

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Mémoire

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

Recherche de l'aflatoxine B1 dans l'aliment
complet de bétail et de volaille
Par la technique d'ELISA

Présenté par : BADIS Amina

Soutenu le : 28/02/2019

Devant le jury composé de:

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

Année universitaire : 2018/2019

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.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers **parents** à qui je dois toutes mes

études, que Dieu me les garde.

A mon grand-père **ABDESSELEM** que Dieu

l'accueille dans Son Vaste Paradis, et à **ma grande**

mère à qui je souhaite une longue vie.

A mes frères et mes sœurs.

A tous mes proches, oncles et tantes et leurs familles

A mes amis, je cite en particulier **AIDA** et **MARWA**

Ainsi qu'à tous mes **enseignants** du primaire à l'université.

Table de matières

Remerciements

Dédicaces

Listes des figures et des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie bibliographique

I. Chapitre 1 : Généralités sur les mycotoxines :.....2

I.1. Définition :.....2

I.2. Origine des mycotoxines :.....2

I.3. Classification:.....3

I.3.a. Moisissures productrices de mycotoxines :.....3

I.3.b. Mycotoxines :.....3

I.4. Toxicité :.....4

I.5. Pathogénie et mode d'expression :.....4

I.5.1. Ingestion :.....4

I.5.2. Inhalation /contact.....4

I.6. La biosynthèse des mycotoxines :.....4

I.6.1. La synthèse directe par les moisissures :.....4

I.6.2. Synthèse anormalement élevée de toxines végétales en réponse à l'agression fongique :.....5

I.6.3. Synthèse indirecte par utilisation de composés végétaux :.....5

I.7. Conséquences de la présence des mycotoxines dans les fourrages :.....5

I.8. Contrôle de la contamination pendant et après la récolte :.....5

I.9. Contrôle physique de la contamination :.....6

II. Chapitre 2 : Les aflatoxines.....7

II.1. Définition.....7

II.2. Propriétés physiques et chimiques :.....7

II.3. Structure des aflatoxines.....8

II.4.1. Les moisissures productrices.....8

❖ Caractéristiques du genre *Aspergillus* :.....9

❖ Source de danger :.....9

II.4.2. Voies de biosynthèse.....	10
II.5. Toxinogénèse.....	10
II.6. Facteurs de la toxinogénèse.....	10
• Facteurs physiques.....	11
• Facteurs chimiques.....	11
II.7. Risque pour les animaux d'élevage.....	12
II.7.1. Exposition des animaux aux aflatoxines B1 et M1.....	12
❖ Les ruminants.....	12
❖ Les volailles.....	12
II.7.2. Détection d'aflatoxicose chez un animal.....	13
II.8. Lutte contre les aflatoxines avant et après les récoltes.....	13
III. chapitre 3 : Techniques d'analyse pour la détermination des aflatoxines.....	15
III.1. Introduction.....	15
III.2. Echantillonnage.....	15
III.3. Techniques d'analyse.....	15
III.3.1. Préparation d'échantillons et pré-concentrations.....	15
II.3.2. Techniques d'extraction des mycotoxines.....	16
II.3.2.a. Extraction liquide- liquide.....	16
➤ Principe physico-chimique.....	17
➤ Protocole de l'extraction liquide-liquide.....	17
II.3.2.b. Extraction par fluide supercritique (SFE).....	17
➤ Principe physico-chimique.....	18
II.3.2.c. Extraction en phase solide.....	18
III.3.3. Techniques de séparation et de quantification des mycotoxines.....	19
III.3.3.1. Méthodes quantitatives.....	19
III.3.3.1.a. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....	20
III.3.3.1.b. Chromatographie en phase gazeuse (GC).....	21
III.3.3.1.c. Électrophorèse Capillaire (CE).....	21
III.3.3.2. Méthodes rapides.....	22
III.3.3.3.a. Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	22
III.3.3.3.b. Méthodes immunochimiques.....	23
❖ Les « bandelettes » immunochimiques (Lateral Flow Devices [LFD]).....	23
❖ Le test enzyme-linked immuno filtration assay (ELIFA).....	24
❖ Fluorescence Polarisation Immuno Assay [FPIA]	24

❖ Tests compétitifs basés sur la SPR (Surface Plasmon Resonance [SPR])	24
❖ ELISA basée sur les électrodes de (Screen Printed Carbon Electrodes) (SPCE).....	24
❖ Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAA).....	24
❖ ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	25

Partie expérimentale

I. Chapitre 1 : Matériel et méthodes.....	26
I.1. objectif.....	26
I.2. Matériel.....	26
✓ de broyage.....	26
✓ d'extraction.....	26
✓ d'analyse.....	26
I.3. Méthodes.....	27
II. Chapitre 2 : Résultats et discussion.....	32
II.1. Résultats.....	32
II.2. Discussion.....	33
Conclusion.....	37

❖ Liste des figures

Figure 1: Structures des aflatoxines majeures (PUBCHEM .Open chimistiry data base).....	8
Figure 2: Le genre <i>Aspergillus flavus</i> sous microscopie électronique (mycology.adelaide.edu.au).....	9
Figure 4: Protocole de l'extraction liquide-liquide (METAPHISIK).....	17
Figure 3: Principe physico chimique de l'extraction liquide-liquide (HAGOP ;2007).....	17
Figure 5 : Schéma montrant le principe de l'extraction par un fluide supercritique.....	18
Figure 6: Les quatre étapes constituant une extraction en phase solide (HUMBERT, 2010).19	19
Figure 7: Configuration typique d'un système HPLC.....	20
Figure 8: Principe de l'électrophorèse capillaire.....	21
Figure 9 : Principe de la chromatographie sur couche mince.....	22
Figure 10 : Principe de fonctionnement d'une bandelette immunochimique (ABINGDON HEALTH,2017).....	23
Figure 11: Kit ELISA utilisé de ROMER Labs.....	26
Figure 12 : Répartition des mycotoxines dans les endroits de stockage.....	27
Figure 13: Technique d'extraction suivie.....	28
Figure 14 : Principe de fonctionnement de kit ELISA.....	29
Figure 15 : Couleur de la plaque vire vers le bleu (photo personnelle).....	30
Figure 16 : Couleur de la plaque vire vers le jaune (photo personnelle).....	30
Figure 17: Etapes de l'analyse suivies.....	31
Figure 18 : Courbe de calibration des standards.....	32
Figure 19 : Hydroxylation de l'aflatoxine B1 en aflatoxine M1 dans le foie.....	34

❖ Liste des tableaux

Tableau 1: Moisissures productrices des mycotoxines (ANSES,2006).....	2
Tableau 2: Autres propriétés physico-chimiques des aflatoxines (BATHILLY,1998).....	7
Tableau 3 : Absorbances des standards.....	32
Tableau 4 : Absorbances et teneurs en aflatoxine B1 des échantillons analysés.....	33
Tableau 5 : Présence naturelle d'aflatoxine B1 dans des échantillons d'aliments destinés aux bétails et aux volailles évaluées par ELISA.....	33

❖ Liste des abréviations

- **AFB1** : Aflatoxine B1
- **AFM1** : Aflatoxine M1
- **AOAC** : Association of Official Agricultural Chemists
- **Br** : Bromure
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- **CE** : Electrophorèse Capillaire
- **DAD** : Détecteur à Barrette D'iode
- **Ech** : Echantillon
- **ELAA** : Enzyme Linked Aptamer Assays
- **ELIFA** : Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay
- **ELL** : Extraction Liquide-Liquide
- **FD** : Détecteur à Fluorescence
- **FPIA** : Fluorescence Polarisation Immunoassay
- **GC** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- **HPLC** : Hight Performance Liquid Chromatography
- **I** : Iode
- **LFD** : Latéral Flow Devices
- **LMR** : Limite maximale des résidus
- **OPA** : OrthoPhatAldéhyde
- **Ppb** : Partie par billion
- **SFF** : Extraction par fluide supercritique
- **SPCE** : Screen Printed Carbone Electrode
- **TFA** : Acide trifluoroacétique
- **TLC** : Thin Layer Chromatography
- **UV** : Ultra Violet

Introduction

Introduction

Introduction

Les problèmes de sécurité alimentaire sont essentiellement associés à la présence potentielle de contaminants issus des activités humaines, tels que les pesticides, par exemple. Une attention bien moindre est prêtée aux contaminants d'origine naturelle (les mycotoxines) **(BOUCON ; 2016)**.

La contamination des aliments par des mycotoxines est de plus en plus préoccupante. Elle évolue conjointement aux changements des pratiques agricoles et probablement aux changements climatiques. Ces derniers semblent être responsables de l'augmentation de la prévalence de la contamination par les mycotoxines des aliments du bétail. La contamination des aliments par des mycotoxines engendre des pertes économiques importantes dans l'élevage, ainsi que des barrières commerciales indésirables pour les matières premières et produits consommables **(GUEZLANE N et al. ;2016)**.

Les intoxications alimentaires par les mycotoxines demeurent encore mal connues par les praticiens vétérinaires et sont souvent sous-estimées dans les diagnostics différentiels.

Les techniques analytiques pour détecter et quantifier les champignons et leurs mycotoxines sont en constante évolution pour suivre, voire anticiper les nouveaux seuils réglementaires **(FAO,1979)**.

La détermination de la concentration en aflatoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux est donc très importante. Cependant, en raison de leur faible concentration dans ces deux derniers, les méthodes analytiques de détection et de quantification des aflatoxines doivent être spécifiques, sensibles et simples à mettre en œuvre. Plusieurs méthodes ont été décrites pour détecter et quantifier les aflatoxines dans la nourriture. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des limites à l'examen des aflatoxines **(INRS, 2011)**.

Dans cette étude nous détaillons la technique immunologique ELISA pour la détection des aflatoxines B1 dans l'aliment des volailles et du bétail.

Partie

Bibliographique

I. Chapitre 1 : Généralités sur les mycotoxines :

I.1. Définition :

Le terme de mycotoxines dérive de « mykes » signifiant champignon en grec et de « toxicum » signifiant poison en latin : il s'agit en effet d'une molécule toxique d'origine fongique et les champignons capables de les synthétiser sont qualifiés de moisissures de classes diverses (DEBRAINE, 2006).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par quelques espèces de champignons qui colonisent facilement les cultures et les contaminent sur le champ ou après la récolte lors du stockage (NICHOLAS et al. ; 2009).

Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seule une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes (ANSES, 2006).

I.2. Origine des mycotoxines :

Les mycotoxines sont élaborées par des champignons ou micromycètes appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Tableau1) (ANSES,2006).

Tableau 1: Moisissures productrices des mycotoxines (ANSES, 2006)

Mycotoxines	Champignons producteurs
Aflatoxines B1,B2, G1 et G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. ochraceus</i>
Ochratoxines A,B et C	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. sporotrichoides</i>
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i>
Trichothécène	<i>Fusarium spp</i>
Patuline	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp</i>
Citrinine	<i>Penicillium rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> <i>A. ochraceoroseus</i>
Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i>
Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>

I.3. Classification:**I.3.a. Moisissures productrices de mycotoxines :**

On peut ainsi différencier principalement deux types de moisissures:

- **Les moisissures hygrophiles ou de «champs»** : sont des champignons qui se développent lorsque l'activité de l'eau (A_w) est importante. Principalement *Fusarium spp.* et *Alternaria spp.* qui contaminent les produits agricoles avant et pendant la récolte. Récemment, des données montrent également que *Pyrenophoratrutici-epentis* (agent causal de la tache auréolée du blé) est un champignon phytopathogène et mycotoxinogène hygrophile.

- **Les moisissures xérotolérantes ou «de stockage»** : qui sont les plus redoutables et font partie des *Aspergillus spp.* et les *Penicillium spp* (GUEZLANE N et al., 2016).

I.3.b. Mycotoxines :

La production de ces toxines est catalysée par certaines enzymes qui permettent d'ailleurs de les classer.

On retrouve la polycétidesynthase (PKS), de non-ribosomal peptide synthétase (NRPS) et déterpenescyclase (TC). On forme ainsi trois classes respectivement:

polycétoacides, cyclopeptides, terpènes. Enfin des synthèses sont dites mixtes, elles utilisent plusieurs voies enzymatiques. Il en est ainsi pour l'Ochratoxine A issue de la voie PKS et NRPS. On obtient ainsi la quatrième classe, celle des hybrides (BOUCON; 2016).

I.4. Toxicité :

Les humains et les animaux sont exposés aux mycotoxines par ingestion, contact avec la peau et inhalation. Par exemple, les milieux intérieurs endommagés par l'humidité sont l'une des plus importants menaces en termes d'inhalation de mycotoxines (VERHEECKE ; 2014).

La toxicité se manifeste généralement par des troubles chroniques légers et n'aboutit que rarement à la mort. Une diminution de l'ingestion et des performances zootechniques est généralement observée. Le problème de la présence éventuelle de résidus toxiques se pose pour les produits animaux destinés à la consommation humaine (lait, viande, abats) (YIANNIKOURIS et al.; 2002).

I.5. Pathogénie et mode d'expression :**I.5.1. Ingestion :**

Bien que le pouvoir pathogène des mycotoxines par ingestion n'ait été établi réellement que depuis les années 1960, des effets neurotoxiques, mutagènes, tératogènes et cancérigènes des différentes mycotoxines ont été prouvés chez l'animal par voie digestive **(REBOUX ,2006)**.

Les mycotoxines peuvent être présentes alors que les moisissures ont déjà disparu **(INRS, 2011)**.

I.5.2. Inhalation /contact

Le pouvoir pathogène des mycotoxines absorbées par inhalation reste difficile à établir. La taille des particules contenant les mycotoxines (exemple : spores, fragments mycéliens) ou sur lesquelles elles sont adsorbées (exemple : poussières) détermine la profondeur de la pénétration des substances toxiques dans l'arbre bronchique **(REBOUX ; 2006)**. De nombreuses études expérimentales sur les animaux ont montré que les mycotoxines inhalées ou appliquées sur la peau peuvent avoir des effets toxiques localement (poumon, peau...) ou à distance (foie, rein...) **(INRS, 2011)**.

I.6. La biosynthèse des mycotoxines :

On distingue trois modes de contaminations des aliments du bétail par des mycotoxines **(BOUCON, 2016)**.

I.6.1. La synthèse directe par les moisissures :

A l'instar de la diversité au sein des différentes classes de mycotoxines les voies de biosynthèse de toxines sont elles aussi protéiformes. Les molécules d'initiation de synthèse sont diverses. On retrouve l'acétyl-CoA (aflatoxines, fumonisines, zéaralenone, patuline, ochratoxine A), les acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, ochratoxine A) ou les terpènes (trichothécènes, PR-toxine) **(BOUCON, 2016)**.

Toutes les enzymes nécessaires à l'aboutissement de la réaction, c'est-à-dire la formation du métabolite toxique, doivent être présentes en même temps. Or ces enzymes sont l'expression de gènes. On parle donc de cluster enzymatique, pour un ensemble de gènes qui codent pour un ensemble d'enzymes catalysant la réaction totale (ou presque) jusqu'à la formation de mycotoxine dans ce cas **(BOUCON, 2016)**.

I.6.2. Synthèse anormalement élevée de toxines végétales en réponse à l'agression fongique :

Ces composés sont normalement fabriqués par la plante mais en petite quantité. L'agression de cette plante par un micro-organisme entraîne une augmentation de la production du composé toxique. Par extension, on considèrera ces phytotoxines comme des mycotoxines, car leur production en quantités suffisantes dépend d'une agression fongique dans ce cas. De plus ce type de mycotoxine est assez courant, on y retrouve par exemple des alcaloïdes toxiques avec les graminées ou encore des phytoestrogènes avec les légumineuses. Enfin, ces composés sont lipophiles, cette caractéristique chimique conditionne, notamment, la diffusion possible des composés dans le lait (BOUCON, 2016).

I.6.3. Synthèse indirecte par utilisation de composés végétaux :

Ce dernier type de synthèse possède lui aussi une importance toute particulière, bien que relativement proche de la synthèse directe. Il est, en effet, responsable de la formation de molécules d'importance mondiale comme le dicoumarol, anticoagulant largement utilisé dans la lutte contre les nuisibles. Il est tout à fait courant, logiquement, que des micro-organismes fongiques biotransforment des composés du végétal (BOUCON, 2016).

I.7. Conséquences de la présence des mycotoxines dans les fourrages :

La présence des moisissures et/ou des mycotoxines dans les aliments destinés aux animaux entraîne un certain nombre d'effets préjudiciables : altération des qualités organoleptiques et nutritives des fourrages conduisant à une diminution des performances zootechniques (gain de poids, production lactée...), apparition d'affections variées (mycoses, allergies...), intoxications aiguës ou chroniques liées à l'ingestion de mycotoxines. Aux pertes économiques engendrées par la présence de ces toxines dans l'alimentation animale s'ajoutent des problèmes de sécurité alimentaire par le passage possible de certains résidus dans les produits animaux, comme le lait (BOUDRA, 2009).

I.8. Contrôle de la contamination pendant et après la récolte :

Certaines cultures comme le sorgho, le maïs, sont exposées, dans le champ et avant la récolte, à des attaques internes et externes d'insectes et de moisissures (FAO, 1979).

Plusieurs facteurs importants contribuent au contrôle des mycotoxines pendant et après la récolte. Ceux-ci incluent le stade physiologique de la plante (plus la récolte est précoce plus la concentration en mycotoxines est moindre), le réglage de la machine de récolte (la hauteur de

la coupe de la plante diminue le contact des mycotoxines du sol avec les grains sains), la température pendant le stockage et le niveau de l'humidité, avant et pendant le stockage

(JOUANY, 2007).

Les autres stratégies post-récolte importantes pour la prévention des contaminations par des mycotoxines inclut le séchage avec l'utilisation d'agents naturels, chimiques et irradiation.

La teneur en grains est le principal facteur limitant la croissance fongique. L'activité en eau (A_w) supérieure à 0,65 est essentielle au métabolisme fongique actif. *Aspergillus* peut se développer avec une A_w plus faible, alors qu'une A_w plus élevée est nécessaire à la croissance des champignons *Fusarium*. Des zones humides peuvent se former pendant le stockage, favorisant davantage la croissance fongique. Ceux-ci peuvent être contrôlés en combinant le refroidissement et le séchage, ainsi qu'une ventilation adéquate (SMITH et al .; 2012).

I.9. Contrôle physique de la contamination :

Le traitement physique des grains contaminés comprend le tri, le lavage, le décorticage, la séparation par densité, le traitement thermique, le broyage du grain, les ultrasons, l'irradiation et l'extraction par solvant; ce sont quelques-unes des méthodes utilisées pour contrôler la contamination par les mycotoxines au stade post-récolte (SMITH et al .; 2012).

II. Chapitre 2 : Les aflatoxines

II.1. Définition

L'aflatoxine a été découverte en 1960 en Angleterre, suite à l'empoisonnement massif de dindes nourries avec du tourteau d'arachide (**MARTIN et al.; 1999**).

Les aflatoxines produites par les espèces d'*Aspergillus* sont les mycotoxines les plus toxiques, elles sont également cancérigènes (**ALBERTO et al.;2017**).

L'aflatoxine B1 (AFB1) est la plus abondante dans la nature, elle est toxique et cancérigène chez l'homme et chez les animaux. Ingérée par les ruminants, l'AFB1 est partiellement métabolisée dans le foie en un métabolite plus polaire: l'aflatoxine M1 (AFM1), qui est aussi toxique que la toxine mère et peut être excrétée dans l'urine, les matières fécales, et lait (**FIRMIN et al. ; 2011**).

II.2. Propriétés physiques et chimiques :

Les aflatoxines sont des cristaux macroscopiquement incolores ou jaune pâle et fluorescents en lumière UV, ce qui permet de distinguer les différents groupes de mycotoxines. En effet, les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue, les aflatoxines G1 et G2 une fluorescence vert jaune et l'aflatoxine M1 une fluorescence bleu violet.

Elles sont très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires, très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique)

Elles sont instables à des PH extrême (Ph <3 et Ph >10), sous lumière ultraviolette en présence d'O₂ et en présence d'oxydants et donc différentes techniques de détoxification peuvent mettre à profit cette propriété (**FIRMIN et al.; 2011**).

La température de décomposition thermique s'élève à 267°C mais en dessous elles sont thermostables (**FIRMIN et al.; 2011**).

Tableau 2:Autres propriétés physico-chimiques des aflatoxines (BATHILLY,1998)

Aflatoxines	Formule moléculaire	Masse moléculaire relative	Point de fusion (*0)	Absorption dans l'UV (Σ)*		Emission fluorescente (nm)
				265 nm	360.362nm	
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12400	21800	425
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12100	24000	425
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	9600	17700	450
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	8200	17100	450

II.3. Structure des aflatoxines

Il existe 17 composés au sein du groupe des aflatoxines.

La structure chimique présente 5 hétérocycles dont 4 dérivés du furanne : c'est une structure dérivé de la coumarine (Figure 01) (**FIRMIN et al.;2011**).

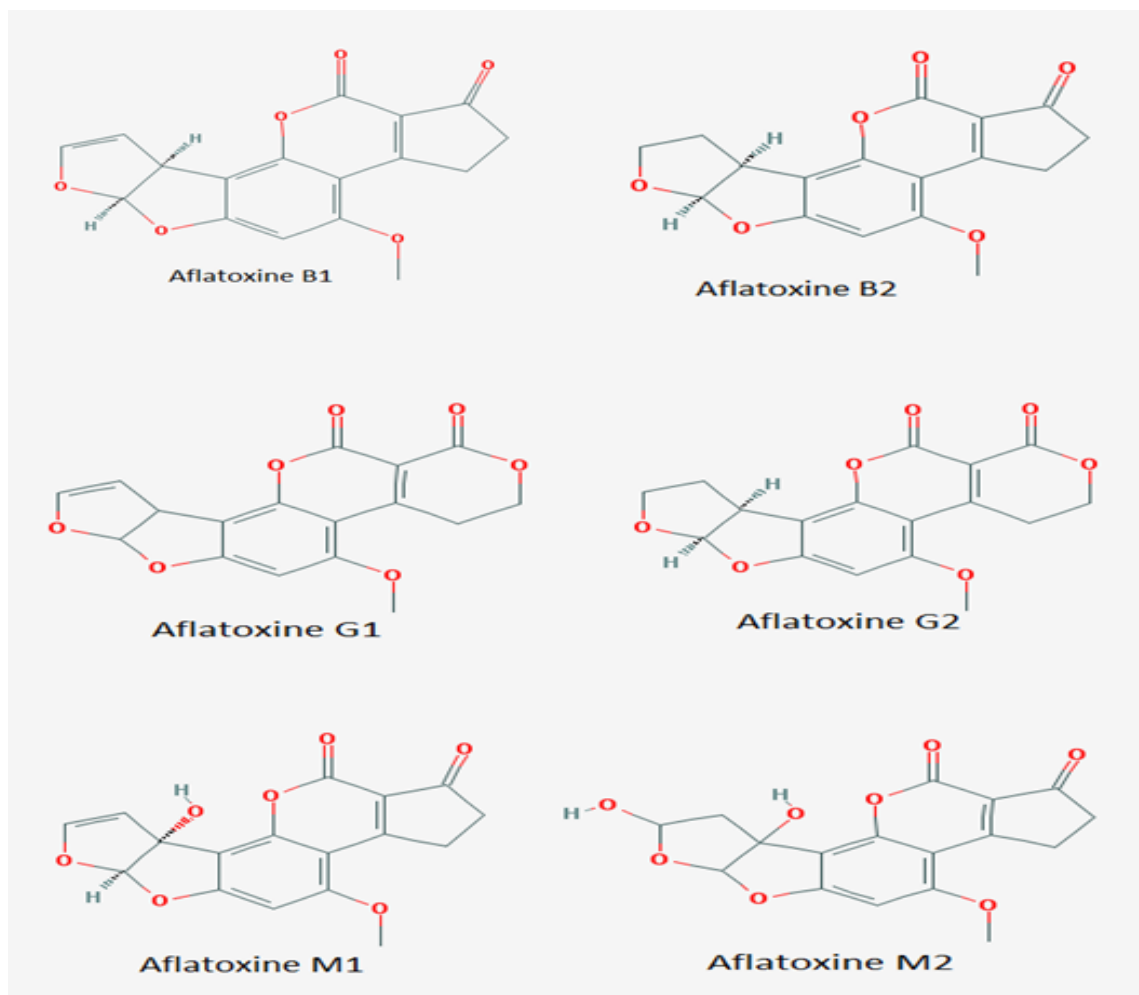


Figure 1: Structures des aflatoxines majeures (PUBCHEM .Open chimistry data base)

II.4. Biosynthèse des aflatoxines

La biosynthèse des aflatoxines est étroitement liée aux conditions de développement des moisissures et à leur écologie (**BATILY, 1998**).

II.4.1. Les moisissures productrices

Les aflatoxines sont produites par certaines souches d'*Aspergillus flavus*, de nombreuses souches d'*A. parasiticus* et quelques souches d'*A. nomius*.

A.parasiticus est capable de produire les 4 aflatoxines principales et *A.flavus* ne peut produire que les aflatoxines B1 et B2 (DEBRAINE,2006).

❖ **Caractéristiques du genre *Aspergillus***

- Surtout présent dans les régions (sub)- tropicales
- Conidiophore en forme d'arrosoir et de couleurs différentes : noires, brunes, vertes
- Aliments principalement concernés : céréales, fruits à coque, épices (GILBERT ; 2018).
- Ces conidiophores sont formés de stipes rugueux mesurant de 400 µm à 1 mm ou plus de long et se terminent par une vésicule sphérique de 20 à 50 µm de diamètre, fertile sur plus des trois quarts de sa surface, portant à la fois des métules et des phialides de 7 à 10 µm de long (Figure 2). Les conidies sont finement rugueuses et sphériques, de 3 à 5 µm de diamètre (ANSES ;2012).

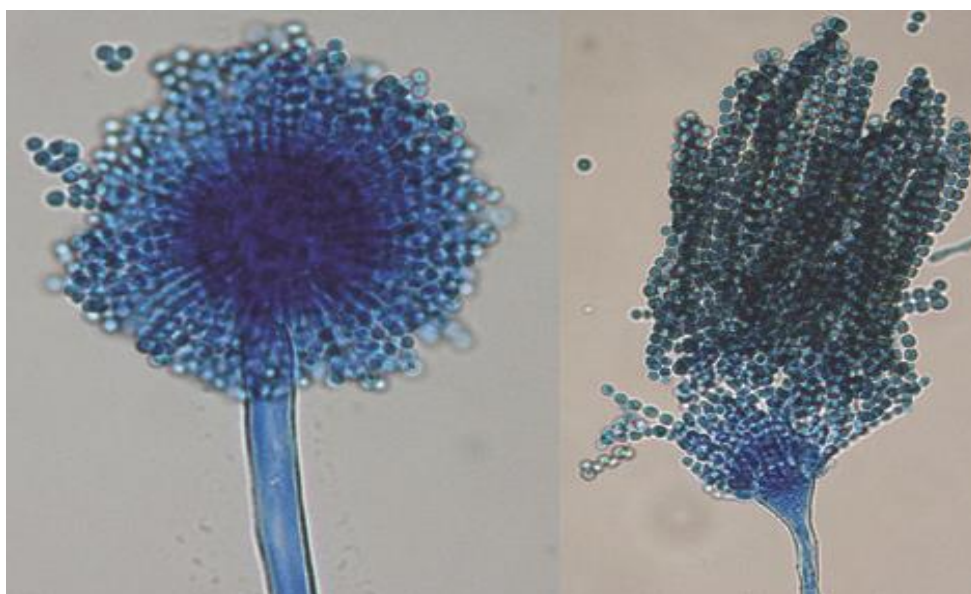


Figure 2: Le genre *Aspergillus flavus* sous microscopie optique
(mycology.adelaide.edu.au)

❖ **Source de danger**

Aspergillus flavus est ubiquitaire (végétation, eau, sol, etc.). Les conidies sont dispersées dans l'environnement principalement par l'air, mais aussi par l'eau, les animaux et l'homme. Les aflatoxines sont produites au champ ou lors du stockage, principalement en zones de climat subtropical ou méditerranéen, mais également dans les zones tempérées en cas de saisons particulièrement chaudes et sèches. *A. flavus* est responsable de la contamination des céréales (principalement le maïs et les produits à base de maïs), des graines oléagineuses et des

tourteaux destinés à l'alimentation animale, des fruits à coques (comme les arachides et les pistaches), des épices de toutes sortes, des fruits secs (comme les figues), du café, des fèves de cacao et des produits laitiers (AFM1). La contamination et la croissance des moisissures productrices d'aflatoxines sont favorisées par la blessure des grains ou des fruits (chocs, attaques d'insectes, etc.). Plusieurs cas d'aflatoxicose aigüe survenus en élevage, notamment chez les porcins, ont été décrits. La mort des animaux est le plus souvent survenue en quelques heures après un épisode hémorragique sévère. Chez les volailles la forme chronique de l'intoxication est la plus fréquente. Elle se manifeste par une diminution des performances associée à des hémorragies et des défauts de pigmentation des carcasses (**ANSES ,2012**).

II.4.2. Voies de biosynthèse

Les aflatoxines dérivent l'acétyl-CoA issu du métabolisme primaire. Celui-ci est ensuite acétylé en un polycétide ou polycétoacide via une polycétidesynthase (PKS), pour conduire à la synthèse des mycotoxines dérivées de polycétoacide. (**REDOUANE-SALAH, 2016**)

II.5. Toxinogénèse

La contamination des aliments par des moisissures ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines. La production des mycotoxines peut s'effectuer à tous les stades de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'au produit fini. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments, ainsi que la quantité de mycotoxines produites dépendent de plusieurs facteurs. Ces derniers peuvent être intrinsèques (nature de la souche), ou bien extrinsèques (conditions écologiques dans lesquelles les champignons se développent). Ils dépendent également de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire (**REDOUANE-SALAH, 2016**).

II.6. Facteurs de la toxinogénèse

Toutes les récoltes poussant à des climats chauds et humides et exposées aux moisissures toxinogènes peuvent être contaminées par les mycotoxines, certaines cultures sont moins favorables par rapport à d'autres. Les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse (**TABUC ;2007**). Les conditions de productions des aflatoxines sont beaucoup plus strictes que celles nécessaires pour le développement des moisissures (**BOUDRA ;2009**).

- **Facteurs physiques**

- **Teneur en eau des substrats** : l'activité en eau du substrat, notée A_w , c'est à dire la quantité d'eau disponible nécessaire à la croissance fongique varie en fonction de l'hygrométrie. En dessous d'une **A_w de 0,6** ; le développement fongique n'est plus possible, une teneur en eau supérieure à 15% pour un foin et inférieure à 65% dans un ensilage pourraient altérer la qualité hygiénique des fourrages (**BOUDRA ; 2009**).
- **Température** : La température agit sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La température optimale pour la croissance des moisissures se situe entre 20 et 30 °C, cependant elles peuvent croître dans un vaste intervalle de température allant de 4 à 40 °C (**ZINEDINE ; 2004**).

Les températures minimales, optimales, maximales pour la prolifération d'aflatoxines sont respectivement 12°C, 26°C, 40-42°C et la toxinogénèse n'est possible qu'entre 15-40°C (**BATHILLY ; 1988**) et selon (**BOUDRA ; 2009**) la production des aflatoxines (AFs) se fait à des températures supérieures à 25°C.

- **Facteurs chimiques**

- **Nature de substrat** : La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) et la présence de certaines molécules peuvent influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production (**TABUC ; 2007**). la nature de substrat est primordiale pour la toxinogénèse ; c'est-à-dire qu'elle est en relation directe avec la richesse de la plante en glucides et secondairement en lipides (**BOUDRA ; 2009**).
- **Tension d'oxygène** : La réduction de la pression partielle en oxygène a un effet inhibiteur bien plus important sur la toxinogénèse que sur la croissance du champignon. La production d'aflatoxine est fortement inhibée lorsque la concentration en oxygène est inférieure à 1 % (**ALOUI, 2018**).
- **pH de substrat** : Le pH du milieu est un facteur important dans la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses (**ZINEDINE, 2004**).
- **Endommagement des grains** : Les graines cassées ou fissurées constituent des foyers favorables pour le développement des moisissures qui après leur envahissement libèrent les toxines. Leur altération par les insectes et les acariens fournit également les conditions favorables pour la croissance et le développement des moisissures (**ZINEDINE ; 2004**).

- **Les traitements agricoles** : L'utilisation des produits phytosanitaires sur les plantes pendant les traitements agricoles a une action préventive sur l'apparition des mycotoxines. L'emploi des insecticides protège des lésions dues aux insectes et acariens et réduit la contamination par les souches toxigènes ou la production des mycotoxines (**ALLOUI, 2018**).

II.7. Risque pour les animaux d'élevage

II.7.1. Exposition des animaux aux aflatoxines B1 et M1

Les aflatoxines sont trouvées dans des nourritures en provenance de régions chaudes et humides. Elles ont été trouvées dans des produits à base de noix : arachides, noix de brésil, pistaches, amandes, noix de pécan ou de grain d'oléagineux : coton, copra, de grains : maïs, sorgho, millet et de figue.

- L'aflatoxine M1 est présente dans le lait ou dans les produits à base de lait (**BOUTON et al.; 2011**).

❖ Les ruminants

Les signes cliniques d'intoxication apparaissent dès 1.5 à 2.23 mg d'AFB1/kg d'aliment chez les bovins adultes, et à partir de 50mg/kg d'aliment chez les petits ruminants.

On observe une altération des fonctions hépatiques, ruminales et digestives associées à une baisse significative de la production. Une exposition longue à de faibles concentrations d'AFB1, pourrait conduire à des fibroses hépatiques et à des tumeurs du foie.

- L'AFM1, produit issu du métabolisme de l'AFB1 se trouve dans le lait environ douze heures après une ingestion orale de l'AFB1 et disparaît de celui-ci dans les quatre jours après l'arrêt de la distribution d'aliments contaminés. La plupart des auteurs s'accordent sur un taux de transfert moyen dans le lait de l'ordre de 1.7% (**BOUTON et al. ;2011**).

❖ Les volailles

La cible principale est le foie, les manifestations de l'intoxication varient selon la durée d'exposition et la dose. La toxicité des aflatoxines varie également en fonction de l'espèce et l'âge des animaux. La forme chronique de l'intoxication la plus fréquente fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés pendant une semaine au minimum. Les formes d'intoxication aiguës sont très rarement observées dans les conditions d'élevage. Les signes

cliniques se traduisent par une diminution des performances (QMG, ponte) avec des hémorragies et des défauts de pigmentation des carcasses, associées à des lésions hépatiques, les défenses immunitaires sont également altérées (**BOUTON L et al ;2011**).

- Le risque de résidus semble variable selon les espèces et selon les études. En dehors du gésier qui est directement exposé, le foie et les reins contiennent des quantités plus importantes de toxines. Une excrétion dans les œufs est possible (**BOUTON L et al ;2011**).

II.7.2. Détection d'aflatoxicose chez un animal

Il est difficile de détecter une aflatoxicose 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. La technique utilisée chez l'animal consiste 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 (**OMS ,2018**).

II.8. Lutte contre les aflatoxines avant et après les récoltes

Des mesures de lutte sont nécessaires avant comme après la récolte. La solution la plus durable et la plus stable pour maîtriser la contamination par des aflatoxines avant la récolte consiste à renforcer la capacité des cultures à résister à l'infection fongique et/ou à prévenir la production d'aflatoxines par les champignons invasifs. Ce résultat peut être obtenu par des croisements entre les végétaux ou par génie génétique sur les cultures intéressantes. Cependant, ces processus sont laborieux et chronophages. Il faudrait donc disposer de stratégies d'intervention pré-récolte efficaces, durables et universellement applicables .L'une des stratégies ayant beaucoup retenu l'attention pour réduire la présence d'aflatoxines avant la récolte réside dans la lutte biologique à l'aide d'isollements d'*A. flavus* non-toxinogènes. Les souches non-toxinogènes occupent les mêmes niches que les souches toxinogènes naturellement présentes et sont capables de concurrencer et de déplacer ces souches. Cette stratégie a été déployée sur des cultures telles que le coton, le maïs, les arachides, les figues et les pistaches aux États Unis d'Amérique, le maïs en Afrique et les arachides en Australie, en Argentine et en Chine. Elle a aussi été appliquée sur du maïs en Thaïlande pour mesurer l'efficacité de ce traitement avant et après la récolte : les résultats sont prometteurs, mais peu homogènes (**OMS, 2018**).

Parmi les interventions mises en œuvre après la récolte figurent des mesures préventives pour remédier à des conditions de stockage inadaptées (humidité, température, dommages mécaniques ou dus à des insectes et aération), qui influent sur la contamination et la production de toxines par les moisissures. D'autres mesures, comme la décontamination chimique ou l'utilisation d'adsorbants, peuvent être appliquées pour éliminer les aflatoxines de denrées alimentaires déjà contaminées (**OMS, 2018**).

III. chapitre 3 : Techniques d'analyse pour la détermination des aflatoxines**III.1. Introduction**

La recherche des mycotoxines dans les aliments, dans le cadre de contrôle réglementaire, exige l'utilisation des méthodes de dosage avec des performances analytiques reconnues. Aucune méthode analytique, aussi performante soit-elle, ne donne des résultats représentatifs du lot examiné sans une qualité satisfaisante de l'échantillonnage. En plus du respect des critères habituels de linéarité et de sensibilité, ces méthodes doivent présenter un degré de fiabilité élevé qui peut se mesurer par les paramètres fidélité répétabilité et reproductibilité, et d'exactitude. De même, il est important de vérifier l'adéquation entre le seuil de détection d'une méthode et les teneurs maximales tolérées qui sont définies par les textes réglementaires ou les recommandations de comités d'experts **(REDOUANE-SALAH, 2016)**.

III.2. Echantillonnage

L'échantillonnage est défini comme le processus de prélèvement d'une quantité appropriée à partir d'un volume plus grand pour réaliser les tests, de telle manière que la proportion et la répartition des paramètres à analyser soient les mêmes dans les deux cas (volume total et la quantité prélevée -échantillon-) **(ELISABETH PICHLER, Romer Labs®, 2016)**.

III.3. Techniques d'analyse

Les méthodes de référence pour l'analyse des mycotoxines suivent toutes le même schéma analytique : extraction de la mycotoxine de l'échantillon préparé, purification de l'extrait obtenu et détection et dosage de cette mycotoxine **(HERRY, 2003)**.

III.3.1. Préparation d'échantillons et pré-concentrations

La plupart des méthodes utilisées pour la détermination d'une mycotoxine doivent s'appuyer sur les méthodes correctes d'extraction et de nettoyage, à l'exception peut-être de la méthode ELISA, qui peut ne pas nécessiter de nettoyage. Ces étapes sont primordiales pour la réussite du protocole, car elles prennent beaucoup de temps (la préparation des échantillons est le principal facteur de temps dans une analyse et prend environ les deux tiers du total) et affectera le choix final de procédure de détection.

La méthode d'extraction utilisée pour séparer la mycotoxine de la matrice biologique dépend de la structure de la toxine. Le choix du solvant d'extraction dépend également de la matrice à partir de laquelle l'extraction est nécessaire, car les différents mélanges chimiques peuvent l'affecter. La procédure de nettoyage utilisée dans un protocole est l'étape la plus importante, car la pureté de l'échantillon affecte la sensibilité des résultats. Les traces d'une molécule peuvent être masquées par des composés interférents, présents non seulement dans la matrice, mais également dans les produits chimiques, les matériaux utilisés et les solvants utilisés dans la technique. La verrerie devrait également être saine de contamination, tels que les détergents alcalins, qui peuvent former des sels avec les composés et entraînent des taux de détection plus faibles. Plusieurs méthodes existent et ont toutes été enregistrées pour une utilisation avec le nettoyage des échantillons de mycotoxines, et certains de ceux qui sont largement utilisés ont été décrits ci-dessous **(NICHOLAS et al .; 2009)**.

II.3.2.Techniques d'extraction des mycotoxines

II.3.2.a. Extraction liquide- liquide

Aujourd'hui l'ELL reste très utilisée en pharmacologie et en toxicologie pour le prétraitement des échantillons car relativement simple à mettre en œuvre **(EMURI et al .;2010)**.

L'extraction liquide-liquide (LLE) consiste à exploiter la différente solubilité de la toxine en phase aqueuse et en phase organique non miscible, pour extraire le composé dans un solvant en laissant le reste de la matrice dans l'autre. Ainsi, des solvants tels que l'hexane et le cyclohexane sont utilisés pour éliminer les contaminants non polaires, par ex. lipides et cholestérol. La procédure est efficace pour plusieurs toxines et fonctionne bien dans les préparations à petite échelle .Cependant, cela prend du temps et dépend de la matrice utilisée et de composés en vue de la détermination **(NICHOLAS et al.;2009)**.

Inconvénients possibles : perte d'échantillon par adsorption sur la verrerie et la consommation de volumes importants de solvants, surtout lorsqu'il s'agit d'extractions multiples **(EMURI et al .;2010)**.

➤ Principe physico-chimique

L'extraction liquide-liquide repose sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles. Considérons un soluté A en solution dans l'eau à extraire par une phase organique non-miscible à l'eau. Lorsque les deux phases liquides sont en contact il s'établit l'équilibre de partage suivant pour A (**INNOVATION FLUIDE SUPERCRITIQUE, 2018**).

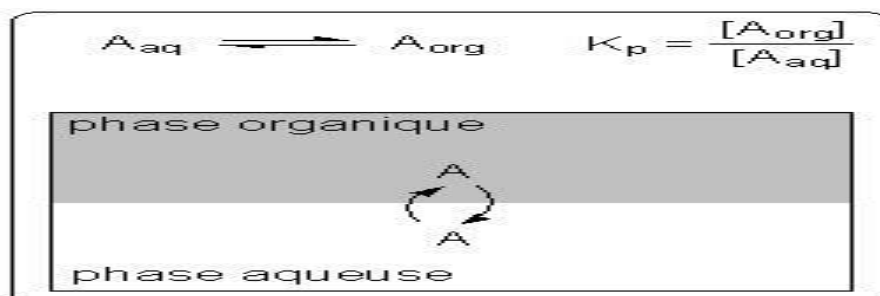


Figure 3: Principe physico chimique de l'extraction liquide-liquide (HAGOP ;2007)

L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage K_p est grand; on choisit, lorsque cela est possible, un solvant d'extraction dans lequel le soluté est très soluble.

➤ Protocole de l'extraction liquide-liquide

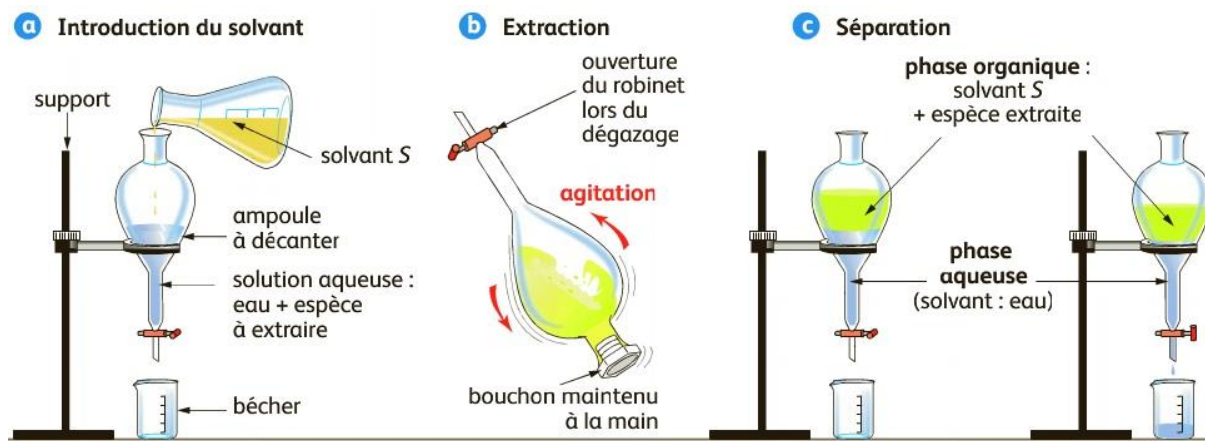


Figure 4: Protocole de l'extraction liquide-liquide (METAPHISIK)

II.3.2.b. Extraction par fluide supercritique (SFE)

S'applique en utilisant un fluide supercritique, tel que le CO_2 , pour extraire le composé recherché de la matrice. Cela fonctionne bien en raison du pouvoir de solvation élevé et de la densité du liquide de solvation. La chromatographie Supercritique en phase liquide sur

colonnes capillaires en silice fondue été appliquée précédemment pour séparer les toxines, mais ce n'est pas une technique efficace en raison des problèmes liés au SFE.

Plus loin, cette technique ne convient pas aux analyses de routine en raison des coûts élevés le besoin d'équipements spécialisés (**INNOVATION FLUIDE SUPERCRITIQUE, 2018**).

➤ Principe physico-chimique

Il consiste à faire circuler du CO₂ supercritique, sous pression et température, à travers une matière, puis d'opérer une décompression pour récupérer l'extrait ou le contaminant. A la dépressurisation, le CO₂ est libéré sous forme gazeuse (ré-exploitable) et le composé recherché sous forme liquide ou solide. Le CO₂ supercritique peut voir sa polarité modifiée par l'ajout d'un « dopant » polaire communément appelé Co-solvant permettant ainsi d'augmenter le spectre des molécules extraites par le solvant supercritique. Par ailleurs, le développement d'unité fonctionnant à haute pression (>400 bars) permet de récupérer des molécules de plus en plus polaires sans ajout de co-solvant (**INNOVATION FLUIDE SUPERCRITIQUE, 2018**).

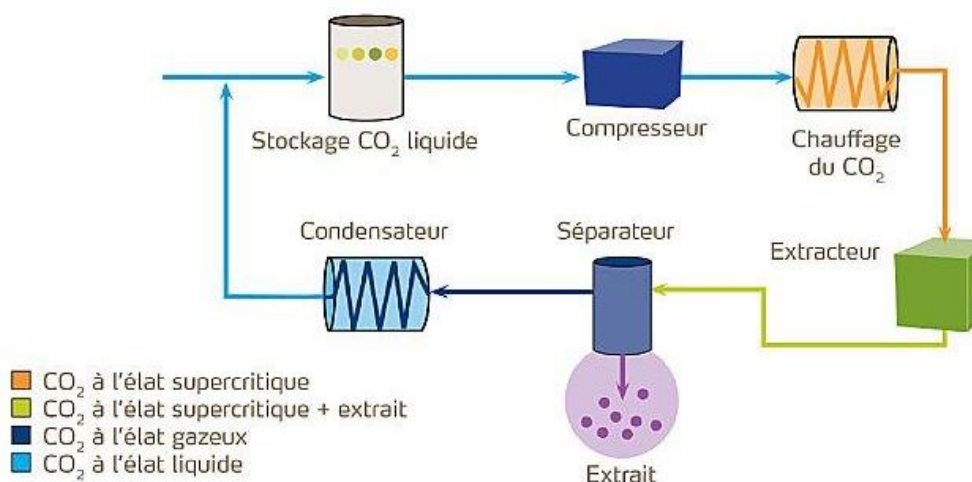


Figure 5 : Schéma montrant le principe de l'extraction par un fluide supercritique

II.3.2.c. Extraction en phase solide

Une procédure de l'extraction sur phase solide comporte trois ou quatre étapes en général. La première est le conditionnement de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction. Cette étape permet de mouiller le support en des groupements fonctionnels présents à sa surface.

Ainsi un support hydrophobe est tout d'abord mouillé par un solvant organique, puis par un solvant de polarité similaire à celle du solvant constituant l'échantillon, généralement l'eau.

Lors de la seconde étape, on procède à la percolation de l'échantillon sur le support. Les interférents n'ayant aucune affinité avec la phase solide ne sont pas retenus sur le support lors de cette étape. Par contre, les molécules cibles et éventuellement des composés présentant une forte affinité avec l'adsorbant sont fixés sur le support. Selon la nature de l'échantillon et des composés à analyser et selon le facteur d'enrichissement recherché.

Une étape supplémentaire de lavage (étape 3) peut être effectuée de manière à éliminer les composés interférents faiblement retenus par le support. On choisira de ce fait un solvant de faible force éluante de façon à éluer les interférents tout en gardant fixés les composés d'intérêt. Enfin, on procède à l'élution des composés ciblés en faisant percoler un solvant spécifiquement choisi pour rompre les interactions mises en jeu entre les analytes d'intérêt et le support solide en évitant, dans la mesure du possible, d'éluer des composés interférents fortement retenus sur le support (CHAPUIS et al.; 2005).

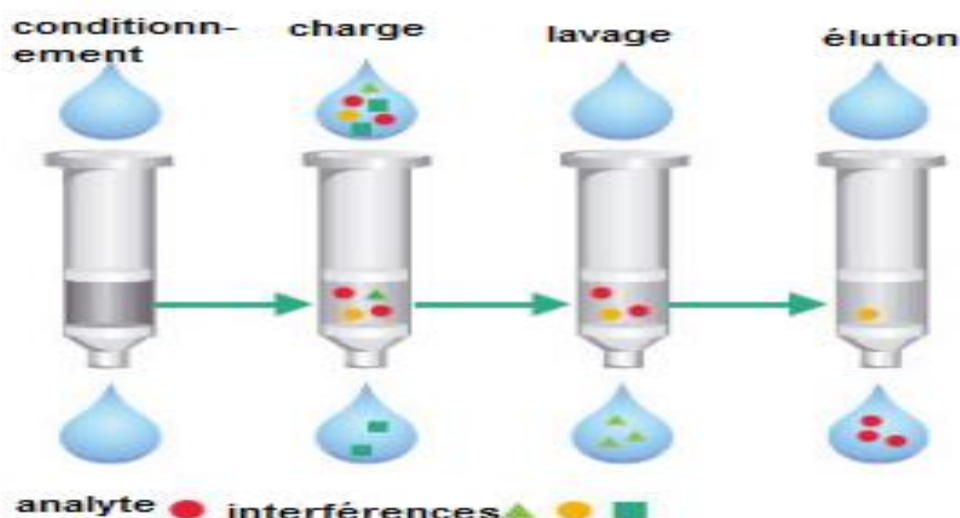


Figure 6: Les quatre étapes constituant une extraction en phase solide (HUMBERT, 2010)

III.3.3. Techniques de séparation et de quantification des mycotoxines

III.3.3.1. Méthodes quantitatives

III.3.3.1.a. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

La HPLC couplée aux UV, à un détecteur à barrette de diodes (DAD) ou à un détecteur à fluorescence (FD) est actuellement la technique la plus largement utilisée pour identifier les principales mycotoxines dans les produits alimentaires. Aflatoxine M1, Ochratoxine A, zéaralénone, patuline et déoxynivalénol sont régulièrement analysées par HPLC / FD ou HPLC / UV (DAD) avec une précision optimales. HPLC / FD est hautement sensible, sélective et répétable. Des réactifs de marquage spécifiques ont été mis au point et sont disponibles dans le marché pour la dérivation des mycotoxines non fluorescentes afin de former des dérivés fluorescents. Soit la dérivation pré-colonne, avec l'acide trifluoroacétique (TFA), ou la dérivation post-colonne, avec Br ou I, peuvent être utilisés pour identifier les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, alors que la dérivation en pré-colonne avec le réactif OPA est requis pour les fumonisines B1, B2 et B3. Plusieurs méthodes CLHP permettant d'identifier diverses mycotoxines dans un certain nombre d'aliments ont été identifiées.

Ces méthodes ont été adoptées comme méthodes officielles ou standard par l'AOAC ou le Comité européen de normalisation. En particulier, les méthodes de mesure des aflatoxines dans le maïs, les arachides brutes et le beurre d'arachide, l'aflatoxine B1 et les aflatoxines totales dans le beurre d'arachide, les pistaches, les figues et le paprika , aflatoxine M1 dans le lait et l' aflatoxine dans les aliments pour animaux en utilisant l'immuno-affinité (JOHN et al .; 2008).

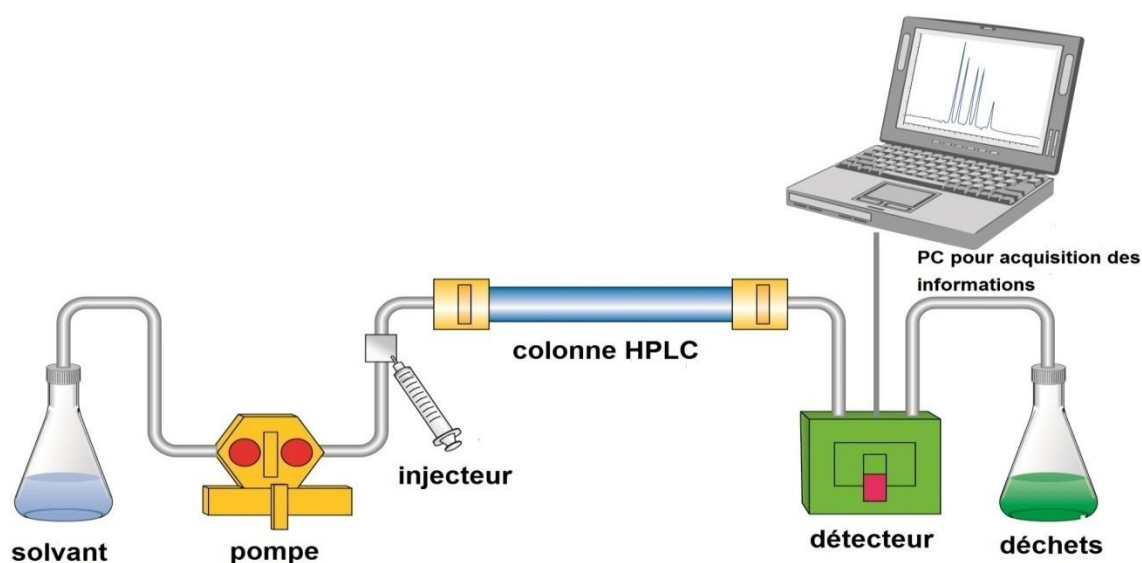


Figure 7: Configuration typique d'un système HPLC

III.3.3.1.b. Chromatographie en phase gazeuse (GC)

La méthode GC a rarement été utilisée pour la détermination de certaines mycotoxines comme la toxine T-2 dans les grains et aliments pour animaux. GC-MS a été utilisée pour identifier les aflatoxines dans le beurre de maïs et d'arachide au début de 1984.

La méthode GC exige que les composés soient suffisamment volatils et relativement non polaire. Ces mycotoxines qui ne sont pas suffisamment volatils nécessitent une réaction telle que silylation ou polyfluoroacylation pour obtenir un composé volatil dérivé. Apparemment, telles étapes ajoutent une complexité de la procédure (LEMING et al.; 1998).

III.3.3.1.c. Électrophorèse Capillaire (CE)

La détection individuelle de toxines étroitement liées nécessite une technique de séparation sophistiquée de haute sensibilité. La séparation efficace des composants peut être basée sur la migration dépendante de la charge et de la masse dans un champ électrique. La séparation rapide peut être réalisée par électrophorèse capillaire dans des solutions tampons aqueuses, excluant le besoin de solvants organiques. La combinaison de CE avec une détection sensible basée sur la fluorescence des méthodes a été décrite pour les aflatoxines et les fumisinines (NICHOLAS et al. ; 2009).

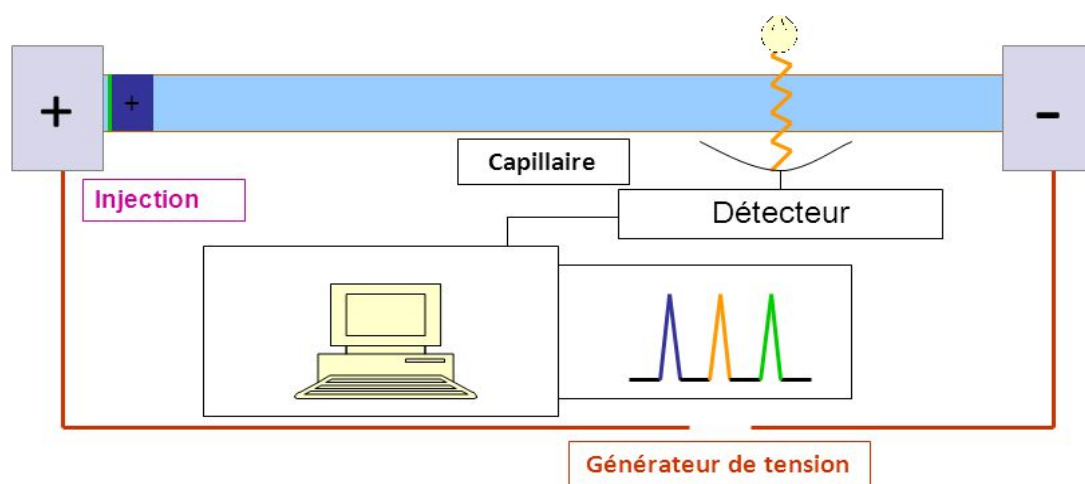


Figure 8: Principe de l'électrophorèse capillaire

III.3.3.2. Méthodes rapides

III.3.3.3.a. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La CCM est l'une des méthodes traditionnelles de détection des mycotoxines. Cette technique permet d'analyser un grand nombre de d'échantillons, une identification facile et rentable. Une couche de gel de silice est le plus couramment utilisée; cependant, le phényle non polaire lié, silanisé et le polyamide ont également été utilisés. Les mycotoxines sont visualisées sur la plaque CCM en les observant sous lumière UV ou par pulvérisation de produits chimiques qui réagissent avec les mycotoxines et améliorent la fluorescence ou produire des produits de couleur. Les aflatoxines, la citrinine et l'ochatoxine sont naturellement fluorescentes. Ces composés; par conséquent, sont identifiés en fonction de leurs propriétés fluorescentes. Par exemple, les aflatoxines B et G sont différenciées par fluorescence bleue et verte, respectivement, tandis que la citrinine est identifiée par fluorescence jaune. Les aflatoxines ont été identifiées par confirmation chimique en pulvérisant de l'acide trifluoroacétique et de l'acide sulfurique sur la plaque de chromatographie sur couche mince. La pulvérisation d'acide sulfurique améliore la limite de détection de l'aflatoxine M1 de 0,5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ à 0,3 $\mu\text{g} / \text{kg}$. Une analyse semi-quantitative a été réalisée pour les mycotoxines par CCM; cependant, la méthode a une faible sensibilité. La méthode CCM a été améliorée en hautes performances Chromatographie sur couche mince (HPTLC) pour améliorer la résolution et la précision. La HPTLC a été utilisée pour déterminer les aflatoxines dans les produits à base d'arachides et s'est avérée équivalente à la chromatographie en phase liquide en termes de précision, d'exactitude et de précision sensibilité (VISENUO el al.,2015).

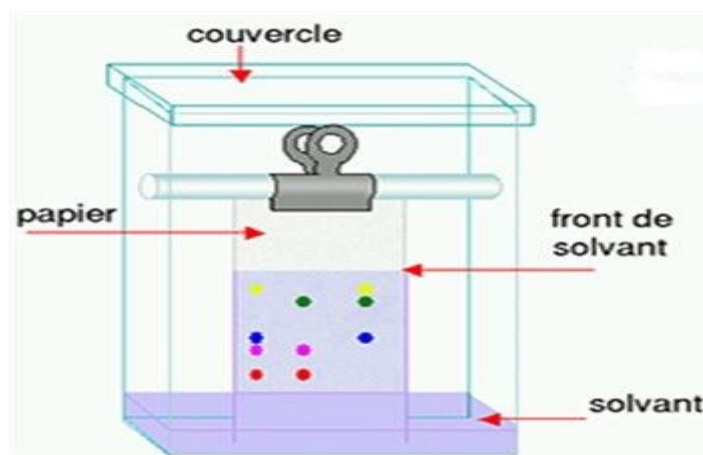


Figure 9 : Principe de la chromatographie sur couche mince

III.3.3.3.b. Méthodes immunochimiques

Différents tests rapides et une variété de kits de test ELISA sont disponibles sur le marché auprès de divers fabricants sur la base de réactions immunochimiques (ELISABETH et al.; 2008).

Les tests immunochimiques sont basés sur les interactions entre les anticorps et les antigènes que constituent les mycotoxines. Les anticorps doivent être fortement spécifiques pour identifier les composés structurellement très différents (BART et al.;2013).

❖ Les « bandelettes » immunochimiques (Lateral Flow Devices [LFD])

Permettent une détection rapide basée sur l'interaction entre les anticorps spécifiques, immobilisés sur une bande de membrane et des récepteurs anticorps coatés (latex ou colloïdal), qui réagissent avec l'analyte pour former un complexe d'analyte-récepteur. Les LFD ont été développés et sont disponibles dans le commerce pour la détermination des aflatoxines, des fumonisines, du déoxynivalénol, de l'ochratoxine A, des toxines T2 et HT2 dans les céréales, les produits céréaliers et le vin. Les lecteurs de bande photométriques portatifs permettent l'analyse quantitative, semi-quantitative ou qualitative des concentrations de ces toxines (BART et al.;2013).

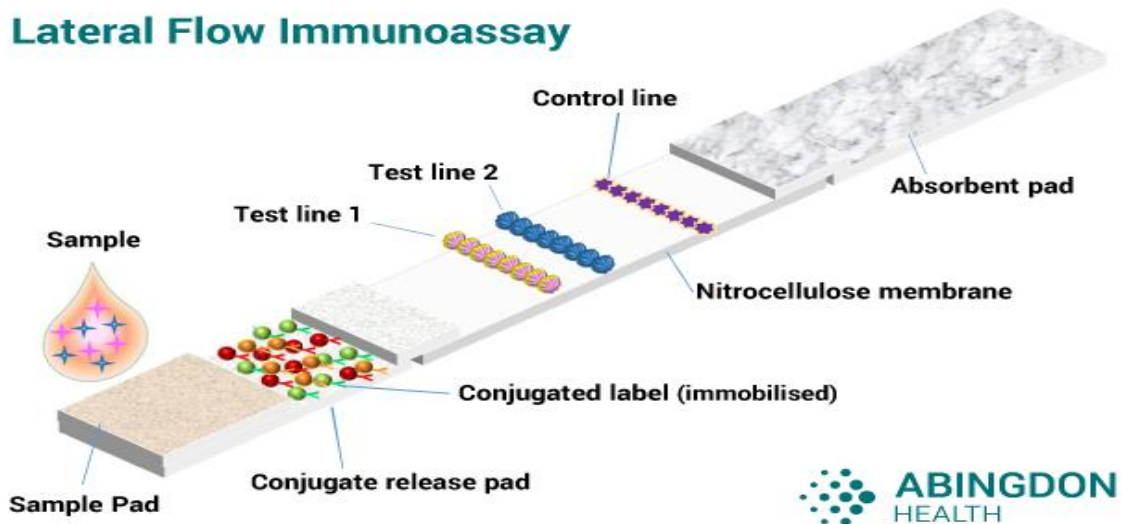


Figure 10 : Principe de fonctionnement d'une bandelette immunochimique
(ABINGDON HEALTH,2017)

❖ **Le test enzyme-linked immuno filtration assay (ELIFA)**

est un outil jetable (après emploi) basé sur l'utilisation d'une membrane au travers de laquelle l'écoulement est dirigé parallèlement (à l'opposé des LFD avec écoulement perpendiculaire), analogue à la CCM (**BART et al ;2013**).

❖ **Fluorescence Polarisation Immuno Assay [FPIA] :**

C'est une technique simple qui mesure les interactions entre un antigène en solution fluorescente marqué (marqueur, traceur ou label) et un anticorps spécifique. Le marqueur peut être radioactif dans le cas du test radio-immuno-dosage (rarement utilisé) ou une réaction composée chromogène ou fluorogénique. Les FPIA sont développés pour la détermination rapide d'aflatoxines, zéaralénone, fumonisines ou déoxynivalénol. A la différence de la plupart des techniques déjà citées, le test FPIA se développe en solution et ne nécessite pas la fixation de l'anticorps ou de l'antigène à un support solide (**BART et al ; 2013**).

❖ **Tests compétitifs basés sur la SPR (Surface Plasmon Resonance [SPR]) :**

Ils ont été récemment décrits pour la détermination de déoxynivalénol dans le blé, avec ou sans nettoyage de l'extrait. Une bonne corrélation existe entre la concentration de déoxynivalénol mesurée avec ce bio-détecteur et les méthodes de référence (**BART et al ;2013**).

❖ **ELISA basée sur les électrodes (Screen Printed Carbon Electrodes) (SPCE) :**

Ils ont été aussi utilisés pour la détermination quantitative de l'Ochratoxine A dans le blé. Les résultats confirmés par HPLC/IAC révèlent une bonne concordance pour les échantillons de blé naturellement contaminés (**BART et al ;2013**).

❖ **Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAA):**

Ces tests sont basés sur les molécules aptamères qui sont des oligonucléotides (ADN ou ARN) sélectionnés à partir d'une banque aléatoire de séquences selon leur aptitude à reconnaître une cible. Ces aptamères présentent des affinités et spécificités comparables à celles des anticorps pour des molécules variées telles que les mycotoxines. Comparés aux anticorps, ils ont l'avantage d'être synthétisés chimiquement et ne nécessitent pas l'utilisation d'animaux. Moins chers, ils peuvent être choisis de manière spécifique contre les cibles toxiques ou peu immunogènes. En outre, la fonction des aptamères immobilisés peut être

facilement régénérée, ce qui permet leur réutilisation. En raison de ces avantages, les aptamères constituent une alternative plausible aux anticorps ou autres bio-récepteurs dans le développement des techniques analytiques **(BART et al ;2013)**.

❖ **ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):**

Voir Partie Expérimentale.

Partie expérimentale

I. Chapitre 1 : Matériel et méthodes**I.1. objectif**

L'objectif de la présente étude est de déterminer la teneur en aflatoxine dans certains échantillons d'aliment de bétail et volaille et la comparer avec les LMR fixées par la réglementation européenne. Les analyses sont faites par la technique **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) au sein de laboratoire de recherche (**Santé et Production Animale**) de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

I.2. Matériel

- ✓ **de broyage** : blinder à grande vitesse
- ✓ **d'extraction** : balance électronique, flacons, solvant (eau+méthanol), papiers filtres whattman, tubes à fonds coniques, petits tubes, eppendorfs,.
- ✓ **d'analyse** : pipettes multicanaux, pipette monocanal, cônes de pipettes, chronomètre, kit ELISA pour aflatoxine B1, lecteur de microplaques ELISA



Figure 11: Kit ELISA utilisé de ROMER Labs

I.3. Méthodes**➤ D'échantillonnage :**

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

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

Afin d'avoir un échantillonnage représentatif, 20 échantillons d'aliments de volailles et de bétail (500g min/Ech) ont été prélevés au hasard des régions différentes d'Algérie. L'échantillonnage se fait en respectant certaines précautions selon le type du lot à inspecter :

- les endroits plus propices d'apparition des moisissures dans un lot sont sur les surfaces, aux cotés et aux rebords, et dans les lots d'aliment stocké les moisissures se localisent dans les couches profondes, ce qui conditionne un prélèvement de ces zones-là.
- les échantillons obtenus doivent être mis dans des sacs inertes pour éviter toute contamination externe.
- Acheminement rapide des échantillons vers le laboratoire et conservation dans un endroit frais et sec jusqu'à leur analyse.

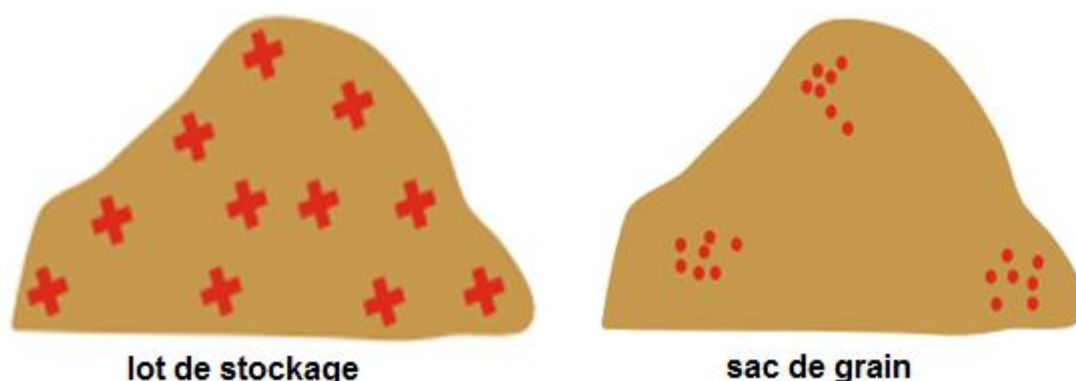


Figure 12 : Répartition des mycotoxines dans les endroits de stockage

➤ **le broyage et l'extraction :**

- Les échantillons récupérés sont bien broyés pour les réduire en poudre.
- Prendre 20g de chaque échantillon, et les mettre dans des flacons propres.
- Ajouter à chaque flacon 10ml de 70/30 (v/v) méthanol/eau
- Agiter les flacons pendant 3 min pour bien homogénéiser la solution.
- Laisser sédimenter pendant 24h
- Filtrer la couche supérieure de l'extrait à l'aide d'un papier whatman et récupérer le filtrat dans des tubes coniques.

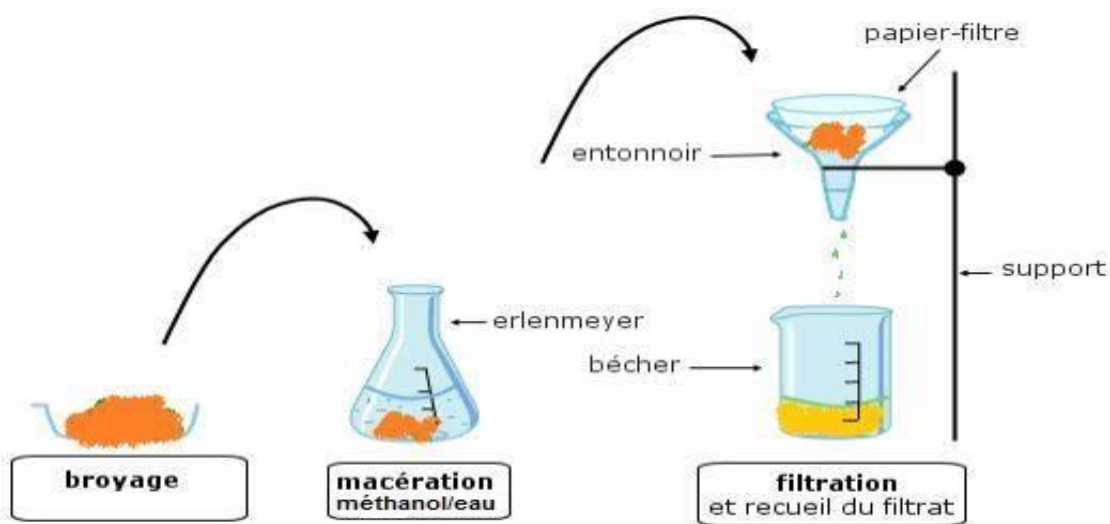


Figure 13: Technique d'extraction suivie

⚠ Les extraits des produits devraient avoir un pH de 6-8. les conditions alcalines ou acides peuvent affecter les résultats du test, et doivent être ajusté avant le test.

- Emballer les tubes dans du papier aluminium en raison de la sensibilité des aflatoxines à la lumière.
- Diluer le filtrat 1:2 avec **le tampon de dosage** fourni dans des Eppendorf, et bien mélanger à l'aide d'un vortex. (100µl de filtrat + 100 µl du tampon de dosage)
- L'échantillon est maintenant prêt pour l'analyse.

➤ L'analyse :❖ Le test ELISA✓ Histoire

La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par 2 scientifiques suédois, **Peter Perlmann** et **Eva Engvall** à l'Université de Stockholm en **1971**.

A la fin des années 60, **Stratis Avrameas** et **GB Pierce** mettent au point la technique d'immuno-enzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps et utilisant comme marqueur des enzymes.

✓ Principe

Selon (**Elisabeth R ; 2009**) L'ELISA compétitif direct ou indirect a été largement utilisé pour la quantification des AF dans différents aliments et alimentation.

Les kits ELISA reposent sur le principe d'une réaction entre antigène (molécule à doser) et anticorps.

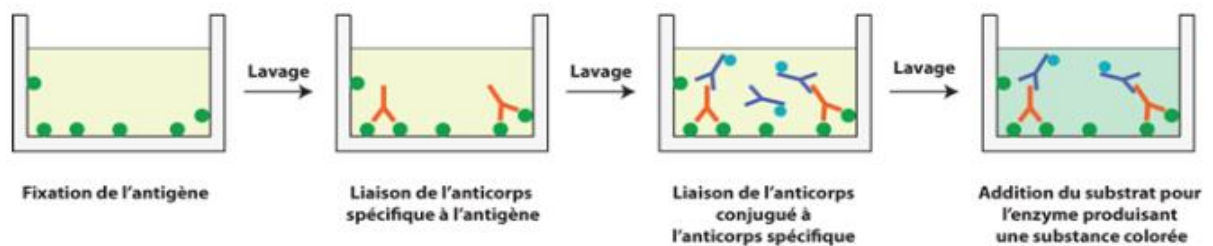


Figure 14 : principe de fonctionnement de kit ELISA

✓ Les étapes à suivre

Avant de commencer il faut savoir que :

La date de validité de kit doit être contrôlée avant sa mise en œuvre.

Le kit et ses composants doivent être maintenus à une température ambiante de 18-30°C

❖ Le kit ELISA utilisé : **Romer LabsAgra Quant Aflatoxin B1 (2-50ppb)**
QUANTITATIVE KIT - COKAQ8000/8048

- 1- A l'aide d'une pipette multicanaux, prendre **200 µl** de la solution conjuguée déjà versée dans un récipient propre et les ajouter dans chaque bordure bleue/verte.

- 2- En utilisant une pipette monocanale, ajouter 100 µl de chaque standard en duplicata (en changeant le cône utilisé après chaque prélèvement).
- 3- Le reste des puits est rempli par 100 µl d'échantillon en duplicata.
- 4- Mélanger bien chaque puits en pipetant de haut en bas, en utilisant une pipette multicanaux.

⚠ Il faut s'assurer que les embouts de pipette sont bien vidés.
- 5- A l'aide d'une pipette à 8 canaux (embouts changés à chaque bordure bleue/verte) transférer 100 µl de chaque puits à son correspondant sur la plaque sensibilisée par les anticorps de l'aflatoxine B1.
- 6- Incuber la plaque à température ambiante pendant 15 mn.
- 7- Vider le contenu de la plaque et effectuer un lavage avec de l'eau distillée ou déminéralisée pour chaque micropuits, en faisant 5 lavages successifs.
- 8- Taper la plaque sur un papier absorbant, pour expulser le plus d'eau possible, et sécher les fonds des micropuits à l'aide d'un chiffon propre.
- 9- A l'aide d'une pipette multicanaux, prendre 100 µl de substrat déjà versé dans un récipient propre, et les pipeter dans les micropuits.
- 10- Incuber pendant 5 min à température ambiante. La couleur des puits à ce stade est bleue.

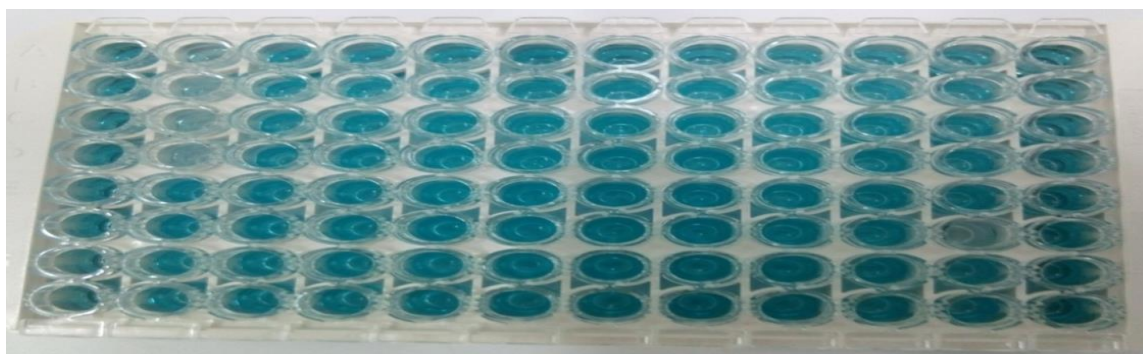


Figure 15 : Couleur de la plaque vire vers le bleu (photo personnelle)

- 11- Pipeter 100 µl du stop solution dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux. La couleur doit changer de bleu vers le jaune.

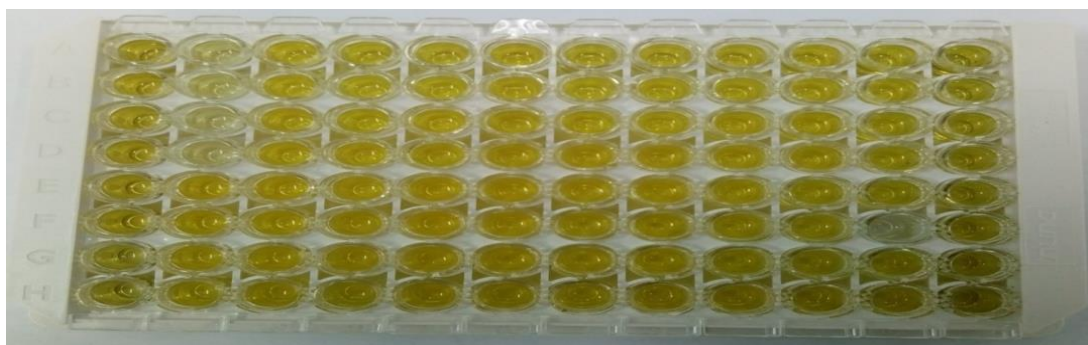


Figure 16 : Couleur de la plaque vire vers le jaune (photo personnelle)

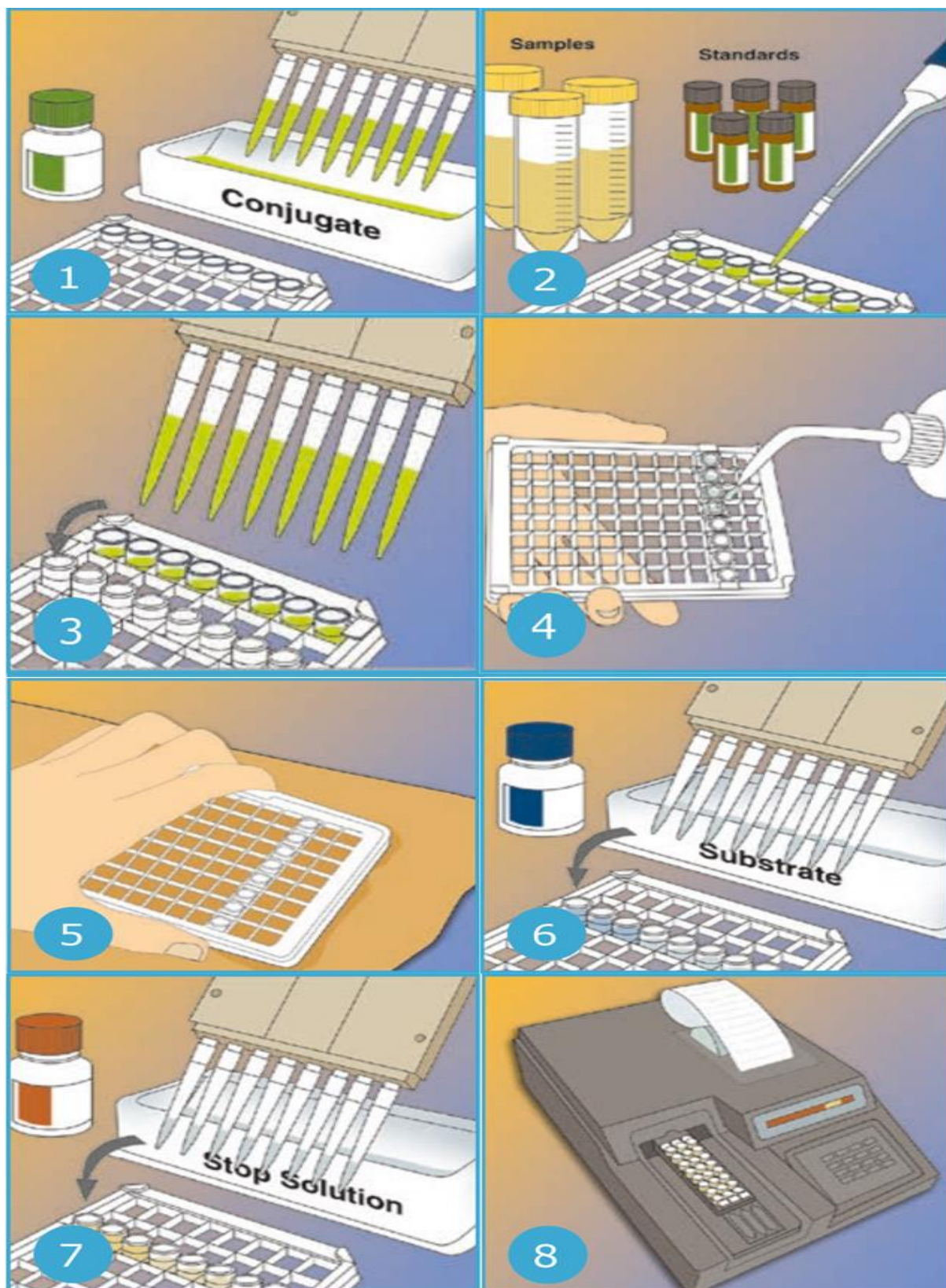


Figure 17: Etapes de l'analyse suivies

II. Chapitre 2 : Résultats et discussion

II.1. Résultats

Cinq dilutions de standard 0,2, 5, 20, 50 ng / L d'aflatoxine B1 ont été utilisées et immuno-essayées en duplicata. Le standard zéro était du méthanol dilué dans l'échantillon.

Tableau 3 : Absorbances des standards

Std. Level	Abs.	B/Bo	Log(Conc.)	Logit B/Bo	
0 ppb =	2,172				
2 ppb =	1,550	0,71	0,30	0,40	
5 ppb =	1,288	0,59	0,70	0,16	
20 ppb =	0,496	0,23	1,30	-0,53	
50 ppb =	0,184	0,08	1,70	-1,03	
					R = -0,9918 Slope = -1,0437 Intercept = 0,7925 50% Inhibition = 5,7980

Après la calibration on a obtenu la courbe suivante :

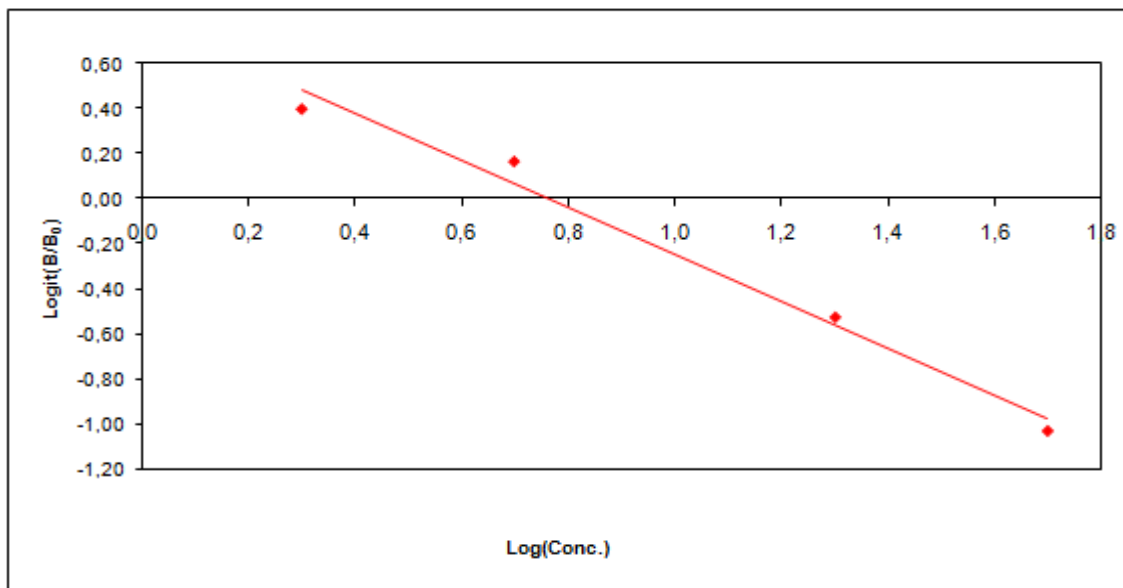


Figure 18 : Courbe de calibration des standards

D'après la courbe d'étalonnage, il a été observé que, lorsque la concentration d'antigène dans les standards augmente, les valeurs **B / B₀** diminuent.

Quand les données ont été soumises à une analyse de régression / corrélation, une corrélation négative hautement significative (**R = - 0.9918**) a été observée.

Ce test ELISA standardisé a été appliqué à différents échantillons d'aliments pour volaille et bétail afin de déterminer les concentrations en aflatoxine B1 (Tableau 4)

Tableau 4 : Absorbances et teneurs en aflatoxine B1 des échantillons analysés

No.	Sample ID	Abs.	Aflatoxin B1 [ppb]
1	0 ppb Std.	2,172	0,00
2	2 ppb Std.	1,550	2,40
3	5 ppb Std.	1,288	4,01
4	20 ppb Std.	0,496	18,47
5	50 ppb Std.	0,184	56,35
6	E2 Belkacem AEK	1,199	4,71
7	E2 Belkacem AEK	1,853	<LOD (2ppb)
8	E4 Zidani Sofiane	1,620	2,05
9	E5 Zidani Med	1,563	2,33
10	E6 Rakhal ABD	1,602	2,14
11	E7 Belgacem B	1,784	<LOD (2ppb)
12	E9 Tipaza	1,498	2,67
13	E10 Tipaza TIVLB15	1,630	2,00
14	E11 Tipaza VLB17	1,595	2,17
15	E12 VL	1,726	<LOD (2ppb)
16	E13 VL	1,555	2,37
17	E16 VL Sac	1,729	<LOD (2ppb)
18	E17 Bougaa Sétif	1,491	2,71
19	E18 Rouiba	1,530	2,50
20	E19 Rouiba	1,739	<LOD (2ppb)
21	E20 Rouiba	1,835	<LOD (2ppb)
22	E21 Rouiba	1,722	<LOD (2ppb)
23	E22 Rouiba	1,645	<LOD (2ppb)
24	E23 Rouiba	1,522	2,55
25	E24 Rouiba	1,384	3,35

Tableau 5 : Présence naturelle d'aflatoxine B1 dans des échantillons d'aliments destinés aux bétails et aux volailles évaluées par ELISA

L'aliment	Nombre total des échantillons	Echantillons positifs (%)	La moyenne (ppb)	L'intervalle (ppb)
Bétail	12	8 (66.66%)	2.55	[2.00 – 4.71]
Volaille	08	4 (20%)	2.78	[2.50 – 3.35]

II.2. Discussion

Il a été observé que la plupart des échantillons d'aliments (bétail et volaille) étaient contaminés par diverses concentrations d'aflatoxine B1.

Pour l'aliment de bétail **8 échantillons** sur un total de 12 échantillons analysés ont été positifs (66.66%), le reste des échantillons sont contaminés par des concentrations inférieures à la limite de détection du kit ELISA (< **2 ppb**).

Cependant l'aliment de volaille présente une moyenne de 2.78 calculée sur **4 échantillons** positifs sur un total de **20 analysés**.

Tous les échantillons d'aliments de bétail analysés positifs, sont contaminés par des concentrations d'aflatoxines B1 inférieures à la limite maximale qui est fixée **5 ppb/kg** pour le bétail laitier selon le règlement de la Communauté Européenne N° **2006/576/CE** de la commission du **17 août 2006**.

Cependant, les échantillons d'aliment de volaille sont contaminés par des concentrations d'aflatoxines B1 inférieures à la limite maximale qui est fixé **20 ppb/kg** (jeunes animaux exceptés : 5 ppb/kg) selon la Directive 2002/32/ CE du Parlement Européen et du Conseil du 7 mai 2002.

La réglementation européenne est plus stricte sur la LMR de l'aflatoxine B1 dans l'alimentation destinée au bétail laitier par rapport à l'américaine qui la fixe à **20 ppb/kg**, parce que l'aflatoxine B1 est hydroxylée dans le foie et donne l'aflatoxine M1 qui se trouve dans le lait, qui a des effets néfaste sur la santé publique.

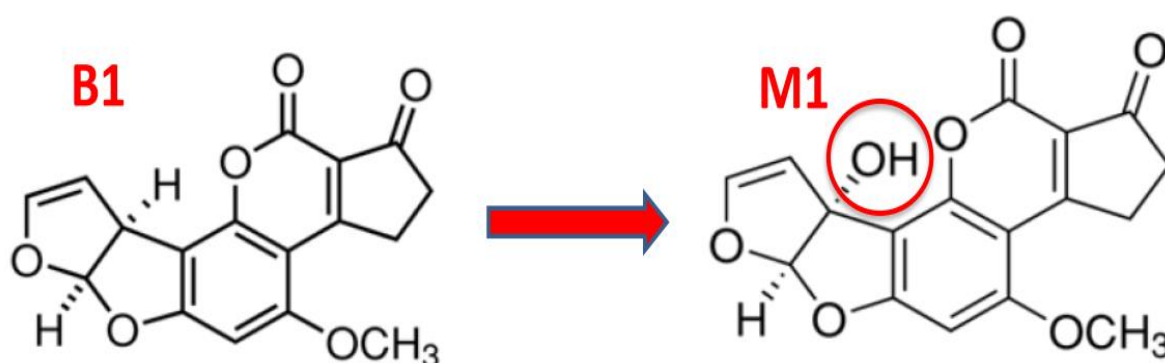


Figure 19 : Hydroxylation de l'aflatoxine B1 en aflatoxine M1 dans le foie

✍ Pour l'analyse des échantillons d'aliment de volaille :

- Nos résultats sont en accord avec ceux de **Zinedine A. et al** ; il a analysé **21 échantillons** avec une teneur qui s'étale entre $[0.05 - 5.38] \mu\text{g/kg}$ et une moyenne de **1.26 $\mu\text{g/kg}$ < 20 ppb**.

- Une moyenne de **23.75 ppb** été le résultat d'une analyse de **487** échantillons d'aliment de volaille dans une région du Pakistan faite par **Anjum M. A. ; et al. En 2012**, et qui est supérieure au seuil autorisé par la réglementation européenne 20ppb/kg.
- Une étude qui été faite au Brésil par **Carolina Nachi R. et al**, sur **36** échantillons d'aliment de poulets de chair et **34** échantillons d'aliment de poules pondeuses. Pour les résultats d'analyse ces derniers montrent une moyenne de contamination de **10.48 µg/kg** qui est inférieure à la LMR européenne **20 ppb/kg**, pour les premiers ils dépassent la LMR avec une moyenne de **20.83 µg/kg**.
- Une autre étude est faite au Niger par **Oyekemi O. et al** ; Ils ont analysé **30** échantillons d'aliment, ayant une moyenne de **74 µg/kg** qui est supérieure au seuil autorisé par la réglementation européenne 20 ppb /kg.
- **Korrapati Kotinagu et al** ; ont fait une étude sur **17** échantillons dans lesquels il ya **6 positifs** avec une moyenne de **13.4 ppb > 20 ppb**.
- Une étude similaire a été faite en Jordanie par **Khalil Alshawabkeh et al**. Les analyses des différentes rations d'aliment de volaille (démarrage ; croissance ; finition) ont donné les résultats suivants : **25** échantillons de démarrage, avec une moyenne de **19.65 ppb > 20 ppb**.
14 échantillons pour la croissance, avec une moyenne de **14.8 < 20 ppb**
13 échantillons pour la finition, avec une moyenne de **16.38 < 20 ppb**

 Pour les échantillons d'aliments de bétail :

- Une étude Malaisienne faite en 2010 par **Wejdan Shakir Khayoonet al** ; où ils ont analysé **42** échantillons, la moyenne des résultats était **25.55 µg/kg**, qui est vachement supérieure à la LMR européenne **5 ppb**.

- En Turquie dans une étude datant de cinq ans, **Huseyin Eseceli et al** ont eu sur **23** échantillons d'aliments de bétail, **14** échantillons positifs avec une moyenne de **0.26 ppb** < 5 ppb.
- **Korrapati Kotinagu et al** ; ont fait des études sur **24** échantillons, **6** sont **positifs** avec une teneur de moyenne **32 ppb** qui est supérieure à la LMR 5ppb.
- Une étude similaire faite au sein de notre école par **Achiche salah**, une vingtaine d'échantillons été analysée, 9 échantillons positifs avaient une teneur moyenne de **46.15** qui au-delà de la LMR européenne 5 ppb.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude, une analyse d'une vingtaine d'échantillon d'aliment de volaille et de bétail prélevés de régions différentes en Algérie, a été faite par la technique ELISA et a révélé une concentration en aflatoxine B1 de **66.66%** et **20%** pour l'aliment de bétail et l'aliment de volaille respectivement.

La problématique des mycotoxines ressort de l'ubiquité des moisissures dans l'environnement d'où une large contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines, de leur très grande stabilité chimique, de leur transfert dans la chaîne alimentaire, de leur toxicité avérée chez l'homme et les animaux même à l'état de traces par le risque de cancérogénicité

La sécurité sanitaire des aliments d'animaux représente de nos jours une préoccupation croissante pour la santé animale et la santé publique. En effet, elle représente l'une des composantes essentielles de la protection de la santé publique qui est un droit fondamental reconnu à l'échelle internationale. Donc plusieurs études faites pour focaliser la lumière sur les effets néfastes des aflatoxines dans l'alimentation animale et leurs effets secondaires sur la santé humaine.

Par conséquent, il est nécessaire que l'état algérien fasse des plans de maîtrise des risques de la présence des aflatoxines dans les aliment d'animaux en surveillant la teneur en aflatoxines B1 ainsi que des mesures de lutte doivent être appliquées pour limiter la contamination des aliments et l'intoxication des animaux .

Références

❖ Liste des références

1. **ALBERTO R ;CUSTODIA L ; FILOMENA R**.Aflatoxin B1 Contamination in Chicken Livers and Gizzards from Industrial and Small Abattoirs, Measured by ELISA Technique in Maputo, Mozambique.international journal of environmentalreserch and public health,2017.vol.14,pp. 951.
2. **ANJUM A., KHAN S., SAHOTA A., SARDAR R.**assessment of aflatoxin b1 in commercial poultry feed and feed ingredients.the journal of animal and planet sciences,2012, vol.22,n°2,pp. 268-272.
3. **ANSES**. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaire humaine et animale 2011 .Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [en ligne].disponible sur <https://www.anses.fr> (consulté le 28/10/2018)
4. **BART HUYBRECHTS ; EMMANUEL KOSSI ; TANGNI PHILIPPE et al.** Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles : une revue,CahAgric, 2013.vol. 22, n°8 ,pp.202-2015.
5. **BATHILY A.**aflatoxines' dans les aliments: recherche et dosage dans les huiles de pression artisanale et leurs residus d'extraction essais de detoxification. thèse doctorat en pharmacie.Sénégal :université cheikh antadiop de dakar,1998,83p.
6. **BIOMIN** disponible sur :
<<<https://www.biomin.net/fr/especes/ruminants/mycotoxines/>>> (consulté le 17/11/2018)
7. **BOUCON M.**les mycotoxines : de la vache laitiere aux produits laitiers. thèse doctorat veterinaire. lyon :universiteclaude-bernard - lyon i,2016,124p.
8. **BOUDRA H.**Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants.,2009,vol.199, pp.265-280.
9. **BRERA ET AL., 2005; MACDONALD ET AL., 2005, SENYUVA AND GILBERT, 2005.**High performance liquid chromatography (HPLC). In :Leslie

F.Mycotoxins Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade.myco-globe.London, UK : CAB International,2008.pp 175-176.

10. **CAROLINA NACHI ROSSI A, CASSIA REIKA TAKABAYASHI B, MARIO AUGUSTO ONO. ;et al.**Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. Food Chemistry, 2012. Vol.132, pp 2211-2216.
11. **CRISTINA TABUC.** flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines.l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest,2007 , 155 p.
12. **DEBRAINE A.** étude clinique ds intoxications alimentaires des équidés par les mycotoxines revue bibliographique. Thèse DOCTORAT VETERINAIRE. Alfort : école nationale vétérinaire d'alfort,2006,136p.
13. **ELISABETH PICHLER.**,RomerLabs@[en ligne].disponible sur : <https://www.romerlabs.com/> (consulté le 08/11/2018)
14. **ELISABETH REITER, JRGEN ZENTEK AND EBRAHIM RAZZAZI1,** Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed,Mol. Nutr. Food Res. 2009, vol.53, pp.508 – 524.
15. **EMURI A, STANILAS G, JEAN CLAUDE A.** Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. Société Française de Toxicologie Analytique ,2010.vol. 22 n°2,pp. 51-59.
16. **Etude FAO :** alimentation et nutrition. Prévention des mycotoxines ; 1979. 60 p.
17. **F. CHAPUIS, V. PICHON , M.-C. HENNION.** Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières. Oil&Gas Science and Technology,2005. Vol. 60 No. 6, pp. 899-912.
18. **FIRMIN S., P. MORGAVI D., YIANNIKOURIS A., H. BOUDRA.**Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes.American Dairy Science Association, 2011.vol.94,pp.5611–5619.
19. **GILBERT MORIS.** mycotoxines occurrences et risques pour la santé.2018

20. **GUEZLANE-TEBIBEL N., BOURAS N. et OULD EL HADJ M.**..les mycotoxines :un danger de santé publique.Algerian journal of arid environment,2016,vol. 6, n°1, pp. 32-49

21. **HAGOP D 2007.** Site de ressources en chimie pour les enseignants [en ligne] .disponible sur : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/>. (consulté le 05/11/2018)

22. **INNOVATION FLUIDE SUPECRIQUE.** le portail des liquides supercritiques [en ligne]. Disponible sur : <http://www.supercriticalfluid.org/> . (consulté le 05/11/2018)

23. **INRS.** Mycotoxines en milieu de travail.institut national de recherche et de sécurité [en ligne].disponible sur :<http://www.inrs.fr/> (consulté le 07/11/2018)

24. **JEAN PIERRE JOUANY.**Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds.Animal Feed Science and Technology, 2007, vol.137, pp 342-362.

25. **KHALIL ALSHAWABKEH, N.I. ALKHALAILEH, ANAS ABDELQADER ;et al.** Occurrence of Aflatoxin B1 in Poultry Feed and Feed Ingredients in Jordan Using ELISA and HPLC.American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences, 2015. Vol.7, n°4, pp 316-320, ISSN 2079-2050.

26. **KORRAPATI KOTINAGU, T. MOHANAMBA ;RATHNAKUMARI L.**Assessment of aflatoxin B1 in livestock feed and feed ingredients by high-performance thin layer chromatography.Veterinary World, 2015, vol.8, pp 1396-1399.

27. **LEMING LIN , JUN ZHANG, PING WANG, YUESONG WANG, JIPING CHEN.**Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods.Journal of Chromatography A 1998,vol.815,pp. 3–20.

28. **LISA MANSELL,Abingdonhealth,** 2017.disponible sur :<<<https://www.abingdonhealth.com/>>> (consulté le 18/11/2018)

29. **LUC HUMBERT.** Extraction en phase **solide (SPE)** : théorie et applications ; 2010 , vol.22 , n°6, pp 61-68.

30. **MARTIN J. BA A. DIMANCHE P. SHILLING.R** .Comment lutter contre la contamination de l'arachide par les aflatoxines ? Expériences conduites au Sénégal , Agriculture et développement,1999. n° 23.

31. **METAPHYSIK.** apprendre comme on aime. disponible sur : <<http://metaphysik.fr>> (consulté le 18/11/2018)
32. **NOUFISSA ALUOI.** étude de la contamination fongique alimentaire et mycotoxines. pharmacie. faculté de médecine et de pharmacie Rabat, 2018, 115 p.
33. **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Notre sécurité sanitaire des aliments[en ligne].disponible sur : <http://www.who.int/fr> . (consulté le 04/11/2018).
34. **OYEKEMI O. ; AKINMUSIRE¹ ; ABDUL-DAHIRU EL-YUGUDA ; JASINI A. MUSA.et al.** Mycotoxins in poultry feed and feed ingredients in Nigeria. Mycotoxin Research, 2018.
35. **PUBCHEM.**open chemistry data base [en ligne].disponible sur <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (consulté le 04/11/2018)
36. **Reboux G.** Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques.revue française d'allergologie et d'immunologie clinique,2006,vol. 46,pp 208–212.
37. Règlement (UE) n° 574/2011 de la commission du 16 juin 2012 n° L 159 page 7 17/06/2011.
38. **SMITH T. K.AND GIRISH C. K.**Prevention and control of animal feed contamination by mycotoxins and reduction of their adverse effects in livestock.WoodheadPublishing Limited .2012.
39. **TANAY BILAL¹, DIDEM HILKAT AKSAKALE, SELIM SÜNNETCI et al.** Detection of Aflatoxin, Zearalenone and Deoxynivalenol in Some Feed and Feedstuffs in Turkey.Pakistan Veterinary Journal, 2014, vol. 34, n°4, pp 459-463, ISSN 0253-8318.
40. **THE UNIVERSITY OF ADELAID.** mycology on line [en ligne].disponiblesur : <https://mycology.adelaide.edu.au>. (consulté le 04/11/2018).
41. **TURNER, N. W., SUBRAHMANYAM, S., & PILETSKY, S. A..** Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. AnalyticaChimica Acta, 2009,vol.632, n°2,pp.168–180

42. **VERHEECKE C.** MODULATION OF AFLATOXIN B1 PRODUCTION BY *ASPERGILLUS FLAVUS*. thèse de doctorat MEGeP. toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2014, 244p.
43. **VISENUO AIKO and ALKA MEHTA.** Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. A review on mycotoxins, 2015.
44. **WEJDAN SHAKIR KHAYOON A, BAHRUDDIN SAAD A, CHEW BEE YAN ; et al.** Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. Food Chemistry, 2010, vol.118, pp 882-886.
45. **YIANNIKOURIS A., JOUANY J-P.** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Prod. Anim, 2002, vol.15, n°1, pp.3-16.
46. **ZINEDINE A., JUAN C., SORIANO J. et al.** Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. International Journal of Food Microbiology, 2007, vol.115, pp 124-127.

Résumé :

les aflatoxines sont des contaminants naturels, ils sont susceptibles d'être présents dans un large éventail d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale, ils ont un impact très significatif sur la santé publique. la présente étude a pour objectif pour déterminer la teneur en aflatoxine B1 dans les aliments de bétail et de volaille en utilisant la technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay) et les comparer avec les normes internationales. les résultats montrent un taux de contamination de **66,66%** pour l'aliment de bétail et **20 %** pour l'aliment de volaille et des moyennes de contamination de **2.55 ppb/kg** et **2.78 ppb/kg** respectivement qui ne dépassent pas les seuils réglementés . La présence des aflatoxines dans les aliments engendre l'émergence de nombreuses maladies dans le monde entier.

Mots clés : aflatoxine B1 , ELISA , aliment de bétail , aliment de volaille , LMR .

Abstract :

aflatoxins are natural contaminants, they are likely to be present in a wide range of foods for human or animal consumption, they have a very significant impact on public health. the purpose of this study is to determine aflatoxin B1 content in feed and poultry feed using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (**ELISA**) and compare them with international standards. The results show a contamination rate of **66.66 %** for livestock feed and 20% for poultry feed and average contamination of **2.55 ppb / kg** and **2.78 ppb / kg**, respectively, which do not exceed the regulated thresholds. The presence of aflatoxins in food causes the emergence of many diseases around the world.

Key words: aflatoxin B1, ELISA, livestock feed, poultry feed, MRL.

ملخص:

الأفلاتوكسين هي ملوثات طبيعية ، ومن المرجح أن تكون موجودة في مجموعة واسعة من الأطعمة للاستهلاك البشري أو في الحيواني ، ولها تأثير كبير جدا على الصحة العامة. الغرض من هذه الدراسة هو تحديد محتوى الأفلاتوكسين بي1 تغذية العلف الحيواني والدواجن باستخدام مقايصة الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم ومقارنتها بالمعايير الدولية ، وتبين النتائج تثبت وجود معدل تلوث بنسبة **66.66 في المائة** للعلف الحيواني و **20 في المائة** لعلف الدواجن ومتوسط التلوث البالغ **2.55 جزء من البليون / كيلوغرام** و **2.78 جزء في البليون لكل كيلوغرام** على التوالي ، والتي لا تتجاوز العتبات الخاضعة للتنظيم. وجود الأفلاتوكسين في الغذاء يسبب ظهور العديد من الأمراض في جميع أنحاء العالم

الكلمات المفتاحية: الأفلاتوكسين ، مقايصة الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم ، العلف الحيواني ، علف الدواجن ، LMR