

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de m'hamed bougarra Boumerdès



Faculté des Sciences

Département SNV

Mémoire de fin d'études

Présenté par

MEHDANI Fella et SEBAA Romaiassa

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN (BIOLOGIE)

Spécialité : biotechnologie microbienne

Thème

**Les aflatoxines dans l'alimentation de bétail,
Etat actuel des connaissances et stratégies de lutte.**

Soutenue publiquement le 20/11/2020

Devant le Jury composé de

M.MOKRANE Salim

Professeur

Président

MME.BOUTI Karima

MAA

Examineur

MME BENACER Sana

Directrice de laboratoire ONAB

Co promoteur

M.RIBA Amar

Professeur

Promoteur

Année Universitaire : 2019/2020

REMERCIEMENT

Avant tout, nous remercions Allah le tout miséricordieux l'unique, le puissant, maître des cieux et de la terre pour nous avoir guidé, protégé, aidé et permis de mener à bien ce travail.

C'est avec un grand plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail :

Notre responsable de formation monsieur RIBA Amar, encadreur de notre mémoire, merci pour son aide, ses conseils, la correction du manuscrit, et pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire merci surtout.

Nous remercions également chaleureusement madame BENACEUR Sana, responsable de laboratoire ONAB, encadreur de notre mémoire pour sa disponibilité, ses conseils, son enthousiasme et l'attention particulière avec laquelle elle a suivi et dirigé ce travail, son aboutissement à temps malgré qu'on a pas eu l'occasion de réaliser la partie pratique vu les mauvaises conditions sanitaires suite à la propagation du virus covid-19 dans le monde.

Nous tenons aussi à exprimer toute notre gratitude à monsieur MOKRANE Salim pour avoir accepté le président de ce jury

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à madame BOUTI Karima qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillance et nous en sommes très honorés.



Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

L'amour, le respect, la reconnaissance...Aussi, c'est

tout simplement que



Je dédie ce mémoire....





À ma très chère mère « Dalila »

Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mon très cher père « Sidali »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais.

À mes chers frères « Saad et Diaa Fddine »

Mes anges gardiens .Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À mes chères sœurs « Nouha et Farah »

Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour, Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

À mon fiancé « Hichem »

La source de grand courage tout le moment de travail, Tu as partagé avec moi les meilleurs et les difficiles moments de ma vie, t'étais toujours à mes côtés, Je te remercie de ne m'avoir jamais déçu. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect.

À mes grandes mères à mes oncles et tantes

À la mémoire de mon grand-père « Saad »

J'aurais tant aimé que tu sois présent. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde

À tout la famille MEHDANI et LAIFAOU

À mes cher cousin (e) s et ami (e) s :

*Belkiss, Oussama, Narimen, Nestine, Meriem, Rosa, Fatma zohra, Chaima, En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Et tous les étudiants de ma promotion et bien sûr mon binôme **Romaïssa**.*



À ma très chère mère «Naceta »

Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments et le respect que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée. Vous êtes la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie, et surtout vous gardé toujours à mes côtés.

À mon très cher père « Boualem »

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

À mon cher et unique frère « Mohamed »

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, te protège et te garde.

A mon fiancé « Ourati Smail »

Mon conseiller, et meilleur ami, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles.... Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

A mon grand-père « Elias » et ma tante « Fouad »

Qui m'ont accompagné par leurs douaa, leur douceur et leur soutenance, Je ne pourrai jamais assez-vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, puisse Dieu leur prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.

*Je dédie aussi ce travail a toute la famille Larid, ainsi qu'à mes copines **Nesrine, Hassna,** et **Fella** avec qui j'ai passé des moments mémorable durant ces 5 dernières années comblé de joie et de fou rire.*

SOMMAIRE

Index des tableaux

Index des figures

Liste des abréviations

Résumé

I.	Introduction à la problématique des mycotoxines	1
1.	Définition	2
	A. Mycotoxine	2
	B. Aflatoxine	2
	C. Mycotoxinogenese	2
2.	Les principales mycotoxines.....	2
	A. Aflatoxines.....	4
	B. Ochratoxines.....	4
	C. Fumonisines.....	5
	D. Zéaralénone.....	5
	E. Alcaloïdes de l'ergotduseigle.....	5
	F. Trichothécènes.....	6
	G. Patuline.....	6
2.1.	Conditions de production.....	6
	2.1.1. Facteurs extrinsèques.....	9
	2.1.1.1. Facteur physique.....	9
	2.1.1.1.1. Activité de l'eau.....	9
	2.1.1.1.2. Température.....	10
	2.1.1.1.3. Lumière.....	10
	2.1.1.2. Facteurs chimiques.....	10
	2.1.1.2.1. Acidité du milieu– pH.....	10
	2.1.1.2.2. Composition gazeuse.....	11
	2.1.1.2.3. Nature du substrat.....	11
	2.1.1.2.4. Traitement chimique du milieu.....	12
	2.1.2. Facteurs intrinsèques (biologique).....	13
2.2.	Effets sur la santé.....	13
2.3.	Analyse de mycotoxines	15
	2.3.1. Description des méthodes physico-chimiques.....	16

a.	Chromatographie sur couche mince.....	16
b.	Chromatographie liquide à haute performance.....	16
c.	Chromatographie en phase gazeuse.....	17
2.3.2.	Avantages et inconvénients.....	17
2.3.3.	Méthodes immunologiques.....	17
a)	Dosage immuno-enzymatique –TestELISA.....	17
2.3.4.	Avantages et inconvénients.....	18
2.4.	Stratégies de lutte.....	19
3.	Les champignons producteurs de mycotoxines.....	21
3.1.	Principales espèces impliquées.....	21
3.1.1.	Aspergillus.....	23
o	Aspergillus flavus,A. parasiticus et A. nomius : les aflatoxines.....	24
3.1.2.	Fusarium.....	24
o	Fusarium moniliforme:lesfumonisines.....	25
3.2.	Moyens de détection (isolement et identification).....	25
3.2.1.	Détection par des méthodes microbiologiques conventionnelles.....	25
3.2.2.	Détection analytique de la production de mycotoxines.....	25
3.2.3.	Méthodes culturelles.....	26
3.3.	Détection moléculaire des moisissures productrices de mycotoxines.....	26
4.	Les champignons producteurs d'aflatoxines.....	27
4.1.	Principales espèces impliquées.....	27
o	Aspergillus.....	27
4.2.	Isolement et dénombrement des champignons toxinogènes.....	29
4.3.	Identification des champignons toxinogènes.....	30
II.	Production de l'aliment de Bétail	31
1.	Description du processus de fabrication de l'aliment de bétail.....	33
2.	Analyse de la qualité microbiologique du produit.....	36
2.1.	Recherche et dénombrement des Microorganismes. Méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C, dans denrées alimentaires.....	37
2.2.	Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	40
3.	Stratégies d'amélioration de la qualité au niveau de l'ONAB.....	42
III.	Les aflatoxines dans la filière « Alimentation Animale»	44
1.	Introduction.....	44
2.	Cas de contamination rapportés dans la bibliographie en Algérie et dans le monde....	44
a.	En Algérie.....	44

b.	Dans le monde.....	55
b.1)	En Nigéria.....	55
b.2)	En Inde.....	59
b.3)	En Espagne.....	62
b.4)	En Croatie.....	63
b.5)	En Egypt.....	66
b.6)	En Argentine.....	71
IV.	Conclusion Générale.....	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (C.A.S.T, 1989).....	8
Tableau 2 : Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action Cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (AFSSA, 2006).....	14
Tableau 3 : Les mycotoxines produits par certains champignons et leurs substrats.....	22
Tableau 4 : les <i>Aspergillus</i> producteurs d'aflatoxines.....	29
Tableau 5 : Caractérisation morphologique des isolats d' <i>Aspergillus</i> section Flavi.....	51
Tableau 6 : Caractérisation chimique des isolats d' <i>Aspergillus</i> section Flavi.....	53
Tableau 7 : Niveaux d'aflatoxine dans les aliments pour volaille de 5 sites d'Abeokuta.....	58
Tableau 8 : Contamination naturelle de différents ingrédients d'aliments pour volaille avec des mycotoxines.....	61
Tableau 9 : Prévalence des aflatoxines dans les aliments simples et composés pendant la saison estivale dans le gouvernorat de Beni-Suef.....	69
Tableau 10 : prévalence des aflatoxines dans les aliments simples et composés pendant la saison hivernale dans le gouvernorat de Beni-Suef.....	70
Tableau 11 : Production d'aflatoxine B1 par section <i>Aspergillus</i> Souches Flavi isolées à partir du grain de brasseur.....	74
Tableau 12 : incidence d'AFB1 dans le grain de brasserie à 0 et 7 jours de stockage.....	75

Listes des figures

Figure1 : Facteurs environnementaux influençant la production des mycotoxines.....	12
Figure2 : Les différentes étapes du test ELISA.....	18
Figure3 : <i>Aspergillus flavus</i>	24
Figure4 : photomicrographie qui représente le champignon <i>Fusarium</i> sous microscope photonique.....	25
Figure5 : caractères micro-morphologiques du genre <i>Aspergillus</i>	28
Figure6 : schéma qui représente la recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophiles Totaux.....	40
Figure7 : Production d'AFB1 (ng / g) par section <i>Aspergillus Flavi</i> souches en fonction de leur chénotype.....	55
Figure8 : Prévalence des aflatoxines dans les aliments pendant les saisons d'été et d'hiver dans le gouvernorat de Beni-Suef.....	71

Liste des abréviations

AFs : les aflatoxines

OTA : ochranotoxine A

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé

FAO : L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

FB : Fumonisines du groupe B

ZEA : Zéaralénone

TCT : Trichothécènes

DON : Déoxynivalénol

NIV : Nivalénol

DAS : Diacétoxyscirpénol

a_w : activité de l'eau

pH : potentiel hydrogène

O₂: dioxygène

CO₂ : dioxyde de carbone

AFB1 : Aflatoxine B1

CCM : chromatographie sur couche mince

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

CLPG : chromatographie liquide en phase gazeuse

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI : ionisation par electrospray

CMV : condiments minéraux vitaminés

CAM : coconut agar medium

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

PDA : dextrose de pomme de terre

LCeMS / MS : Spectrométrie de masse

CRM : référence de maïs certifié

UV: Ultra-Violet.

PBS : tampon phosphate salin

Résumé

L'alimentation animale joue un rôle déterminant dans l'industrie alimentaire mondiale, malgré le succès qu'elle a connu mais elle reste toujours exposé au risque d'être infecté par des champignons toxigènes présents dans ces aliments qui peuvent avoir lieu au champ, avant la récolte ou lors de l'entreposage, certaines moisissures revêtent une importance particulière. Elles se développent notamment dans des conditions humides et chaudes et produisent des substances toxiques portant le nom de mycotoxines, et parmi les plus marquants dans la liste on trouve les aflatoxines, qui peuvent avoir des effets nocifs divers pour la santé et représenter une grave menace pour les animaux d'élevage.

Une recherche a été effectuée au niveau de l'entreprise ONAB qui nous a filé toute les informations concernant la fabrication de l'aliment, contrôle et analyse de matières premières et produits finis.

Grace aux stratégies de lutte basée sur des techniques industrielles et de détoxification qu'on a pu réduire et contrôler le taux de mycotoxines dans les produits alimentaires. Mais avant tout cela, diverses méthodes hautement spécifiques, utiles et pratiques dans le domaine agro-alimentaire ont été utilisé en Algérie ainsi que d'autres pays du monde tel que la méthode d'HPLC, CCM, CL-MS et la méthode d'ELISA afin de détecté la présence des aflatoxines dans l'aliment destiné au bétail avant d'être consommé.

Mot clés : champignon,mycotoxine, aflatoxine, *Aspergillus*, aliment de bétail.

Summary

Animal feed plays a decisive role in the global food industry, despite the success it has experienced but it still remains exposed to the risk of being infected by toxigenic fungi present in these foods can take place in the field, before the harvest or during storage, certain molds are of particular importance. They thrive in particular in humid and hot conditions and produce toxic substances called mycotoxins, and among the most prominent in the list are the aflatoxins, which can have various harmful effects on health and represent a serious threat to farm animals.

A research was carried out at the level of the ONAB Company which provided us with any details concerning the manufacture of feed, control and analysis of raw materials and finished products.

Control strategies based on industrial and detoxification techniques, have been able to reduce and control the rate of mycotoxins in agro-food products. But before all this various highly specific, useful and practical methods were carried out in Algeria as well as other countries worldwide such as HPLC, CCM, CL-MS and ELISA in order to detect the presence of aflatoxins in feed before consumption.

Keywords: fungus, mycotoxin, aflatoxin, *Aspergillus*, cattle feed.

ملخص

يلعب العلف الحيواني دورًا حاسمًا في صناعة الأغذية العالمية ، على الرغم من النجاح الذي حققته ، إلا أنه لا يزال معرضًا لخطر الإصابة بالفطريات السامة الموجودة في هذه الأطعمة والتي يمكن أن تحدث في هذا المجال ، من قبل بعض القوالب لها أهمية خاصة أثناء الحصاد أو التخزين. تزدهر بشكل خاص في الظروف الرطبة والحارة وتنتج مواد سامة تسمى السموم الفطرية ، ومن بين أكثرها بروزًا في القائمة الأفلاتوكسين ، والتي يمكن أن يكون لها تأثيرات ضارة مختلفة على الصحة وتمثل تهديدًا خطيرًا لصحة حيوانات المزرعة.

قدم لنا جميع المعلومات المتعلقة بتصنيع الأعلاف والتحكم في وتحليل المواد الخام ONAB تم إجراء بحث على مستوى شركة والمنتجات النهائية.

بفضل استراتيجيات التحكم القائمة على التقنيات الصناعية وإزالة السموم، تمكنا من تقليل مستوى السموم الفطرية في المنتجات الغذائية والتحكم فيه. ولكن قبل كل هذا، تم استخدام العديد من الأساليب المحددة والمفيدة والعملية للغاية في مجال الأغذية الزراعية في الجزائر للكشف عن وجود الأفلاتوكسين في ELISA وطريقة CL-MS و CCM و HPLC وكذلك في بلدان أخرى من العالم مثل طريقة الأعلاف المعدة للماشية قبل الاستهلاك.

الكلمات المفتاحية: الفطر، السموم الفطرية، الأفلاتوكسين، الرشاشيات، علف الماشية.

I. Introduction

Le progrès de connaissance en nutrition animale et la mécanisation ont contribué à ce développement mais de nombreuses maladies liées à l'alimentation se sont multipliées à cause de la contamination par des mycotoxines produites par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les principales mycotoxines présentant une importance sur le plan sanitaire et agroéconomique sont les aflatoxines (AFs), l'ochratoxine A (OTA), les fumonisines, certaines trichothécènes, la zéaralénone et la patuline (Hussein et Brasel., 2001 ; Creppy., 2002 ; Jarvis et Miller., 2005).

Cette contamination a été récemment reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) comme source importante de maladies d'origine alimentaire (O.M.S., 2002). L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O) estime qu'environ un quart de la production mondiale est contaminé, représentant ainsi une perte économique de 5 à 10 %.(Yiannikouris et Jouany., 2002). Outre l'impact économique, les mycotoxines posent un réel problème de santé publique. Leur contact peut donner lieu à des intoxications aiguës ou chroniques, ces dernières étant plus fréquentes. Cancérogénèse, immunotoxicité, néphrotoxicité, hépatotoxicité et neurotoxicité forment la palette des effets néfastes des toxines fongiques (Alban Gauthier.,2016). Dans ce mémoire, nous nous interrogerons sur les différents mycotoxines sécrétés par les champignons toxigènes, tout en citant quelques exemples d'aflatoxines présentes dans l'aliment de bétail, leurs moyens de détection et les différentes méthodes d'analyses ; en Algérie et dans quelques pays du monde tel que le Nigeria, l'Inde, la Croatie, l'Espagne, l'Argentine et l'Égypte, et d'un autre part nous citerons quelques nouvelles stratégies de lutte contre ces derniers afin de garantir la sécurité sanitaire des aliments contaminés que se soit avant la récolte ou pendant le stockage. Ainsi que d'établir des mesures de contrôle adéquates grâce à des programmes de surveillance nationaux bien définis, et l'application de toutes les mesures susceptibles de prévenir la contamination des animaux.

1. Définition

Le mot moisissure est un terme générique qui regroupe tous les champignons microscopiques d'aspect lévuriforme ou filamenteux (micromycètes). Ce sont des champignons ubiquistes à croissance filamenteuse. Par ailleurs, ils sont saprophytes (plus rarement parasites), c'est-à-dire qu'ils vivent aux dépens de matières organiques en décomposition en y implantant leur mycélium, qui émet alors des filaments porteurs de spores, les unités de dissémination. Ces spores sont issues d'un mécanisme de reproduction sexuée ou asexuée. Les micromycètes peuvent être bénéfiques et prendre part à la transformation de matières premières alimentaires (notamment lors de la fermentation), dans la production d'enzymes, de protéines, ou encore d'agents aromatiques. Ils peuvent aussi être utilisés dans la production de médicaments comme les antibiotiques (ex: amoxicilline), les immunosuppresseurs (ex : ciclosporine) ou les anticorps monoclonaux. Cependant, une souche employée à ces fins n'est pas nécessairement atoxique mais peut se révéler délétère dans certaines conditions. (Dupuy J.,1994).

A. Mycotoxine

Le terme Mycotoxine provient du grec ancien « *Mycos* », qui signifie champignon, et du latin « *Toxicum* » signifiant poison. Les mycotoxines sont donc des substances toxiques, sécrétées essentiellement par les micromycètes. Ce sont plus précisément des métabolites dits secondaires, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas indispensables au fonctionnement des champignons. Ils résultent de la dégradation de métabolites primaires rassemblant les sucres, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques, qui eux participent à la nutrition et à la croissance d'un organisme. (Pfohl-Leszkowicz A., 1999) Elles sont, chez l'animal et l'humain qui en consomment, à l'origine d'effets biologiques nocifs regroupés sous le terme de mycotoxicoses. Environ 25 % des produits alimentaires seraient contaminés par des toxines fongiques. On estime entre 200 000 et 300 000 le nombre d'espèces composant la mycoflore. Il existe donc une grande diversité de mycotoxines. Sur plus de 400 mycotoxines recensées, seule une trentaine de molécules possède des propriétés toxiques inquiétantes. (Mannon J, et al, 1985)

Certaines de ces toxines sont supposées cancérogènes ou mutagènes, tandis que d'autres sont toxiques pour les reins, le système nerveux ou encore le foie. Par ailleurs, il convient de noter que la toxicité ne provient pas forcément de la mycotoxine elle-même, mais peut être due à l'un de ses métabolites issus de sa dégradation (Alban Gauthier., 2016).

B. Aflatoxine

Les aflatoxines sont des substances toxiques produites par certains types de champignons (moisissures) présents naturellement partout dans le monde; elles peuvent contaminer les cultures alimentaires et constituent une menace grave pour les humains et le bétail. 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.

C. Mycotoxinogenese

La mycotoxinogénèse, c'est-à-dire les conditions de synthèse et d'excrétion des mycotoxines, est un phénomène d'une grande complexité. Mais les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique.

2. Les principales mycotoxines

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires ne jouant pas de rôle avéré dans les réactions physiologiques du champignon. Le métabolisme primaire, amenant à la production de glucides, lipides et protides, est commun à toutes les espèces de mycètes. Le métabolisme secondaire diffère du primaire par sa dépendance aux conditions extérieures (température, pH, Aw...) et à l'espèce considérée. (Yiannikouris A, Jouany J.P., 2002.) Il n'est pas directement lié à l'activité cellulaire. L'absence de mycotoxines n'entraîne pas la mort du champignon mais peut limiter sa survie ou sa croissance. Le rôle des toxines fongiques est d'améliorer la compétitivité des champignons qui les produisent : communication entre champignons, moyen de défense, chimiotactisme des insectes favorisant la dissémination des spores. Plusieurs mécanismes peuvent amener à l'élaboration de toxines:

- En contaminant un végétal, le mycète entraîne une augmentation des réactions métaboliques de la plante, conduisant ainsi à l'augmentation importante de teneur d'une molécule habituelle, ou à la formation d'une toxine normalement absente de la plante.
- Le champignon transforme un composé peu ou non toxique en composé toxique : ainsi, par le biais d'une bioconversion, l'acide coumarique devient du dicoumarol, un puissant anticoagulant.
- Dans le dernier cas, la toxine est un pur produit du champignon (Le Bars J., 1988).

Les principales mycotoxines sont :

A. Aflatoxines

La « maladie X du dindon », qui a sévi en Angleterre au début des années 1960, a permis de mettre en lumière l'existence des toxines de moisissures. Le terme d'Aflatoxine (AF) a été attribué à ces toxines en référence à *Aspergillus flavus* (abrégié en *A. flavus*), premier champignon identifié comme étant responsable de la sécrétion de ces toxines (Asao T, et al .,1963)

B. Ochratoxines

L'Ochratoxine A (OTA) a été isolée pour la première en 1969 par des chercheurs sud-africains à partir de souches d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe K.J, et al, 1956.). À ce jour, neuf Ochratoxines ont été identifiées. De toutes les Ochratoxines c'est l'OTA qui est la plus toxique de toutes les Ochratoxines connues (Chritensen C.M,etal ., 1973).

C. Fumonisines

Le groupe des Fumonisines est constitué d'une quinzaine de molécules différentes, réparties en 4 groupes : les Fumonisines A, B, C et P. Elles ont été identifiées assez tardivement en 1988 (Bezuidenhout S.C, et al., 1988). Elles sont souvent à l'origine d'atteintes du système nerveux chez les équidés consommant de l'avoine et du maïs contaminés par des moisissures du genre *Fusarium*. Ce groupe de toxines fait partie des Fusariotoxines, toxines produites par *Fusarium spp*. Les Fumonisines les plus fréquemment rencontrées sont les Fumonisines du groupe B(FB).

D. Zéaralénone

La Zéaralénone (ZEA) ou Toxine F-2, mycotoxine à action oestrogénique, a été isolée pour la première fois en 1962 à partir de maïs contaminé par le champignon *Gibberella zeae* (Stob M, Baldwin R.S, et al., 1962), la forme téléomorphe de *Fusarium graminearum*.

E. Alcaloïdes de l'ergot du seigle

Le terme « alcaloïde » désigne, de manière générique, un ensemble de molécules azotées et le plus souvent hétérocycliques. Elles proviennent majoritairement du métabolisme des végétaux et des champignons. Ce sont des métabolites secondaires issus de la voie des acides aminés. Les alcaloïdes de l'ergot forment un groupe qui comprend une quarantaine de molécules, toutes isolées de sclérotés de champignon du genre *Claviceps* (schar dl C, et al.,2006).

F. Trichothécènes

Le groupe des Trichothécènes (TCT) est composé de plus de 160 molécules. L'intérêt des TCT a augmenté après la Seconde Guerre Mondiale : en effet, leur utilisation dans des armes chimiques en Iran et en Afghanistan a été suspectée (AFSSA, Mars 2009.). Les TCT font partie des Fusariotoxines, mycotoxines produites essentiellement par le genre *Fusarium*. Les TCT les plus répandus sont le Déoxynivalénol (DON), ou Vomitoxine, le Nivalénol (NIV), le Diacétoxyscirpénol (DAS), la Toxine T-2 et la Toxine HT-2.

G. Patuline

La Patuline a été identifiée pour la première fois en 1943 dans des cultures d'*Aspergillus clavatus* (Creppy E. E, *et al.*, 1983.), puis isolée pour la première fois à partir de colonies de *Penicillium griseofulvum* (aussi nommé *Penicillium patalum*) et de *Penicillium expansum*. Elle reçut pour cette raison plusieurs dénominations : Clavacine, Claviformine, Clavitine, Expansine, Pénicidine... Ses propriétés antibiotiques envers les bactéries à Gram négatif et à Gram positif ont conduit la Patuline à être utilisée initialement en médecine humaine et vétérinaire. Son utilisation est aujourd'hui suspendue en raison de sa neurotoxicité.

2.1. Conditions de production

La formation de mycotoxines peut s'effectuer à tous les stades, depuis le champ jusqu'au produit commercialisé consommé par l'homme ou l'animal. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales mais aussi les fruits (dont les noix, les amandes, les arachides etc.), les fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés issus de ces filières et destinés à l'alimentation humaine et animale (Tableau 1). Comme les mycotoxines sont peu métabolisées par les organismes

vivants, elles peuvent également se transmettre via les produits d'origine animale (lait et produits laitiers, abats, charcuterie, etc.) (Pitt., 2000). Les mycotoxines possèdent des structures chimiques leur conférant une bonne stabilité et de ce fait, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire totalement (Scott, 1984; Park., 2002).

Le métabolisme secondaire, dont les mycotoxines sont issues, se distingue du métabolisme primaire par la grande diversité des composés formés et par la nature aléatoire de son activation et la spécificité des espèces et des souches impliquées. Du point de vue écologique, deux groupes de champignons toxigènes peuvent être distingués (Christensen et al., 1977):

- ✚ Les champignons de « champs » qui contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte, principalement *Fusarium* et *Alternaria*, mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des régions à climat chaud.
- ✚ Les champignons de « stockage » (*Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Des champignons du sol ou des débris de plantes peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions sont favorables. Toutefois, certaines mycotoxines, formées principalement au cours de la conservation, peuvent apparaître parfois avant la récolte. C'est le cas des aflatoxines dans l'arachide, le maïs et le coton.

Le profil et la quantité de mycotoxines produites est un phénomène complexe qui dépend non seulement des espèces fongiques et des souches qui les produisent (Lacey., 1986), mais aussi de l'interaction de nombreux facteurs incluant la composition du substrat, l'humidité, la température, l'aération et les interactions entre les autres microorganismes (C.A.S.T., 2003). Actuellement, il est impossible de dégager des lois générales de latoxinogénèse.

Tableau 1. Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (C.A.S.T, 1989).

Denrées	Espèces toxiques contaminantes	Mycotoxines contaminantes
Blé, farine, pain, maïs et chips	Aspergillus flavus, A. ochraceus, A. versicolor, Penicillium citrinum, P. citreoviride, P. cyclopium, P. martensii, P. patulum, P. pubertum et Fusarium moniliforme.	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, acide pénicillique et patuline.
Arachides et noix.	Aspergillus flavus, A. ochraceus, A. versicolor, Penicillium citrinum, P. expansum et P. cyclopium.	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, trichothécènes, cytochalasines et patuline.
Pommes et produits dérivés.	Penicillium expansum.	Patuline.
Tourte à la viande, viande cuite,	Aspergillus flavus, Penicillium viridicatum, P. roquefortii,	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, patuline

fromage, cacao et houblon.	<i>P. patulum</i> et <i>P. commune</i> .	et acide pénicillique.
Viandes, porc salé et fromage.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> et <i>P. cyclopium</i> .	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique et pénitrème.

Parmi les facteurs affectant la production de mycotoxines dans une denrée, il faut distinguer les facteurs intrinsèques liés à la souche fongique et les facteurs extrinsèques constitués par l'ensemble des conditions écologiques (facteurs environnementaux).

2.1.1. Facteur extrinsèque

2.1.1.1 Facteurs physiques

2.1.1.1.1 Activité de l'eau

- ✓ l'activité de l'eau reflète la quantité d'eau disponible dans une substance liquide ou solide. Elle permet de rendre compte de la quantité d'eau « libre », indispensable aux réactions biochimiques d'un micro-organisme. L' A_w permet de donner des informations importantes sur la stabilité physico-chimique d'un produit et sur son innocuité microbiologique.
- ✓ La valeur de l'activité de l'eau s'établit de 0 à 1, dont l'activité optimale pour la plupart des espèces fongiques est comprise entre 0,85 et 0,99. Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont la capacité de se multiplier à des A_w inférieurs à 0,75 et pour une température de 25°C (Lesage-MeesenL,et

al., 1998.). Elles font partie des espèces xérophiles que l'on retrouve dans les produits pauvres en eau (céréales, fruits secs...), notamment au moment de la phase de stockage. En revanche, quelques espèces de *Fusarium* exigent un *Aw* supérieur à 0,98 (Castegnaro M, et *al.* , 2002.). Il s'agit de moisissures de champs qui se développent sur les plantes endommagées ainsi que dans les milieux riches en eau.

2.1.1.1.2 Température

La température est un facteur prépondérant de la croissance des micromycètes et donc de la production de toxines. Elle est intimement liée à l'activité de l'eau. De même que pour l'*Aw*, la température idéale de croissance d'un champignon ne correspond pas à celle de la toxine. De manière générale, elle est supérieure à la température optimale de la toxinogénèse. (Norholt M.D, et *al.*, 1979).

2.1.1.1.3 Lumière

Bien que l'impact de la lumière n'ait pas été démontré sur la croissance des moisissures, il semblerait tout de même qu'elle intervienne sur la germination des spores, favorisant de ce fait la dissémination fongique (Tabuc Cristin., 2007.). Certaines espèces ne peuvent pas se passer de lumière tandis que d'autres la fuient : chez *Verticillium agricinum*, l'exposition prolongée aux rayons ultraviolets peut limiter la croissance voire provoquer la mort du mycélium.

2.1.1.2. Facteurs chimiques

2.1.1.2.1 Acidité du milieu -pH

Le potentiel hydrogène (ou pH) reflète l'activité chimique des ions hydrogènes (protons) en solution. Il permet de déterminer si une solution est acide ou alcaline. L'échelle de pH est basée sur le pH de l'eau pure à 25°C :

- Elle est **neutre** lorsque son pH est égal 7,
- Elle est **basique** si le pH est supérieur à 7,

- Et elle est **acide** si le pH est inférieur à 7.

Les moisissures peuvent croître dans une gamme de pH allant de 3 à 8, leur pH optimal de croissance étant plutôt situé entre 5 et 6. Les aliments (en particulier les fruits et les légumes) ayant un pH inférieur à 6, se trouvent être des cibles privilégiées de l'infestation fongique. (Blackwell B.A, et *al.*, 1994)

2.1.1.2.2. Composition gazeuse

La disposition O₂/CO₂ est une ressource sélective pour la croissance fongique. La majeure partie des micromycètes est aérobie, c'est-à-dire que ces champignons ont besoin d'oxygène, sous la forme de dioxygène (O₂), pour pouvoir se développer. Certains peuvent vivre en anaérobiose, comme *Byssochlamys nivea*, que l'on retrouvera plus en profondeur dans les denrées car moins exigeante (Paster N, et *al.*, 1988). La production de toxines fongiques est plus sensible à la variation de composition gazeuse que la croissance fongique. Une concentration en O₂ inférieure à 1 % et des concentrations élevées de dioxyde de carbone (CO₂) empêchent la synthèse de toxines.

2.1.1.2.3. Nature du substrat

Les nutriments, dont les champignons ont besoin pour pousser, sont élémentaires et proviennent de matières organiques en décomposition. Les enzymes catabolisent le substrat pour former les nutriments requis, qui seront ensuite absorbés au travers des membranes cellulaires des moisissures. Ces molécules sont des sucres simples, des fractions d'amidon, des peptides et des substances carbonées (comme les acides aminés). Les moisissures ne sont pas capables de proliférer sur n'importe quel substrat (Madhyastha S.M, et *al.*, 1990.). Dans certaines conditions, elles peuvent se développer sur des matières inorganiques (polymères, métaux), à condition que celles-ci présentent des résidus de matières organiques.

2.1.1.2.4. Traitement chimique du milieu

L'action des pesticides est intéressante puisqu'ils sont abondamment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation des aliments et le contrôle de l'apparition de maladies végétales. S'ils sont utilisés avec succès, le risque d'apparition de mycotoxines est faible. Cependant, il a été démontré qu'à des concentrations sub-létales (proches de celles qui provoquent la mort), la synthèse de certaines mycotoxines est facilitée (Moss M.O, et al., 1987.). Par exemple, la mauvaise maîtrise de l'utilisation d'acide propionique dans l'orge entraîne une augmentation de la production d'Aflatoxine B1 (AFB1), tandis que la croissance d'*Aspergillus flavus* est réduite (Al-Hilli A.L, et al. , 1979.). L'utilisation de fongicides doit donc être judicieuse.

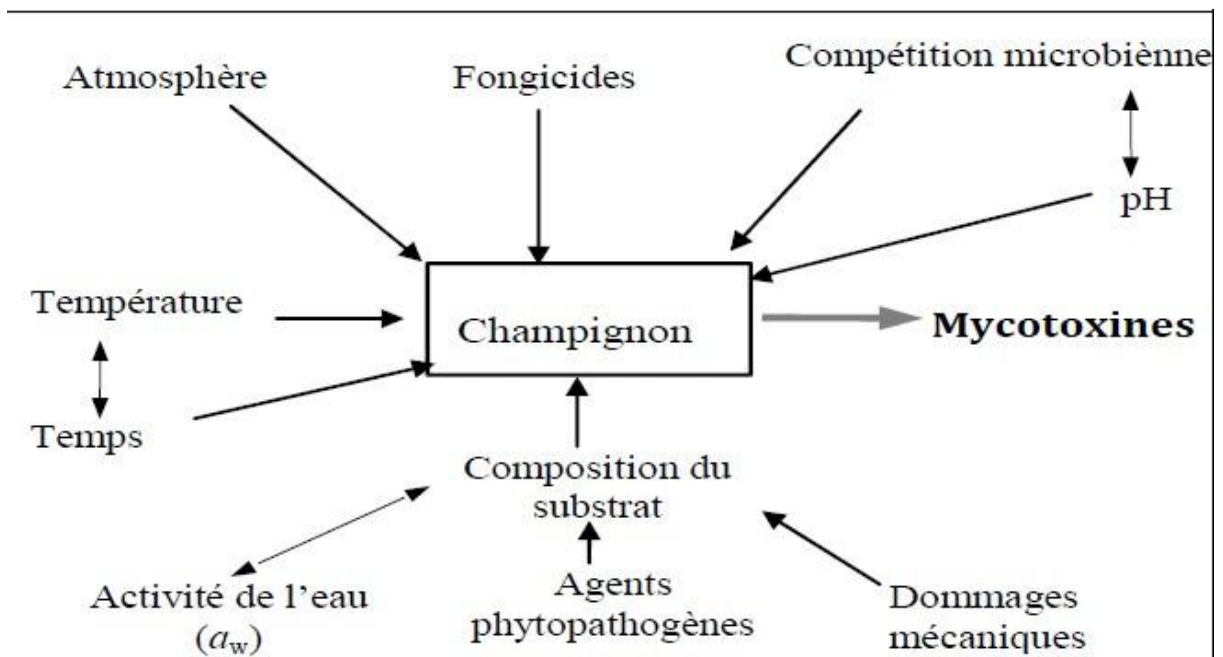


Figure 1 : Facteurs environnementaux influençant la production des mycotoxines.

2.1.2. Facteurs intrinsèques (biologique)

Le métabolisme secondaire n'est pas commun à toutes les espèces fongiques, mais spécifique d'une espèce, voire même d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques. Au sein d'une même espèce toxigène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. Certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques. D'autres sont, au contraire élaborées par des espèces appartenant à des genres différents. Ainsi, l'ochratoxine A (OTA) et la patuline sont produites par *Penicillium* et *Aspergillus*. Inversement, plusieurs mycotoxines peuvent être produites par une même espèce fongique selon le substrat utilisé et les facteurs environnementaux (ex. : aflatoxines, acide cyclopiazonique, aspertoxine, etc., produites par *Aspergillus flavus*). La fréquence des souches toxigènes dépend de l'espèce fongique considérée, de la distribution du potentiel toxigène au sein de l'espèce et parfois du substrat d'origine et de la région.(Riba Amar.,2008).

2.2. Effets sur la santé:

Les mycotoxines sont des molécules très toxiques pour l'Homme et l'animal. La palette de leurs effets toxiques est très étendue : effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotoxiques, etc.

Les organes et tissus cibles sont très divers : foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines, etc., où des lésions organiques irréversibles peuvent être produites.

Contrairement aux toxines bactériennes dont les effets sont immédiats (souvent entre 12 et 36 h après ingestion des aliments contaminés), les mycotoxines ont des effets insidieux, qui se manifestent à plus ou moins long terme (quelques mois à quelques années). Les articles faisant le point sur les effets néfastes des mycotoxines sont nombreux (Peraica *et al.*, 1999 ; Hussein et Brasel., 2001 ; Bennett et Klich., 2003).

Certaines toxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent oestrogéniques (zéaralénone), immuno/hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (patuline). Le tableau 2 résume les effets des principales mycotoxines. Certaines d'entre elles sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes. En outre, plusieurs mycotoxines peuvent être présentes dans le même produit ou la même ration alimentaire.

Tableau 2 : Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action Cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (AFSSA., 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaire et Moléculaire
Aflatoxine B1+ M1	Hépatotoxicité. Génotoxicité. Cancérogénicité. Immunomodulation.	Formation d'adduit à l'ADN. Péroxydation lipidique. Bioactivation par le cytochrome P450. Conjugaison aux GS-transférases.
Ochratoxine A	Néphrotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP. Détoxification par les peptidases.
Patuline	Neurotoxicité. Mutagenèse invitro.	Inhibition indirecte d'enzymes. Liaison aux récepteurs oestrogéniques.

Zéaralénone	Fertilité et reproduction.	Bioactivation par des réductases. Conjugaison aux glucuronyltransférases.
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central. Hépatotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Inhibition de la synthèse de céramide. Altération du rapport sphinganine/sphingosine. Altération du cycle cellulaire.

2.3. Analyse des mycotoxines

Les mycotoxines étant présentes à l'état de traces dans les aliments et matières premières étudiés, il est indispensable d'avoir recours à des méthodes d'analyse extrêmement performantes. Qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, ces méthodes reposent le plus souvent sur le principe de séparation chromatographique, couplée à des procédés de détection comme la fluorimétrie, la spectrophotométrie ou la radiodétection (Pfohl-Leszkowicz A, 1999.). Les méthodes physico-chimiques comme la « chromatographie sur couche mince » (CCM), la « chromatographie liquide à haute performance » (CLHP) et la « chromatographie liquide en phase gazeuse » (CLPG) permettent la quantification des composés. Des méthodes plus récentes et plus rapides sont fondées sur des principes immunochimiques comme le test ELISA (Alban Gauthier.,2016.).

2.3.1. Description des méthodes physico-chimiques

a) Chromatographie sur couche mince

La CCM est une technique couramment utilisée pour séparer des composés, dans un but analytique ou de purification. On utilise une plaque en verre couverte d'une fine couche de gel de silice, cette fine couche de matériaux absorbant constitue la phase stationnaire, la plaque est ensuite plongée dans une phase mobile liquide (éluant), composée d'un solvant qui va obliger les molécules à se séparer le long de la phase stationnaire. Cette méthode est fondée sur les différences d'affinité des composés vis-à-vis des deux phases (Images libres de droits). Elle permet la séparation et le dosage simultanés de plusieurs toxines.

b) Chromatographie liquide à haute performance

Dans ce procédé, l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire de faible granulométrie (Plus les grains sont petits, et plus la surface de contacts entre les deux phases est élevée ce qui impose une haute pression.

La HPLC est préférée à la CCM en raison de ses bons facteurs de sensibilité, détectabilité et spécificité. En revanche, la CLHP reste la méthode chromatographique la plus coûteuse.

c) Chromatographie en phase gazeuse

La CPG s'applique aux composés gazeux. Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent He ou N₂) contenant la phase stationnaire. Il est ensuite transporté à travers cette colonne à l'aide d'un gaz vecteur (phase mobile). Les différents composés du mélange vont se séparer et sortir de la colonne, les uns après les autres, suivant leur affinité avec la phase stationnaire. La CPG est peu utilisée car elle impose de volatiliser la molécule à analyser. Cependant, elle présente l'avantage d'être aisément associée à la spectrométrie de masse, qui facilite l'identification de la molécule (Jeunot B.,2005).

2.3.2. Avantages et inconvénients

La chromatographie permet la séparation, les analyses, et la purification précises ainsi que de détecter spécifiquement de faibles taux de toxines fongiques. Son champ d'application est vaste ; cette méthode peut aussi bien être mise en œuvre pour l'analyse des matières premières que pour celle du produit fini. Contrairement au test ELISA, il n'y a aucune possibilité de faux négatif (toxine présente mais non détectée) ou de faux positifs (toxine absente mais obtention de résultats positifs). Cependant son coût important, l'appareillage complexe (imposant un personnel qualifié) et la durée des analyses (délai de plusieurs jours) sont autant de paramètres qui freinent son utilisation (Jeunot B, 2005 ; Grosjean F, *et al.*,2002).

2.3.3. Méthodes immunologiques:

a) Dosage immuno-enzymatique - Test ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA est principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence de protéines, d'anticorps ou d'antigènes, dans un échantillon.

Le test ELISA est une technique utilisant un ou deux anticorps (figure 02). Un de ces anticorps est spécifique de l'antigène recherché (par exemple une toxine fongique), tandis que l'autre réagit aux complexes immuns formés (complexes antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cette enzyme permet de catalyser une réaction qui libère un substrat chromogène ou fluorogène, capable de colorer le milieu. Cette coloration, proportionnelle à la quantité de toxines contenues dans l'échantillon, pourra ensuite être appréciée par fluorimétrie ou colorimétrie.

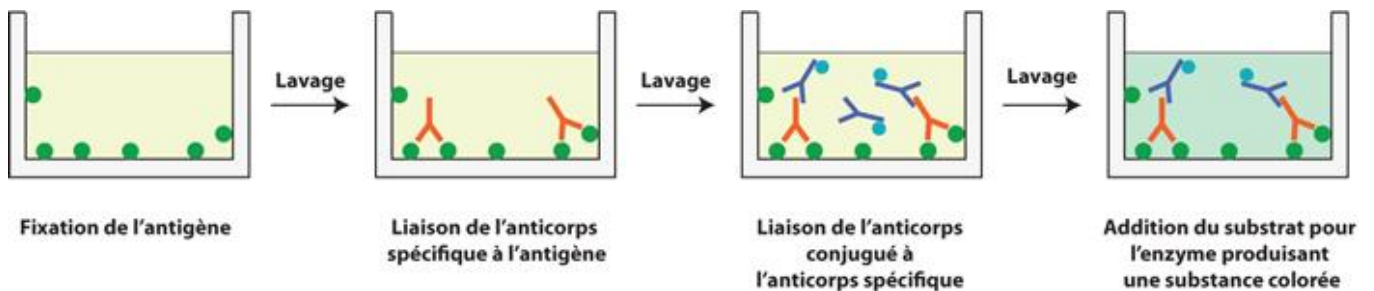


Figure 2 : Les différentes étapes du test ELISA (BiOutils: l'interface de l'Université de Genève pour soutenir l'enseignement des sciences de la vie)

C'est un outil efficace, Elle est notamment utilisée pour le dépistage du VIH. Il a également des applications dans l'industrie alimentaire, dans la détection d'allergènes comme les œufs, les arachides (Jeunot B., 2005.).

2.3.4. Avantages et inconvénients

Le test ELISA est une méthode rapide, peu coûteuse et présentant une bonne sensibilité. De plus, les résultats du dosage sont obtenus après un court délai de quelques heures (3 à 24 heures). En revanche, elle ne permet pas d'évaluer une contamination multiple car elle ne peut permettre le dosage que d'une seule toxine à la fois. Bien que ce soit une méthode fiable, le risque de résultats faux positifs demeure non négligeable (Jeunot B., 2005.).

2.4. La lutte contre les mycotoxines

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, les récoltes contaminées par les mycotoxines représenteraient un quart de la production totale du Globe (Pfohl-Leszkowicz A., 1999). À l'heure où la production de denrées agricoles n'est pas suffisante pour subvenir aux besoins de l'ensemble de la population mondiale, le choix de la destruction des aliments contaminés n'est pas évident.

Il n'existe pas de solution unique dans la lutte contre les mycotoxines. Il est important de prendre en compte diverses stratégies pour garantir la sécurité sanitaire des aliments vis-à-vis de la présence de mycotoxines dans les aliments, qui consiste à appliquer les règles pratiques permettant de limiter la survenue de ces contaminants, ainsi que la maîtrise des étapes pré-récolte, post-récolte et de stockage permet de réduire la contamination (Lacey., 1989).

Avant la récolte

- Choix du cultivar:

La lutte contre l'apparition de moisissures au champ repose sur le choix de la variété de la plante cultivée. Période de floraison, vitesse de floraison, hauteur des tiges, résistance naturelle aux micromycètes, et adaptation aux conditions climatiques sont autant de facteurs permettant de prévenir une contamination fongique au champ. En effet, les cultivars arrivant rapidement à maturité permettront une récolte plus rapide. Cette récolte aura pour conséquence :

- Diminuer l'humidité des grains.
- Eviter la progression d'une éventuelle maladie et une trop importante production de

toxines (Jeunot B.,2005).

- Modifications génétiques

Elles permettent d'obtenir ou de sélectionner des plantes naturellement résistantes aux maladies fongiques, on parle alors d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM). Le second intérêt des manipulations génétiques est de permettre l'obtention de plantes résistantes aux insectes nuisibles. Car les dommages engendrés par ces derniers créent des lésions qui favorisent

l'introduction et la croissance fongiques dans les grains (Boudra H, *et al.*, 2007 ; Sinha A.K., 1994.).

- Utilisation de fongicides.

Il est également possible d'avoir recours à des traitements fongicides pour prévenir l'apparition de moisissures. Toutefois, leur utilisation est délicate et leurs résultats aléatoires.

En effet, les champignons vivant en symbiose avec la plante, la disparition d'une moisissure peut permettre le développement d'une autre moisissure insensible au fongicide utilisé (Jeunot B., 2005.).

- Utilisation de souches fongiques moins toxigènes

Le principe est de combattre « le mal par le mal », en favorisant la compétition entre les moisissures de champs et d'autres micro-organismes peu, voire non toxigènes. Ces derniers, introduits dans le sol, vont pouvoir se développer grâce aux nutriments présents, au détriment des moisissures toxigènes. On parle de phénomène d'exclusion compétitive (Galtier P, Draggaci S., 2011.).

- Bonnes pratiques culturale

- La semaison, tout comme la récolte, doivent être effectuées à une période précise afin d'esquiver le stress de la plante causé par les périodes de chaleur et de pluies, tels que les mois de juin et juillet (Delos M, *et al.*, 2014.).

- La rotation des cultures est dans ce cas un élément important (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Il faut souligner que les plantes stressées sont plus susceptibles à la contamination par les moisissures et lesmycotoxines.

- Réduire autant que possible la présence d'inoculum à proximité de la plante en éliminant tous les résidus des cultures récoltées (Pfohl-Leszkowicz.,1999).

Pendant le stockage

- Le choix de la période de stockage est primordial. Elle doit être effectuée le plus tôt possible, de manière à éviter une éventuelle apparition d'*Aspergillus* et de *Fusaria* qui se développent assez rapidement dans des conditions de forte humidité (Pageau D, Filion P., 2016.) En général, l'activité de l'eau (*aw*) doit être inférieure ou égale à 0,70 ce qui correspond à une teneur en eau d'environ 14% pour les grains de céréales (maïs, blé, etc.) et 7,0% pour les arachides à une température de 20°C (Lillehoj et Elling., 1983).
- La température joue également un rôle déterminant dans le développement fongique ainsi que dans la mycotoxinogénèse. Cependant, les conditions optimales de température et d'humidité relatives pour la croissance fongique diffèrent de celles optimales pour la mycotoxinogénèse (Steyn, 1984, et *al.*, 2004). La surveillance de l'évolution de la température au cours du stockage peut être révélatrice du développement de moisissures. Une variation de 2 à 3°C de la température peut être le signe d'un développement microbien.
- L'état physique du grain et la température au moment de la récolte, peuvent influencer le développement des moisissures et la formation de mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Molinié et Pfohl-leszkowicz, 2002 ; Magan et Aldred, 2005; Scudamore, 2005).

3. Les champignons producteurs de mycotoxines

3.1. Principales espèces impliquées

Les champignons producteurs de mycotoxines dans les denrées se classent grossièrement en deux groupes : ceux qui se développent avant la récolte, appelés communément champignons de terrain, et ceux qui apparaissent uniquement après la récolte, appelés champignons des stocks. Les mycotoxines peuvent être présentes alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de microflore, soit du fait de traitements technologiques.

En effet, lorsqu'elles sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile, par conséquent, ces molécules ne sont pas détruites au cours d'un stockage prolongé et sont souvent résistants aux traitements thermiques ou chimiques. Toutefois, la présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe. Cependant ; plusieurs facteurs d'ordre biologique, physique et chimique conditionnent la mycotoxinogénèse .La nature et la quantité des mycotoxines produites dépend des espèces fongiques, des conditions écologiques et de la stabilité de ces toxines dans les milieux alimentaires (Bouguerra, N. Khelfane, M.,2008).

Tableau 3 : Les mycotoxines produits par certains champignons et leurs substrats

Groupe de mycotoxines	Mycotoxines	Conditions d'apparition	Moisissures	Substrats
Aflatoxines	Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Climats tropicaux et subtropicaux	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus Flavus</i>	Arachide, maïs, sorgho
Ochratoxines	Ochratoxines A, B, C et D	<ul style="list-style-type: none"> • Climats frais et tempérés • En cours de stockage 	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Maïs, orge

Zéaralénone	Zéaralénone	Moisissures Ubiquistes	<i>Fusarium</i>	Maïs, blé, sorgho
Fumonisines	Fumonisines	Climats tempérés et climats chauds	<i>Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum et Fusarium sp.</i>	Maïs, orge, blé, avoine

3.1.1 *Aspergillus*:

Le nom *Aspergillus* est donné à un genre de champignons imparfaits (deutéromycètes), et appartient à la classe des Ascomycètes (ordre des Eurotiales, famille des Trichocomacées pour plusieurs espèces d' *Aspergillus*, le stade parfait demeure inconnu.

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, de type moisissure, dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le thalle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule.

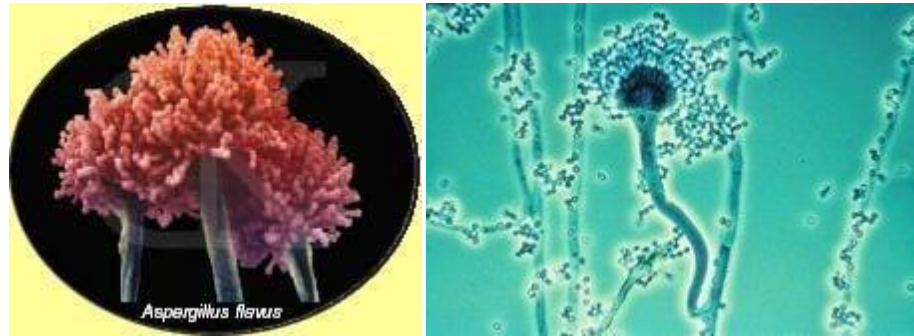


Figure 3: *Aspergillus flavus* (Department of Health and Human Services, Center for disease control)

✓ ***Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* : les aflatoxines**

Lors de la croissance saprophyte des *Aspergillus*, ils produisent des millions de spores qui sont véhiculées par l'air et sont inhalées par tous les individus. À cause de leurs petites tailles, les spores atteignent tous les compartiments du poumon (Bouguerra, N. Khelfane, M., 2008).

Les conditions les plus favorables pour une croissance et une production optimales en aflatoxine par *A. flavus* sont une activité en eau relativement faible de 0,84 à 0,86 ainsi qu'une température élevée entre 25 et 40°C.

Trois souches d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser l'aflatoxine. Il y a *A. flavus* qui produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2. *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1, G2). Enfin, *A. nomius*, une espèce rare proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines (Bouguerra, N. Khelfane, M., 2008).

3.1.2. *Fusarium* :

Le nom *Fusarium* est donné à un genre de champignons imparfaits (deutéromycètes). Les formes parfaites (téleomorphes) de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes (ordre des Hypocryales, famille des Nectriacées, genres *Gibberella*, *Calonectria*, et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le

stade parfait demeure inconnu. Dans ce genre, plusieurs espèces causent une maladie des plantes, dite « fusariose ». Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies. Impacts agro-économiques ces champignons infectent de nombreuses céréales, graminées et autres plantes, et ils survivent dans les graines, dans les résidus de culture et dans le sol. À l'automne, favorisé par les sols humides, ils envahissent le collet, les racines ou les gaines foliaires. Au printemps, ils sont favorisés par les sols secs et la forte concentration d'engrais. Les lésions continuent de s'étendre, donnant lieu à la pourriture du collet, de la tige et des racines.



Figure 4 : photomicrographie qui représente le champignon *Fusarium* sous microscope photonique (bibliothèque d'images de santé publique du CDC)

✓ *Fusarium moniliforme*: les fumonisines

Il s'agit d'un groupe d'une quinzaine de mycotoxines qui apparaissent fréquemment sur le maïs, souvent au même temps que d'autres types de mycotoxines telle que *A. flavus*. Elles n'ont été identifiées que tardivement, au milieu des années 1980, bien que leurs effets, sur les chevaux notamment, soient connus depuis plus de 150 ans (Bouguerra, N. Khelfane, M., 2008).

3.2. Moyens de détection

Il existe des méthodes rapides qui permettent la détection des champignons producteurs de mycotoxines tels que :

3.2.1. Détection par des méthodes microbiologiques conventionnelles

Cette méthode comprend l'échantillonnage, la culture, l'isolement et la caractérisation de la production de mycotoxine, ainsi que l'extraction de la toxine, les procédures de nettoyage et enfin l'analyse des mycotoxines qualitativement ou quantitativement (Yeni et al., 2014).

3.2.2. Détection analytique de la production de mycotoxines

La méthode dans laquelle la procédure d'échantillonnage est la plus grande source de test de

variance des mycotoxines et l'étape définitive de généralité pour obtenir des résultats fiables (Köppen et al., 2010). Plusieurs facteurs déterminent la difficulté de préparer un échantillon représentatif tel qu'une taille de particule ou le nombre de particules dans la masse ou la complication des milieux de culture ou les modèles alimentaires (Whitaker et al., 2009). Ces facteurs rendent impossible la détermination de toutes les mycotoxines. (Shephard et al., 2013).

3.2.3. Méthodes culturelles

Par :

- Fluorescence bleue ; en utilisant soit des milieux solides, tels que CAM et PDA, soit des milieux liquides, comme le milieu APA ; les résultats obtenus par coupe a de petits bouchon de colonie ont été identifié sous lumière UV à ondes longue (365nm) (Rodrigues et al., 2007).
- Changement de couleur induit par la vapeur d'hydroxyde d'ammonium (Saito and Machida., 1999).

3.2.4. Détection moléculaire des moisissures productrices de mycotoxines

La technique alternative utilisée pour détecter les gènes est impliquée dans la biosynthèse des métabolites par des méthodes basées sur les acides nucléiques et donne une caractérisation des moisissures et des mycotoxines pour la détection des moisissures productrices de mycotoxines dans les aliments (CAST, 2003). Les techniques basées sur la PCR font partie de ces méthodes.

Récemment, de nouvelles techniques moléculaires, comme la LAMP, sont utilisées comme exemple de cette méthode (Notomi et al., 2000).

4. Les champignons producteurs d'aflatoxines

4.1.Principales espèces impliquées

✓ Aspergillus

Le genre *Aspergillus* est classé dans la division des Deutéromycètes. De même que pour les *Penicillia*, certaines formes sexuées d'*Aspergillus* spp sont connues et appartiennent à la division des Ascomycètes, dont les genres les plus notables sont *Eurotium* et *Emericella*. Environ 180 espèces, réparties en 18 groupes, composent le genre *Aspergillus* (**Gams W, et al.** 1986.). Sur ces 180 espèces, une vingtaine est pathogène pour l'animal.

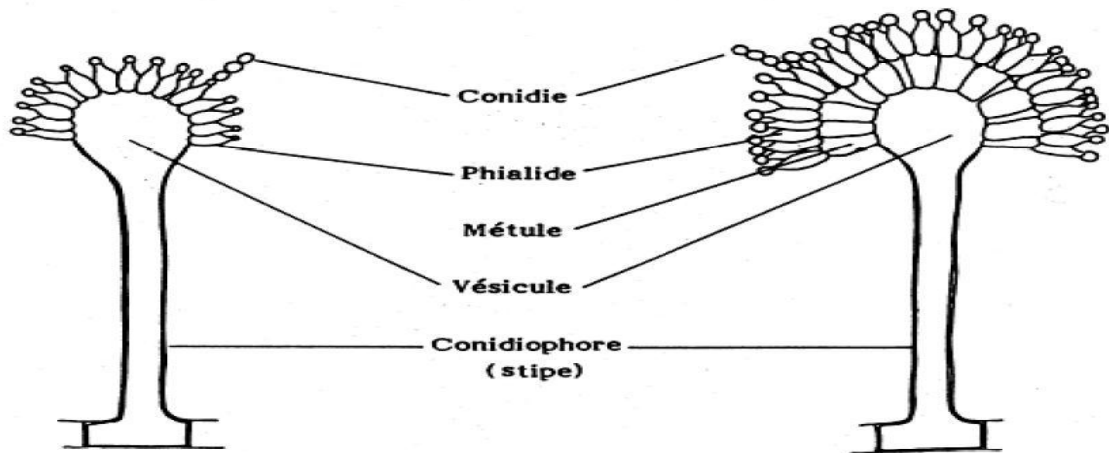


Figure5 : caractères micro-morphologiques du genre *Aspergillus* (GUIDEnR, Haute Qualité Environnementale)

Les *Aspergillus* ont une répartition mondiale, ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. Ils sont présents dans l'environnement humain, notamment dans les plantes, les fruits, la poussière, l'air. Certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour les animaux et les plantes. Dont on cite Trois souches d'*aspergillus* connues pour leur capacité à synthétise aflatoxine. Il y a *A. flavus* qui produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2. *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1, G2). Enfin, *A. nomius*, une espèce rare proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines ((Bouguerra, N. Khelfane, M.,2008.).

Tableau 4 : les Aspergillus producteurs d'aflatoxines.

Espèce d'Aspergillus	Mycotoxines produites
Aspergillus flavus	Aflatoxine B1 et B2, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, acide kojique.
Aspergillus nomius	Aflatoxine B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique.
Aspergillus parasiticus	Aflatoxine B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique, acide kojique.

4.2. Isolement et dénombrement des champignons toxigènes

Dans le cadre d'une gestion s'appuyant sur la prévention, il est indispensable d'évaluer le nombre de champignons toxigènes présents dans les produits alimentaires. Les méthodes conventionnelles, basées sur la technique des suspensions-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé, sont généralement les plus employées pour l'analyse fongique des produits alimentaires. Après ensemencement et incubation à température optimale (25-30°C) pendant 5 à 10 jours, les colonies sont dénombrées et analysées (ISO 7954.,1987).

Une autre méthode dite « direct plating » est également employée pour la recherche des champignons toxigènes dans les aliments. Celle-ci consiste à ensemercer les particules d'un aliment (graines, noyaux, etc.) directement sur un milieu de culture solide. Les résultats de cette technique d'isolement et de dénombrement sont généralement exprimés en pourcentage de particules infectées. Cette méthode permet beaucoup plus une analyse qualitative que quantitative.

4.3. Identification des champignons toxinogènes

La classification des champignons est historiquement basée sur de nombreux caractères morphologiques et biologiques observables. L'identification des champignons filamenteux est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères d'ordre morphologique, physiologique et écologique (Guarro et al., 1999), après leur culture sur différents milieux qui servent alors à induire les phénotypes recherchés.

-Caractère morphologique :

L'observation de l'aspect de la colonie (couleur, texture), des septations, de la forme et du branchement des hyphes, des structures de sporulation et des spores sont une partie des caractères observés pour identifier correctement le champignon.

-Caractères chimiques

Méthodes d'analyse biochimiques peuvent indiquer des informations sur le champignon. Tel que le contenu en acide gras, la composition de la paroi cellulaire, la composition en protéines ou encore des métabolites secondaires font partie des critères étudiés pour l'identification des champignons toxinogènes (Samson *et al.*, 2006).

-Caractères moléculaires

Certaines espèces appartenant au même genre fongique ne peuvent être différenciées que par des outils moléculaires, basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont aujourd'hui utilisées même pour la quantification de certains champignons mycotoxinogènes (PCR quantitative), (Russell et Paterson, 2006).

II. Production de l'aliment de Bétail

Les aliments pour bétail sont fabriqués selon leurs destinations (bovins, ovins, cabris, volailles...) à partir d'une vingtaine de produits de base (orge, blé, maïs, soja,...) auxquels sont ajoutés des éléments complémentaires en faible quantité (minéraux, protéines...etc.)

Le Groupe ONAB a pour activités principales :

- ✓ La production d'aliments de bétail :

L'ONAB dispose de 23 Unités d'Aliment de Bétail, d'une capacité globale de 380 t/h, correspondant à 1.500.000tonnes.

La production actuelle de l'ONAB s'élève à 530.000 t répartie comme suit :

- 320.000 t aliments de volailles
- 210.000 t aliments Ruminants (Ovins à l'engraissement, vaches laitières)

- ✓ La production des condiments minéraux vitaminés (CMV):

L'ONAB dispose de 02 unités PREMIX d'une capacité globale de 30.000 tonnes de CMV par an.

Actuellement les deux unités CMV produisent 12.500 tonnes par an :

- 5.300 tonnes destinées aux besoins des UAB du Groupe

7.200 tonnes destinées aux clients tiers.

- ✓ L'importation de matières premières nécessaires à l'aliment de Bétail:

L'ONAB dispose de 04 unités portuaires : Oran, Alger, Bejaia, Skikda

En 2017/2018, L'ONAB a réalisé l'importation de 1,5 Millions de tonnes de matières premières (Maïs, Soja).

L'ONAB a réalisé sur investissement, des hangars et des silos lui permettant une augmentation conséquente de ses capacités de stockage.

✓ Le contrôle qualité des matières premières, intrants et produit finis :

L'ONAB dispose d'un (01) laboratoire central et de laboratoires annexes

PRESENTATION DE L'UNITE LABORATOIRE

- Situé à Alger, aux 4 chemins de gué de Constantine
- le laboratoire central a été créé au siège de L'ONAB en 1979
- Son rôle était :
 - Contrôler les matières premières locales et d'importation
 - Contrôler les produits finis et CMV (composés minéraux vitaminés) du groupe.
- Suite à la filialisation du groupe ONAB et l'obtention de l'autorisation d'exploitation auprès du ministère du commerce.
- Le laboratoire a été érigé, en 2003 en une unité de prestation.
- Ses missions sont élargies vers les tiers.
- L'unité laboratoire dépend actuellement de la filiale ONAB Nutrition exTrade.

L'entreprise veille au respect des bonnes pratiques d'achat, de réception, de stockage des matières premières, de fabrication des aliments de bétail, de contrôle à travers les analyses de laboratoires et de commercialisation.

Les mesures de biosécurité et de contrôle de la qualité pour lutter contre la diffusion d'un produit de mauvaise qualité ou l'intrusion dans les unités d'aliments de bétail de germes pathogènes.

1. Description du processus de fabrication de l'aliment de bétail

Un aliment composé est un mélange de matières premières, préalablement contrôlées, qui obéit un ensemble d'opérations, selon une formule établit pour répondre aux besoins nutritionnelles des animaux d'élevages.

Le processus de fabrication des aliments de bétail est comme suit :

- a) La commande du client avec désignation de la gamme et la quantité.
- b) Demande de fabrication.
- c) Ordre de fabrication
- d) Demande d'approvisionnement matières premières entre service fabrication et service GDS Matières Premières.
- e) Vérification des quantités de matières premières par le contrôleur de la qualité avant dosage.
- f) Broyage:
Le broyage est une opération qui vise la réduction de la taille des particules des matières premières à l'effet d'optimiser la qualité de l'uniformité des mélanges des aliments
La vitesse de rotation du broyeur (tours/minute), est programmée en fonction de la taille des particules recherchées ; Il est nécessaire que le broyage fournisse un grain fin, voire totalement broyé, pour obtenir la meilleure qualité de granulé possible.
- g) Dosage:

Le dosage est l'opération qui permet de mesurer avec précision les divers composants d'une formule, dans les trémies et chaque matière première transféré par voie mécanique ou pneumatique à un silo de dosage spécifique

h) Mélange:

Le mélange est une opération qui a pour objectif de mélanger de façon complète et homogène les éléments de la formule préalablement dosée.

Le manque d'homogénéité dépend de quelques causes principales :

-Mauvais fonctionnement du mélangeur (temps de mélange erronés par excès ou par défaut)

-Mauvais broyage des matières premières (ingrédients trop hétérogènes au point de vue de la granulométrie)

Après chaque opération de mélange, un échantillon est pris au niveau du laboratoire de contrôle, pour faire l'objet de test d'homogénéité.

i) Granulation :

La transformation de farine en granulé dans une presse, sous pression et température élevées. La procédure de granulation à une influence réelle sur la qualité des granulés.

La granulation se fait en quatre opérations qui doivent être soumises à des contrôles de qualité.

i.1) Le conditionnement : C'est la préparation des farines pour les rendre plus aptes à former des granulés, par l'adjonction de 4 à 6 % de vapeur d'eau, à une température de 60 à 80°C.

i.2) La formation du granulé : Le produit conditionné est forcé à travers une filière rotative, par des rouleaux qui le compressent, pour être extrudé par les orifices de la filière, et coupé par descouteaux.

i.3) Le refroidissement du granulé : La chaleur et l'excès d'humidité provenant du conditionnement, doivent être éliminés pour éviter la casse et la détérioration du granulé.

La température du granulé doit être ramenée à 5°C environ en dessous de la température ambiante.

i.4) La formation des miettes : Les granulés sont trop durs et trop grands pour les poussins, auxquels il faut une présentation adaptée à leur possibilité d'absorption.

Les miettes sont obtenues par l'effritement, la friction et la cassure nette des granulés, qui passent entre deux rouleaux cannelés et tournant à vitesses différentes.

Après chaque opération de granulation, un échantillon est pris au laboratoire de contrôle de qualité interne pour faire l'objet d'un test de dureté.

j) Mise en sac et étiquetage:

Les sacs doivent être hermétiquement cousus, Les sacs mis sur le marché doivent comporter une étiquette faisant corps avec l'emballage. L'étiquette doit être conforme aux dispositions du décret exécutif 90.367 du 10 novembre 1990.

Les étiquettes doivent être adaptées à chaque changement de composition, sans rature ni surcharge et ce, conformément à la réglementation en vigueur (Documentation interne EPE ONAB).

➤ Analyse de la qualité du produit

L'unité laboratoire fournis divers prestations :

- Analyses Microbiologiques
- Analyses Physico-chimiques
- Analyses Biochimiques

Selon les normes et méthodes nationales et internationales

J.O.R.A ISO AFNOR CODEXALIMENTARIUS

2. Analyse de la qualité microbiologique du produit

L'objectif de l'analyse microbiologique des aliments de bétails n'est pas l'inventaire de toutes les espèces présentes, mais d'effectuer une recherche dirigée vers une flore particulière. C'est-à-dire que l'analyse doit permettre de mettre en évidence dans l'échantillon la présence d'un microorganisme spécifique, le plus souvent pathogène, même s'il n'est présent qu'en faible quantité.

Analyses Microbiologiques : Eau et toute catégorie de denrées alimentaires

- Germes totaux
- Entérobactéries
- Coliformes
- Colibacilles

- Levures et Moisissures
- A.S.R
- Streptocoques
- Staphylocoques
- Salmonelles
- Listeria

2.1. Recherche et dénombrement des Microorganismes. Méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C, dans denrées alimentaires

Mode opératoire.

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée comme l'indique le schéma n°3ci-après

Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 47°C. Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans la boîte et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 minutes. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose, sur une surface fraîche et horizontale.

Laisser solidifier sur paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 4 ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 ± 3 heures avec :

Première lecture à 24 heures,

Deuxième lecture à 48 heures, et

Troisième et dernière lecture à 72 heures.

Lecture et interprétation.

Retenir les boîtes contenant moins de 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies. Calculer le nombre N, de microorganismes' dénombrés à 30°C par ml ou par gr de produit en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum c}{1,1 \times d}$$

Où :

$\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues,

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs.

Le résultat final de microorganismes dénombrés à 30°C par ml ou par gr de produit est noté par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x où x est la puissance appropriée de 10.

Exemple :

Un dénombrement de microorganismes à 30°C a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue 10^{-2} : on a 158colonies.
- A la seconde dilution retenue 10^{-3} : on a 14colonies.

Σ	158+14	172	
N=	_____	=	_____ = 15636
$1.1 \times d$	1.1×10^2	0.011	

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 16000 ou mieux :

$1,6 \times 10^4$, microorganismes par ml ou par gr de produit (ISO4833-1).

LOGIGRAMME

A partir des dilutions décimales :

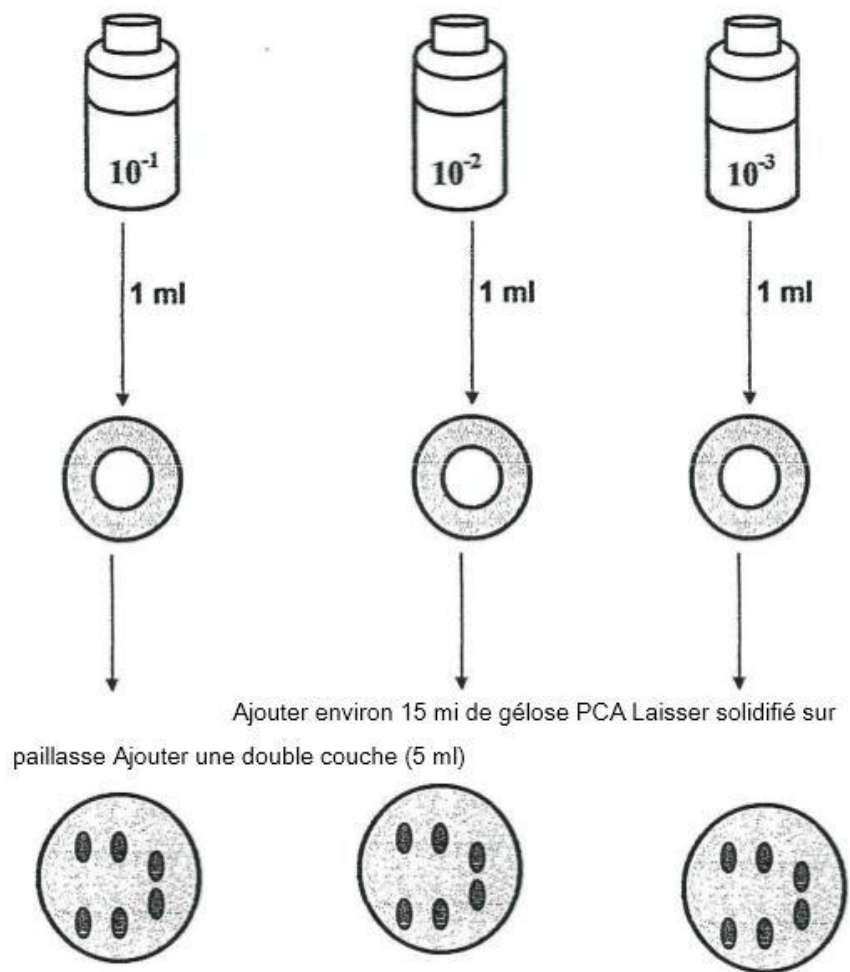


Figure 6 : schéma qui représente la recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophiles Totaux

2.2. Recherche et dénombrement des Levures et Moisissures

Mode opératoire

A partir des dilutions décimales, 10^3 à 10^1 , porter aseptiquement 4 gouttes dans une boîte de Pétri contenant de la gélose ŪGA à l'Oxytétracycline ou Sabouraud au

Chloramphénicol, Etaler les gouttes à l'aide d'un râteau stérile, puis incuber à 25°C pendant 5 jours.

Dans le souci de ne pas se trouver en face de boîtes envahies soit par les Levures soit par les Moisissures, on doit effectuer des lectures et des dénombrements tous les jours, Levures à part et les Moisissures à part.

Remarques importantes :

1. Opérer de la même façon et dans les mêmes conditions, avec le diluant (TSE), c'est-à-dire qu'il faut prendre quatre gouttes du diluant, les étaler avec un râteau à part et les incuber dans le même endroit que les boîtes tests, cette boîte constitue le témoin ds¹ "L
2. Incuber telle quelle, une boîte du milieu utilisé à savoir OGA ou Sabouraud, cette dernière sera incubée également telle quelle dans le même endroit et dans les mêmes conditions de température, elle constitue le témoin du milieu.
3. Au moment de la lecture, commencer obligatoirement par les deux boîtes témoin milieu et diluant si l'une d'entre elles est contaminée, l'analyse est ininterprétable donc à refaire.

Interprétation des résultats :

- Etant donné d'une part, qu'on a pris 4 gouttes des dilutions décimales,
- Etant donné d'autre part, qu'on considère que dans 1 ml, il y a 20gouttes,
- Pour revenir à 1 ml, il faut multiplier le nombre trouvé par 5.

Par ailleurs, étant donné qu'on a travaillé avec des dilutions décimales, on doit multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution correspondante, faire ensuite la moyenne

arithmétique, puis exprimé le résultat final en ml ou en gr de produit à analyser (ISO21527-2).

3. Stratégies d'amélioration de la qualité au niveau de l'ONAB

- L'entreprise veille au respect des bonnes pratiques d'achat, de réception, de stockage des matières premières, de fabrication des aliments de bétail, de contrôle à travers les analyses de laboratoires et de commercialisation.

Les mesures de biosécurité et de contrôle de la qualité pour lutter contre la diffusion d'un produit de mauvaise qualité ou l'intrusion dans les unités d'aliments de bétail de germes pathogènes.

- Les laboratoires **ONAB** réalisent tout contrôle et analyse de matières premières et produits finis pour le compte du Groupe et fournissent des prestations pour tiers.

Outre l'accompagnement des entités du Groupe, les laboratoires de l'**ONAB** œuvrent dans la recherche de meilleures formulations de l'aliment du Bétail et la substitution des matières premières importées dans le but de réduire la facture d'importation.

- Le contrôle de la qualité à l'**ONAB** est régi par des procédures qui prennent en compte tout le dispositif mis en place de l'achat de la matière première jusqu'à la vente aux clients et parfois au-delà.

A l'embarquement, l'**ONAB** est représenté par son agréateur, qui intervient auprès du fournisseur choisi, pour procéder à un contrôle rigoureux « agréage et analyses » avant l'embarquement de la matière première importée.

Cette dernière subit toutes sortes d'analyses physico-chimiques et microbiologiques et isotopiques avant de recevoir le feu vert à son embarquement.

A son arrivée, et avant son débarquement sur un port algérien, l'**ONAB** en parallèle à l'intervention de l'agréateur, procède à un autocontrôle de tous les produits réceptionnés. Des échantillons sont prélevés sur place, et sont transmis aux laboratoires de l'**ONAB**. La libération des lots ou de la marchandise n'est autorisée que si les analyses n'ont relevé aucune anomalie.

Les méthodes de prélèvements d'échantillons et d'analyses se réfèrent aux normes nationales et internationales.

- Aujourd'hui l'ONAB utilise quelques stratégies afin d'améliorer la qualité des produits

- La production localement le maïs et autres cultures fourragères à intégrer dans l'aliment du bétail en substitution aux matières premières importées (Maïs, soja).
- La Valorisation des Matières Premières utilisables.
- Le Développement des systèmes culturaux pour optimiser les productions végétales (Tritical, orge, mâche...).
- Le Développement des méthodes de conservations et conditionnement des matières agricoles produits et des semences (Documentation interne EPE ONAB).

III. Les aflatoxines dans la filière « Alimentation Animale»

1. Introduction

La présence des AFs dans l'alimentation animale est le résultat d'une contamination par des espèces aflatoxinogènes. Les aflatoxines sont généralement trouvées dans des aliments en provenance de régions chaudes et humides (Amérique de sud, Afrique, Asie). Elles ont été détectées dans les céréales (maïs, blé, orge, avoine, seigle, riz), les produits à base de céréales, des oléagineux (soja), des noisettes et leurs dérivés, arachides, beurre d'arachide, pistache, des légumes (pommes de terre, lentilles, piments), fruits secs et bière (Tabuc., 2007).

2. Cas de contamination rapportés dans la bibliographie en Algérie

A. En Algérie

En Algérie, peu d'informations sont disponibles sur la structure de la population d'*Aspergillus* section *Flavi* dans les matières première et les aliments pour animaux qui en résultent. (Bouti, et *al*, 2019)

Caractérisation morphologique

- Un total de 172 isolats appartenant à la section *Aspergillus Flavi* ont été récupérés à partir de 57 aliments pour animaux, après avoir isolé et identifié ces souches, des caractères morphologiques basé sur le diamètre et la couleur des colonies ainsi que la tailles et la couleur des sclérotés ont été déterminé dans le tableau ci-dessous, dont quatre morphotypes ont été distingué:

Tableau 5 : Caractérisation morphologique des isolats d'*Aspergillus* section Flavi

Morphotype	numéro d'isolat	Taille des desclérotés (µm) a	Séiation	Conidie	Couleur de la colonie
A. flavus	39	400	B ou b/n	Lisse; finement rugueux	Vert jaunâtre
	75	-	B ou b/n	Lisse; finement rugueux	Vert jaunâtre
	6	400-1.000	B ou b/n	Lisse	Vert jaunâtre
	4	-	B ou b/n	Lisse	Vert jaunâtre
	7	500-800	B ou b/n	Lisse	Vert jaunâtre
	4	-	B ou b/n	Lisse	Vert jaunâtre
A. parasiticus	3	-	U	finement rugueux	Vert foncé
A. tamarii	33	-	u/b	finement rugueux	Marron foncé
A. alliaceus	1	500-1.000	B	Lisse	Blanc

(-) Aucun sclérote observé.

B : biseriata.

b / u : principalement biseriata.

U : uniseriate.

u / b : principalement unisérié.

- Sur la base chimique, une analyse et production d'aflatoxine était réalisé ainsi que d'autre mycotoxine tel que l'acide Cyclopiazonique, l'OTA et l'acide aspergillique;

Production d'aflatoxine :

- ❖ Pour un criblage préliminaire de la production d'AF, les souches ont été inoculées en un seul point central sur des boîtes de Pétri (; 6 cm) contenant 10 ml de Coconut Agar Medium (CAM) (Davis, Iyer, & Diener.,1987).
- ❖ Incubées à 25 C pendant 10 jours dans l'obscurité.
- ❖ Les souches fluorescentes ont été observé sous une lumière UV à ondes longues (365 nm) après 3 et 5 jours d'incubation et notées comme positives ou négatives.
- ❖ Ensuite, trois bouchons d'agar ont été retirés de chaque boîte de Pétri, pesés, et 1 ml de méthanol a été additionné et laissé agir pendant 1h (Bragulat, Abarca et Cabañes.,2001).
- ❖ la solution a été centrifugée à 12 000 tr / min pendant 10 min et filtrée avec un filtre hydrophile Q-Max PTFE (; 0,45 um).
- ❖ Après extraction, les solutions de toutes les souches ont été déposées sur chromatographie sur couche mince (CCM) analysée par un système chloroforme / acétone 90:10: v / v puis observées sous la lumière UV (365 nm).
- ❖ La concentration en AF de tous les extraits a été mesurée par HPLC Ultimate 3000 en phase inversée (Dionex, FR) couplée à une cellule de carottage (Diagnostix GmbH, GE) pour la dérivation post-colonne.
- ❖ Le détecteur de fluorescence (Ultimate 3000, RS Fluorescence Detector, Dionex) a été fixé à une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 365$ nm et une longueur d'onde d'émission $\lambda_{em} = 440$ nm. Une colonne C18 Phenomenex Kinetex (5 μ m, 250 x 4,6 mm) a été utilisée.
- ❖ Un volume d'injection de 10 à 100 μ l a été utilisé (selon le niveau de FA quantifié) avec un auto-injecteur Dionex. La phase mobile était le méthanol: acétonitrile (Fisher., UK): eau (20:20:60) avec 119 mg / L de bromure de

potassium (Acros Organics, BE) et 100 µl / L d'acide nitrique à 65% (Merck, DA) ont été ajoutés.

- ❖ Le débit était de 1 ml / min. La quantification des AF a été effectuée avec des standards (AFB1 produit par *A. flavus*, Sigma-Aldrich, FR) et les données ont été traitées avec le logiciel Chromeleon. La production d'AF a été mesurée en ng / g de milieu de culture. La limite de détection (LOD) était de 0,05 ng /g.

Résultats

Les résultats ont montré qu'à un total de 172 isolats, les chercheurs ont pu les classer en cinq chémotype (tableau ci-dessous),

Tableau 6 : Caractérisation chimique des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* (

Chimio- types	Nombre et pourcentage d'isolat	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	CPA	Reverse- t-on AFPA	identification possible
I	114(66.27%)	++/+	+	+	-	+	Orang	<i>A. flavus</i>
IV	10(5.8%)	-	-	-	-	+	Orange (9) et crème (1)	<i>A. flavus</i>
	33(19.19%)	-	-	-	-	+	marron	<i>A. tamarii</i>
V	11(6.4%)	-	-	-	-	-	Orange	<i>A. flavus</i>
VII	3(1.74)	+	+/-	++	+	-	Orange	<i>A. parasiticus</i>

Remarque : ++, signal de haute intensité ; +, signal d'intensité moyenne; +/-, signal faible; -, non détecté.

Dont les souches d'*A. Flavus* étaient prédominantes (78,5%) et celles qui produisent le plus d'AF, suivies de 19,2% d'*A. Tamaritii* qui produit seulement CPA, 1,7% d'*A. Parasiticus* qui est connu pour avoir la capacité à produire AFB et AFG mais pas CPA et 0,6% d'*A. Alliaceus* qui produit une grande quantité d'OTA.

L'analyse de la production d'AF par fluorescence en CCM a montré une bonne corrélation avec les résultats HPLC. Pour la détection de fluorescence sur CAM, seuls 5,1% (6 isolats) ont montré des résultats faussement négatifs. Un total de 31,6% des souches testées n'étaient pas en mesure de produire des AF, tandis que 68,4% étaient capables de produire des AF avec des concentrations différentes (Figure 6). Les isolats des chémotypes IV et V n'étaient pas capables de produire des AF de F1, mais une grande variabilité a été observée dans le chémotype I. la plus faible production (<100 ng / g) a été notée dans les isolats (4,7%). La cooccurrence de AF et de CPA a été trouvée dans 114 isolats de chémotype I, tandis que le chémotype IV ne produisait que du CPA, et le chémotype VII ne produisait que l'AFB et l'AFG avec une concentration d'AFB1 comprise entre 500 et 1 000 ng / g.

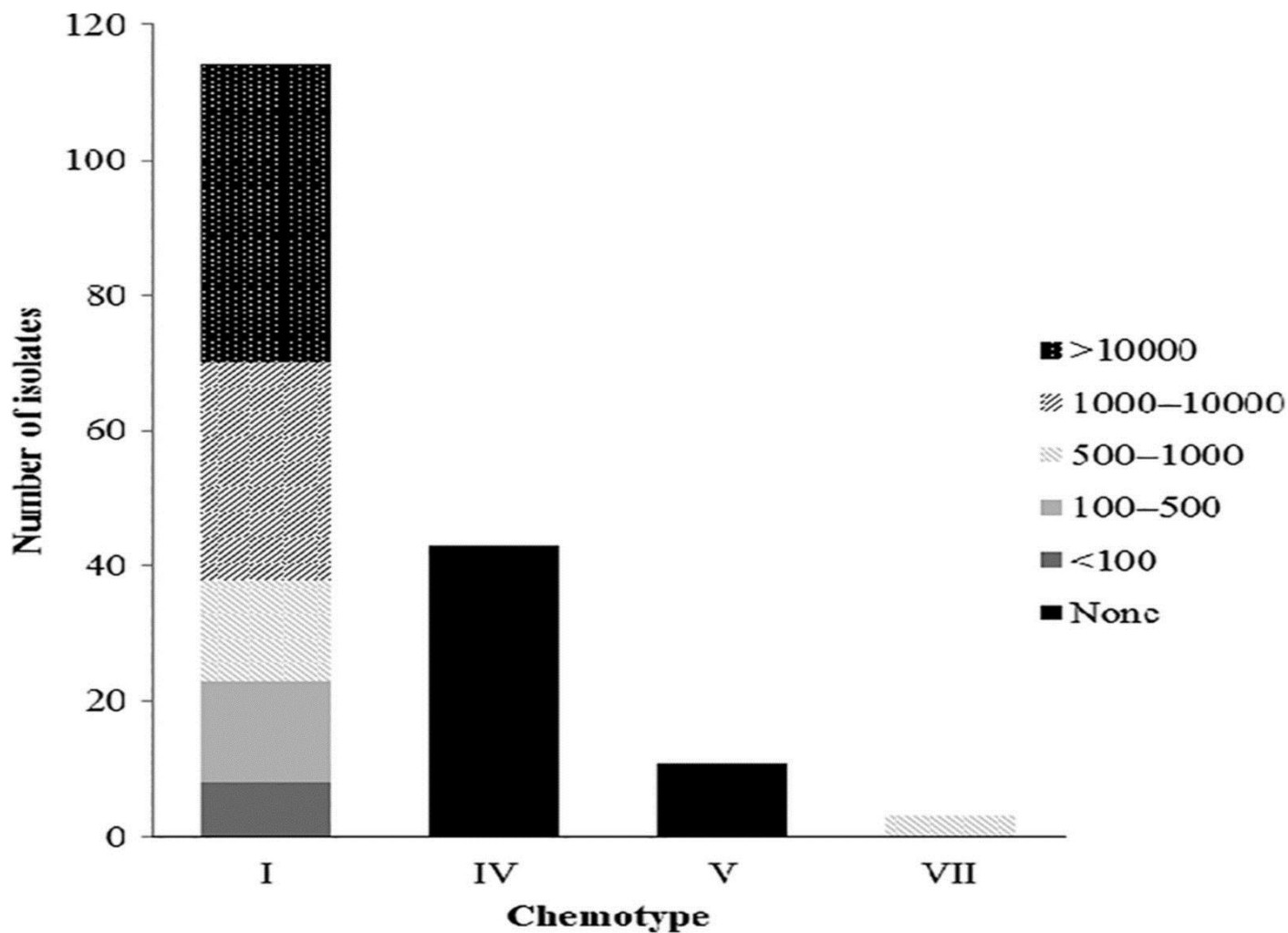


Figure 7 : Production d'AFB1 (ng / g) par section *Aspergillus Flavi* souches en fonction de leur chémotype.

a. Dans le monde

b.1) En Nigéria

La contamination par les aflatoxines des aliments pour animaux est courante et largement répandue dans certain zones de Nigéria, Leur détections dans cinq échantillons a été réalisée en utilisant une enzyme test d'immunosorbant lié (ELISA) (Kehinde et *al.*, 2014)

Collecte d'échantillons

- ❖ Collection dans 5 zones d'Abeokuta : Lafenwa, Obantoko, Idi-Aba, Kuto, Omida ; 200 g chacun d'aliments pour volaille (Purée decouches).

- ❖ Numération fongique et détermination des aflatoxines ont été effectuée sur chacun pour déterminer le total population fongique et niveau d'aflatoxine.
- ❖ Pour chaque échantillon d'aliment pour volaille, trois dilutions, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ont été fabriqués. À partir des dilutions 10⁻³, 1 ml de dilutions a été pipette aseptiquement.
- ❖ Les inoculé ont été recouverts de la préparation gélose dextrose de pomme de terre stérile (PDA) contenant 0,04 g / l de streptomycine, méthode sur plaque de coulée, tourbillonnait sur la table de travail et laissait reposer.
- ❖ les plaques ont été incubées dans une position inversée pendant 5 à 7 jours ; après quoi les colonies sur les plaques ont été comptés et enregistrés. Toutes les colonies ont été comptées et exprimé en unité formant colonie par gramme (cfu / g) de l'échantillon. Les unités formant colonie étaient déterminées à l'aide de la formule:

$$\frac{\text{No de colonies}}{\text{Volume utilisé}} \times \text{facteur de dilution}$$

- ❖ Dans l'analyse des aflatoxines, enzymatique compétitive directe un test d'immunosorbant est utilisé. Le test d'immunosorbant lié à une enzyme est basé sur une réaction d'anticorpsantigènes (Aycicek et. al.,2005).
- ❖ 5 g de chaque échantillon ont été pesés dans cinq flacons coniques différents étiquetés selon le lieu d'étude / le point d'échantillonnage. 25 ml de méthanol à 70% ont été ajoutés dans chaque flacon pour extraire l'aflatoxine dans les échantillons d'aliments.
- ❖ Les différents mélanges ont été filtrés en test tubes étiquetés en conséquence, en utilisant des papiers filtres. les filtrats étaient de couleur jaune pâle. 100 µl de filtrat a été ajouté à 500 µl de méthanol à 70% (dilué dans rapport 1: 5) à l'aide de micropipettes et mélangésensemble.
- ❖ Ensuite, 50 pi du mélange ont été mélangés avec 100 µl d'enzyme conjuguée (trouvée dans l'ELISA kit de test d'aflatoxine totale AgraQuant (R) ELISA) dans les puits de dilution (blanc, trouvé dans le kit ELISA). 100 µl de chacun ont été prélevés et mis dansdespuitsrevêtusd'anticorps(couleurbleue,égalementdanslekitELISA)et

incubé pendant 15 minutes en chambre Température. Cela facilite la formation d'un complexe.

- ❖ Après l'incubation, l'excédent a été éliminé et les puits ont été rincés avec de l'eau distillée. 100 µl de substrat (trouvé dans le kit ELISA) a été ajouté; changer la couleur en bleu (l'enzyme précédemment ajouté agit sur ce substrat et cela améliore la réaction antigène-anticorps. Plus la réaction d'anticorps antigène est importante, plus la couleur bleue est claire; et plus la couleur bleue est claire, plus le niveau d'aflatoxine est élevé). Cela a été laissé au repos pendant 5 minutes, après quoi la solution d'arrêt (trouvée dans le kit ELISA) a été ajoutée, changer la couleur de la solution en jaune (arrêter solution arrête l'activité enzymatique sur le substrat).
- ❖ Les puits revêtus d'anticorps ont ensuite été mis en ELISA lecteur d'aflatoxine (Stat Fax (R) 303 ELISA Reader) pour mesure photométrique du taux d'aflatoxine à 450 nm. L'absorbance est inversement proportionnelle à la concentration d'aflatoxine dans l'échantillon, c'est-à-dire plus l'absorbance est faible, plus l'aflatoxine est élevée concentration.

Résultat de l'analyse (microbiologique) :

- Des échantillons ont été prélevés dans cinq zones différentes d'Abeokuta. Le niveau d'aflatoxine a été observée comme la plus élevée dans les aliments pour volailles de Lafenwa avec une valeur de 93,1 µg / kg avec un niveau d'absorbance plus faible 0.840 et le plus bas de l'alimentation de Idi-Aba avec la valeur 13,5 µg/kg avec un niveau l'absorbance plus élevée 2.391 .Le nombre de champignons est compris entre 4×10^3 et 42×10^3 cfu / g, avec le nombre le plus élevé se produisant dans l'alimentation de Lafenwa et le plus bas à Idi-Aba. La croissance fongique était sur gélose dextrose de pomme de terre (PDA), et *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *Rhizopus oryzae* et *Penicillium notatum* ont été isolés et identifiés, avec *Aspergillus flavus* prédominant.

Tableau 7 : Niveaux d'aflatoxine dans les aliments pour volaille de 5 sites d'Abeokuta

Concentration d'aflatoxines ($\mu\text{g/g}$)	Échantillon	Absorbance en 450nm
43.2	Obantoko (O)	1.522
13.5	Idi-aba (Ia)	2.391
24.0	Omida (om)	2.168
29.7	Kuto (k)	1.981
95.1	Lafenwa(l)	0.840

- Par enquête physique, Lafenwa est situé sur un terrain inférieur autour du cours de la rivière. Le niveau élevé d'aflatoxine dans Lafenwa peut être considéré comme être influencé par sa proximité avec la rivière Ogun affluent. En conséquence, le niveau d'humidité sera haut. Sachant que l'humidité est un facteur important dans la croissance des champignons, le taux d'aflatoxine sera très élevé en raison de la grande prolifération du toxigène champignons, Contrairement à Idi-aba , le niveau inférieur de concentration d'aflatoxine trouvé dans les aliments est due à une faible humidité.
- D'après les résultats, il est montré que l'alimentation obtenue de Lafenwa ne doit pas être donné à la volaille, car il pourrait conduire à une toxicité aiguë, a cause de la présence d'une quantité importante d'aflatoxine. Bien que le flux d'Idiaba a un taux d'aflatoxine inférieur, il est toxique et pourrait provoquer une toxicité chronique à long terme. Mycotoxines, étant omniprésente en raison de la distribution mondiale de champignons toxigènes, mettent les cultures et les consommateurs en danger (Simpson et Pemberton, 1989; Lee et. al., 1992; Park,1992).

Des agents séquestrant ont été proposé comme stratégie de désintoxication tel que le charbon actif, la bentonite de sodium et aluminosilicate de sodium hydraté, dont leur rôle est de se lié à l'aflatoxine et diminuer sa biodisponibilité. (Harvey et. al., 1989; Lindermann et. al., 1990; Bonna et. al., 1991). Les niveaux d'aflatoxine peuvent également être réduits par le processus de cuisson, la torréfaction à sec de les arachides et le maïs éclaté ; la réduction est cependant modeste (Simpson et Pemberton, 1989). La production d'aflatoxine peut être contrôlée par l'isolement ou le

développement de souches atoxigènes d'*A. flavus* et *A. parasiticus* ; ces souches sont capables pour exclure de manière compétitive les souches de terrain toxigènes de la plante hôte (Cole et Cotty, 1990; Cotty, 1994). Approches telles que le développement de résistantes variétés, lutte biologique, pratiques agronomiques et la gestion intégrée de l'aflatoxine sont exploitées.

b.2) En Inde

L'incidence des mycotoxines est un problème majeur rencontré par l'industrie avicole car dans la plupart des cas, des ingrédients alimentaires de qualité inférieure sont utilisés dans la formulation des aliments. Les enquêtes ont été effectuées afin d'évaluer l'incidence des mycotoxines dans les aliments pour volailles (Parvath *et al.*, 2017).

Méthodologie :

- ❖ Des échantillons d'aliments pour volaille préparés commercialement, d'aliments pour volailles mélangés à la ferme et d'ingrédients situés dans le district de Warangal ont été collectés par échantillonnage aléatoire.
- ❖ Pour chaque échantillon, trois échantillons initiaux de trois kg chacun ont été prélevés à différents endroits. Après un mélange minutieux, un échantillon composite de 1 kg placé dans un sac en polyéthylène stérile a été amené au laboratoire et ils ont été réfrigérés jusqu'à utilisation ultérieure.

Résultats :

Incidence naturelle des mycotoxines dans les aliments pour volailles.

La contamination naturelle des aliments commerciaux pour volailles a été réalisée par «Méthode CCM rapide pour l'analyse multi-mycotoxines», comme suggéré par Devegowda et Raju (2005).

Différentes mycotoxines produites par les espèces d'*Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* ont été détectées par des méthodes standard. Aflatoxines (Stack et Pohland, 1975); ochrotoxine-A (Gimeno, 1979); la stérigmato-cystine (Adey et Mateles, 1964); l'acide pénicillique (Gorst-Allman et Steyn, 1979); le désoxynivalénol et le nivalénol (Ramakrishna et Bhat, 1987); moniliformin, toxine T-2 et zéaralénone (Kamimura *et al.*, 1981)

Ingrédients alimentaires

Les ingrédients des aliments pour animaux sont les principales ressources pour la contamination des aliments par les mycotoxines. Par conséquent, il a été jugé nécessaire de cribler les différents ingrédients alimentaires utilisés dans le district de Warangal, et les résultats sont présentés dans le (tableau 8). D'après le tableau, il est évident que la plupart des ingrédients alimentaires testés étaient positifs pour différentes mycotoxines. Sur 50 échantillons de maïs criblés, 34 échantillons sont positifs pour les aflatoxines et 13 pour l'ochratoxine A, 2 pour la zéaralénone et 8 pour la toxine T-2 et 9 pour la stérigmatocystine.

Sur 5 échantillons de farine de tournesol testés pour la présence de mycotoxines, 22 échantillons étaient positifs pour les aflatoxines et 3 pour l'ochratoxine A, 1 pour la zéaralénone et 4 pour la toxine T-2. Aucun échantillon de farine de tournesol n'était positif pour la stérigmatocystine. De même, sur 50 échantillons de tourteaux d'arachide testés pour la présence de mycotoxines, 28,13,3,2 échantillons étaient respectivement positifs pour les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone, la toxine T-2. La stérigmatocystine n'a pas été enregistrée dans les échantillons examinés.

Le dépistage de 50 échantillons de son de riz déshuilé pour leur contamination naturelle par les mycotoxines a indiqué que 14 échantillons étaient positifs pour les aflatoxines et 8 pour l'ochratoxine A, 6 pour la zéaralénone, 4 pour la toxine T-2 et 1 pour la stérigmatocystine. De même, dans 50 échantillons de farine de poisson testés, un seul échantillon était positif pour la stérigmatocystine, 3 échantillons étaient positifs pour les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone et les toxines T-2 n'ont pas été retrouvées dans l'échantillon de farine de poisson. De même, lorsque 50 échantillons de tourteau de soja ont recherché la présence de mycotoxines, 9 échantillons étaient positifs pour les aflatoxines et 6 pour l'ochratoxine A, 5 pour la zéaralénone et 4 pour la toxine T-2. Aucun échantillon n'était positif pour la contamination par la stérigmatocystine.

Des études sur l'incidence naturelle des mycotoxines dans les aliments pour volailles ont révélé que l'aflatoxine suivie de l'ochratoxine A est la plus courante et contaminée un grand nombre d'aliments pour volailles et d'ingrédients alimentaires. La plupart des échantillons étaient contaminés par plus d'une mycotoxine. Les échantillons d'aliments mélangés à la ferme ont été enregistrés avec les fréquences les plus élevées de contamination par les mycotoxines que les marques commerciales.

Tableau 8 : Contamination naturelle de différents ingrédients d'aliments pour volaille avec des mycotoxines.

Nom des ingrédients Tests.	Nombre d'échantillons testés	Nombre d'échantillons positifs	% d'incidence	Toxine détectée
Semence de maïs	50	34	68.0	Aflatoxines
		13	26.0	Ochratoxin A
		2	4.0	Zearalenone
		8	16.0	T-2 toxin
		9	18.0	Sterigmatocystin
Farine de tournesol	50	22	44.0	Aflatoxines
		3	6.0	Ochratoxin A
		1	2.0	Zearalenone
		4	8.0	T-2 toxin
		ND	--	Sterigmatocystin
Gâteau aux arachides	50	28	56.0	Aflatoxines
		13	26.0	Ochratoxin A
		3	6.0	Zearalenone
		2	4.0	T-2 toxin
		ND	--	Sterigmatocystin
Son de riz déshuilé	50	14	28.	Aflatoxines
		8	16.0	Ochratoxin A
		6	12.0	Zearalenone
		4	8.0	T-2 toxine
		1	2.0	Sterigmatocystin
Farine de poisson	50	3	6.0	Aflatoxines
		ND	--	Ochratoxin A
		ND	--	Zearalenone
		ND	--	T-2 toxin
		1	2.0	Sterigmatocystin
Plat à base de soja	50	9	19.0	Aflatoxines
		6	12.0	OchratoxinA
		5	10.0	Zearalenone

		4 ND	8.0 --	T-2 toxin Sterigmatocystin
--	--	---------	-----------	-------------------------------

b.3) En Espagne:

Un total de 50 g d'échantillon d'aliments pour bovins, 4 g de chlorure de sodium et 250 ml d'agent d'extraction ACN / H₂O (60/40, v / v) ont été mélangés dans un bocal mélangeur pendant 2 min à vitesse de cuisson. Papier filtre Whatman N ° 4 (What ma International, Maidstone, Royaume-Uni) .Un liquide de 25 ml a été évaporé à une température de 30 ° C et une vitesse de rotation de 65 tr / min pendant 8 min dans un rotavapor (BuchiR - 3000Rotavapor; BüchiLabortechnikAG, Postfach, Suisse). a été collecté, mélangé à 500 L ACN et transféré dans un ballon volumétrique de 50 ml; et finalement dilué au volume avec un solution de PBS.

Ensuite, 10 ml d'extrait constitué ont été passés à travers la colonne d'immunoaffinité (Aflaprep, P07, R-Biopharm, Madrid, Espagne) pour effectuer le nettoyage de tous les AF afin d'éviter tout type d'interférence, à un débit de 2 ml / min.la colonne a été inclinée avec deux aliquotes de 10 ml d'eau de culture à un débit de 5 ml / min, et toutes les analyses répondent lentement libéré de l'anticorps en utilisant 1 ml de méthanol et ensuite élué avec 1 ml d'eau ultra pure. filtrage des échantillons élués avec une seringue en PVDF (fluorure de polyvinylidène) filtre (13 mm, 0,22 m, Tecnokroma, Barcelone, Espagne), et la collecte des flacons pour l'analyse HPLC.(Raquel Hernández-Martínez ,et al, 2015)

Détermination HPLC des AF

La technique HPLC a été utilisé pour la séparation de l'AFS (AgilentTechnologies, Barcelone, Espagne), ainsi que pour la détection des AFB1 et AFG1 (Hernández- Martínez et Navarro-Blasco, 2010).

HPLC méthode performance

Afin de vérifier et de valider la méthode analytique, Six répétitions de chaque échantillon ont été testées pour effectuer la récupération.

La répétabilité intra-journalière (RSDr) et la reproductibilité journalière (RSDR) sont également vérifiées aux niveaux de piquage mentionnés au-dessus. Il y a plusieurs gammes de précision (récupérations selon les concentrations de AFB1: inférieure à 1 g / kg: 50-120%, de 1 à 10 g / kg: 70–110%, et supérieur à 10 g / kg: 80–110%) et de précision (RSDr et RSDR selon la concentration AFB1 niveaux :

Inférieurs à 1 g / kg: $\leq 40\%$ et $\leq 60\%$;

De 1 à 10 g / kg: $\leq 20\%$ et $\leq 30\%$;

Supérieur à 10 g / kg: $\leq 15\%$ et $\leq 20\%$, respectivement), fixés par le rapport UNE-CR13505 (UNE, 2003), sont impératifs. Les taux de récupération obtenus à partir des expériences de récupération.

En outre, la précision de la méthode a été vérifiée en évaluant plusieurs matériaux de référence naturellement contaminés. (Alimentation animale P64-ASF3 et P64-ASF4, and Groundcorn P64-A227, R-Biopharm, Madrid, Espagne) .

En outre, le laboratoire participé à aFAPAS® (Food Analysis Performance Assessment Scheme, organisé par The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, Royaume-Uni, conformément à l'ISO 5725-2) test inter-laboratoires de compétence (# 04124), où 70 participants de 27 pays différents ont analysé des matières premières pour les animaux et ont déterminé leur contenu AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 et la total aflatoxine

Ces tests de performance qualifient de résultat satisfaisant lorsque le score z est nul que 2. L'essai de compétence procède à un contrôle indépendant des procédures de laboratoire afin de garantir la précision résultats d'aflatoxine avec la méthode analytique utilisée. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées à un rapport signal sur bruit (S / B) de 3/1 et 10/1, respectivement.

b.4) En Croatie

Le but de l'étude était de déterminer le niveau d'aflatoxine B1 (AFB1) dans le maïs prélevé dans les fermes et usines d'aliments pour animaux situées dans le nord, le centre et l'est de la Croatie en 2013, à la suite de contamination AFM1 du lait de vache. Des échantillons de maïs (633) ont été analysés en utilisant le dosage immuno-enzymatique (ELISA) comme méthode de criblage et le tandem de chromatographie liquide haute performance. Spectrométrie de masse (LCeMS / MS) comme méthode de confirmation (jelka, et *al.*, 2013)

○ **Méthode ELISA**

Procédure d'extraction

- ❖ Les grains de maïs ont été préparés en utilisant 5 g de l'échantillon homogénéisé additionné de 25 ml de méthanol à 70% et secoués au-dessus sur un agitateur pendant 3 minutes. L'extrait a ensuite été filtré (Whatman, rubannoir).
- ❖ 1 ml du filtrat obtenu a été dilué avec un volume approprié d'eau déminéralisée.

Performance du test

La concentration d'AFB1 a été déterminée en utilisant la méthode ELISA utilisant les kits Ridascreen . Chaque kit contient une plaque de micro-titre avec 96 puits recouverts d'anticorps contre l'AFB1, des solutions étalons aqueuses d'AFB1 (0, 1, 5, 10, 20 et 50 mg / L), conjugué à la peroxydase, substrat / chromogène (peroxyde d'urée), un réactif d'arrêt (acide 1 N-sulfurique) et un tampon de lavage (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4). Les concentrations d'AFB1 obtenues ont été calculées à partir d'une courbe d'étalonnage en six points prenant ainsi en compte le facteur de dilution appliqué, puis corrigées pour la valeur de récupération.

Procédure de validation

Paramètres nécessaires à la validation de la méthode ELISA ont été déterminés en utilisant les échantillons de maïs de contrôle (échantillons blancs analysé plus tôt). La limite de détection (LOD) a été calculée à partir de la valeur moyenne obtenue avec dix échantillons de maïs blancs plus trois écarts types. Le taux de récupération a été déterminé à quatre niveaux différents (2, 5, 10 et 50 mg / kg) en ajoutant aux échantillons de contrôle la solution de travail standard AFB1 (100 mg / L) adoptée pour une utilisation en interne (six répétitions par niveau de concentration par jour).

Pour la détermination de la précision intermédiaire, les mêmes étapes ont été répétées à deux reprises supplémentaires par deux analystes indépendants sur une période de trois mois et dans les mêmes conditions analytiques. La détermination de la justesse a été effectuée en vertu de l'analyse de huit répétitions de matériel de référence de maïs certifié (CRM) dans la gamme AFB1 de 4,49e11,54 mg / kg (T04209QC, Fapas, Sand Hutton, York).

○ **Méthode LCeMS /MS**

La préparation des échantillons

A 25 g de l'échantillon, 100 mL de la solution d'extraction (ACN / H₂O ¼ 80/20) ont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant 2 h sur un agitateur horizontal et ensuite filtré (Whatman, ruban noir). 1ml du filtrat obtenu a été dilué avec 3 ml d'eau ultra pure, mélangé et filtré à travers un filtre de 0,45 mm-RC. Quarante ml de l'échantillon ont été injectés dans le système LC.

Conditions LCeMS / MS

La séparation LC a été réalisée sur des colonnes XBridge BEH C18 (150x4,6, granulométrie 2,5 mm) au débit de 0,80 mL / min et la température de 40 C. La phase mobile était constituée de constituant A (0,1% d'acide formique dissous dans l'eau) et le constituant B (acétonitrile). Un programme d'élution par gradient a été utilisé comme suit: 0-3 min: 90% -A, 18 min: 10% -A, 18,1 min: 90% -A, avec le temps de post-analyse de 4 min et le volume d'injection de 40 ml. Les conditions dans lesquelles la spectrométrie de masse a été réalisée étaient les suivantes: ionisation par électropulvérisation, polarité positive, tension capillaire de 6 kV, température de la source de 350 C, pression de fonctionnement du nébuliseur de 45 psi et débit de gaz de 9 L / min. Le spectromètre de masse a fonctionné dans le mode de surveillance de réactions multiples, l'ion moléculaire protoné AFB1 à m / z ¼ 313 étant l'ion précurseur. Deux ions produits à m / z ¼ 285 et m / z ¼ 241 ont été surveillés. La quantification a été réalisée lors de la transition la plus intense (m / z 313/285) grâce à une extrapolation à partir de courbes d'étalonnage en six points

Procédure de validation

Le processus de validation a commencé avec le plan factoriel où cinq facteurs ont été fixés à deux niveaux. Les facteurs en question étaient les suivants: l'analyste (A / B), le temps d'extraction (2h/3h), la matrice (maïs/orge), la modalité de stockage de l'extrait (4C nuit / pas de stockage) et les producteurs de filtres RC (Technologies Agilent / Phenomenex). Afin de valider la méthode, 8 séries, chacune constituée d'échantillons enrichis à 6 niveaux de concentration, ont été effectuées à des jours différents en utilisant des combinaisons de facteurs produites par le logiciel. Au total, 48 mesures ont été réalisées. Dans chaque essai, les échantillons blancs ont été enrichis à six niveaux de concentration: 2,5, 5, 7,5, 15, 30 et 60mg / kg. De plus, un échantillon de matrice à blanc et un échantillon de matrice enrichie ont été inclus dans chaque série.

Résultats

Etude de validation

Dans cette enquête, la détermination de l'AFB1 a été effectuée en utilisant la méthode ELISA validée comme méthode de dépistage quantitative, tandis que dans les échantillons contenant des niveaux d'AFB1 in supérieurs à la MPL, la présence de mycotoxines a été confirmée à l'aide de LCeMS / MS (comme recommandé par la directive 2002/32 / CE).

Ces derniers permettent une détermination et une confirmation fiables et efficaces de la présence d'AFB1 dans les échantillons de maïs.

b.5) En Egypt.

La prévalence des mycotoxines dans les aliments pour animaux et volailles sous différentes variations environnementales en été et en hiver a été étudiée. Cent six échantillons d'aliments ont été collectés dans des fermes du gouvernorat de Beni-Suef (58 échantillons pendant l'été et 48 pendant les saisons d'hiver) pour la détection de la contamination par les aflatoxines (Afs) (Abdou Kh,et *al.*, 2017).

Détection des contaminations par les aflatoxines dans les aliments par CCM

Préparation des échantillons

- ❖ 100gr d'échantillon d'alimentation ont été finement broyés et soigneusement mélangés dans un broyeur électrique pour passer le tamis n ° 10,25 g de chaque échantillon ont été transférés dans un ballon Erlynmeyer à bouchon en verre de 500 ml pour l'extraction de la toxine.
- ❖ Ensuite les échantillons ont été extraits avec 50 ml de solution méthanol : eau (55:45 V / V) après avoir été bien agités pendant 30minutes.
- ❖ la suspension a été filtrée avec du papier filtre Whatman N °1.
- ❖ Le filtrat a été recueilli dans une ampoule à décanter et la toxine extraite deux fois avec une portion de 50 ml de chloroforme et la couche inférieure de chloroforme a ensuite été drainée et passée sur une couche mince de 10 g de sulfate de sodium anhydre(Na₂S₀4).
- ❖ Le filtrat a ensuite été évaporé dans un bain d'eau bouillante jusqu'à siccité.

Purification et nettoyage du filtrat extrait

Chaque résidu d'échantillon a été dissous dans 2-3 ml de chloroforme et purifié (nettoyer) en utilisant la chromatographie sur colonne. Après purification, l'extrait a été évaporé jusqu'à

siccité. Le résidu a été refroidi et stocké à 0 ° C pour une étude de chromatographie sur des plaques à couche mince pour la détection de l'aflatoxine

Analyse chromatographique sur couche mince de extrait de chloroforme

Préparation des plaques à couche mince

Préparation de la suspension de gel de silice

La suspension de gel de silice pour le revêtement des plaques de verre était préparée en ajoutant 80 ml d'eau distillée à 40 g de gel de silice dans un ballon conique agité vigoureusement pendant 1 minute.

Revêtement des plaques de filles :

La suspension de gel de silice a été versée dans l'épandeur sans laisser fente en position fermée. L'épandeur était alors placé sur des plaques de verre de départ (20 x 20 cm) sur le plateau et le niveau a été tourné de 180 degrés et immédiatement le verre les plaques ont été revêtues avec une épaisseur de 0,25 mm de suspension de gel de silice. Les plaques ont été soulevées pendant 10 minutes jusqu'à gélifiée pour la chromatographie, une ligne a été grattée à 16 cm du bord inférieur de la plaque TLC comme un arrêt de solvant et 0,5 cm du gel de silice a été retiré de chaque côté de la plaque CCM pour éviter les effets de bord.

Détection des aflatoxines par CCM

Résolutions de la solution d'aflatoxine de référence B1, B2, G1 et G2 ont été préparés pour donner une dilution finale avec du benzène-acétonitrile (9: 1) identiques à ceux préparés individuellement (0,5 µg d'aflatoxine B1, G1 ou M1 et concentration 1/5 pour B2 ou G2). Un flacon résidu d'extrait d'échantillon n'apas été bouché et 0,1 ml de benzène-acétonitrile (9-

1) a été ajouté et mélangé. Activation des plaques en couches minces pendant 1 heure dans un four à air chaud à 110 ° C et retirées immédiatement au dessiccateur pour refroidir. Un volume connu des spots de solution échantillon de (5, 10, 20 et 40 µl) a été arrêté sur une ligne imaginaire à partir du bord inférieur de la plaque. La solution standard a été déposée sur la plaque avec une concentration connue en utilisant une pipette capillaire de 10-20 µl. La plaque a été développée avec (toluène:acétate d'éthyle:90% d'acide formique)(5:4:1, V/V / V) dans un équilibre pot ou réservoir de développement pendant 30 minutes. environ 12 cm avant, les assiettes ont été retirées du pot, l'air séché et inspecté sous une lampe ultraviolette à ondes longues (360 nm) pour l'examen des spots testés et standard allumettes..

Résultats

Les résultats actuels ont révélé que l'incidence et les niveaux de résidus d'aflatoxines (Afs) dans les aliments pour animaux pendant la saison estivale étaient comparativement plus élevés qu'en hiver. Où, les résidus Afs ont été détectés dans tous les échantillons examinés de (maïs blanc, son de blé, foin barseem, aliments pour volaille, aliments concentrés et ensilage) (Tableau 9 et fig.7).

Tableau 9 : Prévalence des aflatoxines dans les aliments simples et composés pendant la saison estivale dans le gouvernorat de Beni-Suef.

Type de nourriture		Prévalence des aflatoxines				
		% de + ve	Niveaux d'aflatoxines dans les échantillons (mg / kg –ppm)			Types de AFs
			Maximum	Minimum	Moyenne ± SE	
Alimentation unique	Du maïs jaune	72.2	32	3.2	16.26±3.2	B1,B2,G1, G2
	Maïs blanc	100	96	16	56±4.0	B1,B2,G1, G2
	son de blé	100	96	64	80±6.0	B1,B2,G1, G2
	Foinde Barsem	100	16	16	16±00	B1,B2,G1, G2
Aliment composé	Aliments pour volaille	100	32	1.6	8.3±1.7	B1,B2,G1, G2
	alimentation concentrée	100	32	3.2	11.73±1.2	B1,B2,G1, G2
	Ensilage	100	32	32	32±00	B1,B2,G1, G2

En revanche, en hiver, une incidence et des niveaux d'aflatoxines comparativement plus faibles ont été détectés dans les échantillons (tableau 9 et figure 7). Où, les résidus Afs ont été détectés dans des échantillons de (maïs jaune, maïs blanc, soja, son de blé, foin barsem, aliments pour volailles, aliments concentrés et ensilage, tourteaux de coton, aliments laitiers et concentrés de poulets de chair).

Tableau 10 : prévalence des aflatoxines dans les aliments simples et composés pendant la saison hivernale dans le gouvernorat de Beni-Suef.

types aliments		prevalence des aflatoxines				
		% de +ve	niveaux d'aflatoxines dans les échantillons (mg / Kg-ppm)			Type d'AFS
			Maximum	Minimum	Moyen±SD	
Alimentation unique	Maïs jaune	16.6	0.8	0.8	0.8±00	B1,B2
	Maïs blanc	50	1.6	1.6	1.6±00	B1,B2,G1,G2
	graine de soja	33.3	0.8	0.8	0.8± 00	B1,B2
	son de blé	70	8	0.8	4.4±3.6	B1,B2
	Foin de Barsem	80	6.2	0.4	2.66±1.16	B1,B2,G1,G2
aliments composés	aliments pour volaille	60	1.6	0.4	0.8±0.22	B1,B2,G1,G2
	alimentation concentrée	75	3.2	1.6	1.8±0.16	B1,B2,G1,G2
	Ensilage	62.5	3.2	0.8	2.2±0.6	B1,B2
	gâteau aux graines de coton	50	1.6	1.6	1.6±00	B1
	aliments laitiers	0	0	0	00	0
	concentrés de poulets de chair	66.6	1.2	0.4	0.8±0.2	B1

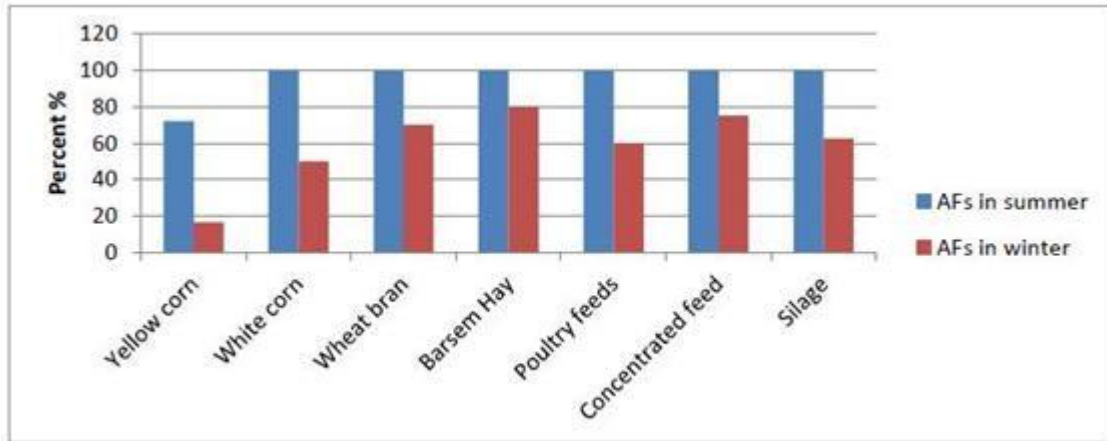


Figure 8 : Prévalence des aflatoxines dans les aliments pendant les saisons d'été et d'hiver dans le gouvernorat de Beni-Suef

Il est intéressant de lui signaler que tous les types d'aflatoxines (B1, B2, G1, G2) ont été détectés dans tous les échantillons d'aliments positifs pour la contamination par les aflatoxines pendant la saison estivale. Alors que, en hiver, les échantillons positifs de son de blé de soja de maïs jaune et d'ensilage ont montré la détection de seulement Afs B1 et B2 et des échantillons de tourteau de coton et les concentrés de poulets de chair ont permis de détecter l'AfB1seul.

b.6) En Argentine :

La province de Córdoba, au centre de l'Argentine, est une zone importante de production porcine, La contamination par l'aflatoxine leur pose de graves problèmes ce qui a abouti à une étude qui détermine les niveaux de contamination naturelle par l'aflatoxine B1 ainsi que la capacité des isolats d'*Aspergillus section Flavi* à produire des aflatoxines in vitro.(Gisela A,et al 2011).

Méthodologie

○ **Echantillonnage**

- ❖ Des échantillons de grains de brasserie ont été collectés dans une brasserie artisanale située à Villa General Belgrano (31° 59 S 64° 34 O), Córdoba, Argentine.
- ❖ Ces échantillons ont été collectés à des moments différents : jour zéro (0) (immédiatement après la fermentation) et après sept (7) jours de stockage (avant de nourrir les animaux).

- ❖ Un total de 50 échantillons (3 kg chacun) de grains de brasserie ont été prélevés à des moments différents : 26 ont été prélevés au jour 0 (extraits des cuves de fermentation une fois le processus terminé), et 24 échantillons ont été prélevés au jour 7 (prélevés sur le stockage sacs avant de nourrir les animaux).
- ❖ Les échantillons ont été stockés dans des sacs en plastique et les conditions de stockage n'ont pas été contrôlées. Les échantillons primaires ont été homogénéisés et coupés en quartiers pour obtenir des échantillons de laboratoire de 1kg.

○ **Détermination des propriétés physiques**

Détermination du pH dans les échantillons de grains de brasserie a été effectuée comme suit :

- ❖ cinquante grammes de l'échantillon ont été homogénéisés avec 100 ml d'eau déminéralisée pendant 5 minutes dans un mélangeur de laboratoire et le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre étalonné.
- ❖ Les déterminations de l'activité de l'eau ont été effectuées avec un appareil AQUALAB CX2 (Decagon, Devices, Inc. USA) conformément au manuel de l'opérateur. La précision des valeurs de a_w était de $\pm 0,003$.

○ **Analyse de l'aflatoxineB1**

- ❖ Une aliquote de 50 g de chaque échantillon a été extraite avec 150 ml de solution méthanol: eau (80: 20, v / v) pendant 3 minutes dans un mélangeur.
- ❖ Le mélange a été filtré à travers du papier filtre Whatman N°4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA) et 2,5 ml du filtrat ont été ajoutés à 2,5 ml d'acétonitrile.
- ❖ Ce mélange a été placé dans un tube à essai de 10 ml. Colonnes de nettoyage Aflazon Mycosep 228 (MFC, Romer Labs, Inc., MO., USA) Des colonnes multifonctionnelles ont été utilisées pour nettoyer les extraits, en suivant la méthodologie fournie par le fabricant. L'extrait a été forcé à travers une fritte, à travers une vanne 1 voie et à travers un matériau de garnissage. L'extrait purifié (4 ml) a été recueilli dans un flacon et séché sous un courant de N₂. La détection et la quantification de l'aflatoxine B1 ont été effectuées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon la méthodologie proposée par Trucksess et al. . Une aliquote (200 μ L) a été dérivée avec 700 μ L d'acide trifluoroacétique: acide acétique: eau (20: 10: 70, v / v). Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur une colonne à phase inversée (gelsilice, 150x4,6mmid., Taille de particule 5 μ , VARIAN, Inc. Palo Alto,

USA). Du méthanol-eau (60: 40 v / v) a été utilisé comme phase mobile à un débit de 1 mLmin⁻¹. La fluorescence des dérivés AF a été enregistrée à une excitation λ 360 nm et une émission λ 460 nm. Les courbes d'étalonnage ont été construites en utilisant différentes concentrations de solutions standard AFB1 (Sigma, St. Louis, MO, USA; pureté > 99%). L'aflatoxine a été quantifiée en corrélant les hauteurs des pics des échantillons avec celles de la solution standard. La limite de détection de la méthode analytique était de 0,4 ng g⁻¹.

○ **Production d'aflatoxine par *Aspergillus Section Flavi***

Un total sur 137 souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées à partir du grain de brasseur a été testé pour la production de FA selon Geisen . Les souches ont été cultivées sur des plaques MEA pendant 7 jours à 28 ° C. Trois bouchons de gélose ont été retirés de la zone centrale de la colonie, pesés et introduits dans un petit flacon. On a ajouté du chloroforme 1 mL à chaque flacon et le mélange a été centrifugé à 10 000 tr / min pendant 10 min. La phase chloroformique a été éliminée et évaporée à siccité sous un flux de N₂ et le résidu a été redissous dans 200 μ l de chloroforme. Les extraits ont été analysés par Chromatographie sur couche mince (CCM) sur des feuilles d'aluminium de gel de silice 60 F254 CCM (20 x 20 cm, épaisseur de 250 μ m, Merck, Allemagne). Le solvant de développement était le chloroforme: acétone (90: 10, v / v). La limite de détection de la méthode était de 5 ng g⁻¹. Les plaques ont été observées sous lumière UV (360 nm) et la concentration d'AFB1 a été déterminée par comparaison visuelle entre les intensités de fluorescence de la toxine et les taches standard.

Résultats

Production d'aflatoxine par *Aspergillus Section Flavi*.

Tableau 10 montre la production d'AFB1 (μ g g⁻¹) par *Aspergillus* section *Flavi* espèces. Sur un total de 138 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* testés, 89,3% des isolats des échantillons du jour 0 et 76,3% des isolats des échantillons du jour 7 ont pu produire de l'AFB1 in vitro. Le niveau le plus élevé d'AFB1 produit était de 32,14 mg kg⁻¹. Une seule souche a pu produire à la fois AFB1 (2,86 μ g g⁻¹) et AFG1 (7,14 μ g g⁻¹).

Tableau 11 : Production d'aflatoxine B1 par section *Aspergillus* Souches *Flavi* isolées à partir du grain de brasseur.

Echantillonnage	souches positives*	%	Aflatoxine B1($\mu\text{g g}^{-1}$)°	
			Gamme	niveaumoyen
0	50/56	89.3	0.6-26.5	5.0 \pm 3.6
7	61/80	76.3	0.2-32.1	4.9 \pm 3.7

*nombre de souches productrices par rapport aux souches totales.

°niveaux mineurs et majeurs d'aflatoxine B1.

\pm niveau moyen d'AFB1 \pm écart type (SD).

Analyse de l'aflatoxineB1

Le tableau 11 montre l'incidence de l'AFB1 dans les échantillons de céréales du brasseur. Plus de 50% des échantillons étaient naturellement contaminés par l'AFB1 aux deux points d'échantillonnage testés. Les échantillons prélevés à 0 jour (14) et les échantillons prélevés au jour 7 de stockage (33) ont montré des niveaux d'AFB1 dépassant le maximum autorisé pour les aliments pour porcs.

Tableau12 : incidence d'AFB1 dans le grain de brasserie à 0 et 7 jours de stockage.

échantillonnage (jours)	échantillons positifs(%)	Aflatoxine B1 (ng.g ⁻¹) [°]		au-dessus de la limite
		Intervalle	Niveaumoyen±SD [‡]	
0	57	5.40-26.88	11.76-9±9.15	25
7	50	4.32-446.40	256.96±150.96	67

[°]niveaux mineurs et majeurs d'aflatoxine B1.

Niveau moyen d'AFB1 ± écart type (SD).

[‡] Pourcentage d'échantillons avec des niveaux AFB1 supérieurs aux limites établies par GMP 20ng.g⁻¹

IV. Conclusion

L'étude a mis en évidence une contamination extrêmement élevée dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'élevage par des espèces aflatoxigènes, cette dernière peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, du stockage et après la transformation des graines...etc. Si de très nombreuses études sont disponibles concernant la contamination par les aflatoxines des céréales, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. De manière schématique, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et les conditions climatiques pendant le développement et/ou le stockage des grains. Car elle pourrait être associée à un temps extrêmement chaud et sec ainsi que d'autres paramètres environnementaux et nutritionnels qui améliorent la production d'AFs dedans. En raison du risque important pour la santé des animaux, il est très important d'établir des mesures de contrôle adéquates grâce à des programmes de surveillance nationaux bien définis, qui doivent garder un œil sur les conditions météorologiques pendant la production, ainsi que l'application de toutes les mesures susceptibles de prévenir la contamination des aliments pour animaux et par conséquent la contamination des denrées alimentaires et les éventuels effets néfastes de cette toxine sur la santé animale, ainsi que les pertes économiques, est de la plus haute importance pour l'industrie agricole.

Référence bibliographique :

- Abdou, Kh. Atef A. Hassan.Nour El-Houda Y. Houda, R. Abd El-Hamed. Seasonal Variation in Prevalence of Mycotoxins in Feed and Feedstuffs at Beni-Suef; Governorate in Egypt, *European Journal of Academic Essays* 4(4): 99-109,2017.
- Adye J and Mateles RC (1964) Incorporation of labeled compounds into aflatoxins. *Biochimica et Biophysica Acta* 86,418-420.
- AFSSA, Mars 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final, Maison Alfort.
- Al-Hilli A.L, Smith J.E. Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett*, 6, 1979. pp.367-370.
- Amar Riba « Recherche sur les champignons producteur d'Aflatoxine et d'Ochratoxine A dans la filière blé en Algérie » thèse de doctorat sciences biologiques, Tizi Ouzou, Université Mouloud Mammeri, 2008,190p.
- Asao T, Buchi G, Abdelkader M.M, et al. Aflatoxins B and G. *Am Chem.Soc.* 85, 1963. 1706-1707.
- Bennett J.W. et Klich M. (2003).- Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16, 497–516.\$
- Bezuidenhout S.C, Gelderblom W.C.A, Gorst-Allman C.P, et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Commun.* 11, 1988.743-745.
- Blackwell B.A, Miller J.D, Savard M.E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. *J Assoc. Off. Anal. Chem. Int*, 1994. pp.506-511.
- Boudra H, Barnouin J, Dragacci S, et al. Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in raw bulk milk from french dairy herds. *J. of Dairy Science* 90, 2007.3197-3201.
- Bouguerra, N. Khelfane, M « Les mycotoxines », thèse de doctorat sciences de la nature et de la vie, M'sila, Université Mohamed Boudiaf,2008.
- Bouti K, Verheecke-Vaessen C, Mokrane S,Meklat A ,Djemouai N ,Sabaou N ,Mathieu F , Riba A, Polyphasic characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from animal feeds in Algeria,*journal of food safety*,18 November 2019.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2–3), 139–144.[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00581-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00581-5).
- Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*. Lavoisier, Tec&Doc, 2002.
- Chritensen C.M, Nelson G.H, Speers G.Mt al. Results of feeding tests with ration containing grain invaded by a mixture of naturally present fungus plus *Aspergillus flavus*. *NRRL2999, Feedstuffs*, 1973. pp.20-41.
- Christensen C.M., Mirocha, C.J. et Meronuck, R.A. (1977).- *Molds Mycotoxins and Mycotoxicoses*. Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul,MN.
- Cole, R.J. and Cotty, P.J. (1990). Biocontrol of aflatoxin production by using biocompetitive agents. In: Robens, J.F. (ed.) *A Perspective on Aflatoxin in Field Crops and*

Animal Food Products in the United States. Agricultural Research Service, Beltsville, M D, pp. 62–68.

- Cotty, P.J. (1994). Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84: 1270–1277.
- Creppy E. E, Kern D, Steyn P.S, et al. Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicology Letters* 19, 1983:217-224.
- Creppy E. E. (2002).- Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicology letters*, 127,19–28.
- C.A.S.T (Council for Agricultural Science. and Technology) (1989).- Mycotoxins, economics and health risks. Task force report. N° 116. Ames, Iowa, USA.
- CAST. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Council for Agric. Sci. Technol. Task Force Report, 139. Ames, IA.
- C.A.S.T (Council for Agricultural Science. and Technology) (2003). - Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task force report. 139, ISBN N° 1– 887383–22–0, pp 200, Ames IOWA, USA.
- Davis, N. D., Iyer, S. K., & Diener, U. L. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7),1593–1595.
- Delos M, Regnault C, Joudrier P. Les mycotoxines dans les récoltes de céréales. Quelle gestion en 2013 ? Qu'attendre des biotechnologies contre ces fléaux ? Académie d'Agriculture de France, 2014.
- Devegowda G and Raju MVLN (2005) Manual on mycotoxin quantification in foods and feeds. Veterinary College, University of Agricultural Sciences, Karnataka University, India.
- Dupuy J. Principales mycotoxines produites par des souches de *Fusarium* isolées de céréales, Toulouse : Thèse INP, 1994
- Galtier P, Draggaci S. Danger dans l'assiette. Quae Éditions, 2011.184p.
- Gams W, Christensen M, Onions A.H.S, et al. Infrageneric taxo of *Aspergillus*, in: Samson R.A. Pitt J.I. *Advances of Penicillium and Aspergillus systematics*. London & New-York, Plenum Publi, 1986.
- Gimeno A (1979) Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 62, 579-585.
- Gisela A. Gerbaldo, Carina M. Pereyra, Lilia R. Cavaglieri, Francisco Ruiz, Liliana Pascual, Ana M. Dalcero, Isabel L. Barberis, Surveillance of Aflatoxin and Microbiota Related to Brewer's Grain Destined for Swine Feed in Argentina, SAGE-Hindawi Access to Research Veterinary Medicine International Volume 2011, Article ID
- Gorst-Allman CP and Steyn PS (1979) Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. *Journal of Chromatography A* 175,325-331.
- Grosjean F, Leuillet M, Berhaut P, et al. Dossiers mycotoxines. *Perspectives Agricoles*, 278,2002..
- Guarro J., Gené J. et Stchigel A.M. (1999). - Developments in fungal taxonomy.

Clinical and Microbiological Review, 12 (3) ,454–500.

- GUIDEnR, Haute Qualité Environnementale. (image)
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Huff, W.E. and Corrier, D.E. (1989). Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to the diets of growing barrows. *Am. J. Vet. Res.* 50: 416–420.
- Hernández-Martínez, R., Navarro-Blasco, I., 2010. Aflatoxin levels and exposure assessment of Spanish infant cereals. *Food Addit. Contam. B* 3 (4), 275–288. Raquel Hernández-Martínez, Inigo Navarro-Blasco, 2013. Surveillance of aflatoxin content in dairy cow feedstuff from Navarra (Spain); ELSEVIER.
- Hussein H.S. et Brasel J.M. (2001).- Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167 (2), 101–134.
- Images libres de droits, disponibles sur : <http://commons.wikimedia.org>.
- ISO4833-1 Microbiologie de la chaîne alimentaire-Méthode horizon pour le dénombrement des micro-organismes-partie1 : comptage des colonies à 30°C par la technique d'ensemencement en profondeur).
- ISO21527-2 Microbiologie des Aliments-Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures-partie2 : technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0.95).
- I.S.O (International Organization for Standardization) (1987).- Microbiology-General guidance for enumeration of yeast and moulds-Colony count technique at 25°C International Standard 11–2. ISO7954.
- Jarvis B.B. et Miller J.D. (2005).- Mycotoxins as harmful indoor air contaminants, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 67–372.
- Jelka Pleadin , Ana Vulic , Nina Persi , Mario Skrivanko , Brankica Capek , Zeljko Cvetnic. ELSEVIER. *Food control* V40, june 2014, pages 286-291.
- Jeunot B. Les fusariotoxines sur céréales, détection, risque et nouvelle réglementation. Sous la direction de Benizri E. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, 2005. 125p.
- Kamimura H, Nishijima M, Yasuda K, Saito K, Ibe A, Nagayama T, Oshiyama Hand Naoi Y (1981) Simultaneous detection of fusarial toxins. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 64, 1067.
- *Microbiol Biotechnology*, n°19, 1997. pp.305-309.
- Kehinde, M.T. Oluwafemi, F. Itoandon, E.E. Orji, F.A. and Ajay, O.I. Fungal profile and aflatoxin contamination in poultry feeds sold in Abeokuta, Ogun state, Nigeria. *Nigerian food journal. Official journal of Nigerian institute of food science and technology. NIFOJ* Vol. 32 No, 1, pages 73-79, 2014.
- Lacey J. (1986).- Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- Le Bars J. Toxinogenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms systems, in : *Multon J.L. Preservation and storage of grains. Seeds and their by-products.* New-York : Lavoisier Publishing, 1988. pp.347-366.
- Lesage-Meesen L, Cahagnier B. Mécanisme d'adaptation des micromycètes aux activités de l'eau réduite, dans : *Cahagnier B. Moisissures des aliments peu hydratés.* Paris,

Londres, New-York : Tec&Doc, 1998. pp. 21-35.

- Lee, L.S., Bayman, P. and Bennett, J.W. (1992). Mycotoxins. In Finkelstein, B. and Ball, C. (eds.) *Biotechnology of Filamentous Fungi. Technology and Products*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 463–502.
- Lillehoj E.B. et Elling F. (1983).- Environnemental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 33, 113–128.
- Madhyastha S.M, Marquadt R.R, Frolich A.A, et al. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agric. Food. Chem* 38, (1990). pp.1506-1510.
- Magan N. et Aldred D. (2005).- Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, S1,10–16.
- Mannon J, Johnson E. Fungi down on the farm. *New Sci*, 1985. pp.12-16.
- Moreau C. *Moisissures toxiques dans l'alimentation*. Pologne : Masson Et Cie, 1994. 322p.
- Moss M.O, Franck M. Prevention effects of biocides and other agents on mycotoxin production, in Watson D.H, ed, *Toxicants in foods*. Chichester : Ellis Horwood, 1987. pp. 231-251.
- M. W. Trucksess, M. E. Stack, S. Nesheim, R. H. Albert, and T. R. Romer, "Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in corn, almonds, brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study," *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 77, no. 6, pp. 1512–1521, 1994.
- Norholt M.D, Van Egmond H.P, Paulsch W.E. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 1979. pp.485-490.
- Notomi ,T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T.(2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28(12): 63.
- O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé) (2002).- Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante–sixième réunion du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires, Série de rapports techniques de l'OMS no 906, Organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, Suisse.
- Pageau D, Filion P. Fusariose : réduire les risques aux champs ! Journée d'informations sur les mycotoxines. Consulté le 21/01/16. Disponible sur www.symposium-mycotoxines.ca.
- Paster N, Bullerman L.B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grain as controlled by physical means. *Int. J. Food. Microbiol* 7, 1988. pp.257-265.
- Park, D. L., (1992). Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Microb. Hyg. Alleg.* 4(9) : 21 –27.
- Park J.W., Kim E.K., Shon, D.H. et Kim, Y.B. (2002).- Natural co–occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, 19,1073–1080.
- Parvathi D, Rajender Reddy A and Krishna Reddy V. Indicence of mycotoxins in

poultry feeds and feed ingredients used in warangal (TS), India. *Int. J. Of life science*, 2017, vol.5 (3): 399-404.

- Peraica M, Domijan A.M., Fuchs R., Lucic A. et Radic B. (1999).- The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters*, 110,105– 112.
- Pitt J.I. (2000).- Toxigenic fungi, which are important? *Medical Mycology*, 38,17–22.
- Pfohl-Leszkowicz A. et Castegnaro M. (2002).- Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancers. Dans *Toxines et recherches biomédicales*, collection SFET, Goudey–Perrière, F., Bon Cassian, Puiseux-Dao,S. & Sauviat M–P (eds) Elsevier, pp143–152.
- Pfohl-Leszkowicz A. *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Paris : Tec&Doc, 1999.478p.
- Ramakrishna Y and Bhat V (1987) Comparison of different spray reagents for identification of trichothecenes. *Curr. Sci.* 56,524-526.
- Raquel Hernández-Martínez, Inigo Navarro-Blasco, 2013.Surveillance of aflatoxin content in dairy cow feedstuff from Navarra (Spain);ELSEVIER.
- Russell R. et Paterson, M. (2006).- Identification and quantification of mycotoxigenic fungi byPCR. *Process Biochemistry*, 41, 1467–1474.
- R. Geisen, “Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi,” *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 19, no. 3, pp. 388–392,1996.
- Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006).- Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44,133–148.
- Schardl C, Panaccione D, Tudzynski P. Ergot Alkaloids. *Biology and Molecular Biology. The Alkaloids Chemistry and Biology* 63, 2006.45-86.
- Scudamore K.A. (2005).- Prevention of Ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives and Contaminants*, 1S,17–25.
- Simpson, T.J. and Pemberton A.D. (1989). High field 1 H NMR studies on the ammoniation of aflatoxin B1 .*Tetrahedron* 45: 2451 –2464.
- Sinha A.K. The impact of insect pests on a atoxine contaminant of stred wheat and maize in : *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored- product Protection*. UK,1994.
- Stack ME and Pohland AE (1975) Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 58,110-113.
- Steyn P., (1984).- *Ochratoxins and related dihydrocoumarins in* , Betina ed. *Mycotoxins– production, isolation, separation and purification*. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo,183–216.
- Stob M, Baldwin R.S, Tuite J, et al. Isolation of an anabolic uterotropic coumpound from corn infested with *Gibberella zeae*. *Nature* 196, 1962.1318.
- Tabuc Cristina. *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*. Sous la direction de Sesan Tatiana et BaillyJean-Denis.
- Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 2007. 190p. Ressource numérique disponible sur :oatao.univ-toulouse.fr/7652/.

- Van der Merwe K.J, Steyn P.S, Fourie L, et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature* 205, 1956.1112-1113.
- Whitaker, T.B., Trucksess, M.W., Weaver, C.M. and Slate, A.(2009). Sampling and analytical variability associated with the determination of aflatoxins and ochratoxin A in bulk lots of powdered ginger marketed in 1-lb bags. *Analyt. Bioanalyt. Chem.*, 395(5): 1291-1299.
- Yiannikouris A. et Jouany J.P. (2002).- Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Animal Research*, 51, 81–99.
- Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö.G , Soyer Y. and Alpas ,H. (2014). Rapid and standardized methods for detection of food borne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Cont.* 40: 359–367.