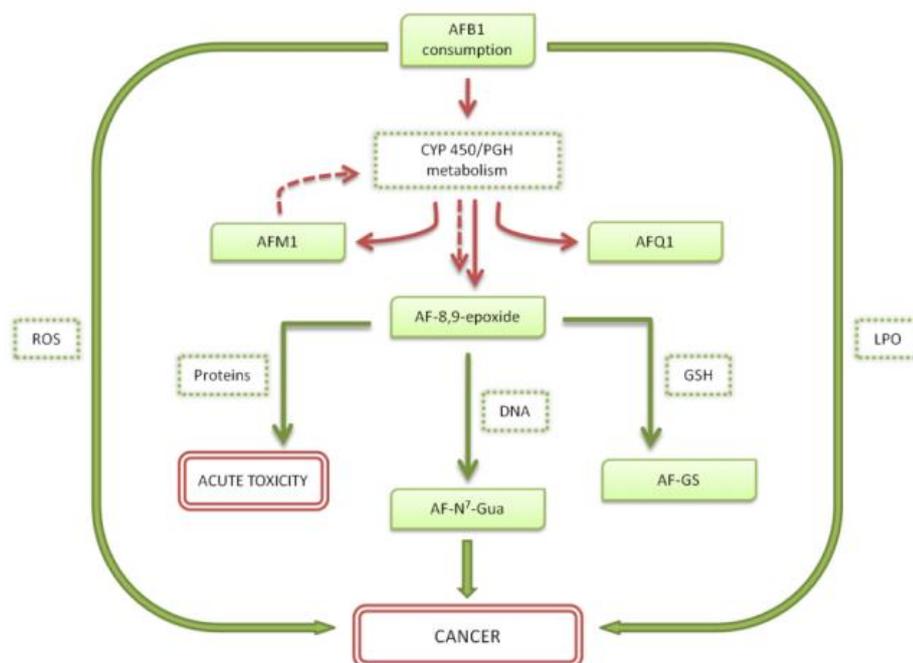


Figure 2 : Représentation schématique du métabolisme de l'AFB1 et de l'AFM1 [127]

La biotransformation microsomale de l'AFB1 inclut également une hydroxylation de la toxine, ce qui conduit à la formation de métabolites plus polaires et moins toxiques, principalement AFM1 et Aflatoxine Q1 (AFQ1). Différentes études ont tenté d'évaluer le rôle des enzymes du CYP450 responsables de la formation de métabolites cancérigènes ou détoxifiants. Le CYP1A2 et le CYP3A4 se sont avérés être les isoenzymes les plus actives de cette famille et capables d'activer AFB1 [71].

D'autre part, il est important de souligner que l'AFM1 est principalement considéré comme un produit de désintoxication du métabolisme de l'AFB1, présentant seulement 10% de mutagénicité par rapport à son précurseur [130]. Le devenir métabolique de l'AFM1 s'est avéré être similaire à celui de l'AFB1, à la différence que l'AFM1 représente un substrat plus pauvre pour l'époxydation, expliquant ainsi les différences de potentiel de génotoxicité. De plus, il a été rapporté que l'activation du CYP n'était pas nécessaire pour que l'AFM1 exerce des effets cytotoxiques [87].

3.6. Effets des aflatoxines

3.6.1. Effet chronique

Une exposition de longue durée à des aflatoxines peut avoir notamment les conséquences sanitaires ci-après [90] :

- Les aflatoxines sont potentiellement cancérogènes et peuvent affecter l'ensemble des systèmes organiques, en particulier le foie et les reins ; elles peuvent provoquer des cancers du foie et ont été associées à d'autres types de cancer – l'AFB1 est connue pour être cancérogène chez l'homme ; la capacité de cette aflatoxine à provoquer un cancer du foie est significativement accrue en présence d'une infection par le virus de l'hépatite B (VHB).
- Les aflatoxines sont mutagènes dans des bactéries (elles affectent l'ADN), génotoxiques et ont la capacité de provoquer des anomalies congénitales chez les enfants.
- Les enfants pourraient subir à cause d'elles des retards de croissance, même si les données à ce sujet doivent encore être confirmées car d'autres facteurs contribuent aussi au fléchissement de la croissance comme le faible statut socioéconomique, les diarrhées chroniques, les maladies infectieuses ou la malnutrition).
- Les aflatoxines ont un effet immunosuppresseur, elles peuvent donc réduire la résistance aux agents infectieux (VIH ou tuberculose, par exemple).

3.6.2. Effet aiguë

Un empoisonnement aigu peut être fatal. En cas d'exposition à des doses importantes, les aflatoxines entraînent un empoisonnement aigu (aflatoxicose) qui peut être fatal, généralement par le biais d'une atteinte hépatique. Des flambées d'insuffisances hépatiques aiguës (ictère, léthargie, nausées, décès), identifiées comme des aflatoxicoses, sont observées parmi les populations humaines depuis les années 1960. Les décès les plus récemment attribués aux aflatoxines ont été signalés pendant l'été 2016 en République Unie de Tanzanie. Les adultes sont plus tolérants à une exposition aiguë que les enfants. On soupçonne la consommation d'aliments contenant des concentrations d'aflatoxines supérieures ou égales à 1 mg/kg d'entraîner des aflatoxicoses.

D'après les flambées survenues dans le passé, on a estimé que la consommation, sur une période d'une à trois semaines d'une dose d'AFB1 comprise entre 20 et 120 µg/kg de poids corporel et par jour, exerçait une action toxique aiguë et était potentiellement létale [90].

Chez les animaux, les aflatoxines entraînent divers effets indésirables :

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

Les porcs sont aussi très affectés, avec des effets chroniques flagrants comme des lésions du foie.

Chez le bétail, les principaux symptômes sont une baisse de poids et des lésions hépatiques et rénales ; lesquelles s'accompagnent aussi d'une baisse de la production de lait. L'existence de différentes formes d'enzymes métabolisant les aflatoxines (cytochromes P450 ou glutathion S-transférases, par exemple) est considérée comme responsable des variations de susceptibilité de diverses races animales aux effets toxiques des aflatoxines.

Par contre, ils ne sont pas tous également sensibles aux aflatoxines.

Les ovins, par exemple, sont remarquablement résistants, éliminant rapidement ces toxines par les urines et les fèces [27].

Tableau 2: Toxicité aiguë de l'AFB1 exprimée par une seule dose orale chez plusieurs espèces [82]

Espèce	DL50 (mg/kg PC)	DL50 (ppt)
Lapin	0.30	300
Chat	0.65	650
Chien	0.50-1.00	500-1000
Poule	6.32	6320
Rat	5.52-7.20	5520-7200
Hamster	10.20	10200
Homme	5	5000

Il est difficile de détecter une aflatoxicose chez l'homme et chez l'animal en raison de la variabilité des signes cliniques et de la présence potentielle d'autres facteurs tels qu'une dépression du système immunitaire provoquée par une maladie infectieuse.

Les deux techniques utilisées la plupart du temps pour détecter les concentrations d'aflatoxines chez l'homme consistent, pour l'une, à mesurer un produit de décomposition dans l'urine (qui n'est cependant présent que 24 heures après l'exposition) et pour l'autre, à mesurer la concentration d'adduits AFB-albumine dans le sérum sanguin, en fournissant des informations sur la durée de l'exposition (semaines ou mois). La mesure de ces marqueurs biologiques est importante dans l'investigation des flambées lorsqu'on suspecte une contamination par des aflatoxines [90].

4. La réglementation

Actuellement en Algérie, à notre connaissance, on ne possède pas de normes ou de limites réglementaires, fixant les teneurs maximales en mycotoxines dans l'alimentation humaine ou animale.

La réglementation américaine a fixé une limite de 500 ng / kg soit 500 ppt d'AFM1 dans le lait et les produits laitiers [5]. Ces teneurs admissibles sont 5 fois plus grandes que celle établies en Europe.

Les Communautés Européennes ont fixé la limite maximale de 50 ng / kg soit 50 ppt d'AFM1 (Communauté européenne n ° 466/2001) afin de protéger les consommateurs du lait contaminé. Les mesures réglementaires en vigueur dans l'Union européenne sont des plus sévères au monde. Des plans de surveillance et de contrôle rigoureux permettent de maîtriser le risque à un niveau très faible [2].

On peut expliquer ce large écart des deux nations par le plan sanitaire que visent les nations Européennes et le plan économique qui intéresse les nations unis d'Amérique.

Aussi, En Égypte, l'Organisation égyptienne de normalisation et de contrôle de la qualité a défini une tolérance zéro pour les résidus AFM1 dans le lait et les produits laitiers (ES: 1623/2005).

De plus, il n'existe aucune preuve montrant que la conservation au froid, la congélation, le traitement thermique (AFM1 point de fusion est 299°C), la fermentation, la concentration ou le séchage du lait contaminé modifie le niveau de l'AFM1 [141,19].

Les méthodes officielles d'échantillonnage et d'analyse qui seront discutées dans le chapitre suivant sont régies par la directive de la Commission européenne.

Tableau 3 : limites d'aflatoxine autorisées par US FDA et EU dans l'alimentation humaine [5]

Mycotoxine	Espèce de champignon	Aliments	US FDA* (µg/kg*)	EU* (µg/kg)
Aflatoxine B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Mais, riz, arachides, sorgho...	20 pour total	2-12 pour B1 4-15 pour total
Aflatoxine M1	Métabolite d'AF B1	Lait, produits laitiers	0.5	0.05 lait 0.025 lait pour enfant

***US FDA**= US Food and Drug Administration (Agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux)

***EU**= Europe Union

***1 µg/kg** = 1000 ppt

Remarque :

-concernant l'alimentation animale, la commission européenne conformément au règlement 32/2002, la limite autorisée dans les céréales et autres est égale à : 5-50 µg/kg.

-ISIRI (Institute of Standards and Industriel Research of Iran) : LMR (AFM1) = 500 ppt [5]

-GCC (Golf Cooperation Council) : LMR (AFM1)= 50 ppt [143]

-EOSQC (Egyptian Organization for Standardization and Quality Control): LMR (AFM1) = 0 ppt [78]

CHAPITRE 2

Les techniques d'analyse

Chapitre 2 : Les techniques d'analyse

1. Les différentes techniques d'analyse

Dans ce chapitre, nous allons discuter de l'analyse des mycotoxines. On verra les différentes méthodes, leurs limitations, et les problèmes qu'on peut rencontrer quand on fait des analyses.

Il y a trois étapes: l'échantillonnage, la préparation de l'échantillon (extraction) et le dosage (détection). Nous allons commencer par décrire les méthodes d'échantillonnage [76] :

1.1. Technique d'échantillonnage

Des études menées par plusieurs scientifiques ont montré que l'échantillonnage est habituellement la plus importante source de variation des tests analytiques des mycotoxines [30,91,111,132,131]. Par exemple, près de 90% de l'erreur associée à l'analyse d'aflatoxine peut être attribuée à l'échantillonnage. En raison du temps et des coûts associés aux analyses des mycotoxines, le temps supplémentaire consacré à un échantillonnage approprié est essentiel pour l'obtention de résultats reproductibles.

Les procédures d'échantillonnage doivent être écrites, examinées et suivies par tous les intervenants. Une erreur d'échantillonnage élevée lors des tests de mycotoxines est due à deux principaux facteurs: une faible concentration en mycotoxines dans un produit donné (le «problème ppb») et la répartition inégale de ces mycotoxines dans le lot (figure 3)

En effet, contrairement aux protéines ou à l'humidité dans le maïs ou le blé, les mycotoxines n'apparaissent pas dans chaque grain. Dans les cas extrêmes, les mycotoxines peuvent être présentes seulement dans quelques épis ou têtes sur l'ensemble d'un champ de culture. Cela sous-entend que certains grains peuvent présenter de hautes teneurs en toxines tandis que d'autres ne contiennent aucune toxine du tout.

Cela est dû au fait que les champignons ne poussent pas uniformément a sein d'un champ ou dans un bac de grains. Ainsi, les mycotoxines ont tendance à être concentrées dans certains endroits, que l'on appelle les «foyers sensibles» ou «pépites», alors que le reste du lot est exempt de toxines. Toutefois, plus le degré de contamination est important, plus il est probable que la répartition soit plus homogène. Inversement, lorsque la concentration totale d'une toxine est faible dans un lot de grain, sa distribution inégale est accentuée [77].

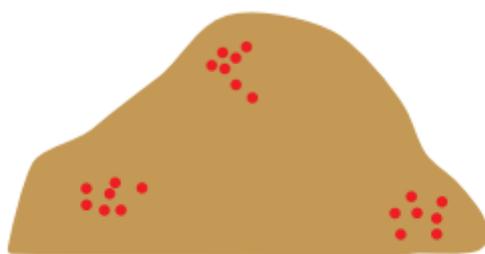


Figure 3 : Schéma représentant la dispersion hétérogène des mycotoxines (en points rouge) dans l'aliment [106]

À l'exception des échantillons d'aliments liquides tels que le lait ou certains aliments transformés (beurre d'arachide, par exemple), les méthodes traditionnelles d'échantillonnage des aliments ne sont généralement pas utilisées, celles-ci ne conviennent pas aux analyses de mycotoxines, car elles ne sont pas présentes de manière homogène dans les aliments [114,134,104].

➤ *Mode de prélèvement d'échantillons pour le lait, les produits laitiers et les préparations pour nourrissons* [102] :

Ce mode de prélèvement est à utiliser pour le contrôle officiel des teneurs maximales en aflatoxine M1 fixées pour le lait et les produits laitiers ainsi que les préparations pour nourrissons et les préparations de suite, y compris le lait pour nourrissons, le lait de suite et les aliments diététiques pour nourrissons (lait et produits laitiers) destinés à des fins médicales spéciales.

Tableau 5 : Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever sur le lot [102]

Forme de commercialisation	Volume ou poids du lot (en litres ou en kg)	Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever	Volume ou poids minimum de l'échantillon global (en litres ou en kg)
Vrac	—	3-5	1
Bouteilles/briques	≤ 50	3	1
Bouteilles/briques	De 50 à 500	5	1
Bouteilles/briques	> 500	10	1

1.2. Techniques d'extraction

L'extraction de mycotoxines présentes dans des échantillons d'aliments solides vers une phase liquide constitue la première étape de la préparation des échantillons, suivie de procédures de nettoyage visant à améliorer la sensibilité et la spécificité d'une méthode de détection donnée [67].

La plupart des échantillons d'aliments liquides tels que le lait, le vin et le jus de pomme sont soumis à des extractions pour séparer initialement les mycotoxines.

Les mycotoxines sont très solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol, l'acétonitrile, l'acétone, le chloroforme, le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle, mais difficilement solubles dans l'eau [99,122]. Cependant, les fumonisines sont solubles dans l'eau car elles contiennent quatre groupes carboxyle libres et un groupe amino et l'AFB1 est très stable dans un mélange d'eau et d'acétonitrile [17]. Un mélange de solvants organiques avec l'ajout d'une certaine quantité d'eau ou d'un tampon acide est fréquemment utilisé pour extraire les mycotoxines. Pour les échantillons à haute teneur en lipides, les solvants non polaires tels que l'hexane et le cyclohexane sont utilisés [92].

Récemment, de nombreuses méthodes d'extraction au solvant automatisées instrumentales ont été utilisées dans l'analyse des mycotoxines, y compris l'extraction au fluide supercritique (SFE), l'extraction accélérée au solvant (ASE) et extraction assistée par micro-ondes (MAE) [75,64]. Par rapport aux méthodes conventionnelles, ces méthodes accélèrent l'extraction des mycotoxines, nécessitent de plus petites quantités de solvant chimique (qui est donc plus respectueux de l'environnement) et offrent généralement une meilleure efficacité d'extraction; cependant, ces méthodes automatisées peuvent être coûteuses [77].

La méthode pour laquelle on a opté dans le cadre de cet ouvrage sera détaillée dans la partie expérimentale, néanmoins, un rapide aperçu d'une autre technique fréquemment utilisée sera décrit dans les lignes qui suivent.

➤ *Protocol de base de QuEChERS*

QuEChERS est l'acronyme de Quick (rapide), Easy (facile), Cheap (peu cher), Effective (efficace), Rugged (robuste) et Safe (sûr). Cette technique est idéale pour l'analyse des résidus de pesticides, médicaments vétérinaires et de mycotoxines pour un large éventail de produits alimentaires et agricoles.

Les produits nécessaires à la préparation des échantillons par extraction en mode dispersif sont conditionnés en privilégiant l'aspect pratique : supports et tampons pré-pesés en sachets et en tubes, comme décrit dans les protocoles et méthodes réglementaires, les étapes sont comme suit [139] (figure 4) :

- 10 mL d'échantillon ont été introduits dans un récipient de 50 mL.
- Tube Falcon et 2,5 ml d'eau distillée et 5 ml d'acétonitrile, contenant 3,35% d'acide formique (v / v) a été ajouté.
- Le mélange vortexé vigoureusement pendant 2 min puis soumis à des ultrasons.
- extraction pendant 15 min (vortexée toutes les 5 min).
- Après cela, on rajoute dans le tube impliqué 4,0 g de sulfate de sodium anhydre et de 1,2 g de chlorure de sodium, que l'on a secoué à la main pendant 2 min et ensuite centrifugé pendant 3 min à 4000 tr / min et à 4 ° C.
- La couche organique supérieure est transférée dans un tube Falcon de 15 mL contenant 300 mg de sorbant C18, 140 mg de PSA et 1,5 g de sulfate sodium.
- Le mélange est agité par tourbillonnement pendant 1 min puis a été centrifugé pendant 1 min à 1500 tr / min et à 4 ° C.
- Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube en verre puis évaporé sous azote doux débit à 45 ° C.
- Enfin, le résidu a été reconstitué avec 500 µL de MeOH: H₂O (70:30, v / v), filtré (Filtre à membrane de 0,22 µm) et transféré dans un flacon pour l'analyse.

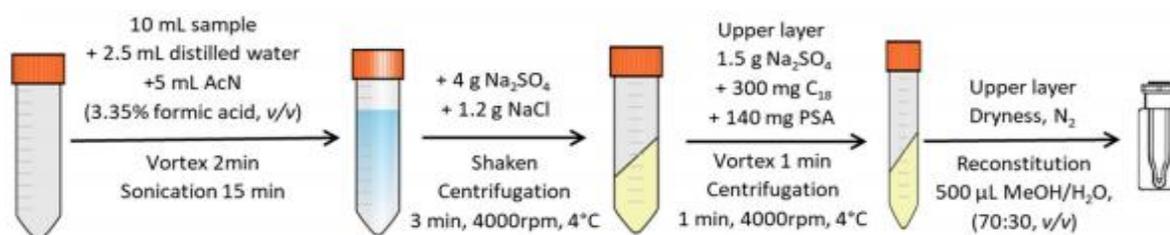


Figure 4 : technique d'extraction liquide-liquide [139]

1.3. Techniques de dosage :

Au préalable, il est utile de rappeler que toute analyse comprend une incertitude de mesure qui doit être prise en compte dans l'interprétation de ses résultats. Cette incertitude dépend de la méthode utilisée et du laboratoire [57].

Le fait qu'une méthode d'analyse nouvellement développée soit adaptée ou non à une utilisation commerciale en routine est déterminée par trois critères pratiques : la fiabilité (l'exactitude), la précision et la rapidité, et puis, dans une large mesure, le prix de l'analyse ainsi que la possibilité de réaliser l'analyse "sur le terrain".

Sur la base de ces critères, les techniques d'analyse des mycotoxines peuvent être classées en deux catégories : les tests rapides de dépistage et les méthodes de confirmation [15].

Les analyses par kit rapide sont intéressantes dans la mesure où elles sont adaptées aux contrôles de routine. Lorsque le résultat est supérieur à la limite réglementaire, les résultats obtenus par ces outils de mesure nécessitent d'être confirmés par des analyses par chromatographie de référence. Cependant, nous avons opté pour la division en deux catégories comme suit :

1.3.1. Techniques chromatographiques de détection

En plus des méthodes de chromatographie en couche mince (CCM), des méthodes chromatographiques, telles que la chromatographie en phase liquide (CPL) et la chromatographie en phase gazeuse (CG) couplée à un détecteur spécifique sont les techniques les plus couramment utilisées à ce jour pour obtenir des résultats très précis [76].

Dans le cas d'une seule analyse des mycotoxines, par exemple : AF, l'ochratoxine... la CPL traditionnelle avec détecteur FLD, est la méthode la plus largement utilisée.

Actuellement, la cooccurrence de plusieurs mycotoxines a gagné de plus en plus d'attention. Par conséquent, la chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS) est la technique de choix pour la détermination simultanée de diverses mycotoxines appartenant à différentes familles chimiques.

1.3.1.1. Méthode CCM

Depuis la découverte des AF en 1961, la chromatographie sur couche mince est la méthode traditionnelle utilisée pour l'analyse des mycotoxines [110]. Parallèlement à la demande accrue d'exactitude, de séparation et de quantification des données, les procédures ont été progressivement améliorées de la CCM à la CLHP.

Une revue de Honma et al. [52] a montré que les déterminations de l'AFB1 dans les échantillons de maïs ont été principalement effectuées par des méthodes de CCM en 1978. Cependant, il a été démontré que le pourcentage d'utilisation des méthodes de chromatographie sur couche mince diminuait à 48% en 1989 et 7% en 2002.

Actuellement, les méthodes de CCM sont toujours recommandées pour la détection de l'AF dans tout matériel végétal [138], mais en raison des faibles taux de détection et de la demande d'équipement, les méthodes de chromatographie sur couche mince sont parfois difficiles.

➤ Principe de base

Cette technique consiste à la séparation de substances par une migration différentielle dans un milieu sorptif.

Un extrait est déposé au bas d'une plaque et celle-ci est déposée dans un peu de solvant. À mesure que le solvant monte sur la plaque par capillarité, les composantes de l'extrait montent aussi, mais à des vitesses différentes, caractéristiques des produits [76] (figure 5).

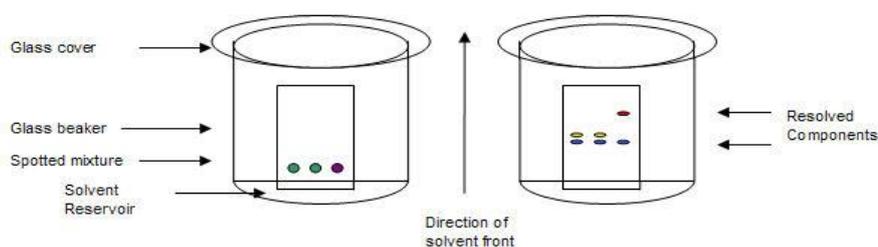


Figure 5 : Technique de la chromatographie sur couche mince [128]

Klaric a réalisé une étude utilisant à la fois la chromatographie sur couche mince et le dosage ELISA pour analyser une contamination spécifique au cours d'une épidémie de neuropathie endémique en Croatie. L'analyse des denrées alimentaires et des aliments pour

animaux a été réalisée pour source des contaminants [64]. Il a été constaté que 29% des produits alimentaires à base de céréales avaient des niveaux supérieurs à la normale, limites admissibles, tandis que la matière première, qui a un niveau de tolérance plus élevé, était inférieure. Les résultats de la CCM étaient en corrélation avec la méthode ELISA mais cette dernière s'est avérée plus sensible.

1.3.1.2. Méthode CG

La GC a été utilisée comme méthode alternative pour la détermination des mycotoxines. Ceci permet des mesures qualitatives et quantitatives simultanées d'analytes simples ou multiples.

Une étape de dérivation supplémentaire, telle que la silylation ou l'acylation, est généralement nécessaire après le traitement de nettoyage des échantillons. Cela est dû au fait que certaines mycotoxines ne sont pas suffisamment volatiles à la température de la colonne ou ne peuvent pas être converties en dérivés volatiles comme résumé par Meneely et al. [80,66,69].

➤ Principe de base

Dans le cas de la CG, un gaz au lieu d'un solvant pousse l'extrait au travers d'un tube contenant un adsorbant. Ce qui influence le plus de temps de rétention dans ce cas est le point d'ébullition des produits analysés (figure 6)

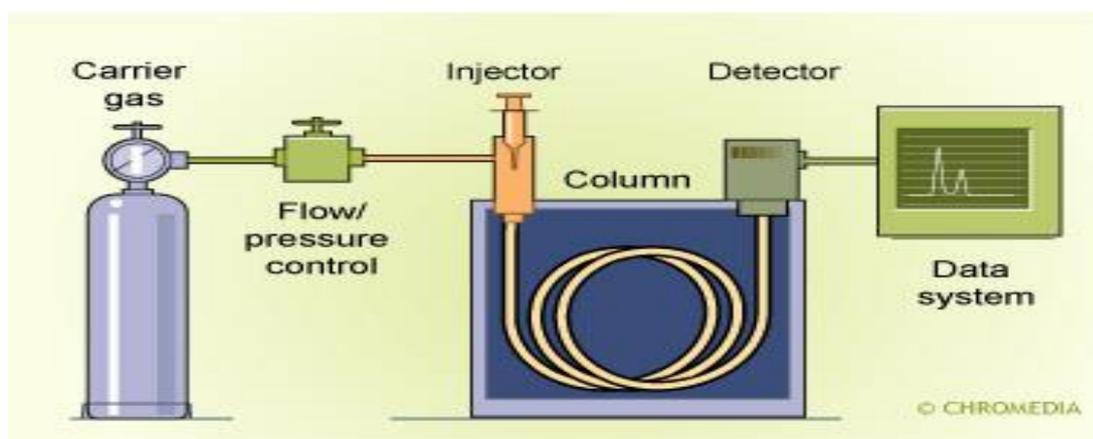


Figure 6 : Technique de chromatographie gazeuse [109]

Si une sensibilité élevée a été atteinte, aucune avancée significative n'a été rapportée en ce qui concerne la CG ou les méthodes basées sur la CG pour l'analyse des mycotoxines. Ceci est probablement attribué à l'application croissante de la technologie LC-MS, qui est plus efficace dans ce qui concerne le temps et peut être effectuée en l'absence de procédure de dérivatisation complexe [68].

1.3.1.3. Méthode CLHP

Les méthodes de chromatographie en phase liquide constituent l'essentiel de l'analyse des mycotoxines. La clé AOAC (Association of Analytical Communities) [23] basée sur la HPLC en tant que norme admet que LC-MS, ou LC Fluorescence sont la référence absolue à laquelle toutes les autres méthodes sont comparées [26,89] En tant que tel, l'accent est mis sur le développement ultérieur du protocole HPLC et des techniques.

Dans certaines matrices, comme le lait et autre produits laitiers, la présence de l'AFM1 est un risque potentiel. Wang a développé un protocole de détection spécifique à cette toxine et le chloramphenicol en utilisant HPLC-MS/MS [130] (Tandis que Iha a utilisé la fluorescence comme technique de détection liée à celle de HPLC pour la détection de l'AFM1 et OTA dans les produits laitiers [55] et le lait humain [54].

➤ Principe de base

Les méthodes CG et HPLC, fonctionnent sous le même principe. Pour le HPLC, l'élution se fait avec un liquide sous haute pression, et la polarité des substances est le facteur déterminant (figure 7)

Dans ces deux derniers cas, les produits élués sont détectés de façon quantitative par divers moyens, soit l'absorbance de la lumière ultraviolette, la réfraction, la fluorescence, etc.

Cependant, ces méthodes ont aussi leurs limitations. Elles nécessitent beaucoup de manipulations, incluant le nettoyage des échantillons, et, à moins d'avoir un spectromètre de masse ou un spectrophotomètre à balayage comme détecteur, l'identification du produit se fait par seulement un temps de rétention. On peut aussi se servir de colonnes d'immunoaffinité pour le nettoyage des échantillons, mais celles-ci ont une capacité limitée. Si un échantillon contient une plus grande quantité d'une toxine que la capacité de la colonne, l'excédent sera perdu et les résultats seront plus bas que la réalité [1].

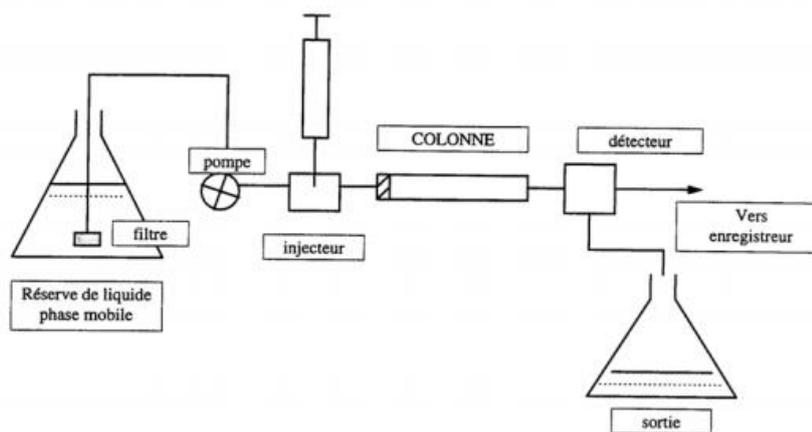


Figure 7 : Représentation schématique simplifiée de fonctionnement de CLHP [1]

Remarque : le passage positif de la CLHP traditionnelle à la CLUHP (Ultra-High), l'utilisation de particules plus petites ($2\mu\text{m}$ sur $5\mu\text{m}$) permet d'utiliser une plus grande surface et des pressions plus élevées, conduisant à une meilleure séparation en augmentant le nombre de plaques théorique (calculé par l'équation de van Deemter). Le taux de séparation augmente également en améliorant le rapport coût / temps / analyse [50].

1.3.1.4. Méthode LC- MS

Le niveau de sensibilité obtenu par les équipements modernes de chromatographie et de spectrométrie de masse a révolutionné le domaine de la détection d'analytes en traces.

On sait que l'effet de matrice n'influence pas seulement la sensibilité mais aussi le choix de l'étalonnage. Idéalement, un étalonnage adapté à la matrice sera utilisé dans les protocoles LC-MS, dans lesquels un échantillon d'une matrice «propre» est utilisé avec des échantillons enrichis pour produire une courbe d'étalonnage, car elle donne des résultats supérieurs par rapport à une courbe d'étalonnage externe générée sans matrice. Ceci est préférable à une méthode d'addition standard où d'autres erreurs peuvent être introduites dans le système et ne nécessitent pas des analyses supplémentaires à effectuer, réduisant les coûts.

Par conséquent, la LC-MS constitue la méthode de référence standard à la base de laquelle une nouvelle méthode est utilisée. Par rapport; ou comme système d'analyse pour l'identification et la quantification après l'isolement des composés via d'autres moyens.

Par ailleurs, le travail de Shen démontre que la méthode ELISA pour la détection de l'AFB1 et AFM1 a été standardisée contre LC-MS [65]

En résumé, les techniques chromatographiques seront toujours la norme de référence par rapport à toutes les autres techniques. La sensibilité et la flexibilité extrêmes observées dans les analyses publiées (parfois plus de 50) aux ppb dans les échantillons complexes ne peuvent pas être appariées. Cependant, les méthodes LC subiront toujours des problèmes de portabilité, de coût et de problèmes pratiques liés au type d'échantillon, à l'effet de matrice, au choix de l'étalonnage, à la préparation de l'échantillon, de sorte que l'accent est mis sur d'autres méthodologies analytiques comme l'utilisation de techniques immunologiques, car celles-ci sont souvent conçues pour mesurer directement avec une préparation minimale.

1.3.2. Techniques non chromatographiques

1.3.2.1. Les bioessais et l'évaluation visuelle

Ce sont les Méthodes les plus vieilles [76].

- Les bioessais impliquent l'utilisation d'organismes et mesurent simplement la toxicité des extraits analysés. Ils sont encore utilisés surtout pour certaines toxines marines, et peuvent être très sensibles, sans toutefois identifier les toxines.
- L'évaluation visuelle est probablement encore utilisée dans certains endroits pour l'évaluation de la vomitoxine. En fait, ce qu'on fait c'est l'évaluation du nombre de grains avariés, ce qui a été démontré comme étant très subjectif.

1.3.2.2. La fluorométrie

Il y a deux types d'instruments, mais le principe est le même. Il s'agit de mesurer la fluorescence de la toxine ou de la toxine modifiée avec une étiquette fluorescente. On suppose qu'aucun autre produit n'est fluorescent à la même longueur d'onde. Donc, la prépurification par immunoaffinité est suggérée.

1.3.2.3. Tests rapides

La majorité des tests rapides se basent sur les anticorps (essais immunologiques) pour la détection et diffèrent essentiellement entre eux suivant la manière dont est utilisé l'anticorps. Trois formats sont actuellement commercialisés: les tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent-Assays), les tests à bandelette réactive et à flux latéral et les FPIA (immunoessais à polarisation de fluorescence).

1.3.2.3.1. Les FPIA

Un FPIA sensible pour les aflatoxines dans du maïs, du sorgho, de la pâte d'arachide et du beurre d'arachide naturellement contaminés a été signalé [86].

Le nombre d'applications du FPIA dans l'analyse des mycotoxines continue de croître. Les avantages de la FPIA comprennent l'élimination des étapes permettant de séparer les étiquettes liées et libres (telles que les étapes de lavage des tests ELISA concurrents), ce qui permet de réaliser des dosages immunologiques très rapides. Les FPIA rapportés sont en effet rapides, la plupart prenant entre 2 et 15 minutes à compléter. Les paramètres importants du test, tels que la vitesse et la sensibilité, dépendent non seulement de la qualité de l'anticorps et du traceur utilisés, mais également de la manière dont ils interagissent en compétition avec la toxine. La sélection de la combinaison appropriée d'anticorps et de traceur peut donner des analyses rapides et sensibles des mycotoxines.

1.3.2.3.2. Les tests à bandelette réactive et à flux latéral

Ce sont des tests immunochromatographiques où la présence de la toxine est mesurée au moyen d'une bandelette jetable.

Ces bandelettes contiennent un anticorps lié à une particule de couleur ; lorsque l'agent d'extraction est ajouté, la toxine présente se lie à la particule de couleur, la bandelette de papier se colore et démontre ainsi la présence de la toxine.

Le grand avantage de ce test par rapport au test ELISA est qu'il peut être appliqué sur le terrain, raison pour laquelle il a récemment fortement gagné en popularité. Ces tests immunologiques ont cependant un point faible : les autres composants présents dans l'échantillon sont susceptibles d'influencer la liaison de l'anticorps et d'ainsi donner lieu à un faux négatif ou à un faux positif [86].



Figure 8 : Test bandelette [85]

➤ *Principe de base*

Les kits bandelettes reposent sur le principe d'une réaction entre antigène (molécule à doser) et anticorps pour former un complexe antigène – anticorps.

Ce test est basé sur la migration de ce complexe le long d'une membrane et leur capture sur des zones dites de test permettant le dosage.

Les tests sont de type [85] :

_ "sandwich" : la couleur développée est proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon

_ "compétition" : la couleur développée est inversement proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon

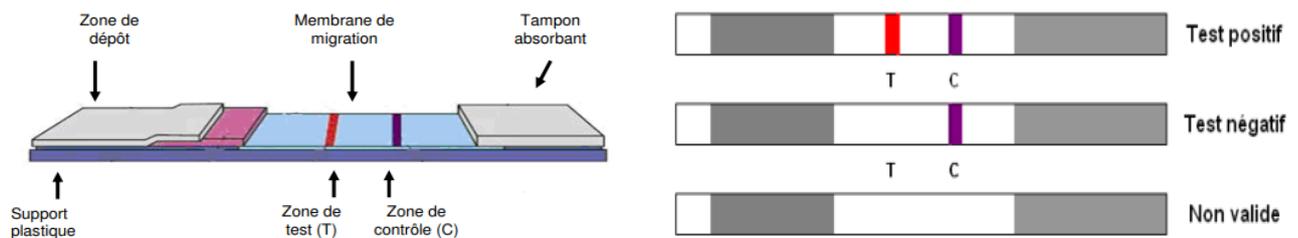


Figure 9 : Schéma représentant le principe d'une bandelette avec interprétation des résultats possibles [85]

a. Tests à flux multi-toxines (multiplex)

Grâce à leur manipulation beaucoup plus aisée, les tests rapides sous la forme de bandelettes ont rapidement gagné des parts de marche, comparativement aux tests ELISA.

Un inconvénient important qu'ils partageaient avec les tests ELISA est qu'ils ne pouvaient détecter qu'une seule mycotoxine par analyse. Récemment, plusieurs tests à flux capables de mesurer plusieurs toxines au cours d'une même analyse ont été mis à disposition sur le marché. Leur inconvénient, cependant, est qu'ils sont pour l'instant encore moins sensibles que les tests à bandelette réactive mono-toxine [15].

b. Polymères à empreintes moléculaires (MIP) & Aptamères

Jusqu'il y a peu, les tests rapides étaient basés sur des anticorps d'origine biologique (p.ex. de lapins, de souris) mais, récemment, des tests rapides à base d'éléments de liaison non biologiques ont été commercialisés. Les MIP sont des polymères avec une mémoire

moléculaire intégrée qui, à l'instar des anticorps, ont la capacité de lier spécifiquement une toxine *via* un mécanisme "clé-serrure".

La stabilité, la réutilisabilité, la reproductibilité, les faibles coûts de production et l'absence d'éventuelles questions éthiques autour de l'utilisation d'animaux de laboratoire constituent des atouts commerciaux importants. Des aptamères (éléments de liaison basés sur l'ADN) sont déjà utilisés à l'échelle du laboratoire comme alternative aux anticorps mais leur avenir commercial est encore incertain [15].

c. Méthodes rapides de spectroscopie

Les techniques spectroscopiques ou, par exemple, un laser infrarouge est dirigé sur l'échantillon et ou l'absorption spécifique d'une certaine longueur d'onde de la lumière révèle la présence d'une toxine, possèdent un très grand atout : elles permettent d'omettre l'étape d'extraction. Cela ouvre un nombre infini de nouvelles possibilités : par exemple, des grains de maïs peuvent être soumis à un screening individuel tandis qu'ils passent sur un tapis roulant et ainsi être éliminés individuellement, ce qui évite la destruction de tout un lot.

Cependant, cette technique est relativement sensible aux interférences, une conséquence inévitable de l'absence de toute forme de préparation de l'échantillon, et la technologie utilisée est relativement coûteuse. Par contre, une fois mises en œuvre, ces analyses se déroulent de façon entièrement automatique [15].

d. Biocapteurs

Un biocapteur est un appareil permettant de détecter des molécules, qui combine un composé biologique comme élément sensible à une lecture physico-chimique. Un biocapteur se compose de 3 parties : un élément biologique sensible, un convertisseur (transducteur) et un détecteur physico-chimique.

Si la toxine est présente, elle se lie à l'élément et provoque ainsi une alteration physico-chimique dans les détecteurs. Bien que cette technologie ait jusqu'à présent donné des résultats prometteurs à l'échelle du laboratoire, elle ne semble pour le moment pas présenter d'avantages concluants par rapport aux technologies existantes et elle n'est pas disponible sur le marché [15].

e. Bead-based assays

Dans les bead-based assays, des petites billes (beads) codées avec une couleur ou des billes magnétiques sont ajoutées à une solution d'échantillon. Outre leur codage d'identification, ces billes sont également marquées au moyen d'un anticorps dirigé contre une certaine toxine. Les altérations causées aux billes par le complexe anticorps-antigène peuvent alors être mesurées au moyen d'un laser, par exemple. Un des grands avantages de cette technologie est qu'elle est particulièrement bien adaptée aux analyses multi-toxines. Des kits commerciaux sont déjà attendus dans le courant de cette année [15].

1.3.2.3.3. ELISA

La méthode la plus rapide en ce moment est l'ELISA, un acronyme pour EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay. Dans ce cas-ci, on peut analyser près d'une cinquantaine d'échantillons en même temps [75]. C'est pour cette méthode qu'on a opté pour nos analyses.

➤ *Principe de base*

En fait, cette analyse est basée sur la capacité du système immunitaire animal de produire des anticorps à presque n'importe quoi. On produit donc des anticorps aux toxines qu'on veut analyser, et on choisit les anticorps les plus sélectifs. Il existe notamment plusieurs types d'ELISA, on cite :

- **ELISA « compétitive » et « sandwich »**

Pour mesurer la concentration de toxine, la méthode « compétitive » consiste à faire une compétition entre la toxine dans l'extrait et la même toxine attachée à un enzyme. Cet enzyme est la peroxydase de raifort (PR). Une fois qu'un équilibre est établi entre ces deux molécules, on peut mesurer la quantité de toxine attachée à la PR en ajoutant du peroxyde et un substrat de l'enzyme qui produit une couleur. On peut ensuite mesurer l'intensité de la couleur, ce qui est proportionnel à la concentration de PR et inversement proportionnel à la concentration de la toxine [43] (figure 10).

Il existe aussi une autre méthode, l'ELISA type « sandwich » où il est nécessaire de rajouter un anticorps secondaire (de marquage) et la couleur développée (résultat de la réaction enzymatique), est proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon [43] (figure 11)

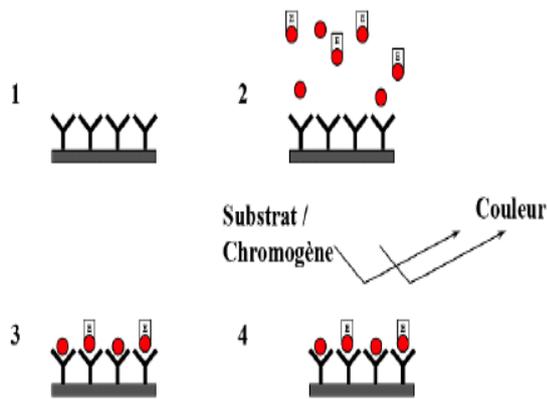


Figure 10 : ELISA « compétitive » [43]

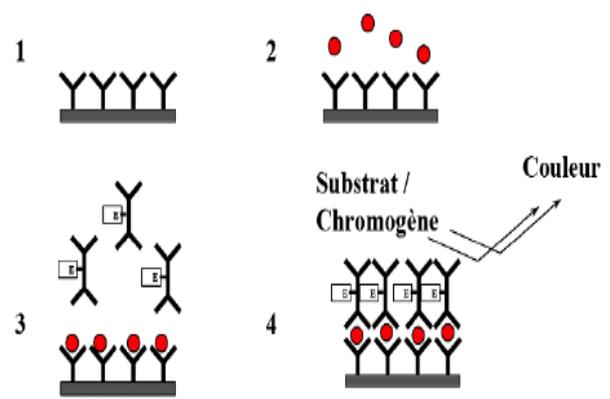


Figure 11 : ELISA « sandwich » [43]

• **ELISA « directe » et « indirecte »**

Le principe de l'ELISA indirecte consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Le test comporte quatre étapes principales [112] :

- **Fixation de l'antigène :** L'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.
- **Fixation de l'anticorps à doser :** On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d'anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.
- **Fixation de l'anticorps de détection :** On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anti IgG qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- **Révélation :** On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnel à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

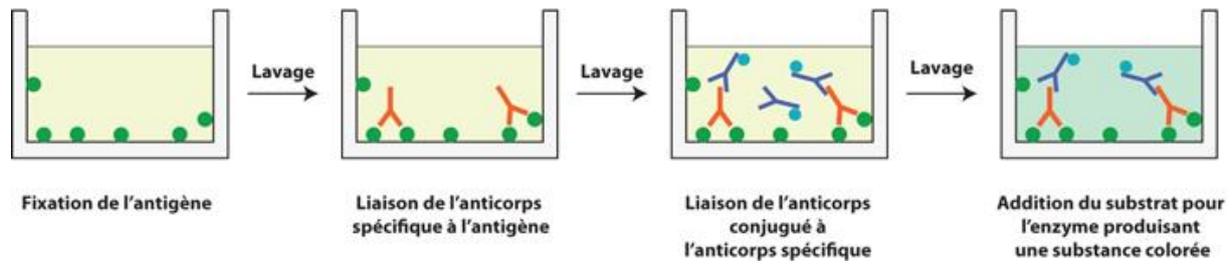


Figure 12 : Schéma représentant la technique ELISA « indirecte » [112]

Quant à la technique « directe », elle sera détaillée dans la partie qui suit (voir Partie Expérimentale)

❖ Sommaire des méthodes

En sommaire, si on compare les méthodes, sous trois caractéristiques [76] :

- La CG et la HPLC ont la meilleure précision, mais sont lentes et dispendieuses.
- La TLC coûte très peu, mais manque de précision et de vitesse.
- Les bioessais ne sont pas dispendieux, mais sont encore plus lents et sans beaucoup de précision.
- Les tests visuels coûtent très peu et sont rapides, mais sont très subjectifs.
- La fluorométrie est moyenne dans tous les aspects.
- L'ELISA est la méthode la plus rapide, a une précision adéquate et un prix modéré.

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3

Matériel et méthode

Chapitre 3 : Matériel et méthode

1. Matériel

Notre étude s'est déroulée au sein du laboratoire de recherche de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire au mois de Mars 2018, le matériel utilisé est listé ci-dessous :

1.1. Kit ELISA AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus par Romerlabs®

Numéro de commande: COKAQ7248

- 48 micro-puits recouverts d'anticorps (6 barrettes de huit puits) dans un porte-micro-puits (scellé dans une pochette à fermeture à glissière).
- 48 micro-puits de dilution non recouverts d'anticorps et bordés de vert (6 barrettes de huit puits)
- 6 flacons de 0,75 ml de chaque étalon d'aflatoxines (0, 100, 200, 500, 1000, 2000ppt), prêts à l'emploi.
- 1 bouteille de 12,5 ml de conjugué d'aflatoxine, prête à l'emploi (bouchon vert).
- 1 bouteille de 7,5 ml de solution de substrat prête à l'emploi (bouchon bleu).
- 1 bouteille de 7,5 ml de solution d'arrêt, prête à l'emploi (bouchon rouge).
- 1 flacon de 5 ml d'échantillon de diluant, prêt à l'emploi (bleu)
- 1 bouteille de 25 ml de solution de lavage avec un concentré 20x (Il doit être dilué à 1 + 19 avec de l'eau distillée)

Remarque : En cas de précipitation cristalline dans des conditions de stockage à froid, le concentré doit être réchauffé à 37 ° C pendant 15 minutes avant dilution.



Figure 13 : Kit ELISA AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus [105]

1.2. Matériel de laboratoire

- Vortex
- Centrifugeuse
- Lecteur de micropuits avec filtre 450 nm et 630 nm.
- Becher 500mL
- Flacons volumétriques avec bouchon
- Tubes à essais de 5mL
- Eppendorfs
- Eau distillée ou désionisée
- Pipette graduée (5mL), à 8 canaux (100 et 200 μ L), à canal unique (100 et 1000 μ L) avec embouts
- Eau distillée ou désionisée.
- Papier absorbant
- Réservoirs (3) réactifs à utiliser pour la pipette à 8 canaux.

2. Méthode

2.1. Echantillonnage du lait

Un total de 20 échantillons de lait cru a été prélevé dans 2 régions différentes sur le territoire Algérien : Mascara (nord ouest) et Constantine (nord est), bien que ces régions se situent dans deux points cardinaux opposés, elles partagent le même climat qui est chaud et tempéré.

La période d'échantillonnage s'est déroulée en saison froide (Décembre 2017) au niveau de fermes privées comprenant plus de 18 têtes/ ferme et plus de 100 têtes à Mascara et à Constantine respectivement.

Ces vaches étaient toutes de race Holstein recevant un concentré à base de maïs intégré dans leur alimentation.

Chaque échantillon comprenait un volume de 100 ml de lait qui a été prélevé à partir du lait cru de mélange de toutes les vaches de chaque ferme puis stocké à -18°C jusqu'à l'analyse de l'Aflatoxine M1, 3 mois après.

2.2. Préparation / extraction des échantillons

- Après décongélation des échantillons, Pipeter 5 ml de chaque prélèvement dans un tube à essai.
- Centrifuger l'échantillon à 3000 tour pendant 10 minutes,
- Filtrer le contenu à l'aide de papier filtre (papier Whatman n°4) ou faites simplement dégager la couche adipeuse,
- Prenez 0,4 ml de sérum de lait et mélangez avec 0,1 ml de méthanol à 100% (le rapport entre le sérum de lait et le méthanol est 4: 1) dans des Eppendorf puis mélangez avec un vortex.

2.3. Préparation de la solution de lavage

- Verser le contenu du flacon de solution de lavage concentrée dans un flacon de 500 ml,
- Ajouter 475 ml d'eau distillée,
- Mélanger la solution en remuant.

2.4. Procédure de dosage en détail

1. Verser une quantité suffisante de solution conjuguée (bouteille avec bouchon vert) dans un réservoir réactif puis, à l'aide d'une pipette à 8 canaux, pipeter 200 μL dans les puits de dilution (deux puits de dilution seront requis pour chaque norme, c'est-à-dire : 0, 100, 200, 500, 1000, 2000 ppt ou un échantillon, ces puits sont bordés de vert)
2. Rajouter 100 μL de chaque standard dans les puits appropriés à l'aide d'une pipette à canal unique,
3. Puis, 100 μL de chaque échantillon est déposée dans 2 puits (1 échantillon /standard = 2 puits de 100 μL) en veillant, à chaque fois, à pipeter 3 fois de haut en bas pour bien mixer le contenu.
4. Transférer immédiatement 100 μL du contenu des puits de dilution vers les micro-puits recouverts d'anticorps correspondants. Puis laisser incuber 20 minutes à température ambiante.
5. Jeter le contenu des puits et laver avec de l'eau ou la solution de lavage préparée au préalable (voir préparation de solution de lavage). Répéter ces mêmes étapes jusqu'à 5 lavages.

6. Tapoter la microplaque sur plusieurs couches papier absorbant pour en extraire le plus d'eau possible (veiller à ce que le fond des micro-puits soit bien sec)
7. Verser une quantité suffisante de substrat (bouteille avec bouchon bleu) dans un réservoir réactif puis, à l'aide d'une pipette à 8 canaux, pipeter 100 μL dans les micro-puits et laisser incuber pendant 10 minutes à l'obscurité et la couleur bleue apparaîtra.
8. Verser une quantité suffisante de la solution d'arrêt (bouteille avec bouchon rouge) dans un réservoir réactif puis, à l'aide d'une pipette à 8 canaux, pipeter 100 μL dans les micro-puits. La couleur devrait passer de bleu à jaune.
9. Placer la microplaque dans le lecteur ELISA afin de mesurer l'absorbance des standards et échantillons à 450 nm de longueur d'ondes.

Remarque

- Le kit a été conservé entre 2 et 8°C puis sorti à température ambiante 1h avant son utilisation.
- Tous les réactifs et composants du kit doivent être à température ambiante 18-30 ° C (64-86°F) avant utilisation.
- Eviter la lumière du jour qui détruit les aflatoxines lors du traitement des échantillons (les aflatoxines se décomposent sous l'influence des ultra-violets) (La Directive Européenne 98/53/CE du 16 juillet 1998 [44])
- Il est recommandé de choisir une pipette à 8 canaux pour effectuer le test.
- Utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque standard ou échantillon.
- Assurez-vous que la pointe de la pipette a été complètement vidée.
- La solution d'arrêt contient de l'acide. Eviter le contact avec la peau ou les yeux. S'il y a exposition, rincez avec de l'eau [105].

2.5. Calcul des résultats

Une fois la microplaque introduite dans le lecteur ELISA (figure 14), les résultats apparaîtront sur une feuille de calcul Excel démontrant la courbe de calibration (figure 15) ainsi que les densités optiques des échantillons qui seront comparées aux DO des normes et un résultat interprétatif sera déterminé (Tableau 6)



Figure 14 : Lecteur ELISA [99]

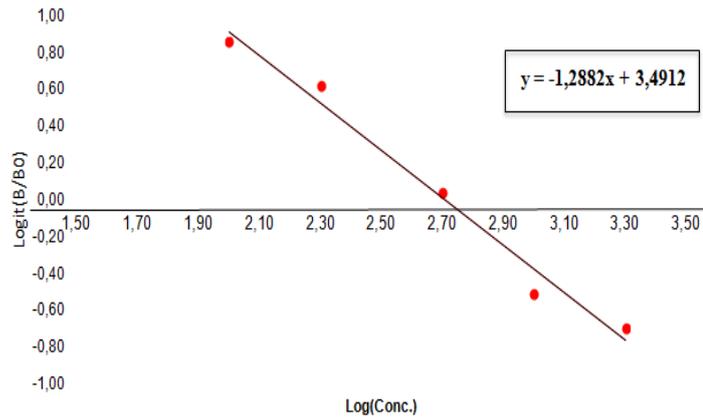


Figure 15 : Courbe de calibration via Excel

Comme on l'a vu dans le chapitre précédemment, L'ELISA compétitif diffère de l'ELISA en sandwich par l'intensité de la concentration de l'antigène dans l'échantillon. En effet, plus cette concentration est élevée, plus la lecture de l'intensité est faible. L'intensité maximale est atteinte lorsqu'aucun antigène n'est présent dans l'échantillon.

Pour évaluer ce niveau maximum dans une analyse ELISA compétitive, il existe généralement un puits de contrôle dans la disposition de la plaque qui ne contient spécifiquement aucun antigène et il est appelé puits zéro ou B0. Les intensités d'échantillonnage peuvent ensuite être comparées au puits B0 pour obtenir un pourcentage lié. Ceci est symbolisé par B / B_0 où B est l'intensité d'un puits d'échantillon et B0 est l'intensité maximale. Ce ratio représente l'Ordonnée dans la courbe de calibration. Tandis que l'Abscisse représente la concentration de la toxine dans les 6 standards mesurée par le lecteur ELISA.

On obtient alors une courbe linéaire de type : $y = ax + b$ ($y = -1.2882x + 4.4912$). Le logiciel déduira alors la concentration de chaque échantillon (x) à partir de son absorbance (y).

Remarque

- Les résultats peuvent aussi être facilement calculés à l'aide du tableur Romer® Log / Logit qui est fourni (gratuitement) sur demande. Si c'est le cas, le coefficient de linéarité (R) de la courbe d'étalonnage doit être compris entre -0,990 et -1,000 (le notre $R = -0.9904$)
- Une densité optique de valeur inférieure à 0,5 unité d'absorbance pour un standard de 0 ppb peut indiquer une détérioration des réactifs.

- Les facteurs de dilution doivent être utilisés pour calculer la concentration finale d'aflatoxine M1 dans les échantillons [105] :

Pour le lait: 1

Pour le lait en poudre (écrémé et crème complète): 10,8

Pour le fromage: 8

Tableau 6: Résultats de l'analyse des AFM1 dans les échantillons de lait cru

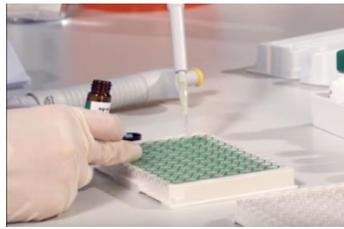
Région	Nombre de vaches / ferme	Nombre d'éch.	DO	Résultat (ppt)	Norme EU	Norme US
Mascara	+18	E1	1,357	<LOD*	-	-
		E2	1,175	<LOD	-	-
		E3	1,250	<LOD	-	-
		E4	1,275	<LOD	-	-
		E5	1,290	<LOD	-	-
		E6	1,364	<LOD	-	-
		E7	1,11	<LOD	-	-
		E8	1,158	<LOD	-	-
		E9	1,176	<LOD	-	-
Constantine	+100	E10	1,229	<LOD	-	-
		E11	1,088	96,87	+	-
		E12	1,172	<LOD	-	-
		E13	1,378	<LOD	-	-
		E14	1,291	<LOD	-	-
		E15	1,13	<LOD	-	-
		E16	1,075	104,81	+	-
		E17	1,180	<LOD	-	-
		E18	1,230	<LOD	-	-
		E19	1,011	147,83	+	-
		E20	1,138	<LOD	-	-

*LOD= 89ppt

3. Principe de dosage AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus

L'aflatoxine M1 conjuguée à une enzyme (1) est mélangée avec de l'Aflatoxine M1 des standards ou les échantillons dans le puits de dilution (2), puis transférés dans les micro-puits revêtus d'anticorps anti-aflatoxine M1, l'AFM1 des standards ou des échantillons est autorisée à rivaliser (compétitionner) avec l'aflatoxine conjuguée à une enzyme pour la liaison avec les anticorps des sites (3) Après une étape de lavage et de séchage (4) un substrat enzymatique est ajouté et la couleur bleue se développe. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration d'aflatoxine M1 dans l'échantillon ou l'étalon (5) On ajoute ensuite la solution d'arrêt qui change la couleur du bleu au jaune [105].

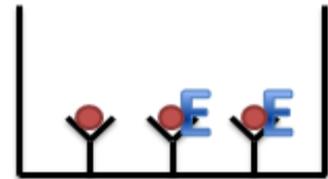
La procédure de dosage est démontrée en photos dans la figure ici-bas ainsi que son principe qui est schématisé juste en dessous :



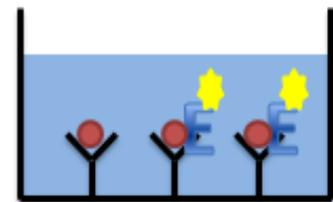
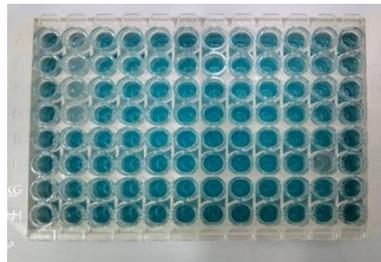
1. Pipeter la Solution conjuguée dans le puits de dilution

2. Rajouter les standards et les échantillons

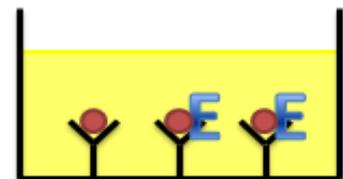
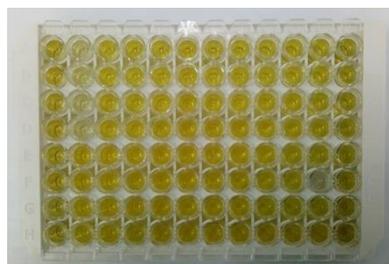
3. Transférer vers les micropuits recouverts d'AC



4. Laver avec la solution de lavage puis faire sécher en tapotant sur du papier absorbant



5. Ajouter le substrat et laisser 10 min le temps que la couleur bleue apparaisse



6. Ajouter la solution d'arrêt et laisser 5min le temps que la couleur jaune apparaisse

Figure 16 : Etapes de dosage des AFM1 ainsi que leur principe avec ELISA « directe »

CHAPITRE 4

Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussion

En raison de graves problèmes de santé, de nombreux pays ont établi des normes maximales admissibles pour les niveaux d'AFM1 dans le lait et les produits laitiers et d'AFB1 dans les aliments pour animaux. Cependant, les limites réglementaires des normes admissibles sont influencées par des considérations économiques mondiales [11,124].

Comme on l'a vu précédemment, l'Algérie – et tout autre pays ne possédant pas de normes fixant la limite autorisée des mycotoxines dans l'alimentation animale et humaine - se voit orientée vers la réglementation américaine (LMR = 500 ppt), c'est pour cette raison qu'on a opté pour un kit ELISA à une LOD (Limit Of Detection) égale à 89 ppt qui est destiné justement, pour cette réglementation.

Notre analyse de lait cru n'a révélé aucun échantillon contaminé par l'AFM1 excédant la limite autorisée par la FAO américaine (500 ppt), toutefois, 3/20 (15%) des échantillons sont positifs et supérieurs à la limite autorisée par la commission européenne (50 ppt) avec 147.83 ppt comme taux le plus élevé (voir Tableau ci-dessous).

Tableau 7: Les différents paramètres du kit et résultat des analyses mycotoxicologiques

Analyte	Matrice	Coefficient de corrélation	LOD (ppt)	LOQ (ppt)	Echantillons positifs (%)	Intervalle (ppt)
AFM1	Lait cru	-0.9904	89	100-2000	3/20 (15)	96.87-147.83

A notre connaissance, il n'y a que deux études qui ont été faites en Algérie pour l'analyse des AFM1 dans le lait cru produit localement. Bien que les conditions (saison, région, alimentation..) soient les mêmes, les résultats de Redouane-salah en 2016 étaient beaucoup moins élevés (0.22% de positif) et aucun échantillon n'a dépassé la limite Européenne (50 ppt) malgré la forte sensibilité de la méthode utilisée (CHLP) avec une limite de détection égale à 5 ppt. Au contraire, l'étude de Aid en 2017 a révélé un taux beaucoup plus élevé soit 50% des échantillons (10/20) étaient positifs et supérieurs à la limite Européenne sans

toutefois dépasser la législation Américaine. Ceci peut être expliqué par la période de l'échantillonnage. En effet, Il a été démontré que l'AFM1 pourrait rapidement apparaître dans le lait (à moins de 12 heures) après ingestion des vaches laitières d'aliments contaminés par l'AFB1 [37,42], Elle atteint un maximum en un ou deux jours [2], puis disparaît progressivement sous la limite de détection dans les 72 heures après le retrait de l'AFB1 des aliments contaminés [98,51].

De plus, nos résultats sont en accord avec plusieurs études récentes qui ont utilisé la même méthode mais avec des kits ayant différentes limites de détection. On cite celle du Kenya 2018 avec 26.4% des prélèvements qui dépassent la limite autorisée par la commission Européenne. Ils ont conclu, parallèlement, que le rendement laitier élevé était étroitement corrélé avec des niveaux élevés de AFM1; cela peut être attribué à la distribution de davantage d'aliments contaminés, principalement concentrés [22] composé d'ingrédients tels que le germe de maïs [74] ce même composé que nos éleveurs Algériens utilisent. Une autre étude a confirmé ce point puisque, chez des vaches produisant 10 à 20 litres de lait par jour, ils ont mis en évidence des taux de transfert très faibles : 0,5 à 0,6%. En revanche, des vaches à forte production de lait (40 litres de lait/jour), ingérant une quantité importante d'aliments contaminés à la limite maximale réglementaire de 5 µg d'AFB1/kg (=5000 ppt), et un ensilage de maïs, lui-même contaminé à la même teneur, avec un taux de transfert de l'AFB1 de 6% dans le lait, il est possible de dépasser les teneurs maximales de 0,05 µg/l (50 ppt) et de 0,025 µg/l (25 ppt) d'AFM1 dans le lait destiné à l'alimentation des adultes et des enfants, respectivement [2].

Le Maroc, l'Afrique du sud, l'Inde et le Nigeria ont trouvé 8.3%, 12%, 44% et 48% d'échantillons contaminés par une quantité d'AFM1 supérieure à 50 ppt respectivement. Bien sûr, il faut prendre en compte plusieurs facteurs en comparant ces résultats qui diffèrent d'un pays à un autre et d'une région à une autre dans le même pays, citons par exemple le climat. Des études antérieures ont signalé des niveaux plus élevés de contamination par AFM1 pendant les saisons froides que les chaudes [53, 88, 107]. La raison en est que pendant les saisons froides, les animaux en lactation sont nourris avec de plus grandes quantités de grains stockés et d'aliments composés qui peuvent être contaminés par des niveaux plus élevés d'AFB1 [42].

Par ailleurs, on a remarqué des variations dans les résultats d'un même pays allant de 35.2% (Iran 2011) et de 15.84% (Egypte 2015) de positifs supérieur à la limite européenne pour atteindre les 0% en 2015 et 2016 respectivement.

Ceci est la conséquence d'une supervision complète et de programmes d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (HACCP) développés dans les pays européens surtout pour gérer les risques associés à la contamination par des champignons toxigènes tout au long de la chaîne d'approvisionnement alimentaire et également légiférant des limites réglementaires strictes pour les aflatoxines dans les aliments pour animaux et le lait [42].

En revanche, le Kenya a révélé un bouleversement négatif puisqu'il est passé de 0% de contamination supérieure aux normes européennes en 2013 pour un taux de 26.4 % en 2018, une fois encore, beaucoup de facteurs entrent en jeu. Globalement, a conclu Gladys Alyango et al., un pourcentage de plus en plus élevé de vaches laitières sont maintenues dans des systèmes d'élevage intensif et sont nourris avec des aliments acquis dans le commerce qui, dans les pays en voie de développement, sont souvent fortement contaminés avec par aflatoxines [123]. Environ 80% du lait total du Kenya, est toujours produit sur de petites fermes [39] En raison de cette forte demande, les petits producteurs laitiers et les agriculteurs nourrissent leurs vaches laitières avec des concentrés provenant souvent de vendeurs non certifiés et sont hautement contaminés par des aflatoxines [125].

L'impact économique de la contamination des aliments par les mycotoxines inclut la réduction de la productivité et des dommages aux organes. Les aliments pour animaux, y compris le foin et la paille, pourraient être contaminés pendant les étapes de la récolte ou le séchage [18].

La Chine et l'Italie en 2017, ont obtenu un nombre assez négligeable de positifs au dessus de la limite autorisée UE (environ 1.11 et 1% respectivement), ces résultats leur permettent de se rapprocher des autres pays n'ayant aucun échantillon, (0%) de contamination dépassant les normes européenne, c'est-à-dire : Qatar et Indonésie en 2018, la Turquie en 2017, Egypte en 2016, l'Iran et le Kenya en 2015 et 2013 respectivement. Cela peut être le signe que les bonnes pratiques de la réduction des AFM1 ont été appliquées sur le terrain, y compris la production d'aliments pour animaux. Ces résultats suggèrent que le lait de ces pays ne soulève pas un problème de santé humaine grâce à son respect des normes de contaminations.

Contrairement à nos résultats, plusieurs pays se trouvent largement au dessus de la limite autorisée des USA, il y a l'Italie avec le taux le plus bas : 23%, puis le Pakistan et le Brésil en arrivant jusqu'au Soudan qui représente le taux le plus élevé avec 83.3%. Les auteurs de cette dernière étude ont rapporté que la contamination par l'AFM1 dans le lait cru des vaches laitières est alarmante et peut poser un grave problème de santé publique. Les parties prenantes doivent être informées par les autorités gouvernementales des conséquences potentielles des aflatoxines sur la santé et leur contrôle.

Bien qu'on ne se soit pas focalisé sur cet aspect dans notre étude mais, les nourrissons et les jeunes enfants sont probablement les plus vulnérables en ce qui concerne les effets négatifs de l'AFM1, et nos résultats indiquent que le lait de vache produit localement peut être une source importante de cette toxine.

Bien que l'allaitement au sein soit encouragé dans plusieurs pays, l'Algérie y compris, de nombreuses mères doivent fournir des alternatives au lait maternel. Plusieurs études ont trouvé des quantités alarmantes dans le lait maternel provenant de mères soudanaises [35], de hauts niveaux d'aflatoxine-albumine associés à un retard de croissance chez les nourrissons Béninois [48] Les mêmes cas ont été observés en Afrique du Nord. En Egypte, El-Sayed et al. [34] ont trouvé l'AFM1 dans 3/15 (20%) des cas dans le lait de vache avec une moyenne de 6300 ppt, et 2/10 (20%) dans le lait maternel avec une moyenne de 2750 ppt des mères allaitantes, dans le même pays, Polychronaki et al. ont observé des bébés égyptiens avec un retard de croissance, ces derniers ont été allaité avec un sein maternel ayant un niveau moyen d'AFM1[94].

Il est vivement recommandé que, dans une telle situation, des efforts soient déployés afin de réduire l'apport en AFM1 à la fois du lait de vache et de l'allaitement.

Un résumé de tous ces résultats se trouve dans le tableau suivant, détaillant le nombre d'échantillon (n) de chaque étude, l'année de sa rédaction, la région, la méthode utilisée dans chacune d'elle ainsi que le pourcentage d'échantillons positifs par rapport aux normes européennes et américaines.

Tableau 8: Incidence de l'AFM1 dans le lait cru des vaches laitières de différents pays

Année	Région	n	Méthode	LOD (ppt)	Positifs (%)	>50 ppt (%)	>500ppt (%)	Référence
2018	Algérie	20	ELISA	89	15	15	0	Cette étude
2018	Qatar	72	ELISA	5	85	0	0	[143]
2018	Pakistan	156	ELISA	5	91.7	80.1	32.7	[83]
2018	Italie	50	ELISA	89	100	66	23	[139]
2018	Indonésie	104	HPLC	1	22.88	0	0	[135]
2018	Kenya	72	ELISA	19	57.5	26.4	0	[47]
2017	Algérie	20	ELISA	89	50	50	0	[4]
2017	Italie	416	ELISA	4	12.3	1	0	[9]
2017	Turquie	26	CHLP	1	61.54	0	0	[120]
2017	Brésil	52	UCHLP	9	53.8	59.6	40.4	[72]
2017	Chine	5650	ELISA	5	4.7	1.11	0	[70]
2016	Algérie	22	HPLC	5	0.22	0	0	[101]
2016	Egypte	90	ELISA	5	95.6	0	0	[12]
2016	Inde	150	ELISA	5	45.3	44	0	[116]
2015	Iran	59	ELISA	1	94.9	0	0	[14]
2015	Egypte	88	ELISA	25	73	15.84	0	[84]
2015	Afrique sud	50	ELISA	25	64	12	0	[84]
2014	Nigeria	100	HPLC	9	75	48	0	[41]
2013	Kenya	264	HPLC	1	58.1	0	0	[117]
2013	Egypte	50	ELISA	5	38	53.19	0	[78]
2012	Maroc	48	HPLC	10	27.1	8.3	0	[13]
2011	Iran	88	TLC	12.5	84.1	35.2	0	[42]
2010	Soudan	44	HPLC	220	95.5	100	83.3	[6]

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

Conclusion

La présente étude a montré que 15% des 20 échantillons de lait cru produit dans quelques fermes Algériennes en 2017 étaient positifs pour l'AFM1 à des taux supérieurs à la limite légale de l'UE. Et malgré qu'aucun des échantillons n'a dépassé la limite autorisée par la législation Américaine, ces quantités présentent un danger potentiel au sein de la population à cause de leur effet cumulatif après une exposition répétée même à faibles doses (intoxication chronique).

La présence de cette mycotoxine peut être considérée comme une préoccupation majeure pour la santé publique. Plusieurs études ont confirmés cela en associant des observations sur les nouveaux nés et les jeunes enfants surtout, comme le retard de croissance par exemple.

Par conséquent, il est nécessaire de surveiller l'AFM1 dans le lait cru et les produits laitiers, ainsi que l'identification des interventions visant à réduire les aflatoxines dans l'alimentation et qui sont réalisables pour les agriculteurs. C'est avant tout important de prévenir la production de toxines dans les aliments pour animaux, que de créer des processus de désintoxication pour réduire leur prévalence.

C'est pourquoi les aliments pour animaux doivent être contrôlés régulièrement sans oublier les conditions de stockage des aliments qui doivent être strictement contrôlées aussi. Une surveillance analytique fréquente par les organismes de contrôle des aliments est hautement recommandée pour contrôler l'incidence de la contamination par les mycotoxines en Algérie, en particulier dans les produits laitiers. La mise en place d'un système de contrôle des aliments, tel que le système HACCP dans les industries alimentaires, suggère un moyen efficace de limiter la contamination par les mycotoxines dans l'approvisionnement alimentaire.

A la lumière de ces résultats on peut conclure que la présence de l'AFM1 dans le lait en Algérie n'est pas dramatique mais d'autres études plus avancées sur la contamination du lait associée à des observations sur les pratiques alimentaires sont fortement recommandées pour comprendre les facteurs impliqués dans la contamination de l'aflatoxine M1, les maîtriser et éviter ainsi l'état d'alarme.

Perspectives

Bien que, les bovins constituent un filtre très efficace contre l'AFM1, en ce qui concerne le lait, puisque son taux de transfert est faible, et que cette voie d'excrétion reste très minoritaire, la présence de toxines fongiques dans le lait représente un risque pour la santé humaine [43].

On peut limiter la présence d'aflatoxines dans les cultures avant la récolte en :

- Limitant la sécheresse et le stress dû aux températures élevées,
- Contrôlant les mauvaises herbes, en réduisant les dommages causés par les insectes,
- Utilisant des techniques de récolte efficaces et en réduisant le nombre de spores d'*Aspergillus* dans le sol par rotation des cultures.
- Le génie génétique peut offrir de nouveaux moyens de limiter la contamination de certaines cultures par les aflatoxines avant la récolte.

Après la récolte, les aflatoxines peuvent être contrôlées dans les cultures sensibles en :

- Contrôlant les facteurs qui affectent la croissance des champignons, par ex. l'activité de l'eau, la température, les atmosphères gazeuses et l'utilisation d'insecticides ou de conservateurs. La considération primordiale pour le stockage des grains et des noix est de maintenir l'activité de l'eau (en contrôlant la teneur en humidité) en dessous de la limite de croissance fongique.
- Les niveaux d'aflatoxine peuvent être réduits dans les produits stockés par des moyens physiques, tels que le tri par couleur, la flottation par densité, le blanchiment et la torréfaction.
- Lorsqu'ils sont approuvés, les processus chimiques permettent de réduire les niveaux d'aflatoxines dans les produits destinés à l'alimentation des animaux. De tels procédés incluent des agents qui lient les aflatoxines, telles que des argiles adsorbantes, et le procédé d'ammoniation qui est principalement utilisée pour éliminer l'aflatoxine des aliments destinés aux vaches laitières [78].

LES REFERENCES

LISTE DES REFERENCES

- [1] **AC NANCY METZ, 2019.** *CHAPITRE II: CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) sur www.ac-nancy-metz.fr*
- [2] **AFSSA, 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).
- [3] **AHMAD ALSHANNAQ AND JAE-HYUK YU, 2017.** Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International journal of environmental research and public health*.
- [4] **AID CYLIA, 2017.** Recherche d'aflatoxine M1 dans le lait cru dans la région de l'ouest de l'Algérie par la méthode ELISA (mémoire de master à l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger) p29.
- [5] **ALSHANNAQ, A., & YU, J. H, 2017.** Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 632.
- [6] **AMIN O. ELZUPIR, ABDELRAHIM M. ELHUSSEIN, 2010.** Determination of aflatoxin M1 in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. *Food Control* 21 (2010) 945–946.
- [7] **ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., TAJNBAHER, D., AND SCHNEK, F.J, 2003.** *J. AOAC.* Int,86 ,412-431.
- [8] **ANFOSSI L., BAGGIANI C., GIOVANNOLI C., GIRAUDI G, 2011.** Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products, *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*, Dr Irineo Torres-Pacheco (Ed.), ISBN : 978-953-307-711-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detectionmeasurement-and-control/occurrence-of-aflatoxin-m1-in-dairy-products>.
- [9] **ANTONELLA DE ROMA, CARMELA ROSSINI, ALBERTO RITIENI, PASQUALE GALLO, MAURO ESPOSITO, 2017.** A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy, *Food Control*.
- [10] **APPLEBAUM, R.S.; BRACHETT, R.E.; WISEMAN, D.W.; MARTH, E.H. AFLATOXIN, 1982.** Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products: A review. *J. Food Protection* 1982, 45, 752.
- [11] **AYCICEK H, AKSOY A, SAYGI S , 2005.** Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Cont*, 16 (3): 263-266, 2005.
- [12] **AZZA M. DEEB ; IBRAHIM M. AMAN* AND AND IBRAHIM EL-HAWARY, 2016.** Determination of Aflatoxin M1 and B1 in Egyptian Raw Milk, Soft Cheese and Table Eggs using ELISA Technique. (*IJRSE*) *International Journal of Innovative Research in Science & Engineering* ISSN (Online) 2347-3207
- [13] **B. EL MARNISSI, RAJAE BELKHOUB, DIEGO P. MORGAVI, LAILA BENNANI, HAMID BOUDRA, 2012.** Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 2819–2821

- [14] **BARIKBIN, BEHNAM & ALLAHRESANI, ALI & KHOSRAVI, RASOUL & KHODADADI, MARYAM, 2015.** Detection of Aflatoxin M1 in Dairy Products Marketed in Iran. *Health Scope*. 4. 10.17795/jhealthscope-18925.
- [15] **BART HUYBRECHTS, 2014.** *dépistage des mycotoxines. Centre d'Etudes et de Recherches vétérinaires et agrochimiques (CODA-CERVA) Direction opérationnelle Sécurité chimique de la chaîne alimentaire, Service Toxines et Substances naturelles Laboratoire national de référence pour les Mycotoxines Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, Belgique.*
- [16] **BBOSA, G.S.; KITYA, D.; LUBEGA, A.; OGWAL-OKENG, J.; ANOKBONGGO, W.W.; KYEGOMBE, D.B, 2013.** Review of the biological and health effects of aflatoxins on bodyorgans and body systems. In *Aflatoxins—Recent Advances and Future Prospects*; Razzaghi-Abyaneh, M., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2013; pp. 239–265, ISBN 978-953-51-0904-4.
- [17] **BENNETT, J.W.; KLICH, M, 2013.** Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16, 497–516.
- [18] **BHAT R, RAI RV, KARIM AA, 2010.** Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(1):57–81.
- [19] **BLANCO JL, DOMINGUEZ L, GOMEZ-LUCIA E, GARAYZABAL JFF, GARCIA JA, SUAREZ, G, 1988.** Presence of aflatoxin M1 in commercial ultra-high-temperature-treated milk. *Appl Environ Microb,* 54, 1622-1623, 1988.
- [20] **BOEVRE, M.; MAVUNGU, J.D.; LANDSHCHOOT, S.; AUDENAERT, K.; EECKHOUT, M.; MAENE, P, 2012.** Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin J.* 2012, 5, 207–219.
- [21] **BOTTON. B ET AL, 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importances industrielles. 2e édition, collection biotechnologique. Masson. Page 438-441.
- [22] **BRITZI M, FRIEDMAN S, MIRON J, ET AL, 2013.** Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid-and late-lactation. *Toxins (Basel).* 2013;5(1):173–183.
- [23] **CAPRIOTTI, A.L., G. CARUSO, C. CAVALIERE, P. FOGLIA, R. SAMPERI, A. LAGANA, 2012.** Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews,* 31 (2012) 466-503.
- [24] **CAPUTO, D., G. DE CESARE, A. NASCETTI, R. SCIPINOTTI, F. PAVANELLO, R. ARRIGONI, 2008.** DEMOCHEM with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam. Part A* 2008, 25, 472–489.
- [25] **CATHEY, C.G.; HUANG, G.; SARR, A.B.; CLEMENT, B.A.; PHILLIPS, T.D, 1994.** Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin MI in milk. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 1223-1231.
- [26] **CIRLINI, M., C. DALL'ASTA, G. GALAVERNA, 2012.** Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins. *Journal of Chromatography A,* 1255 (2012) 145-152.
- [27] **CLAUDE MOREAU, 1976.** Les mycotoxines dans les produits laitiers. Le Lait, INRA Editions, 1976, 56 (555_556), pp.286-303.

- [28] **CLEGG, F. G. AND BRYSON.H, 1962.** - An outbreak of poisoning in store cattle attributed to Brazilian groundnut meal. *Veto Rec.*, t. LXXIV, 992-994.
- [29] **CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2001.** Comment submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. In Codex committee on food additives and contaminants 33rd session. Hauge, The Netherlands Galvano F, Galofaro V, Galvona G (1996) Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *J Food Prot* 59:1079–1090
- [30] **COKER RD, NAGLER MJ, BLUNDEN G, SHARKEY AJ, DEFIZE PR, DERKSEN GB, AND WHITAKER TB, 1995.** Design of sampling plans for mycotoxins in food and feeds. *Natural Toxins*, 3, 257-262.
- [31] **COTTY P-J., CARDWELL K-F, 1999.** Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and environmental microbiology*, 65 (5) : 2264–6.
- [32] **CREPPY, E.E, 2002.** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 2002, 127, 19-28.
- [33] **EATON, D.L.; GALLAGHER, E.P, 1994.** Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994, 34, 135–172.
- [34] **EL-SAYED, A.A., NEAMAT-ALLAH, A.A. AND SOHER-EALY, 2000.** Situation of mycotoxins in milk, dairy products and human milk in Egypt. *Mycotox. Res.*, 16: 91–100.
- [35] **ELZUPIR AO, ABAS A, FADUL MH, MODWI AK, ALI NMI ET AL, 2012.** Aflatoxin M1 in breast milk of nursing Sudanese mothers. *Mycotoxin Res* 28:131–134
- [36] **EPHYTIA, 2016.** *Vég-Di@g - Test ELISA sur ephytia.INRA.fr.*
- [37] **ERTAS N., GONULALAN Z., YILDIRIM Y., KARADAL F, 2011.** A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control.*, 22 : 1956-1959.
- [38] **ESKOLA M, 2002.** Study on trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in finnish cereals: Occurrence and analytical techniques. Academic dissertation, EELA Publications, Helsinki. Gallagher, E.P.; Kunze, K.L.; Stapleton, P.L.; Eaton, D.L. The Kinetics of Aflatoxin B1 Oxidation by Human cDNA-Expressed and Human Liver Microsomal Cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, 141, 595–606.
- [39] **ETTEMA F, 2013.** Dairy development in Kenya. In: Kenya dairy sector. 2013. p. 1–5.
- [40] **ÉVALUATION DES RISQUES LIES A LA PRESENCE DE MYCOTOXINES DANS LES CHAINES ALIMENTAIRES HUMAINE ET ANIMALE.** Rapport synthétique. <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>.
- [41] **F. OLUWAFEMI & A. O. BADMOS & S. O. KAREEM & O. ADEMUYIWA & A. L. KOLAPO, 2014.** Survey of aflatoxin M1 in cows' milk from free-grazing cows in Abeokuta, Nigeria. *Mycotoxin Res* (2014) 3.0:207–211.
- [42] **FALLAH A-A, 2010.** Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control.*, 21 : 1478-1481.

- [43] **FANGEAT L, 2008.** Les mycotoxines chez les bovins. Thèse Présentée à l'Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie), pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire.
- [44] **FISCHLER, F, 1998.** *Directive 98/53/CE de la commission européenne.* COMMISSION EUROPEENNE, 1998.
- [45] **GALVANO, F., GALOFARO, V. AND GALVANO, G, 1996.** Occurrence and Stability of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products: A World Wide Review. *J. Food Prot.*, 59(10): 1079- 1090.
- [46] **GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; SANTINOLI, C.; CONTI, S.; POLONELLI, L, 2015.** AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins* 2015, 7, 4330–4349.
- [47] **GLADYS ANYANGO, FLORENCE MUTUA, IRENE KAGERA, PAULINE ANDANG`O, DELIA GRACE & JOHANNA F. LINDAHL, 2018.** A survey of aflatoxin M1 contamination in raw milk produced in urban and peri-urban areas of Kisumu County, Kenya, *Infection Ecology & Epidemiology*, 8:1,1547094
- [48] **GONG Y, HOUNSA A, EGAL S, TURNER PC, HALL AJ, CARDWELL K, WILD CP ,2004.** Post-weaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environ Health Perspect* 112:1334–1338
- [49] **GUEZLANE-TEBIBEL NADJET, BOURAS NOUREDDINE, OULD EL HADJ MOHAMED DIDI, 2016.** LES MYCOTOXINES: UN DANGER DE SANTÉ PUBLIC. *Laboratoire de Microbiologie. Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar, Alger, Algérie.*
- [50] **GUMUSTAS, M., S. KURBANOGLU, B. USLU, S. OZKAN, 2013.** UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 76 (2013)1365-1427.
- [51] **GÜRBAY A., AYDIN S., GIRGIN G., ENGIN A-B., ŞAHIN G, 2006.** Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*. 17 : 1-4.
- [52] **HONMA, Y.; NAITO, S.; EARNSHAW, A.; NAGASHIMA, H.; GOTO, T, 2004.** Progress in the accuracy of mycotoxin analysis in the last quarter century. *Mycotoxins* 2004, 54, 33–38.
- [53] **HUSSAIN I, ANWAR J, 2008.** A study on contamination of aflatoxin M1 in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control* 19:393–395
- [54] **IHA, M.H., C.B. BARBOSA, A.R. HECK, M.W. TRUCKSESS, 2014.** Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in Ribeirao Preto-SP, Brazil. *Food Control*, 40 (2014) 310-313.
- [55] **IHA, M.H., C.B. BARBOSA, I.A. OKADA, M.W. TRUCKSESS, 2011.** Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food Control*, 22 (2011) 1971-1974.
- [56] **INFOBIT.CO, 2019.** *Conidiophores 31256 / INFOBIT.* [online] Available at: <http://www.infobit.co/conidiophores.html>
- [57] **INTERCÉRÉALES, 2014.** Guide interprofessionnel de gestion des mycotoxines dans la filière céréalière - Edition 2014.

- [58] **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993.** *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk for Humans*; IARC: Lyon, France, 1993.
- [59] **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993.** *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human. Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Constituent Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*; IARC: Lyon, France, 1993.
- [60] **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002.** *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphtalene and Styrene*; IARC: Lyon, France, 2002.
- [61] **JARD, G.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F.; GUYONVARC'H, A.; LEBRIHI, A, 2011.** Review of mycotoxin reduction in food and feed: From prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. Part A* 2011, 28, 1590–1609.
- [62] **JEBALI, R.; ABBES, S.; SALAH-ABBES, J.B.; BEN YOUNES, R.; HAOUS, Z.; OUESLATI, R, 2014.** Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B1 and M1) immunotoxicities in mice. *J. Immunotoxicol.* 2014, 12, 290–299.
- [63] **KANIOU-GRIGORIADOU, I., ELEFThERiADOU, A., MOURATIDOU, A. AND KATIKOU, P, 2005.** Determination of Aflatoxin M1 in Ewe's Milk Samples and the Produced Curd and Feta Cheese. *Food Cont.*, 16: 257-261.
- [64] **KLARIC, M., Z. CVETNIC, S. PEPELJNJAK, I. KOSALEC, 2009.** *Co-occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, Fumonisin, and Zearalenone in Cereals and Feed, Determined by Competitive Direct Enzyme- Linked Immunosorbent Assay and Thin-Layer Chromatography*, in *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. p. 427.2009
- [65] **KONG, W.J.; ZHANG, X.F.; SHEN, H.H.; OU-YANG, Z.; YANG, M.H, 2012.** Validation of a gas chromatography-electron capture detection of T-2 and HT-2 toxins in Chinese herbal medicines and related products after immunoaffinity column clean-up and pre-column derivatization. *Food Chem.* 2012, 132, 574–581.
- [66] **KRSKA, R, 1998.** Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *J. Chromatogr. A* 1998, 815, 49–57.
- [67] **KRSKA, R.; BAUMGARTNER, S.; JOSEPHS, R, 2001.** The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresen. J. Anal. Chem.* 2001, 371, 285–299.
- [68] **LEI ZHANG, XIAO-WEN DOU, CHENG ZHANG, ANTONIO F. LOGRIECO, AND MEI-HUA YANG, 2018.** A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China.
- [69] **LI, P.; ZHANG, Z.; HU, X.; ZHANG, Q, 2013.** Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: Current status and prospects. *Mass Spectrom. Rev.* 2013, 32, 420–452.
- [70] **LI, S., MIN, L., WANG, P., ZHANG, Y., ZHENG, N. AND WANG, J.LI, S., MIN, L., WANG, P., ZHANG, Y., ZHENG, N. AND WANG, J, 2017.** Aflatoxin M1 contamination in raw milk from major milk-producing areas of China during four seasons of 2016. *Food Control*, 82,

- [71] **LIU, Y.; WANG, W, 2016.** Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Anim. Sci. J.* 2016, 87, 1490–1500.
- [72] **LUANA GONÇALVES, ANDREIA DALLA ROSA, SAMANTHA LEMKE GONZALES, MARIA MANUELA CAMINO FELTES, ELIANA BADIALE-FURLONG, GINIANI CARLA DORS, 2017.** Incidence of aflatoxin M₁ in fresh milk from small farms. *Food Science and Technology*. ISSN 0101-2061.
- [73] **LYATIM, S, 2007.** Etablir le profil mycologique des moisissures isolées au Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale à l'Hôpital d'Enfants de Rabat. 2007.
- [74] **MAKAU CM, MATOFARI JW, MULIRO PS, ET AL, 2016.** Aflatoxin B1 and deoxynivalenol contamination of dairy feeds and presence of aflatoxin M1 contamination in milk from smallholder dairy systems in Nakuru, Kenya. *IntJ Food Contam.* 2016;3(1):6.
- [75] **MARAGOS, C.M.; BUSMAN, M, 2010.** Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: A review. *Food Addit. Contam. Part A* 2010, 27, 688–700.
- [76] **MARC SAVARD, AND GUY DURIVAGE, 2018.** L'analyse des mycotoxines, plus facile à demander qu'à faire. *Centre de recherches de l'Est sur les céréales et les oléagineux, AAC, Ottawa*
- [77] **MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V, 2013.** Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 60, 218–237.
- [78] **MAROUF, H.A., ABDALLAH, M.I.M AND BAZALOU, M.S, 2013.** detection of aflatoxin m1 concentration in full-fat cow's ultra heat treated temperature milk sold in damietta markets with reference to its public health importance. *food inspection lab., damietta sea' port, j. egypt. vet. med. assoc.,* 12 no 1, 81 – 105 (2013)
- [79] **MD.QUADRI, S.H.; NIRANJAN, M.S.; CHALUVARAJU, K.C.; SHANTARAM, U.; ENAMUL, H.S, 2013.** An overview on chemistry, toxicity, analysis and control of aflatoxins. *Int. J. Chem. Life Sci.* 2013, 2, 1071–1078.
- [80] **MENEELY, J.P.; RICCI, F.; VAN EGMOND, H.P.; ELLIOTT, C.T, 2011.** Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 2011, 30, 192–203.
- [81] **MONDOLY, P. AND PONCELET, J, 2005.** les mycotoxicoses. Société nationale des groupements techniques vétérinaires.
- [82] **MUHAMMAD ASIF ASGHAR, AFTAB AHMED & MUHAMMAD ARIF ASGHAR, 2018.** Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan, *Food Additives & Contaminants: Part B*
- [83] **MWANZA, M., ABDEL-HADI, A., ALI, A. M. AND EGBUTA, M.MWANZA, M., ABDEL-HADI, A., ALI, A. AND EGBUTA, M, 2015.** Evaluation of analytical assays efficiency to detect aflatoxin M1 in milk from selected areas in Egypt and South Africa. *Journal of Dairy Science,* [online] 98(10), pp.6660-6667

- [84] **MYCOTOXINES : GUIDE D'UTILISATION DES KITS BANDELETTES, 2012.** Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales version 1. Pp 10-13.
- [85] **NASIR, M.S.; JOLLEY, M.E, 2002.** Development of a fluorescence polarization assay for the determination of aflatoxins in grains. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3116–3121.
- [86] **NEAL, G.E.; EATON, D.L.; JUDAH, D.J.; VERMA, A, 1998.** Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, 151, 152–158.
- [87] **NEMATI,M.,MEHRAN,M.A.,HAMED,P. K.,&MASOUD, A, 2010.** A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control*, 21, 1022e1024
- [88] **NUNEZ, O., H. GALLART-AYALA, C.P.B. MARTINS, P. LUCCI, 2012.** New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1228 (2012) 298-323.
- [89] **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE, 2018.** Les aflatoxines. Département Sécurité sanitaire des aliments et zoonoses. Publication de l'OMS, geneve. pp 5
- [90] **PARK, D.L.; PRICE, W.D, 2001.** Reduction of aflatoxin hazards using ammoniation. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2001, 171, 139–175.
- [91] **PEREIRA, V.L.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C, 2014.** Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 2014, 36, 96–136.
- [92] **PIERRE GALTIER, NICOLAS LOISEAU, ISABELLE PAULE OSWALD ET OLIVIER PUEL, 2006.** Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Toxicology of mycotoxins, hazards and risks in human and animal food (2006)*
- [93] **POLYCHRONAKI N, TURNER PC, MYKKANEN H, GONG Y, AMRA H, ABDEL-WAHHAB M, EL-NEZAMI H, 2006.** Determinants of aflatoxin M1 in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. *Food Addit Contam* 23(7):700–708
- [94] **PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G, 2009.** On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 984–991.
- [95] **RADOI, A.; TARGA, M.; PRIETO-SIMON, B.; MARTY, J.L, 2008.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection. *Talanta* 2008, 77, 138-143.
- [96] **RADOVA, Z.; HOLADOVA, K.; HAJLSLOVA, J, 1998.** Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J. Chromatogr. A* 1998, 829, 259–267.
- [97] **RAHIMI E., KARIM G. 2008.** Determination of aflatoxin M1 in raw milk producing in dairy farms in Chahar-Mahal-Bakhtiari province using ELISA. *The Journal of Food Science and Technology.*, 5 : 51–59.
- [98] **RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F, 2009.** Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2009, 8, 202–251.

- [99] **RAZZAGH MAHMOUDI & REZA NORIAN, 2015.** Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran, *Food and Agricultural Immunology*, 26:1, 131-137
- [100] **REDOUANE-SALAH SARA, 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 doctorat, université Badji Mokhtar, Annaba).p14-37.
- [101] **RÈGLEMENT (CE) No 401/2006 DE LA COMMISSION** du 23 février 2006 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires.
- [102] **RICHARD J-L., PAYNE G-A., DESJARDINS A-E., NORRED W-P., PESTKA J-J., PHILLIPS T-D., VAN EGMOND H-P., VARDON P-J., WHITAKER T-B., WOOD G, 2003.** Mycotoxins : Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Edition : Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Task Force Report No. 139. January 2003.
- [103] **RIDGWAY, K, 2012.** Scientific, R. Sample preparation for food contaminant analysis. *LC GC Eur.* 2012, 25, 1-8.
- [104] **ROMERLABS AGRAQUANT® Aflatoxin M1 Plus 100/2000** Order No.:COKAQ7200/COKAQ7248
- [105] **ROMERLABS, 2016.** Quick sampling guid. pp 1.
- [106] **RUANGWISES, N., & RUANGWISES, S, 2010.** Aflatoxin M1 contamination in raw milk within the central region of Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85, 195e198.
- [107] **RUSTOM, I.Y.S, 1997.** Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 1997, 59, 57-67.
- [108] **SAJAD PIRSA, NAADER ALIZADEH, MOHSEN ZANDI, HADI ALMASI, 2016.** Determination of Dimethylsulfoxide in Water by Capillary Gas Chromatography-Gas Sensor Based on Nanostructure Conducting Polypyrrole. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*. Volume 6 , Issue 2 , 2016.
- [109] **SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A.; ALLCROFT, R, 1961.** The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Vet. Rec.* 1961, 73, 1219-1222.
- [110] **SCHATZKI TF, 1995.** Distribution of aflatoxin in pistachios. *J Agric Food Chem*, 1566-1569.
- [111] **SCHOENDAL R., WHITE, A.F, 1965.** Aflatoxin and albinism in plants. *Nature (London)*. 205: 57-58.
- [112] **SCUDAMORE, K.A, 2008.** Bioactive Compounds in Foods; Gilbert, J., Enyuva, H.Z., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2008; pp. 134-172.
- [113] **SHEPHARD, G.S, 2008.** Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 2468-2477.
- [114] **SHEPHARD, G.S, 2016.** Current Status of Mycotoxin Analysis: A Critical Review. *J. AOAC Int.* 2016, 99, 842-848.

- [115] **SHIVRAJ HARIRAM NILE, SE WON PARK & C. N. KHOBRADE, 2016.** Occurrence and analysis of aflatoxin M1 in milk produced by Indian dairy species, *Food and Agricultural Immunology*, 27:3, 358-366
- [116] **SIRMA A-J, 2013.** Sources and levels of human exposure to aflatoxins in nandi county, KENYA. Thèse présentée à l'Université de Nairobi en exécution partielle des exigences pour maîtrise en santé publique vétérinaire. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Nairobi.
- [117] **SPANJER, M.C.; RENSEN, P.M.; SCHOLTEN, J.M, 2008.** LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam. Part A* 2008, 25, 472–489.
- [118] **STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M, 1974.** Aflatoxine M1: Analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. *J. Assoc. Anal. Chem.* 1974, 57, 847-851.
- [119] **SUZAN ÖZTÜRK YILMAZ, ALEV ALTINCI, 2017.** Incidence of aflatoxin M1 contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. *Food Science and Technology* ISSN 1678-457X
- [120] **TAP J., ROYER G, 2003.** Les mycotoxines. Institut Universitaire Professionnalisé, paris, 1-5p.
- [121] **TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S, 2009.** Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* 2009, 632, 168–180.
- [122] **UNNEVEHR L, GRACE D, 2013.** Aflatoxins: finding solutions for improved food safety. *Intl Food Policy Res Inst.* 2013;20.
- [123] **UNUSAN N, 2006.** Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food Chem Toxicol*, 44, 1897-1900, 2006.
- [124] **UPADHAYA SD, PARK M, HA J-K, 2010.** Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2010;23(9):1250–1260.
- [125] **VAN EGMOND, H.P, 1998.** *Introduction to Mycotoxins in Dairy Products*; Applied Science Publishers: London, UK, 1989; pp. 11-55
- [126] **VERMA, R.J, 2004.** Aflatoxin Cause DNA Damage. *Int. J. Hum. Genet.* 2004, 4, 231–236.
- [127] **VIRTUAL LABS, 2018.** Thin Layer Chromatography. Faculty of biological sciences website.
- [128] **WALIYAS, F.; REDDY, S.V, 2009.** *Aspergillus Flavus Seed Infection and Aflatoxin Estimation by ELISA and Aflatoxin Management Option in Ground Nut*; ICRISAP International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: Andhra Pradesh, India, 2009; pp. 502-524.
- [129] **WANG, H., X.-J. ZHOU, Y.-Q. LIU, H.-M. YANG, Q.-L. GUO, 2011.** Simultaneous Determination of Chloramphenicol and Aflatoxin M1 Residues in Milk by Triple Quadrupole Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 3532-3538

- [130] **WHITAKER TB, 2003.** Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. Food Control, 14, 233-237.
- [131] **WHITAKER TB, DOWELL FE, HAGLER WM, GIESBRECHT FG, AND WU J, 1994.** Variability associated with sampling, sample preparation and chemical testing of farmers' stock peanuts. J Assoc Off Anal Chem Intl, 77, 107-116.
- [132] **WHITAKER, T.B, 2005.** Johansson, A.S. Sampling uncertainties for the detection of chemical agents in complex food matrices. J. Food Prot. 2005, 68, 1306-1313.
- [133] **WHITAKER, T.B, 2006.** Sampling foods for mycotoxins. Food Addit. Contam. 2006, 23, 50-61.
- [134] **WIDIASTUTI R, ANASTASIA Y, 2018.** Residu aflatoksin M1 pada susu sapi segar dari peternakan sapi rakyat di Indonesia. JITV 23(3): 143-149. 2018.
- [135] **WILD, C.P.; TURNER, P.C, 2002.** The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis 2002, 17, 471-481.
- [136] **WOGAN, G.W.; PAGLIALUNGA, S, 1974.** Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M1 in rats. Food Cosmet. Toxicol. 1974, 12, 381-384.
- [137] **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2007.** WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines With Reference to Contaminants and Residues; WHO: Geneva, Switzerland, 2007.
- [138] **YELKO RODRIGUEZ-CARRASCO, LUANA IZZO, ANNA GASPARI, GIULIA GRAZIANI, JORDI MAÑES AND ALBERTO RITIENI, 2018.** Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in Milk Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131 Naples, Italy.
- [139] **YIANNIKOURIS A., JOUANY J. P, 2002.** Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review, Anim. Res., INRA, EDP Sciences, 51: 81-99.
- [140] **YOUSEF AE, MARTH EH, 1989.** Stability and degradation of aflatoxin M1. In: Van Egmond HP, editor. Mycotoxins in dairy products. London: Elsevier Applied Science. p 127-161.
- [141] **YUE, Y.-T.; ZHANG, X.-F.; PAN, J.; OU-YANG, Z.; WU, J.; YANG, M.-H, 2010.** Determination of deoxynivalenol in medicinal herbs and related products by GC-ECD and confirmation by GC-MS. Chromatographia 2010, 71, 533-538.
- [142] **ZAHOOR UL HASSAN, RODA AL THANI, FATHY A. ATIA, SAEED AL MEER, VIRGILIO BALMAS, QUIRICO MIGHELI, SAMIR JAOUA, 2018.** Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar, Food Control (2018)
- [143] **ZHOU, J.; XU, J.J.; CONG, J.M.; CAI, Z.X.; ZHANG, J.S.; WANG, J.L.; REN, Y.P, 2018.** Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk. J. Chromatogr. A 2018, 1532, 20-29.

Résumé :

Les mycotoxines représentent une menace pour la santé humaine et animale, certaines d'entre elles se retrouvent 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, un total de 20 échantillons de lait cru de vache provenant des régions de Constantine et de Mascara 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 15% des échantillons étaient contaminés et ceci à des concentrations assez élevées dépassant les teneurs autorisées par la réglementation Européenne et qui sont de 50 ppt.

Mots clés : Aflatoxine M1, Lait, ELISA, Cancérigène, Concentration.

Abstract :

Mycotoxins pose a threat to human and animal health, some of which are found 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 Constantine and Mascara regions were analyzed by ELISA to assess presence and concentrations. The results revealed that 15% of the samples were contaminated and this at high concentrations exceeding the levels authorized by the European regulation and which are 50 ppt.

Keywords : Aflatoxin M1, Milk, ELISA, Carcinogen, Concentration.

ملخص:

تشكل السموم الفطرية تهديداً لصحة الإنسان والحيوان، حيث يوجد البعض منها في منتجات الحليب ولذلك يجب البحث عنها. يتم هضم جزء و استقلابها لكي تفرز في الحليب على شكل B1 من الأفلاتوكسين ، الذي يعتبر من بين السموم المسرطنة للكبد ، و M1 أفلاتوكسين يشكل أيضا مشكلا في الصحة العامة. من أجل تقييم تلوث الحليب ، تم معسكر وتحليل 20 عينة من حليب البقر الخام من مناطق قسنطينة % من العينات ملوثة 15 بواسطة طريقة اليسا أوضحت النتائج أن تتجاوز المستويات المصرح بها من M1 بتركيزات عالية من الافلاتوكسين قبل التنظيم الأوروبي والتي تكون 50 جزئية في المليار. كلمات الرئيسية : الأفلاتوكسين M1 ، الحليب ، اليسا ، مسرطنة ، التركيز.