



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



Université des Frères Mentouri-Constantine
Département de microbiologie

N° d'ordre : 66/DS/2016
Série : 02/MIC/2016

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de
Doctorat en sciences en biologie

Option : Toxicologie

Par : **REDOUANE-SALAH Sara**

**Caractérisation mycologique des fourrages pour
ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le
lait cru de vache : étude comparative aux laits
pasteurisé et lyophilisé**

Soutenue le : 14 / 06 / 2016

Devant le jury composé de :

Président :	BOULAHROUF A-Rahmene	Professeur	Université Frères Mentouri. Constantine
Directeur de thèse	ARHAB Rabah	Professeur	Université Larbi Ben M'hidi. Oum el-Bouagui
Examineur :	HAMIDCHI A-Hafid	Professeur	Université Frères Mentouri. Constantine
Examineur :	BRANES Zidane	Professeur	Université Badji Mokhtar. Annaba
Examineur :	BELHAMRA Mohamed	Professeur	Université Mohamed Khider. Biskra
Examineur :	MECHAI A-Basset	M.C "A"	Université Larbi Tebessi. Tebessa

Année universitaire : 2015 / 2016

Dédicaces

Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux

Louange et Gloire à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien notre modeste travail.

Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète Mohamed

Paix et Salut sur lui.

À ma mère et à mon père

Pour la patience qu'ils ont toujours bien voulu garder face à mes initiatives, et pour les sacrifices qu'ils se sont imposés ; témoignage de tout ce que je leur dois et de tout l'amour que je leur porte.

À ma petite famille ; Mon mari et mes deux fils Yahia et Abderrahmene.

**À mes frères et leurs épouses, mes sœurs et leurs époux ;
À mes cousins et cousines ;**

À tout les/mes enseignants de mon ancien département (département de biochimie-microbiologie, Université de Constantine) ;

À tout mes collègues, enseignants du département de biologie de l'Université de Biskra.

A tous ceux que j'aime, qui m'aiment.

Remerciements

A mon encadreur, Monsieur ARHAB Rabah, qui m'a aidé et guidé dans la réalisation de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma vive gratitude et de mon sincère respect.

Sincères remerciement aux président et membres du jury, pour le temps qu'ils ont consacré pour évaluer notre travail :

Mr. BOULAHROUF A-Rahmene, Professeur à l'Université de Constantine ;

Mr. HAMIDCHI A-Hafid, Professeur à l'Université de Constantine ;

Mr. BRANES Djamel, Professeur à l'Université de Annaba ;

Mr. BELHAMRA Mohamed, Professeur à l'Université de Biskra ;

Mr. MECHAI A-Basset, MC « A » à l'Université de Tebessa ;

Vifs remerciements à :

- Mr : BOUDRA Hamid, qui ma beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail ;

- Mr : DIEGO Morgavi, directeur de recherche INRA de Clermont-Theix, qui m'a aider dans la rédaction de la publication ;

- A tous les membres de l'équipe DIMA, INRA France

A tout le personnel des départements de biologie et des sciences agronomiques à l'université Mohamed Kheider de Biskra, enseignants et administrateurs.

Nous tenons à remercier également les directeurs et tout le personnel des fermes de BAAAOUIA et KADRI à EL KHROUB, ainsi que tous les propriétaires des fermes privées visitées.

Vifs remerciements à toutes les personnes qui de prêt ou de loin m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Table des matières

Table des matières	Page
Introduction	
Chapitre premier : les moisissures	
1. Les moisissures.....	1
1.1. Définition.....	1
1.2. Structure des moisissures.....	1
1.3. Ecologie des moisissures.....	3
1.4. Classification des moisissures.....	3
1.5. Conditions de développement des moisissures.....	4
1.5.1. Facteurs environnementaux.....	4
a. Oxygène.....	4
b. Dioxyde de carbone.....	4
c. Température.....	4
d. pH.....	4
e. Humidité.....	4
f. Lumière.....	5
1.5.2. Facteurs nutritionnels.....	5
a. Besoin en carbone.....	5
b. Besoin en azote.....	5
c. Besoin en éléments minéraux.....	5
d. Besoin en vitamines et facteurs de croissance.....	5
e. Teneur en eau du substrat.....	6
1.5.3. Insectes.....	6
1.6. Reproduction des moisissures.....	6
1.6.1. Reproduction sexuée.....	6
1.6.2. Reproduction asexuée.....	7
1.7. Types de moisissures.....	7
1.7.1. Les moisissures de champ.....	7
1.7.2. Les moisissures de stockage.....	7
2. Moisissures mycotoxinogènes.....	8
Chapitre deuxième : les mycotoxines	
1. Les mycotoxines.....	9
1.1. Définition.....	9
1.2. Localisation.....	9
1.3. Origine.....	9

1.4. Structure des mycotoxines.....	10
1.5. Les principales voies de biosynthèse.....	10
1.5.1. Voies de biosynthèse des aflatoxines.....	11
1.6. Risques pour la santé humaine et animale.....	11

Chapitre troisième : les aflatoxines

1. Les aflatoxines (AFs)	14
1.1. Structure et propriétés physicochimiques des aflatoxines.....	14
2. Toxinogénèse.....	17
2.1. Facteurs extrinsèques.....	17
2.1.1. Température et humidité.....	17
2.1.2. Acidité du milieu (pH)	17
2.1.3. Oxygénation.....	17
2.1.4. Substrat.....	17
2.1.5. Interaction entre micro-organismes.....	18
2.2. Facteurs intrinsèques.....	18
3. Contamination du lait par les aflatoxines.....	18
3.1. Contamination des aliments de bétail par les aflatoxines.....	19
3.2. Conséquences économiques.....	20
3.3. Métabolisation des aflatoxines.....	22
3.3.1. Devenir des aflatoxines chez les ruminants.....	22
3.3.2. Voies d'élimination des aflatoxines et transfert dans les productions animales.....	26
a. <i>Excrétion urinaire et fécale</i>	26
b. <i>Excrétion biliaire</i>	27
c. <i>Excrétion dans le lait</i>	27
4. Aflatoxines et risque pour les ruminants.....	27
5. Aflatoxines et risque pour l'homme.....	28
6. Législation sur les aflatoxines.....	30
6.1. A l'échelle nationale.....	30
6.2. A l'échelle internationale.....	30
7. Mesures de prévention pour les aflatoxines (AFs)	33
7.1. Bonnes pratiques de culture et de stockage.....	33
7.2. Gestion des animaux.....	35
8. Méthodes de détoxication.....	35
9. Méthodes de détection et de dosage des aflatoxines.....	36

Matériel et méthodes

1. Analyse mycologique des aliments de bétail.....	38
1.1. Echantillonnage des aliments.....	38
1.2. Isolement, repiquage et purification des moisissures.....	40
1.2.1. Isolement.....	40
1.2.2. Repiquage et purification.....	40
1.3. Méthodes d'identification des moisissures.....	40
1.4. Expression des résultats.....	41
2. Analyse mycotoxologique du lait de vaches.....	41
2.1. Echantillonnage du lait.....	41
2.1.1. Le lait cru.....	41
2.1.2. Le lait pasteurisé.....	43
2.1.3. Le lait lyophilisé (en poudre).....	44
2.2. Méthode d'analyse de l'AFM ₁	45
2.2.1. Préparation des standards (de la gamme de calibration).....	45
2.2.2. Extraction de l'AFM ₁	46
2.2.3. Purification de l'AFM ₁	46
2.2.4. Conditions chromatographiques.....	46
2.2.5. Procédure de décontamination du matériel des mycotoxines.....	47
3. Analyses physicochimique et biochimique du lait.....	47
3.1. Analyse physicochimique.....	47
3.1.1. Détermination de l'acidité titrable.....	47
3.1.2. Détermination de l'acidité ionique.....	48
3.1.3. Détermination de la densité.....	49
3.2. Analyse biochimique.....	49
3.2.1. Détermination du taux butyreux.....	49
3.2.2. Détermination du taux protéique et du taux de lactose.....	51

Résultats et Discussion

1. Résultats de l'analyse mycologique des aliments de bétail.....	52
1.1. Identification de la flore fongique contaminant les aliments de bétail.....	52
1.2. Prédominance de la flore fongique totale isolée.....	63
1.3. Résultats de l'analyse des échantillons d'aliment par ferme.....	65
1.3.1. Fréquence d'isolement (Fr).....	65
1.3.2. Densité relative (Dr).....	67
1.4. Résultats de l'analyse des échantillons d'aliment selon la saison.....	70

1.5. Résultats de l'analyse mycologique par aliment.....	70
1.6. Discussion des résultats mycologiques.....	79
2. Résultats de l'analyse mycotoxique du lait de vaches.....	84
2.1. Teneurs en AFM ₁ dans les échantillons du lait.....	84
2.2. Discussion des résultats mycotoxiques.....	84
3. Résultats de l'analyses physicochimique et biochimique du lait cru.....	89
3.1. Résultats de la mesure de l'acidité titrable.....	89
3.2. Résultats de la mesure du pH.....	90
3.3. Résultats de la mesure de la densité.....	90
3.4. Discussion des paramètres physicochimiques.....	91
3.4.1. Acidité titrable.....	91
3.4.2. Acidité ionique.....	92
3.4.3. Densité.....	92
3.5. Résultats de la mesure du taux butyreux.....	93
3.6. Résultats de la mesure du taux de protéines totales.....	94
3.7. Résultats de la mesure du taux de lactose.....	95
3.8. Discussion paramètres biochimiques.....	95
3.8.1. Taux butyreux (Matière grasse).....	95
3.8.2. Protéines totales.....	96
3.8.3. Lactose.....	96

Publication

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AFB₁ : Aflatoxine B ₁ .	FAO : Food and Agriculture Organization.
AFB₂ : Aflatoxine B ₂ .	GSH : Gluthation.
AFG₁ : Aflatoxine G ₁ .	GST : Gluthation <i>S</i> -transferase.
AFG₂ : Aflatoxine G ₂ .	HPLC : High Performance Liquid Chromatography.
AFM₁ : Aflatoxine M ₁ .	HSCAS : Hydrated Sodium Calcium AluminoSilicate.
AFM₂ : Aflatoxine M ₂ .	INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.
AFP₁ : Aflatoxine P ₁ .	LD : Limite de Détection.
AFQ₁ : Aflatoxine Q ₁ .	LQ : Limite de Quantification.
AFs : aflatoxines.	µg : microgramme.
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.	N : normalité.
EFSA : European Food Safety Authority	NIV : nivalenol.
AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments).	ng : nannogramme.
A_w : Activité de l'eau.	pg : picogramme.
CE : Commission Européenne.	OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
CIRC (IARC) : Centre Internationale de Recherche sur le Cancer.	ppb : partie par billion.
CYP : cytochrome P.	Qcs : contrôle de qualité.
C18 : Carbone18.	Qsp : quantité suffisante pour.
°D : Degré Dornic.	UV : Ultra-Violet.
DAS : diacetoxyisochlorogenicol.	V : Volt.
DON : déoxynivalénol.	

Liste des tableaux

Tableau 01 : mycotoxines et champignons responsables de leur production (El Khouri, 2007).....	8
Tableau 02 : effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanisme d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement sur l'homme et l'animal (AFSSA, 2006).....	13
Tableau 03 : quelques propriétés physiques des Aflatoxines B ₁ , B ₂ , M ₁ , M ₂ , G ₁ , G ₂ (Fremy et Thomann, 2009 ; Nguyen, 2007)	16
Tableau 04 : estimation des dégâts économiques en Millions de \$ Australiens, causés par différents champignons et aflatoxines en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande en 1991 (Zinedine, 2004)	21
Tableau 05 : résidus d'AFM ₁ dans le lait de vache recevant des aliments contaminés ou des doses orales de toxines fongiques (Galtier, 1998).....	27
Tableau 06 : présence de l'aflatoxine M ₁ dans les différents types de lait.....	29
Tableau 07 : teneurs maximales en AFs exprimées en µg/kg dans l'alimentation humaine et animale dans l'Union Européenne (règlement 1881/2006/CE) (Azzoune, 2011)	31
Tableau 08 : limites maximales pour les mycotoxines dans les aliments dans certains pays (Zinedine, 2004)	32
Tableau 08 : limites maximales pour les mycotoxines dans les aliments dans certains pays (Zinedine, 2004). (suite)	33
Tableau 09 : méthodes recommandées fondées sur les bonnes pratiques agricoles (BPA) et les bonnes pratiques de fabrication (BPF) (Nguyen, 2007 ; FAO, 2003b)..	34
Tableau 10 : avantages et inconvénients des principales techniques utilisées pour le dosage des mycotoxines (Lamrani, 2009)	37
Tableau 11 : origine et type des différents aliments étudiés.....	39
Tableau 12 : origine des échantillons de lait cru.....	42
Tableau 13 : origine des échantillons de lait pasteurisé.....	43
Tableau 14 : origine des échantillons de lait en poudre.....	44
Tableau 15 : caractères cultureux de quelques espèces de moisissures isolées.....	62
Tableau 15 : caractères cultureux de quelques espèces de moisissures isolées (suite).....	63
Tableau 16 : nombre de souches de moisissures isolées par type d'aliments.....	71
Tableau 17 : concentration d'AFM ₁ dans le lait cru, pasteurisé et lyophilisé.....	85

Liste des figures

Liste des figures	Page
<i>Figure 01</i> : hyphe cénocytique (a) et hyphe septé (b) (Prescott <i>et al.</i> , 2007).....	2
<i>Figure 02</i> : morphologie d'un hyphe, représentation schématique de l'extrémité d'un hyphe montrant les organites typiques et d'autres structures (Prescott <i>et al.</i> , 2007)	2
<i>Figure 03</i> : classification des Mycètes dans le monde vivant (Blackwell <i>et al.</i> , 1998)	3
<i>Figure 04</i> : voies de biosynthèse des mycotoxines (Atoui, 2006)	11
<i>Figure 05</i> : voie de biosynthèse des aflatoxines (Snini, 2014 ; Boudih, 2011).....	12
<i>Figure 06</i> : structures chimiques des aflatoxines (Hadjeba-Medjdoub, 2012 ; Richard <i>et al.</i> , 2003)	16
<i>Figure 07</i> : étapes à risque durant la récolte et la conservation des fourrages (Boudra, 2002)	20
<i>Figure 08</i> : métabolisme de l'aflatoxine B ₁ dans le foie (Yiannikouris et Jouany, 2002)	24
<i>Figure 09</i> : biotransformation de l'Aflatoxine B ₁ dans le rumen et évolution de leur toxicité (Fangeat, 2008)	25
<i>Figure 10</i> : bioconversion de l'Aflatoxine B ₁ exo-8,9-époxyde.....	26
<i>Figure 11</i> : les pays qui ont une réglementation pour les mycotoxines dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux (jaune), ceux où on ne sait pas si la réglementation existe (Vert), et les nations qui n'ont aucune réglementation spécifique (rouge) (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture 1997 in Richard <i>et al.</i> , 2003)	30
<i>Figure 12</i> : les différentes étapes et techniques de la quantification des mycotoxines dans les aliments (Dragacci <i>et al.</i> , 2005)	37
<i>Figure 13</i> : schéma d'une chaîne HPLC (Nguyen, 2007)	46
<i>Figure 14</i> : colonies de moisissures poussant sur différents milieux de culture après 7 jours d'incubation à partir des aliments de bétail analysés (avant repiquage).....	52
<i>Figure 15</i> : aspect macroscopique et microscopique (x40) de <i>Penicillium sp</i> ₁ après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de rebuts de datte.....	53
<i>Figure 16</i> : aspect macroscopique et microscopique (x40) de <i>Penicillium sp</i> ₂ après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon d'Orge.....	53
<i>Figure 17</i> : aspect macroscopique et microscopique (x100) de <i>Penicillium sp</i> ₃ après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de son de blé.....	53

Figure 18 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus niger</i> après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon d'ensilage de maïs...	54
Figure 19 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus flavus</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de pain.....	54
Figure 20 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus flavus</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de concentré.....	54
Figure 21 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus flavus</i> après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.....	55
Figure 22 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus niger</i> après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de pain.....	55
Figure 23 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus ochraceus</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de concentré.....	55
Figure 24 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus niger</i> après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de paille.....	56
Figure 25 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus niger</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de concentré.....	56
Figure 26 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus ochraceus</i> après 14 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.....	56
Figure 27 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus fumigatus</i> après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de paille.....	57
Figure 28 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus fumigatus</i> après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de paille.....	57
Figure 29 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Aspergillus</i> sp après 14 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de son de blé.....	57
Figure 30 : aspect macroscopique et microscopique (x100) d' <i>Alternaria alternata</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de son de blé.....	58
Figure 31 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Alternaria alternata</i> après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon de concentré.....	58
Figure 32 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d' <i>Alternaria alternata</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.....	58
Figure 33 : aspect macroscopique et microscopique (x40) du genre <i>Mucor</i> après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon de concentré.....	59
Figure 34 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de <i>Mucor</i> après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon d'ensilage de maïs.....	59

Figure 35 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de genre <i>Rhizopus</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de Luzerne.....	59
Figure 36 : aspect macroscopique et microscopique (x40) du genre <i>Rhisopus</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon d'ensilage d'herbe.....	60
Figure 37 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de <i>Rhisopus</i> après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon d'orge.....	60
Figure 38 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de <i>Rhisopus</i> après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de foin d'avoine....	60
Figure 39 : aspect macroscopique et microscopique (x100) du genre <i>Fusarium</i> après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de paille.....	61
Figure 40 : aspect macroscopique et microscopique (x100) du genre <i>Fusarium</i> après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.....	61
Figure 41 : densité relative des genres de moisissures isolés de l'ensemble des échantillons d'aliments de bétail analysés.....	64
Figure 42 : fréquence d'isolement du genre <i>Aspergillus</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	65
Figure 43 : fréquence d'isolement du genre <i>Penicillium</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	65
Figure 44 : fréquence d'isolement du genre <i>Mucor</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	66
Figure 45 : fréquence d'isolement du genre <i>Alternaria</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	66
Figure 46 : fréquence d'isolement du genre <i>Rhisopus</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	67
Figure 47 : densité relative du genre <i>Aspergillus</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	67
Figure 48 : densité relative du genre <i>Penicillium</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	68
Figure 49 : densité relative du genre <i>Alternaria</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	68
Figure 50 : densité relative du genre <i>Mucor</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	69
Figure 51 : densité relative du genre <i>Rhisopus</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	69
Figure 52 : densité relative du genre <i>Fusarium</i> dans tous les échantillons des fermes analysées.....	69

Figure 53 : densité relative pendant la période froide et la période chaude de tous les genres isolés.....	70
Figure 54 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolées à partir des échantillons de concentré.....	72
Figure 55 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de concentré.....	72
Figure 56 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de paille.....	73
Figure 57 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de paille.....	73
Figure 58 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de foin d'avoine.....	73
Figure 59 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de foin d'avoine.....	74
Figure 60 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de son de blé.....	74
Figure 61 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de son de blé.....	74
Figure 62 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage d'herbe.....	75
Figure 63 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage d'herbe.....	75
Figure 64 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de luzerne.....	75
Figure 65 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de luzerne.....	76
Figure 66 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de rebuts de datte.....	76
Figure 67 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de rebuts de datte.....	76
Figure 68 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de pain.....	77
Figure 69 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de pain.....	77
Figure 70 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'orge.....	77

Figure 71 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'orge.....	78
Figure 72 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage de maïs.....	78
Figure 73 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage de maïs.....	78
Figure 74 : variation de l'acidité titrable de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.....	89
Figure 75 : variation du pH de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.....	90
Figure 76 : variation de la densité relative de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.....	91
Figure 77 : variation du taux de butyreux de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.....	94
Figure 78 : variation du taux de protéines totales de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.....	94
Figure 79 : variation du taux de lactose de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.....	95

Liste des Annexes

Annexe I : composition des milieux de cultures des moisissures.

Annexe II : courbe d'étalonnage de solutions étalons d'AFM₁.

Annexe III : appareillage utilisé dans l'analyse physicochimique et biochimique du lait.

Introduction

Introduction

Avec l'évolution de la société, et à cause des risques sanitaires qui peuvent perturber la sécurité alimentaire, le consommateur est devenu plus soucieux de la qualité sanitaire des aliments, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination. Parmi une multitude de contaminants connus actuellement, les mycotoxines et leurs métabolites notamment l'aflatoxine M₁ (AFM₁), qui sont des substances naturelles produites par le métabolisme secondaire des moisissures, posent de sérieux problèmes. Parmi 300 métabolites secondaires identifiés à l'échelle internationale, environ une trentaine posséderait des propriétés toxiques préoccupantes (EFSA, 2009).

Les ruminants peuvent métaboliser les Aflatoxines (AFB₁) contaminant leur aliments en AFM₁ et la libérer ainsi dans le lait (Quillien, 2002). Chez l'homme, les aflatoxines, notamment l'AFM₁, trouvée majoritairement dans le lait, présentent un effet hépatotoxique, cancérigène, immunotoxique et altèrent également le fonctionnement des organes de reproduction (AFSSA, 2006).

La population algérienne est la première au Maghreb, du point de vue consommation de lait, avec une consommation moyenne de 120 litres de lait par an et par habitant. Pour satisfaire la demande du marché intérieur, l'importation, sous forme de poudre de lait, coûte à l'état Algérien environ 700 millions de dollars par an (Oki, 2014).

En Algérie, jusqu'au début de notre étude, on ne disposait d'aucune information sur la contamination du lait par l'AFM₁, ni sur la situation des aliments de bétail vis-à-vis de l'occurrence des champignons mycotoxinogènes. La situation reste actuellement mal connue et sous estimée, aussi bien chez les animaux que chez l'homme.

Dans notre travail nous avons abordé dans une première partie (partie bibliographique), une étude des moisissures, des mycotoxines et en particulier les Aflatoxines.

Dans la partie expérimentale, nous avons essayé en première étape d'isoler et d'identifier la microflore fongique totale et mycotoxinogène contaminant les aliments de bétail, collectés de différentes régions en Algérie. Ensuite, nous avons quantifié le taux d'AFM₁ (par techniques d'immunoaffinité et HPLC) dans des échantillons de lait cru, collecté de plusieurs fermes situées dans l'Est du pays. Par la même méthode de dosage, l'AFM₁ a été dosée dans des échantillons de lait pasteurisé et lyophilisé (lait en poudre), commercialisés dans différentes régions de l'Est algérien.

Une étude visant l'évaluation de la qualité biochimique des échantillons de lait cru, a été également réalisée.

Synthèse bibliographique

Chapitre premier : les moisissures

1. Les moisissures

1.1. Définition

Les moisissures sont des champignons filamenteux, uni ou multicellulaires (Guiraud, 1998). Ces micro-organismes sont largement répandus dans la nature, et peuvent être observés à divers endroits (atmosphère, sol, eau, végétaux et déchets organiques, etc.), et tout particulièrement sur les denrées alimentaires entreposées, stockées depuis un certain temps (pain rassis, fromage ou fruits) (Tabuc, 2007 ; Berthier et Valla, 2002 ; Marie *et al.*, 2002).

Le terme de "moisissure" n'a pas réellement de signification systématique et ne représente pas un groupe botanique bien défini. Il désigne l'ensemble des champignons microscopiques qui ont de l'importance dans l'industrie humaine et dans l'environnement, de façon bénéfique ou néfaste (Leyral et Vierling, 2001).

1.2. Structure des moisissures

Les moisissures (Micromycètes) ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent dans diverses familles de champignons microscopiques. Leur structure de base est le *thalle filamenteux* qui constitue l'appareil végétatif de ces micro-organismes. Il a la forme de mycélium, constitué d'un amas de filaments enchevêtrés et ramifiés dans tous les sens lors de la croissance, appelé *hyphe* (Bourgeois *et al.*, 1996 ; Heritage *et al.*, 1996). Ces derniers peuvent être non cloisonnés (hyphes cénocytiques) dans le cas des *Phycomycètes*, ou cloisonnés (hyphes septés) chez les *Septomycètes* (Leyral et Vierling, 2001) (cf. Figure 01).

Le développement des champignons se fait par croissance apicale et élongation des filaments, à partir de leurs extrémités, dans toutes les directions et de façon identique (Boquet, 1993). Le mycélium peut différencier des organes spécialisés dans la multiplication et la dissémination, appelés *spores* (Bourgeois *et al.*, 1996).

En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donne naissance à des structures plus spécialisées, qui produisent des spores asexuées (**conidies**) ou, plus rarement, des spores sexuées (Kendrick, 1999).

Synthèse bibliographique

Les cellules de moisissures sont tubulaires, formant des filaments. La composition chimique globale est voisine de celle des bactéries (Guiraud, 1998). La paroi cellulaire responsable de la forme est riche en cellulose ou en chitine selon les groupes. Le cytoplasme, limité par une membrane cytoplasmique, contient des ribosomes, des mitochondries, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des lysosomes, des peroxysomes, des vacuoles, etc.), et un ou plusieurs noyaux (Guiraud, 1998) (cf. Figure 02).

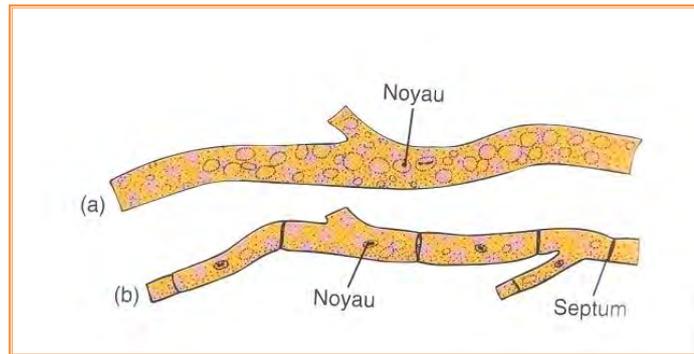


Figure 01 : hyphe cénocytique (a) et hyphe septé (b) (Prescott *et al.*, 2007).

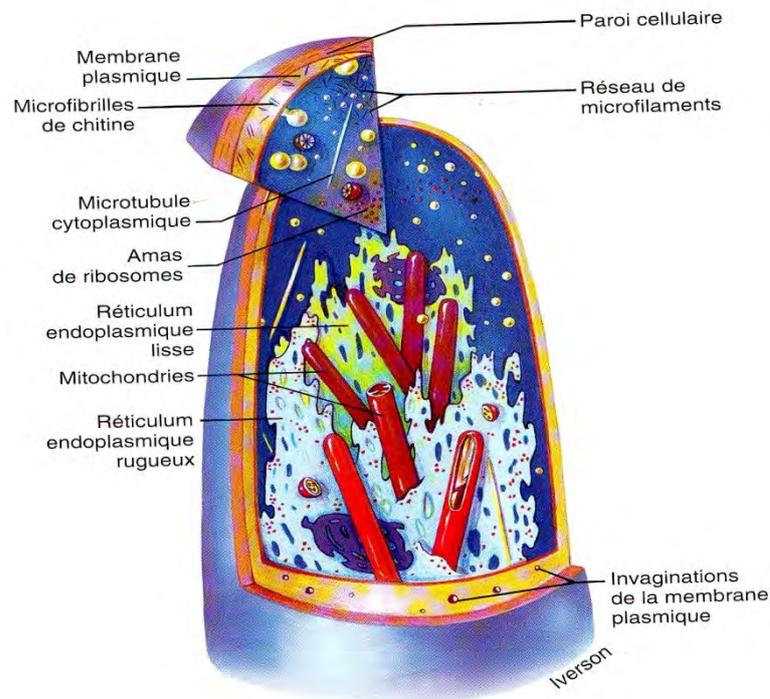


Figure 02 : morphologie d'une hyphe, représentation schématique de l'extrémité d'une hyphe montrant les organites typiques et d'autres structures (Prescott *et al.*, 2007).

1.3. Ecologie des moisissures

Les moisissures colonisent, presque tous les types d'écosystèmes ; certaines vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, et d'autres sont des saprophytes (Carip, 2008). Elles sont aérobies, en générale, acidophiles (pH de développement optimal de 3 à 7), mésophiles (20-30°C) avec un besoin faible en eau. Certaines espèces sont osmophiles, halophiles ou xérophiles (Bousseboua, 2004 ; Guiraud, 1998).

1.4. Classification des moisissures

La classification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères morphologiques (structure du mycélium), et aux mode de reproduction (sexuée ou asexuée), pour définir les grandes classes de moisissures (Heritage *et al.*, 1996 ; Leveau et Bouix, 1993). On différencie ainsi quatre subdivisions selon les modalités de reproduction sexuée : les Mastigomycotina (Chytridiomycotina), les Zygomycotina, les Basidiomycotina et les Ascomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée Deuteromycotina ou *Fungi imperfecti* (Heritage *et al.*, 1996 ; Leveau et Bouix, 1993).

Les Deuteromycotina ne sont pas une division véritable, mais un groupe dans le quel sont réunies les espèces qui n'ont pas de reproduction sexués ou, que l'on ne connaît pas encore. Le tri est en cours, et les organismes qui y sont classés trouvent peu à peu leur place chez les Basidiomycotina et les Ascomycotina (Branger *et al.*, 2007).

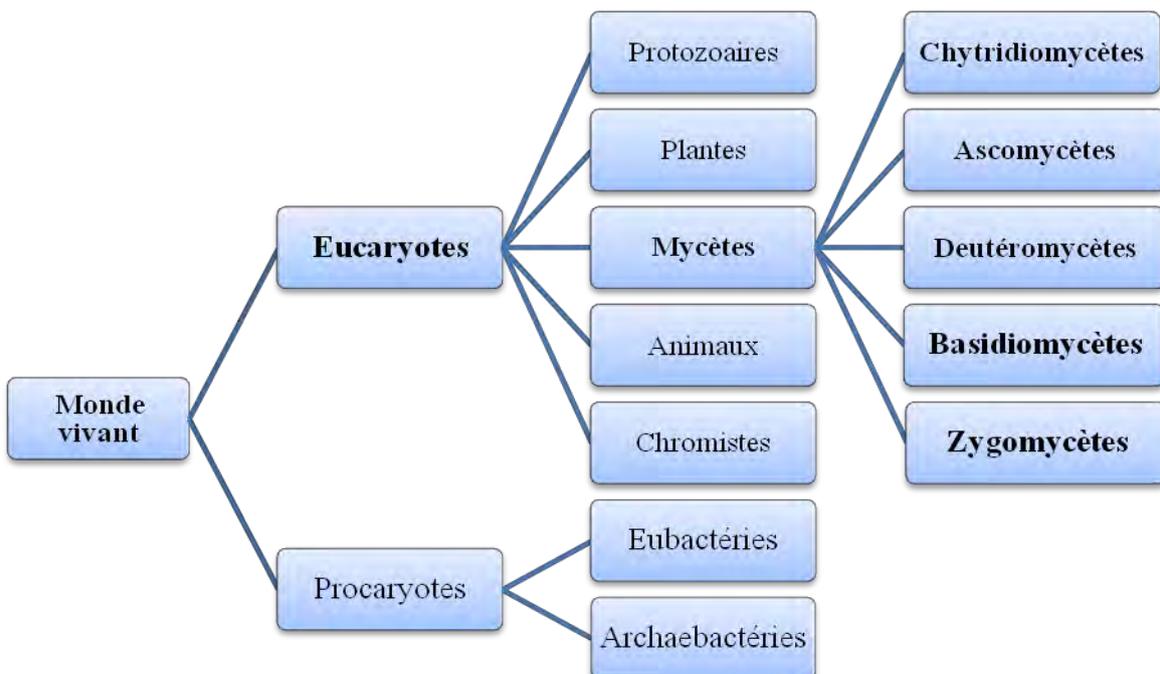


Figure 03 : classification des Mycètes dans le monde vivant (Blackwell *et al.*, 2012).

1.5. Conditions de développement des moisissures

1.5.1. Facteurs environnementaux

a. Oxygène

Les moisissures sont des organismes aérobies, mais les exigences en oxygène des différentes formes d'une même espèce sont différentes. Cela n'empêche pas l'existence de certaines espèces qui peuvent se développer en anaérobiose (**Boiron, 1996 ; Roquebert, 1984**).

b. Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un élément essentiel intervenant dans d'importantes réactions métaboliques des moisissures. Cependant, certaines espèces sont intoxiquées par des concentrations élevées de dioxyde de carbone, alors que d'autres ne peuvent se développer qu'en présence d'une forte concentration de cet élément (**Boiron, 1996**).

c. Température

La végétation maximale des moisissures est produite entre 20 et 30°C, mais la plupart des mycètes tolèrent, généralement, une température de 5 à 40°C ; elles sont dites donc **mésophiles**.

Les espèces **psychrotolérantes** sont capables de se développer à des températures basses et mêmes négatives. Les espèces de moisissures incapables de pousser au dessus de 20°C, sont dites **psychrophiles**. À l'opposé, les espèces **thermotolérantes** poussent à des températures allant jusqu'à 50°C. Celles qui ne poussent pas à moins de 20°C, sont dites **thermophiles** (**Leyral et Vierling, 2001 ; Nicklin *et al.*, 2000 ; Boiron, 1996**).

d. pH

Les moisissures se développent mieux en milieu légèrement acide (croissance optimale à des pH entre 4 et 6), mais elles peuvent tolérer des pH très acides (pH = 1). Par ailleurs, le métabolisme des moisissures modifie le pH, soit par l'utilisation des anions ou des cations du milieu, soit en produisant des acides organiques ou de l'ammoniac (**Leyral et Vierling, 2001 ; Boiron, 1996**).

e. Humidité

Les mycètes ont besoin de l'eau pour extraire les nutriments et sont donc restreints à des environnements assez humides, comme les tissus d'un hôte, les sols et les substances humides (**Nicklin *et al.*, 2000**).

Synthèse bibliographique

f. Lumière

La lumière influence la croissance des moisissures, soit par destruction photochimique des constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique par la stimulation de la biosynthèse de divers pigments (**Boiron, 1996**).

1.5.2. Facteurs nutritionnels

a. Besoin en carbone

Les mycètes utilisent des substances organiques comme sources de carbone et d'énergie. La grande partie du carbone de l'environnement est sous forme de polymères complexes tels que la cellulose, la chitine et la lignine. Ces polymères doivent être hydrolysés par des enzymes hydrolytiques, libérées par les mycètes, pour avoir une forme soluble et diffusable (la paroi cellulaire rigide empêche l'endocytose) (**Nicklin et al., 2000**).

b. Besoin en azote

Les moisissures ne peuvent pas fixer l'azote gazeux (**Heritage et al., 1996**). Cependant, la plupart des espèces peuvent assimiler facilement, aussi bien l'azote ammoniacal que l'azote nitrique. Certaines sources d'azote organique peuvent aussi être utilisées sous formes d'acides aminés, par absorption directe à travers la membrane (**Davet et Rouxel, 1997**). Les peptides et les protéines ne sont utilisables qu'après leur dégradation par des protéases fongiques en acides aminés absorbables (**Nicklin et al., 2000 ; Heritage et al., 1996**).

c. Besoin en éléments minéraux

Les moisissures ont un requis spécifique en éléments traces tels que le Soufre, le Phosphore, le Magnésium, le Fer, le Cuivre, le Manganèse, le Zinc, le Molybdène, le Potassium, le Sodium et le Calcium, qui sont convertis en divers composés après réduction.

Ces traces d'éléments sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production des cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc. (**Boiron, 1996 ; Heritage et al., 1996**).

d. Besoin en vitamines et facteurs de croissance

Beaucoup de moisissures exigent diverses vitamines pour leur croissance, à de très faibles concentrations (10^{-5} à 10^{-12} Molaire). Les besoins les plus communs concernent la thiamine (B_1) et la biotine (B_8), intervenants comme Co-enzymes lors des réactions de carboxylations.

Synthèse bibliographique

Les facteurs de croissance sont des composés indispensables à la nutrition et à la croissance de certains micro-organismes tels que les stérols, les acides gras, les purines et les pyrimidines, nécessaires en quantité relativement importante. À titre d'exemple, les stérols jouent un rôle majeur dans la composition des membranes fongiques et leur perméabilité (**Boiron, 1996**).

e. Teneur en eau du substrat

La teneur en eau du substrat est un facteur déterminant le développement des moisissures. L'activité de l'eau (A_w) exprime la teneur en eau libre du substrat, et qui est disponible pour la croissance des moisissures. Si elle est maintenue en dessous de 0,65, aucun développement fongique ne sera observé (**Roquebert, 1984**).

1.5.3. Insectes

L'effet des insectes est particulièrement préoccupant, aussi bien pour une contamination aux champs que pendant le stockage. Une infestation par les insectes prédispose les grains à une contamination par les moisissures et à la production des mycotoxines. La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *Aspergillus flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**).

Les acariens sont aussi des vecteurs importants des spores ; ils vivent sur les graines et les plantes moisies, récupèrent et transportent ensuite les spores sur la surface de leur corps et dans leur tube digestif (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**).

1.6. Reproduction des moisissures

1.6.1. Reproduction sexuée

Ce type de reproduction permet la recombinaison des caractères héréditaires. Les cellules jouant le rôle de gamètes se forment à partir des hyphes déjà différenciés. La cellule résultant de la fécondation des gamètes subit des transformations plus ou moins importantes pour donner une spore (**Leyral et Vierling, 2001 ; Guiraud, 1998**). Les champignons issus de ce type de reproduction sont dits **téléomorphes** ou **parfaits** (**Cahagnier et al, 1998**).

On connaît quatre sortes de spores issues de la reproduction sexuée :

- Les zygosporés;
- Les oosporés;
- Les ascosporés;
- Les basidiosporés (**Leyral et Vierling, 2001 ; Guiraud, 1998**).

Synthèse bibliographique

1.6.2. Reproduction asexuée

Certaines moisissures sont, le plus souvent ou exclusivement, rencontrées à des stades de multiplication asexuée, par l'intermédiaire de spores ou de conidies. Ces champignons sont dits **anamorphes** ou **imparfaits**, et sont alors classés dans la cinquième subdivision, les Deuteromycotina (**Blackwell et al., 2012**).

Les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose ; elles assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les Deuteromycotina (appelés également champignons mitosporiques ou conidiens) (**Prescott et al., 2007 ; Leyral et Vierling, 2001 ; Guiraud, 1998**).

Lorsque les deux formes de reproduction (sexuées et asexuée) co-existent, les champignons sont dits **holomorphes**.

1.7. Types de moisissures

1.7.1. Les moisissures de champ

Les principaux genres sont : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* et *Fusarium*. Ces moisissures peuvent survivre pendant des années dans la graine sèche.

Parmi les quatre genres, la toxicité du *Fusarium spp* présente un grand risque pour la santé humaine et animale. Les espèces de ce genre contaminent diverses cultures, principalement le maïs, le blé, le mil et le sorgho, ainsi que des plantes ligneuses. Le genre *Fusarium* est considéré comme "champignon des champs", qui secrète sa toxine lorsque les conditions lui deviennent favorables (**Atoui, 2006 ; FAO, 1984**).

1.7.2. Les moisissures de stockage

Les principaux genres inclus dans cette catégorie sont : *Aspergillus* et *Penicillium*. Le premier genre est considéré comme champignon d'entreposage, bien que la contamination débute fréquemment dans les champs. Le genre *Fusarium* (champignon des champs) peut apparaître durant le stockage avec un taux d'humidité élevé et une température basse.

Presque tous les champignons des stocks envahissent d'abord, et de préférence, le germe des grains, ce qui a pour effet immédiat la réduction du pouvoir germinatif.

Les différents facteurs environnementaux, la nature du substrat, le degré de contamination initial, ainsi que les modes de stockage, ont une incidence très importante sur les dégâts causés par le développement fongique, la production des mycotoxines, et la perte de qualité des grains (**Atoui, 2006 ; FAO, 1984**).

2. Moisissures mycotoxinogènes

A côté des effets très bénéfiques des champignons dans la vie courante, ils sont capables de provoquer également d'importantes détériorations, notamment dans le domaine agronomique (Nguyen, 2007).

Cinq genres de champignons, dits **toxinogènes**, ont la capacité de produire des **mycotoxines**, si les conditions écologiques leurs sont favorables. Il s'agit des genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps*. Ces moisissures et leurs mycotoxines secrétées sont susceptibles de contaminer l'aliment, du champ jusqu'à l'assiette des consommateurs.

Tableau 01 : mycotoxines et champignons responsables de leur production (El Khouri, 2007).

Champignons	Toxines
<i>Aspergillus</i>	- Aflatoxines, Stérigmatocytine, Ochratoxine A (OTA).
<i>Penicillium</i>	- Patuline, Citrinine (CIT), Acide pénicillique, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, Ochratoxine A.
<i>Fusarium</i>	- Trichothécènes (DON : Déoxynivalénol, NIV : Nivalénol, Toxine T-2, DAS : Diacétoxyscipenol), Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine.
<i>Alternaria</i>	- Alternariol, Acide Ténuazonique.
<i>Claviceps</i>	- Alcaloïdes de l'Ergot.

Les champignons majeurs connus comme précurseurs de l'Ochratoxine A (OTA) et de l'Aflatoxine B₁ (AFB₁) qui sont impliquées dans la chaîne alimentaire humaine et animale, appartiennent principalement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (El Khouri, 2007).

Chapitre deuxième : les mycotoxines

1. Les mycotoxines

1.1. Définition

Le terme **mycotoxine** vient du grec «mycos» qui signifie champignon, et du latin «toxicum» qui signifie poison (**Yiannikouris et Jouany, 2002**).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de nature chimique ; elles sont ni protéines ni macromolécules. Elles sont élaborées par plusieurs souches de champignons à certains stades de leur développement. Les mycotoxines sont des composés de faible poids moléculaire, et par conséquent ne sont pas directement antigéniques, et ne provoquent pas de phénomènes d'immunisation. Ces métabolites résistent aux phénomènes d'oxydation et aux processus de cuisson (thermostables), et ont une durée de vie bien plus longue que celle des champignons les ayant synthétisés (**Gallot *et al.*, 2000**).

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

1.2. Localisation

Les mycotoxines se trouvent accumulées dans le mycélium et les spores fongiques. Ils peuvent diffuser dans le substratum et contaminer les produits agricoles. Les mycotoxines sont adsorbées également dans les poussières, et sont transportées sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques, ce qui constitue une autre voie d'exposition pour l'homme et l'animal par inhalation (**Atoui, 2006**).

1.3. Origine

Les mycotoxines sont élaborées par des champignons -ou micromycètes- lors de quatre processus différents mettant en jeu respectivement le métabolisme secondaire fongique, la bioconversion de composés végétaux (dicoumarol), la réaction de la plante à des agressions (coumestrol), ou l'association plante-champignons (cas des champignons endophytes) (**Zbib *et al.*, 2014 ; Repussard *et al.*, 2013 ; Yiannikouris et Jouany, 2002**).

1.4. Structure des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés de structure variable ; aliphatique ou polycyclique, aromatique ou non. Elles sont neutres, acides ou basiques, mais presque toujours peu hydrosolubles (**Marasas *et al.*, 1988**). La diversité des voies de synthèse et des espèces productrices fait qu'il existe de très nombreuses molécules, de structure relativement différentes les unes des autres.

Le plus souvent, les mycotoxines sont des molécules de faible poids moléculaire : de 154 Da pour la patuline qui est l'une des plus petites molécules, à 466 Da pour la toxine T2, qui est l'une des plus grosses molécules. Les mycotoxines sont, pour la plupart, des composés hétérocycliques insaturés. La présence de doubles liaisons C=C joue souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes. C'est notamment le cas pour les aflatoxines dont la double liaison à l'extrémité des groupements furanes permet l'addition d'O₂ et la formation d'un cycle triangulaire époxyde, extrêmement toxique (**Tabuc, 2007**).

1.5. Les principales voies de biosynthèse

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés pendant la phase stationnaire, après les stades de multiplication et de croissance. Elles sont classées en trois différentes voies métaboliques (polyacétoacides, terpènes et métabolites azotés), selon leur origine biologique et leur structure (cf. Figure 04) (**AFSSA, 2006 ; Zinedine, 2004**) :

- **Les dérivés des polyacétoacides** (acétate-polymalonate) : c'est la principale voie. Ex : aflatoxines, citrinine, patuline ;
- **Les dérivés des terpènes** : seconde voie principale à partir de l'acétate, via le mévalonate. Ex : trichotécènes ;
- **Les dérivés des acides aminés**. Ex : acide aspergillique (Leucine et Isoleucine), roquefortine (Tryptophane et Histidine).

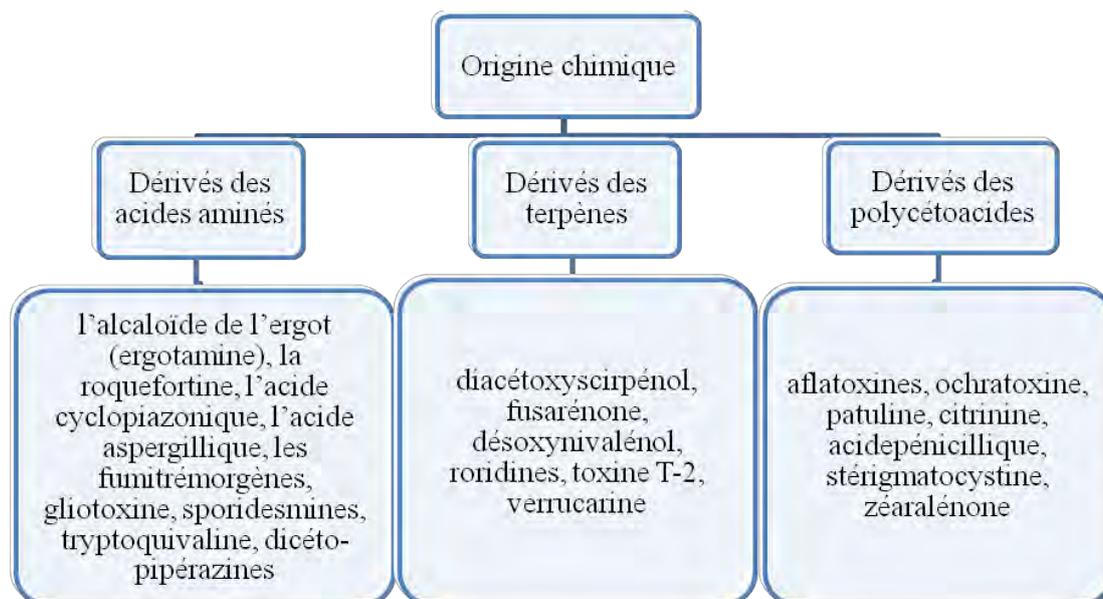


Figure 04 : voies de biosynthèse des mycotoxines (Atoui, 2006).

1.5.1. Voies de biosynthèse des aflatoxines

Les aflatoxines dérivent de l'acétyl-CoA issu du métabolisme primaire. Celui-ci est ensuite acétylé en un polycétide ou polycétoacide via une polycétide synthase (PKS), pour conduire à la synthèse des mycotoxines dérivées de polycétoacides. La voie de biosynthèse des aflatoxines est présentée en Figure 05.

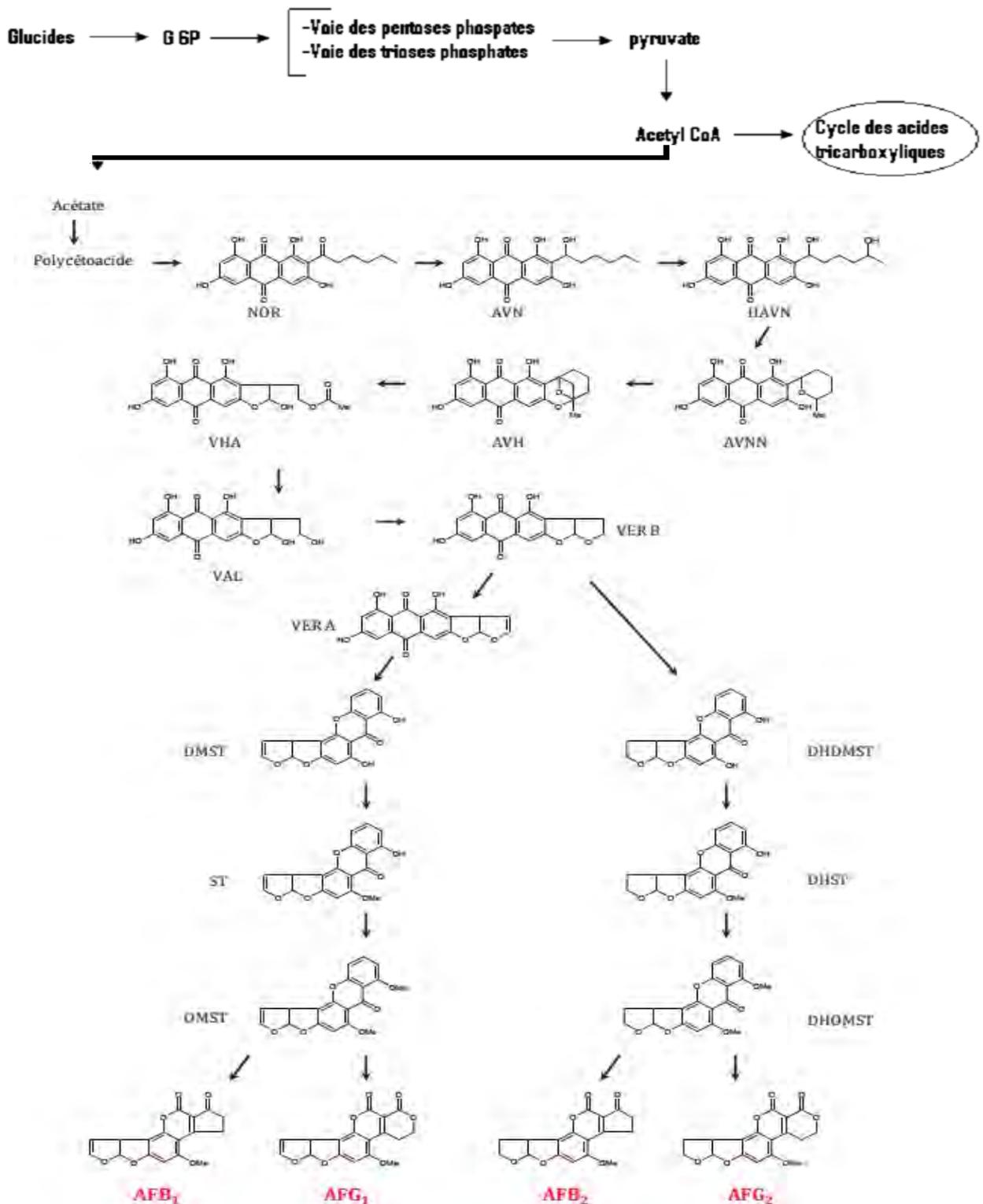
1.6. Risques pour la santé humaine et animale

Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée (exposition unique à une forte dose), mais il est exceptionnel d'être exposé à des doses toxiques en une seule ingestion d'aliments contaminés. Les effets chroniques (exposition répétée à de faibles, voire de très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence de ces toxines (AFSSA, 2006).

Les différentes mycotoxines ont une toxicité variable ; certaines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent oestrogéniques (zéaralénone), immuno/hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (toxines trémorgènes). Certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées être cancérigènes (cf. Tableau 02).

Notons que dans un même produit ou la même ration alimentaire plusieurs types de mycotoxines peuvent coexister (AFSSA, 2006).

Synthèse bibliographique



Abréviations : NOR, acide norsolorinique ; AVN, averantine ; HAVN, 5'-hydroxy-averantine ; AVNN, averufanine ; AVF, averufine ; VHA, versiconal hémiacétal acétate ; VAL, versiconal ; VER B, versicolorine B ; VER A, versicolorine A ; DMST, déméthylstérigmatocystine ; DDMST, dihydrodéméthylstérigmatocystine ; ST, stérigmatocystine ; DHST, dihydrostérigmatocystine ; OMST, O-méthylstérigmatocystine ; DHOMST, dihydro-O-méthylstérigmatocystine ; AFB₁, aflatoxine B₁ ; AFB₂, aflatoxine B₂ ; AFG₁, aflatoxine G₁ ; AFG₂, aflatoxine G₂.

Figure 05 : voie de biosynthèse des aflatoxines (Snini, 2014 ; Boudih, 2011).

Synthèse bibliographique

Tableau 02 : effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanisme d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement sur l'homme et l'animal (AFSSA, 2006).

Toxine	Effets	Mécanisme d'actions cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 + M1	<ul style="list-style-type: none"> - Hépatotoxicité. - Génotoxicité. - Cancérogénicité. - Immunomodulation. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation d'adduit à l'ADN. - Peroxydation lipidique. - Bioactivation par cytochromes P450. - Conjugaison aux Glutathion S-transférases.
Ochratoxine A	<ul style="list-style-type: none"> - Néphrotoxicité. - Génotoxicité. - Immunomodulation. 	<ul style="list-style-type: none"> - Impact sur la synthèse des protéines. - Inhibition de la production d'ATP. - Détoxification par les peptidases.
Patuline	<ul style="list-style-type: none"> - Neurotoxicité. - Mutagenèse <i>in vitro</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition indirecte d'enzymes.
Trichothécènes (Toxine T-2, DON)	<ul style="list-style-type: none"> - Hématotoxicité. - Immunomodulation. - Toxicité cutanée. 	<ul style="list-style-type: none"> - Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires. - Impact sur la synthèse des protéines. - Altération des immunoglobulines.
Zéaralène	<ul style="list-style-type: none"> - Fertilité et Reproduction. 	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison aux récepteurs oestrogéniques. - Bioactivation par des réductases. - Conjugaison aux glucuronyltransférases.
Fumonisine B1	<ul style="list-style-type: none"> - Lésion du système nerveux central. - Hépatotoxicité. - Génotoxicité. - Immunomodulation. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la synthèse de céramide - Altération du rapport sphinganine/sphingosine. - Altération du cycle cellulaire.

Chapitre troisième : les aflatoxines

1. Les aflatoxines (AFs)

En 1960, l'Angleterre a été exposée à une importante épidémie touchant les volailles. Plusieurs centaines de milliers de dindons ont été victimes de ce que l'on appelait alors "Turkey X disease". En étudiant la composition de leur nourriture, des chercheurs ont isolé alors pour la première fois une mycotoxine : l'**aflatoxine (AF)** (Cahagnier *et al.*, 1998).

L'acronyme d'**Aflatoxine** est formé à partir des combinaisons suivantes : première lettre «A» pour le genre *Aspergillus*, les 3 lettres suivantes "FLA" pour les espèces *flavus*, et le mot toxine signifie poison (Sirma, 2013).

Quatre souches d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser les AFs :

- *Aspergillus flavus*, qui produit principalement l'AFB₁ et l'AFB₂ ;
- *Aspergillus parasiticus*, qui produit les quatre aflatoxines (B₁, B₂, G₁, G₂) ;
- *Aspergillus nomius*, une espèce rare proche d'*Aspergillus flavus*, qui est capable de produire des AFs ;
- *Aspergillus pseudotamarii* (Tap et Royer, 2003 ; Richard *et al.*, 2003).

Parmi ces quatre espèces, seulement *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sont d'un point de vue économique importantes, car elles peuvent produire les aflatoxines sur la plupart des substrats mal stockés (Richard *et al.*, 2003). *Aspergillus flavus* peut être subdivisé en deux souches S et L. La première souche produit plus d'aflatoxines que la deuxième (Cotty et Cardwell, 1999).

1.1. Structure et propriétés physicochimiques des aflatoxines

Les aflatoxines sont des cristaux incolores, ou de couleur jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B₁ et B₂ émettent une fluorescence bleue, et les aflatoxines G₁ et G₂, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour *Blue* et G pour *Green*). L'aflatoxine M₁ ou 'Milk aflatoxin 1' présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de *Milk*, car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait (Richard *et al.*, 2003 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999). Elles absorbent la lumière vers 350 nm (Cahagnier, 1998 ; Freyssinet, 1982).

Synthèse bibliographique

Les AFs sont très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires. Par contre elles sont très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique) (**El Khouri, 2007 ; AFSSA, 2006**).

Les aflatoxines se trouvent instables sous la lumière ultraviolette en présence d'oxygène avec des pH extrêmes ($\text{pH} < 3$ ou $\text{pH} > 10$). Par oxydation le cycle lactone des aflatoxines devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. Les aflatoxines sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH_4OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B_1 qui est directement génotoxique (**El Khouri, 2007**).

Les AFs sont peu sensibles aux traitements thermiques (stérilisation, pasteurisation, congélation, etc.) ou au séchage, stables au cours du stockage. Néanmoins, certains procédés technologiques modifient la teneur initiale en AFs dans la matière première pour aboutir, selon le procédé, soit à une réduction, soit au contraire à une concentration de la teneur en AFs dans le produit fini (**AFSSA, 2006**).

Les aflatoxines sont des molécules ne contenant pas d'azote dans leurs molécules, et de ce fait ont un pouvoir antigénique très faible. Elles sont synthétisées uniquement à partir d'acétate. Ce sont des dérivés de la coumarine, structure extrêmement active sur le plan biologique, et elles possèdent la fonction lactone conditionnant largement leur toxicité. Les aflatoxines privées de leurs lactones sont inactives. Elles possèdent un groupement bifurannique qui permet l'interaction spécifique avec certains constituants cellulaires (**Cahagnier et al., 1998 ; Freyssinet, 1982**).

Les aflatoxines G, diffèrent des aflatoxines B par l'addition d'une fonction lactone supplémentaire introduisant un nouvel atome d'oxygène. Les aflatoxine de type 1 (B_1 , G_1 , M_1 , etc.), diffèrent du type 2 (B_2 , G_2 , M_2) par la présence d'une double liaison en position 2, 3 à l'extrémité du groupement bifurannique (**Cahagnier et al., 1998**) (cf. Tableau 3 et Figure 6).

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330g/mol) (**AFSSA, 2006**), difficilement métabolisées par les organismes vivants (**Ruppel et al., 2004**).

Synthèse bibliographique

Tableau 03 : quelques propriétés physiques des Aflatoxines B₁, B₂, M₁, M₂, G₁, G₂ (Fremy et Thomann, 2009 ; Nguyen, 2007).

Aflatoxine	Point de fusion	Masse moléculaire (g/mol)	Formule moléculaire	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
B ₁	268-269	312	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	OCH ₃	H	H	H	O	H ₂
B ₂	286-289	314	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	OCH ₃	H ₂	H ₂	H	O	H ₂
M ₁	299	328	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	OCH ₃	H	H	OH	O	H ₂
M ₂	293	330	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	OCH ₃	H ₂	H ₂	OH	O	H ₂
G ₁	244-246	328	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	H	H	H	-	-	-
G ₂	237-240	330	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	H ₂	H ₂	H	-	-	-

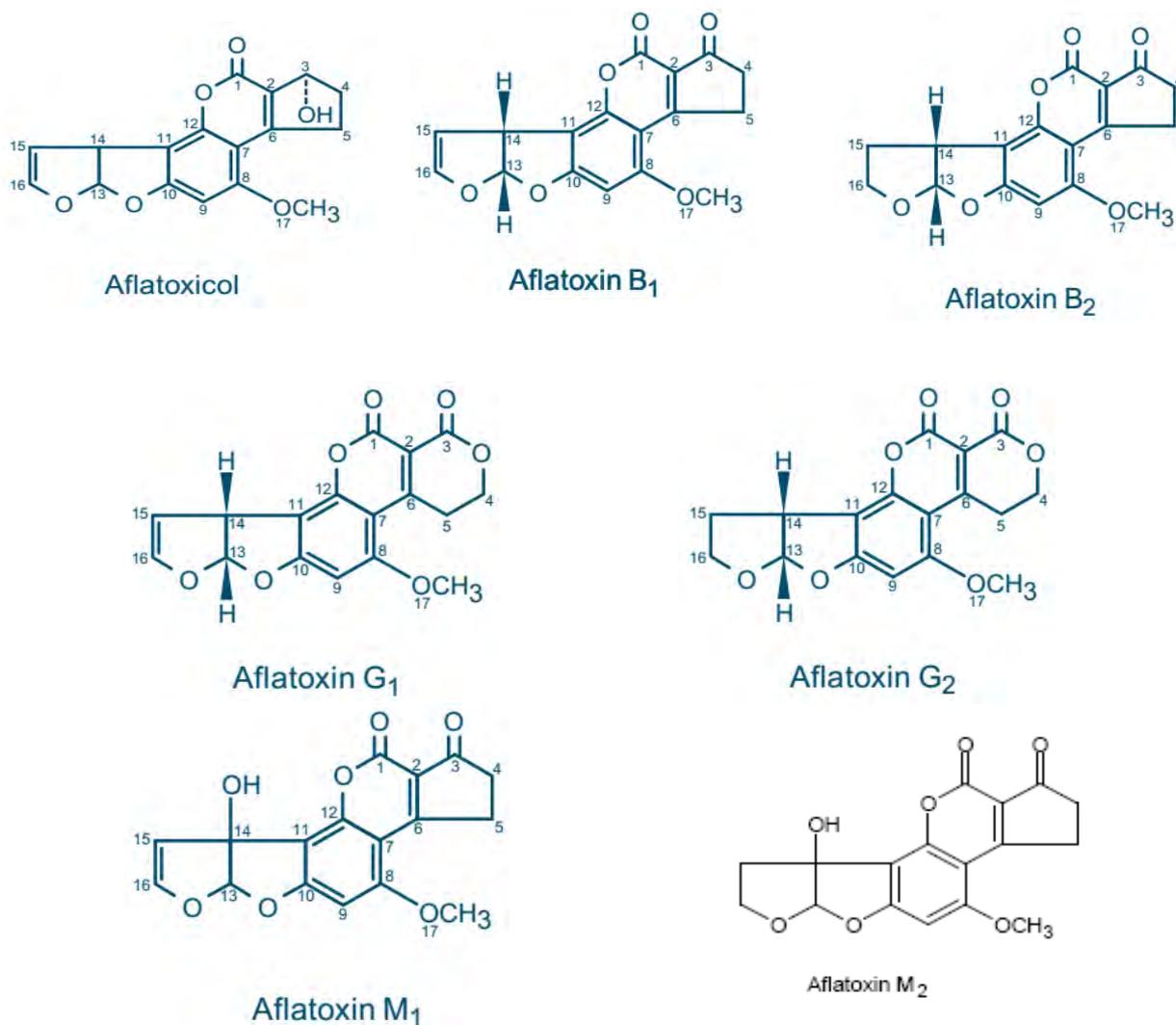


Figure 06 : structures chimiques des aflatoxines (Hadjeba-Medjdoub, 2012 ; Richard *et al.*, 2003).

2. Toxinogénèse

La contamination des aliments par des moisissures ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines. La production des mycotoxines peut s'effectuer à tous les stades de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'au produit fini. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments, ainsi que la quantité de mycotoxine produite dépendent de plusieurs facteurs. Ces derniers peuvent être intrinsèques (nature de la souche), ou bien extrinsèques (conditions écologiques dans lesquelles les champignons se développent). Ils dépendent également de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire (**Ngyuen, 2007**).

2.1. Facteurs extrinsèques

2.1.1. Température et humidité

Les températures et l'activité de l'eau (A_w) les plus favorables à la croissance des champignons, ne correspondent généralement pas à celles de la production de toxines. Les conditions optimales de développement d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* sont de 36°C et un (A_w) de 0.95, alors que la production d'aflatoxines (AFs) nécessite un A_w de 0,99 et une température entre 25 et 33°C (**Boudra, 2009 ; Pfohl-Leskowicz, 1999**).

De manière générale, la température optimale pour la production des mycotoxines est inférieure à celle requise pour la croissance du microorganisme producteur (**Zinedine, 2004**).

2.1.2. Acidité du milieu (pH)

La croissance des champignons élaborant les AFs s'effectue préférentiellement à pH=5, bien que la pousse comme l'élaboration de la toxine puisse avoir lieu à pH plus élevé (**Pfohl-Leskowicz, 1999**).

2.1.3. Oxygénation

La croissance d'*Aspergillus flavus* est plus sensible à la quantité de CO₂ que d'O₂ ou d'N₂. L'inhibition de la croissance, et de la formation des AFs est totale pour un taux de 80% de CO₂ (**Pfohl-Leskowicz, 1999**).

2.1.4. Substrat

Un champignon n'est pas forcément capable de se développer sur n'importe quel substrat. Ainsi, l'Aflatoxine ne se forme quasiment jamais dans le soja. Cela est dû à la présence, à l'état de traces, d'inhibiteurs comme le zinc ou de protéines de faible poids moléculaire.

Synthèse bibliographique

La composition qualitative et quantitative en certains nutriments (sucre, notamment) influe sur la contamination en aflatoxines. L'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxines, alors que la proline stimule leur production par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

2.1.5. Interaction entre micro-organismes

La présence d'autres micro-organismes, que ce soit des bactéries ou d'autres moisissures, modifie la croissance des champignons et la production de mycotoxines. Le taux d'aflatoxine est souvent moins important lorsqu' *Aspergillus parasiticus* est introduit dans le milieu de culture en même temps qu' *Aspergillus flavus*. L'inhibition de la production d'aflatoxines pour l'espèce *Aspergillus flavus* lorsque *Aspergillus niger* est présent, est due à la synthèse par ce dernier de composés inhibant la biosynthèse d'aflatoxines.

Lorsqu' *Aspergillus parasiticus* croit en présence de *Streptococcus lactis* ou *Lactobacillus casei*, la quantité d'aflatoxines diminue. Ceci se produit quand la contamination par les deux agents est séquentielle (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

2.2. Facteurs intrinsèques

Certaines espèces de moisissures sont toxigènes, mais d'autres ne le sont pas. De plus, au sein d'une même espèce toxigène, certaines souches sont fortement productrices de toxines alors que d'autres le sont, mais à des degrés moindres. Par exemple : toutes les souches d' *Aspergillus parasiticus* produisent les aflatoxines, par contre chez *Aspergillus flavus* la production est variable selon les souches.

La toxigenèse d'une souche de moisissure peut dépendre de son stade de développement (Azzoune, 2011 ; Zinedine, 2004).

3. Contamination du lait par les aflatoxines

Les aflatoxines peuvent être transférées de la ration animale contaminée, au lait des mammifères. Des enquêtes sont réalisées régulièrement dans le monde, et montrent que la fréquence de la contamination des laits peut varier géographiquement (exploitations, pays) et temporellement (saison, année) (Firmin, 2011).

3.1. Contamination des aliments de bétail par les aflatoxines

En raison d'une alimentation complexe, les ruminants peuvent être exposés à un nombre variable, mais plus important de mycotoxines que les animaux monogastriques. Les fourrages constituent une part importante de la ration des ruminants, et peuvent présenter un risque supplémentaire d'apport de mycotoxines lorsqu'ils sont de mauvaise qualité, ou lorsque les procédés de conservation sont défectueux. Dans le cas de lots de fourrages contaminés, les animaux peuvent être exposés aux mycotoxines durant une longue période. De plus, l'alimentation des ruminants (fourrages conservés et concentrés) est moins contrôlée que celle des monogastriques. Les aliments de bétail produits *in situ* à la ferme ne sont analysés que lors d'accidents d'élevage (**Boudra, 2009**).

Les céréales sont des vecteurs importants de mycotoxines, particulièrement pour les AFs puisqu'elles sont universellement consommées par l'homme et les animaux (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**). D'une manière générale, les petits grains (blé, riz, etc.) sont moins facilement contaminés que les gros, tel que le maïs. Au niveau des grains, c'est l'enveloppe qui est souvent la plus riche en mycotoxine ; son élimination après broyage permet de diminuer significativement le taux de mycotoxines des farines, mais pose un nouveau problème sanitaire lorsque le son est récupéré pour l'alimentation de bétail (**Berthier et Valla, 2002**).

L'aflatoxine est souvent trouvée dans le maïs, les arachides et les graines de coton cultivé dans les climats chauds et humides (**Whitlow et Hagler, 2001**). A l'inverse des céréales, la contamination des fourrages et des ensilages par les moisissures et les mycotoxines a été très peu étudiée et peu contrôlée. Ceci peut s'expliquer en partie par l'absence de valeur marchande des fourrages conservés, qui sont produits et consommés *in situ*. La contamination des fourrages par les moisissures s'effectue essentiellement au stade de la récolte et durant la conservation (cf. Figure 07) (**Boudra et al., 2002**).

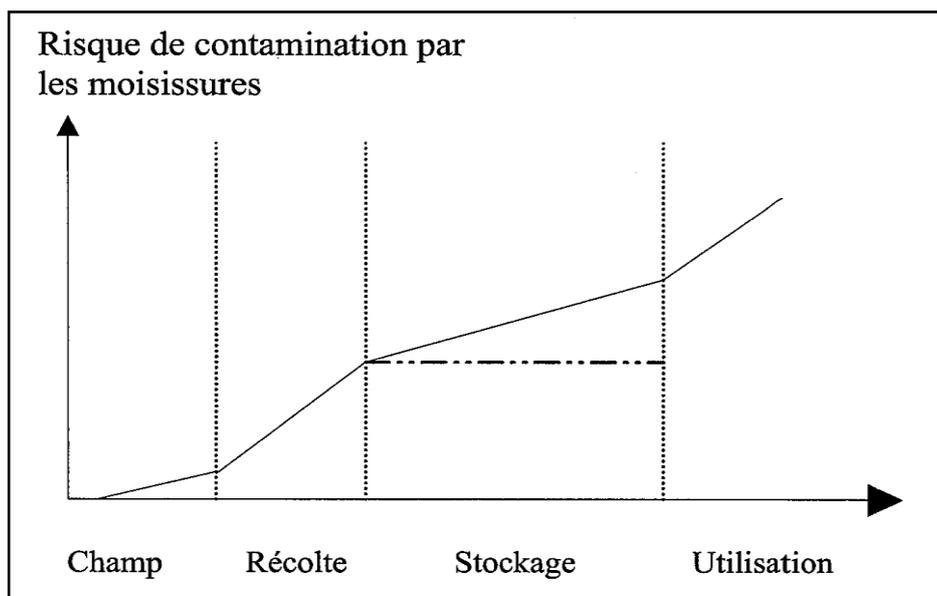


Figure 07 : étapes à risque durant la récolte et la conservation des fourrages (**Boudra et al., 2002**).

3.2. Conséquences économiques

Les altérations induites par les moisissures sont d'une grande importance économique en raison des pertes qu'elles occasionnent sur la productivité animale, le commerce national et international, et du caractère onéreux des mesures de séchage et de conservation qui sont nécessaires à la prévention de la contamination. Il faut ajouter également les problèmes de sécurité alimentaire pour l'homme, par l'intermédiaire des produits (lait et viande) pouvant être contaminés (**Boudra et al., 2002**).

Il est très difficile d'évaluer avec précision l'impact des contaminations alimentaires par les mycotoxines sur l'économie agricole, mais les répercussions financières peuvent être considérables. Les pertes de revenus dues aux aflatoxines sont potentiellement élevées et pénalisantes pour l'ensemble de la filière d'élevage (**Firmin, 2011**). La contamination annuelle des cultures par les mycotoxines a été estimée mondialement à 25%, ce qui se traduit par des milliards de dollars de pertes (**Whitlow et Hagler 2001**).

Le tableau 04 donne un aperçu sur les dégâts économiques annuels, provoqués par différents champignons et aflatoxines, répartis sur différents secteurs en certains pays de l'Asie (**Zinedine, 2004**).

Synthèse bibliographique

Tableau 04 : estimation des dégâts économiques en Millions de \$ Australiens, causés par différents champignons et aflatoxines en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande en 1991 (Zinedine, 2004).

Secteur	Nature des dégâts	Maïs	Arachide	Maïs et Arachide
- Dégradation du produit commercialisé.	- Détérioration de l'aspect extérieur des graines. - Perte du pouvoir germinatif.	70.9	36.8	107.7
- Intoxication humaine.	- Cancer du foie primaire dû à l'aflatoxine.	176.5	114.7	291.2
- Intoxications des animaux domestiques (volaille, bétail, porc).	- Diminution de croissance, stérilité, effets mutagènes, tératogène, carcinogène.	71.7	6.2	77.9
Total		319.1	157.7	476.8

La contamination des aliments destinés aux animaux par les mycotoxines occasionnent des coûts économiques directs et indirects pour la filière d'élevage :

Les pertes directes sont dues à l'altération de l'aliment par les moisissures ; le développement fongique peut conduire à la destruction de la récolte lorsque le végétal est fortement attaqué, et lorsque le grain et les fourrages sont rendus inconsommables. Dans d'autres cas, la croissance des moisissures se traduit par une altération sensorielle et nutritionnelle des récoltes (diminution des teneurs en matière sèche, matière azotée et glucides), responsable d'un refus ou d'une diminution de l'ingestion par l'animal. Dans ces situations, la ration contaminée ne couvre pas les besoins énergétiques de l'organisme. Les animaux en bas âges ou en lactation réagissent très rapidement par un ralentissement de leur croissance ou par une chute de la production laitière (Firmin, 2011).

Les pertes indirectes sont dues à la production de mycotoxines. La présence de mycotoxines sur les aliments peut entraîner une baisse du revenu par la chute de la productivité des animaux de rente, auxquelles s'ajoutent des frais de soins vétérinaires. Des dépenses supplémentaires liées à la mise en place de réglementations (enquêtes et analyses de l'aliment), l'investissement pour la recherche et la mise en œuvre de moyens de prévention et de détoxification des aliments (emploi de conservateurs et d'additifs), peuvent également être comptabilisées dans le coût économique de la contamination des aliments de bétail par les mycotoxines (Firmin, 2011).

3.3. Métabolisation des aflatoxines

La plupart des molécules exogènes ou xénobiotiques subissent une biotransformation hépatique ou tissulaire, conduisant à des métabolites hydrophiles plus facilement excrétables (Fremy, 1982). Parfois cette métabolisation conduit à des métabolites réactifs, capables d'interagir avec les macromolécules de l'organisme (ADN, ARN, protéines) et être à l'origine de mutation, d'inhibition de systèmes enzymatiques ou de réactions inflammatoires (Pfohl-Leskowicz, 1999).

L'AFB₁ est principalement transformée en 8 métabolites : l'époxyde-*AFB*₁, l'*AFM*₁, l'*AFB*_{2a}, l'*AFQ*₁, l'*AFP*₁, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H₁, l'aflatoxicol M₁ (cf. Figure 08). (Jaquet *et al.*, 1982). La métabolisation de l'AFB₁ est principalement réalisée par l'intervention des cytochromes P450 hépatiques. Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure (AFB, AFG), et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau (EL Khouri, 2007).

L'*AFM*₁ est le dérivé hydroxylé en position 9 et se retrouve dans le lait, ainsi que dans le foie, le rein et les muscles. La présence d'*AFM*₁ dans le rumen est due au cycle entérohépatique. Cette molécule est capable de se fixer à l'ADN (Pfohl-Leskowicz, 1999).

3.3.1. Devenir des aflatoxines chez les ruminants

Les aflatoxines sont généralement peu dégradées dans le rumen des bovins (<10% pour des doses de 1 à 10µg/ml). La formation d'aflatoxicol (dérivé hydroxylé de l'aflatoxine B₁), qui est de toxicité élevée a été montrée (cf. Figure 09). En effet, 10µg/ml d'AFB₁ inhibe de nombreuses bactéries ruminales. De ce fait, il semblerait que cette toxine perturbe le fonctionnement et la croissance de la flore du rumen (Fangeat, 2008 ; Yiannikouris et Jouany, 2002). Une récente étude a montré que l'AFB₁ est fortement absorbée au niveau du rumen, en particulier en pH acide (acidose) dû aux glucides fermentescibles contenus dans une alimentation riche en céréales (Pantaya *et al.*, 2014).

Chez les ruminants, les aflatoxines sont absorbées au niveau du duodénum, puis sont véhiculées dans l'organisme à partir d'une fixation sur les protéines plasmatiques ; c'est le cas de l'AFB₁ liée à l'albumine. Les aflatoxines subissent un métabolisme hépatique intense. Une **phase I** de biotransformation (oxydo-réduction), mettant en jeu les enzymes mono-oxygénases à cytochromes P450s (CYPs) est bien connue (AFSSA, 2006).

Synthèse bibliographique

Dans cette phase trois métabolisations enzymatiques de l'AFB₁ interviennent :

- Des réactions d'oxydation formant par hydroxylation l'AFM₁ et par époxydation l'AFB₁ 8,9-époxyde.
- Une O-déméthylation pour former l'AFP₁
- Une réduction de la fonction cétone en C1 (via une NADPH réductase) pour former l'aflatoxicol (AFOL). Les métabolites AFM₁, AFP₁ et AFQ₁ sont éliminés dans les urines des mammifères exposés à l'AFB₁. Seule l'AFM₁ est éliminée dans le lait. La présence de ces métabolites dans les urines et de l'AFM₁ dans le lait et dans le sérum, peut servir de bio-indicateur d'exposition (**AFSSA, 2009**) (cf. Figure 08).

Une **phase II** (conjugaison) du métabolisme concerne le devenir de l'AFB₁ 8,9-époxyde. Ceci inclut la conjugaison de l'AFB₁ 8,9-époxyde au glutathion par des glutathion S-transférases (GST). Une conjugaison à l'acide glucuronique des métabolites hydroxylés aboutit à la formation de glucurono-conjugués. La conjugaison au glutathion est généralement considérée comme la voie majeure de détoxification des aflatoxines. Le principal mode d'action toxique de cet époxyde est l'association aux acides nucléiques (ADN) et l'intervention dans la synthèse des protéines, engendrant la toxicité dont notamment la génotoxicité et la cancérogénicité (cf. figure 10). Le site de formation d'adduits à l'ADN se situe en position N7 de la guanine (**AFSSA, 2006 ; Galtier *et al.*, 2006**).

La biotransformation de l'AFB₁ a surtout lieu dans le foie et les muqueuses gastro-intestinales. La combinaison efficace de ce système de détoxification hépatique expliquerait la moindre susceptibilité des ruminants vis-à-vis de la toxicité de l'AFB₁ (**Firmin, 2011**).

Synthèse bibliographique

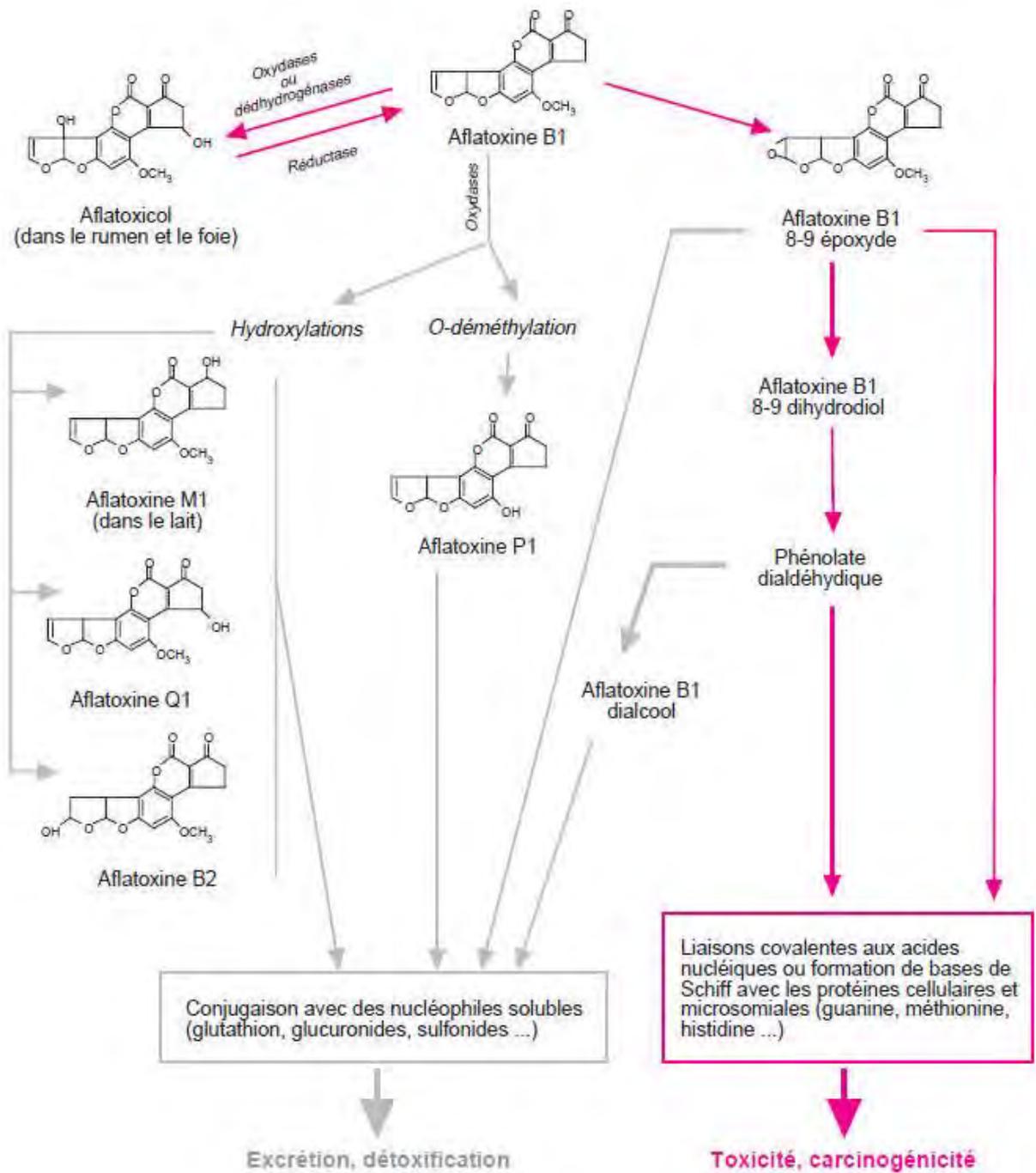


Figure 08 : métabolisme de l'aflatoxine B₁ dans le foie (Yiannikouris et Jouany, 2002).

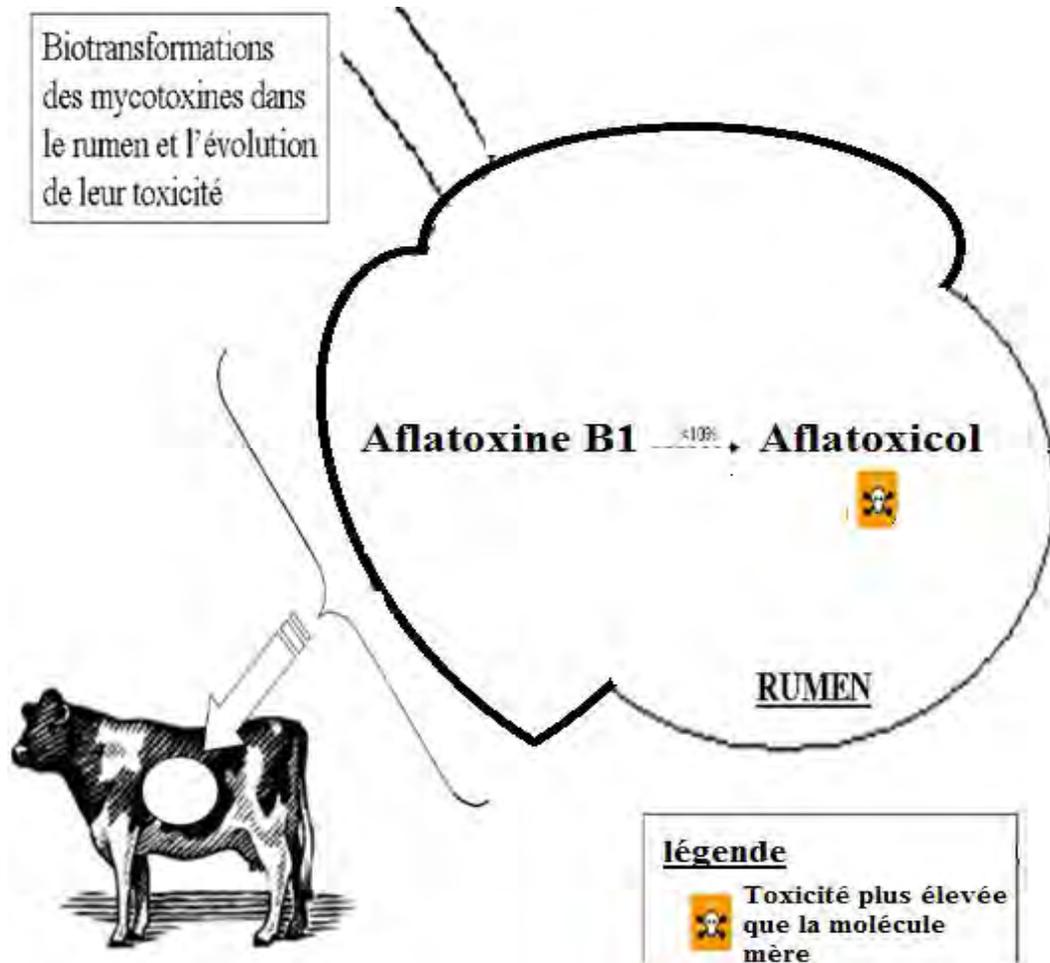


Figure 09 : biotransformation de l'Aflatoxine B₁ dans le rumen et évolution de leur toxicité (Fangeat, 2008).

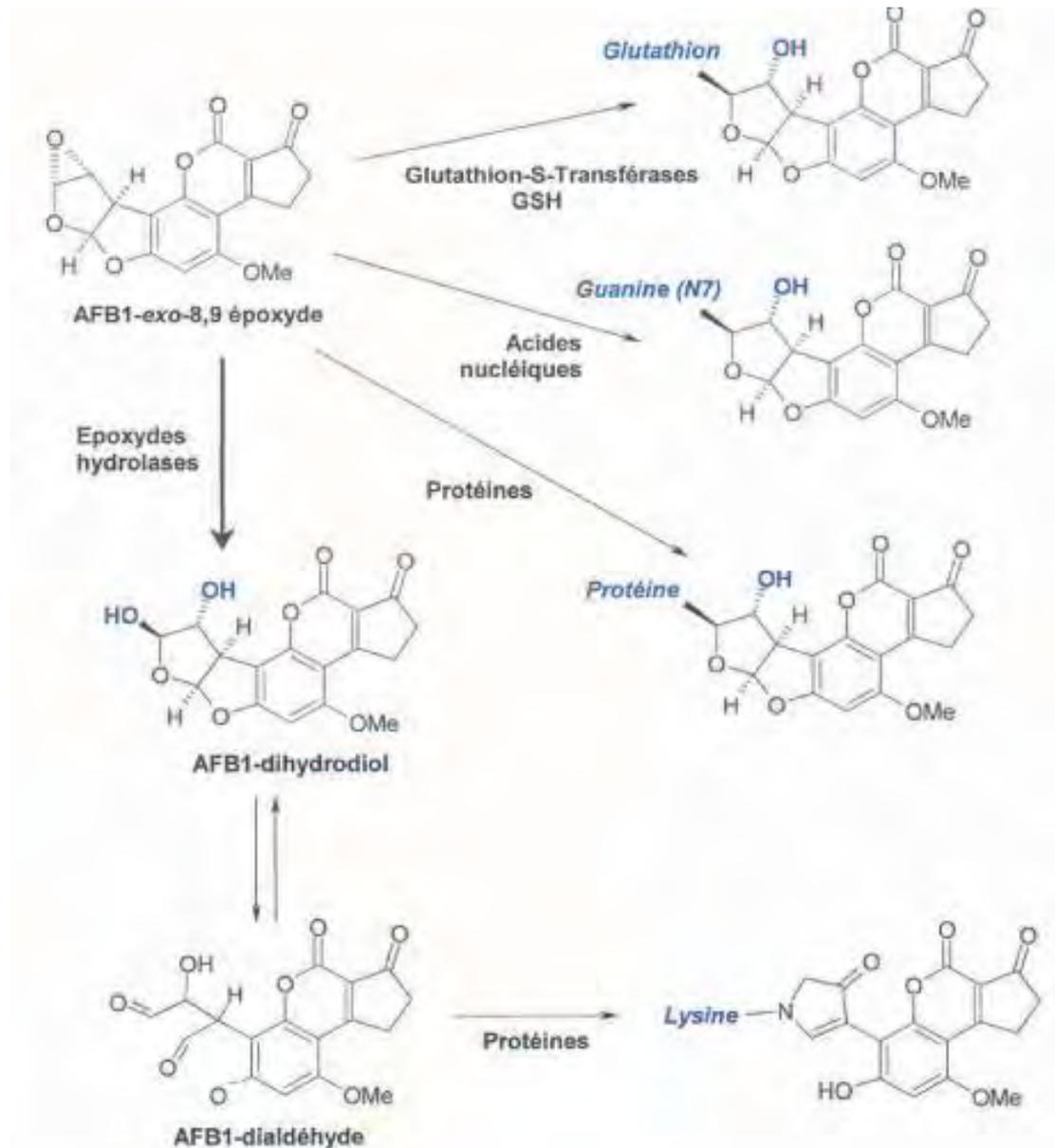


Figure 10 : bioconversion de l'Aflatoxine B₁ exo-8,9-époxyde.

3.3.2. Voies d'élimination des aflatoxines et transfert dans les productions animales

a. Excrétion urinaire et fécale

L'AFB₁ est principalement excrétée dans les urines et les fèces. La part excrétée dans les fèces résulte d'une hydrolyse partielle par des hydrolases hépatiques ou des enzymes intestinales en monoester et aminopentol (Fangeat, 2008). L'excrétion fécale semble aussi efficace et peut représenter jusqu'à 53% des doses reçues d'AFB₁ dans certaines études (Firmin, 2011). Les principaux métabolites retrouvés dans les fèces sont des aflatoxines conjuguées.

L'excrétion urinaire est également une voie importante d'élimination, et peut représenter 30% des doses d'AFB₁ ingérées, selon les conditions expérimentales.

Synthèse bibliographique

L'AFM₁ est le métabolite le plus abondant dans l'urine (**Firmin, 2011**). L'AFB₁ est aussi éliminée par voie urinaire sous forme inchangée, ou sous forme métabolisée telle que l'AFM₁, AFP₁ et AFQ₁, ou sous forme de dérivés conjugués ou d'adduits à l'ADN (**AFSSA, 2006**).

b. Excrétion biliaire

Une partie de l'AFB₁ est éliminée dans la bile conjuguée aux glutathion- et sous forme glucuroconjuguée (**AFSSA, 2006**).

c. Excrétion dans le lait

Chez les ruminants laitiers, le lait représente une voie mineure d'excrétion des mycotoxines. L'AFB₁, absorbée par l'organisme, est essentiellement excrétée dans le lait sous sa forme hydroxylée, l'AFM₁. L'élimination de l'AFM₁ par la glande mammaire des ruminants représente jusqu'à 0,1-2% de la dose ingérée chez la vache laitière (cf. Tableau 05). Les taux excrétés peuvent atteindre 6% de la dose ingérée chez la vache à haute production laitière (**Firmin, 2011**).

Tableau 05 : résidus d'AFM₁ dans le lait de vache recevant des aliments contaminés ou des doses orales de toxines fongiques (**Galtier, 1998**).

Mycotoxine	Dose	Durée de l'exposition en jours	Formes excrétées dans le lait	Concentration dans le lait (ppb)
AFB ₁	0,35mg/kg	3	AFM ₁	0,10

-La dose est exprimée en mg/kg de masse corporelle.

4. Aflatoxines et risque pour les ruminants

La présence des aflatoxines dans les aliments de bétail, notamment l'AFB₁ entraîne une diminution de leur qualité organoleptique et nutritive, une diminution des performances zootechnique des animaux de production, et l'altération de la santé animale (**Lamrani, 2009**). Un certain nombre d'effets indésirables peuvent être ainsi observés chez le ruminant : apparition de troubles cliniques, une diminution de la fertilité, la prédisposition aux infections, ainsi que des échecs de stratégies vaccinales et thérapeutiques (**Firmin, 2011**). L'aflatoxine B₁ est reconnue comme étant l'un des plus puissants cancérigènes d'origine naturelle (**AFSSA, 2009**). De ce fait, l'aflatoxine B₁ est capable d'exercer à la fois l'activation des **proto-oncogènes ras** et d'inactiver par mutation génique le gène p53 suppresseur de tumeurs (**Galtier et al., 2006**).

Synthèse bibliographique

Des études ont montré que les aflatoxines ont un effet sur le gain de poids corporel chez les bovins de boucherie, suivant un régime alimentaire contenant 700 ppb d'aflatoxine et que ces dernières seraient considérées comme toxiques même à des concentrations aussi faibles que 100 ppb. La réduction du rythme de croissance peut être le seul indice d'une aflatoxicose ou d'une autre mycotoxicose chroniques.

Le mécanisme par lequel les aflatoxines ralentissent la croissance est probablement relié à des perturbations du métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (**Whitlow et Hagler, 2001**). La santé des troupeaux laitiers ainsi que la production de lait peuvent être affectées par un régime alimentaire contaminé par les aflatoxines. C'est ainsi, la production du lait a été réduite quand des vaches laitières en lactation consommaient un aliment contenant 120 ppb d'aflatoxine. Lorsque l'aliment contaminé par l'aflatoxine a été substitué par un autre aliment exempt d'aflatoxine, la production de lait a augmenté de plus de 25% (**Whitlow et Hagler, 2010**).

5. Aflatoxines et risque pour l'homme

Pour l'homme, le risque lié aux mycotoxines est induit par la présence possible de résidus dans les productions issues des animaux de rente exposés à une alimentation contaminée par les mycotoxines. Ces résidus correspondent à la toxine elle-même et/ou à des métabolites biotransformés et conservant les propriétés toxiques du composé parental. Les espèces d'élevage peuvent donc constituer un vecteur de ces toxines ou de leurs métabolites dans leurs productions telles que la viande, le lait ou les œufs. C'est le cas notamment de l'aflatoxine B₁, dont le métabolite l'aflatoxine M₁ est retrouvé dans le lait des mammifères lorsque ceux-ci ont ingéré des aliments contaminés par l'aflatoxine B₁ (cf. Tableau 06).

Les aflatoxines sont généralement thermostables et ne sont pas détruites par les procédés habituels de cuisson et de stérilisation. Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques, et leur lipophilie en font des toxiques capables de persister dans l'organisme en cas d'expositions répétées et rapprochées (**AFSSA, 2006**). Par conséquent, l'AFM₁ est reclassée par l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (CIRC) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour être dans le groupe 1 au lieu du groupe 2 (**IARC, 2002**).

En revanche, la présence d'aflatoxines dans le lait pose un problème d'hygiène alimentaire. La consommation régulière de lait ou de produits laitiers contaminés est un facteur aggravant le risque de contamination pour une large population d'individus, notamment les individus les plus sensibles aux effets des mycotoxines.

Synthèse bibliographique

La présence d'aflatoxines dans le lait utilisé en substitution au lait maternel, les yaourts et les fromages démontrent le potentiel d'exposition des nourrissons et des enfants en croissance (Firmin, 2011).

Tableau 06 : présence de l'aflatoxine M₁ dans les différents types de lait.

Pays	Nature des échantillons	Contamination en AFM₁ (ng/l)	Référence
Maroc	- Lait pasteurisé.	1-117	Zinedine et al. (2007).
	- Lait cru.	10-100	Elmarnissi et al. (2012).
Libye	- Lait cru.	0,03-3,13	Elgerbi et al. (2004).
Soudan	- Lait cru.	18-86	Suliman et Abdalla (2013).
	- Lait cru.	220-6900	Elzupir et Elhussein (2009).
Egypte	- Lait cru.	10-250	Motawee et al. (2009).
Syrie	- Lait cru.	20-690	Ghanem et Orfi (2009).
	- Lait pasteurisé.	89-765	Ghanem et Orfi (2009).
	- Lait en poudre.	0-12	Ghanem et Orfi (2009).
Kuwait	- Lait cru.	0,21	Srivastava et al. (2001).
	- Lait frais.	4.90–68.7	Dashti et al. (2009).
Brésil	- Lait cru.	73-370	De-Sylos et al. (1996).
	- Lait UHT.	50-240	Garrido et al. (2003).
	- Lait pasteurisé.		
	- Lait UHT.	11-251	Oliveira et al. (2006).
Espagne	- Lait cru.	10-80	Rodriguez-Velasco et al. (2003).
Portugal	- Lait cru.	5-50	Martins et Martins (2000).
	- Lait UHT.	21-50	
Grèce	- Lait pasteurisé.		Roussi et al. (2002).
	- Lait UHT.	< 50	
	- Lait concentré.		
Italie	- Lait cru.	2-108	Bognano et al. (2006).
	- Lait cru.	1-23,5	Galvano et al. (2001).
Japon	- Lait pasteurisé.	1-29	Nakajima et al. (2004).
Pakistan	- Lait cru.	14-150	Asi et al. (2012).
Iran	- Lait UHT.	8-249	Heshmati et Milani (2010).
Turquie	- Lait cru.	< 50	Oruc et Sonal (2001).
	- Lait UHT.	108.17	Unusan (2006).
Mexique	- Lait cru.	0-8350	Carvajal et al. (2003).

6. Législation sur les aflatoxines

6.1. A l'échelle nationale

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

6.2. A l'échelle internationale

L'état actuel des connaissances scientifiques et techniques permet de dire qu'il n'est pas possible d'éviter totalement le développement des moisissures, et donc la présence d'aflatoxines dans les denrées alimentaires. Par conséquent, il convient de fixer les limites tolérables dans les denrées alimentaires (El Khouri, 2007).

Plusieurs pays du monde ont établi, ou proposé des limites réglementaires concernant les mycotoxines dans les aliments (cf. figure 11). Les pays de l'Union Européenne ont édité un règlement pour limiter la présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale. Les tableaux 07 et 08 donnent un aperçu sur les limites fixées par l'Union Européenne, certains pays Européens et les USA (Azzoune, 2011 ; Zinedine *et al.*, 2007).

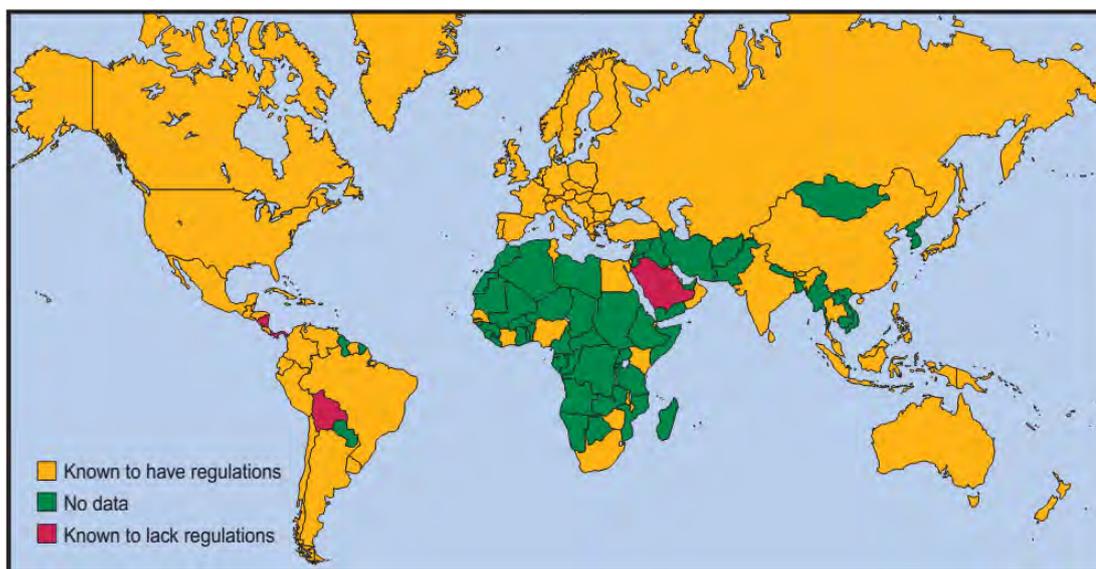


Figure 11 : les pays qui ont une réglementation pour les mycotoxines dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux (jaune), ceux où on ne sait pas si la réglementation existe (Vert), et les nations qui n'ont aucune réglementation spécifique (rouge) (**Organisation pour l'alimentation et l'agriculture 1997 in Richard *et al.*, 2003**).

Synthèse bibliographique

Tableau 07 : teneurs maximales en AFs exprimées en µg/kg dans l'alimentation humaine et animale dans l'Union Européenne (**Règlement 1881/2006/CE**) (**Azzoune, 2011**).

Alimentation	Mycotoxine	Denrée alimentaire	Teneur maximale en µg/Kg
Animale	Aflatoxine B₁	-Aliment complet/Complémentaire.	5-20 (selon les espèces animales)
		- Arachides + autres graines + fruits sec. - Certaines épices. - Préparation à base de céréale et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge.	2.5-8 (selon le produit et son stade de transformation). 5 0.1
Humaine	Aflatoxines B₁+B₂+G₁+G₂	- Arachides + autres graines + fruits sec. - Céréales. - Certaines épices.	4.1-15 (selon le produit et son stade de transformation). 4-10 (selon le produit et son stade de transformation). 10
		-Lait. -Préparation pour nourrisson et enfants en bas âge. -Matière première des aliments pour animaux.	0.05
			0.025 20

Synthèse bibliographique

Tableau 08 : limites maximales pour les mycotoxines dans les aliments dans certains pays (Zinedine, 2004).

Mycotoxine	Pays	Limite Maximale (µg/kg ou µg/l)	Aliment
AFB₁	- Finlande.	2	Tous types
	- Allemagne.	2	Tous types
	- Pays-bas.	5	Tous types
	- Belgique.	5	Tous types
	- Portugal.	25	Arachide
		5	Aliments pour enfants
		20	Autres
	- Autriche.	1	Tous types
		2	Céréales, noix
	- Suisse.	1	Tous types
		2	Maïs, céréales
	- Espagne.	5	Tous types
	-Luxembourg.	5	Tous types
	- Irlande.	5	Tous types
	- Danemark.	5	Tous types
- Grèce.	5	Tous types	
AFs totales : (AFB₁, AFB₂, AFG₁ et AFG₂)	- Suède.	5	Tous types
	- Norvège.	5	Arachides, noix,
	- Finlande.	5	Tous types
	- Allemagne.	4	Tous types
		0,05	Enzymes et
	- G. Bretagne.	4	formulations
	- France.	10	Noix, fruits secs
	- Italie.	50	Tous types
	- Autriche.	5 (B2+G1+G2)	Arachides
		0,02 (M1+B1+B2+G1+G2)	Tous types
	- Suisse.	5 (B2+G1+G2)	Aliments pour enfants
		0,01	Tous types
	- USA.	20	Nourritures de bébés
	- Belgique.	5	Tous types
	- Bosnie.	1 (B1+G1)	Arachides
	5	Céréales	
		Fèves, haricots	

Tableau 08 : limites maximales pour les mycotoxines dans les aliments dans certains pays
(Zinedine, 2004). (suite).

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

7. Mesures de prévention pour les aflatoxines (AFs)

Comme la présence des moisissures dans les récoltes est un phénomène incontournable, il serait impossible d'éliminer toute trace de mycotoxines des produits alimentaires. Les dégâts économiques et les problèmes de santé humaine et animale engendrés par les AFs, à court ou à long terme, ont poussé les scientifiques à chercher des méthodes efficaces pour réduire les taux de ces substances dans les aliments, ou bien d'empêcher leur production par les moisissures toxigènes (Zinedine *et al.*, 2007).

7.1. Bonnes pratiques de culture et de stockage

Il est possible de minimiser la contamination des céréales en prenant des précautions à deux niveaux : premièrement en suivant les méthodes recommandées, fondées sur les bonnes pratiques agricoles (**BPA**) (choix des variétés, pratiques culturales, traitements phytosanitaires, etc.), qui représentent la première ligne de défense contre la contamination par les AFs.

Synthèse bibliographique

Vient ensuite la mise en œuvre de bonnes pratiques de fabrication (**BPF**), durant la manutention, l'entreposage, la transformation et la distribution des céréales destinées à l'alimentation humaine et animale (**AFSSA, 2006 ; FAO, 2003**).

La réduction des taux des AFs relève à la fois du rôle des agriculteurs, des commerçants et des industriels (**Zinedine et al., 2007**). Pour assurer le niveau le plus faible possible d'AFM₁ dans le lait, il faut surveiller les résidus d'AFB₁ dans la ration alimentaire quotidienne d'une vache en lactation. Les moyens de lutte pour chaque période définie sont consignés dans le tableau 09.

Tableau 09 : méthodes recommandées fondées sur les bonnes pratiques agricoles (BPA) et les bonnes pratiques de fabrication (BPF) (**Nguyen, 2007 ; FAO, 2003**).

Période définie	Solutions proposées
Au champ	<ul style="list-style-type: none">- Créer des plantes résistantes.- Faire un plan de rotation des cultures afin d'éviter de planter le même produit dans un champ durant deux années consécutives.- Le travail du sol, en éliminant tous les débris végétaux.- Limiter le développement par l'emploi de fongicides.- Arrosage adapté.- Apport en minéraux.- Eviter les plantations trop rapprochées en respectant les espacements recommandés entre les espèces ou variétés cultivées.
À la récolte	<ul style="list-style-type: none">- Veiller à la maturité du grain.- Inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés.- Eviter la récolte par temps humide.
Au stockage	<ul style="list-style-type: none">- Contrôle périodique.- Contrôle des insectes.- Sécher les céréales et maintenir le taux d'humidité plus bas pour éviter la prolifération fongique durant l'entreposage.- Maintenir une bonne température.- Contrôler l'humidité.- Détruire les produits contaminés.- Une bonne aération des silos.
À la transformation	<ul style="list-style-type: none">- Contrôle mais, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures.
Dans l'alimentation des animaux	<ul style="list-style-type: none">- Tests de contamination, puis décontamination si nécessaire.
À la consommation	<ul style="list-style-type: none">- Eliminer les aliments contaminés.

7.2. Gestion des animaux

Pour éviter la contamination des animaux, il convient d'avoir des animaux en bonne santé et de s'assurer de leur fournir une ration non contaminée. Plusieurs solutions sont proposées:

- Surveillance des aliments ; visuelle, voire analyse des mycotoxines les plus courantes ;
- Elimination des aliments contaminés (moisis ou non) ;
- Tenir les vaches en bonne santé et notamment un bon fonctionnement ruminal, avec des rations de transition et de tarissement adéquates, la diminution des facteurs de stress, la complémentation minérale (sélénium et iode par exemple) ;
- Lorsqu'une mycotoxicose est suspectée, utiliser des liants de mycotoxines de façon raisonnée (Fangeat, 2008).

8. Méthodes de détoxification

Il n'existe pas à ce jour de traitement officiel de décontamination largement accepté, pour réduire les niveaux d'aflatoxine B₁ dans les aliments de bétail contaminés. Cependant, il existe des additifs qui servent à la neutralisation des aflatoxines contenues dans les aliments destinés aux bétail. On distingue 2 grandes familles d'additifs qui, selon leur mode d'action entraînent une diminution de l'exposition des animaux aux mycotoxines, en réduisant leur biodisponibilité dans l'organisme : les agents de *biotransformation* et les agents *adsorbants* (Firmin, 2011).

Un agent de biotransformation est un microorganisme ou une enzyme capable de dégrader ou convertir une mycotoxine en un produit moins toxique ou inactif, tel que le microbiote du rumen (*Eubacterium* souche BBSH 797) qui dégradent l'AFB₁ en utilisant cette toxine comme source de carbone (Firmin, 2011).

En revanche, un agent adsorbant est une substance qui est capable de séquestrer les mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal de l'animal, et de réduire leurs effets sur la santé de l'animal, en facilitant leur élimination dans les fèces. Les agents adsorbants forment une famille hétérogène de composés d'origine minérale, microbienne et végétale. Les adsorbants sont classés selon leur composition chimique en deux groupes : *les adsorbants inorganiques* (charbons actifs, les aluminosilicates : zéolites, bentonites, montmorillonites, aluminosilicates de sodium et de calcium –HSCAS- et les résines synthétiques tel le cholestyramine), et *les adsorbants organiques* (fibres végétales, les parois des bactéries fermentaire et des levures) (EFSA, 2009 ; Firmin, 2011).

Synthèse bibliographique

Les études réalisées chez les ruminants sont focalisées sur l'AFB₁. Les argiles et les charbons actifs sont pour la plupart efficaces pour séquestrer l'AFB₁ *in vitro* et réduire *in vivo* l'excrétion d'AFM₁ dans le lait. Actuellement, la plupart des agents de biotransformation sont au stade d'étude au laboratoire, contrairement aux agents adsorbants qui ont été utilisés sur le terrain (**Firmin, 2011**).

9. Méthodes de détection et de dosage des aflatoxines

La recherche des mycotoxines dans les aliments, dans le cadre de contrôle réglementaire, exige l'utilisation de méthodes de dosage aux performances analytiques reconnues. Aucune méthode analytique, aussi performante soit-elle, ne donne des résultats représentatifs du lot examiné sans une qualité satisfaisante de l'échantillonnage. En plus du respect des critères habituels de linéarité et de sensibilité, ces méthodes doivent présenter un degré de fiabilité élevé qui peut se mesurer par les paramètres fidélité (répétabilité et reproductibilité), et d'exactitude (mesurée par le taux de récupération). De même, il est important de vérifier l'adéquation entre le seuil de détection d'une méthode et les teneurs maximales tolérées qui sont définies par les textes réglementaires ou les recommandations de comités d'experts (**Dragacci et Fremy, 1999**).

Pour analyser les mycotoxines, habituellement présentes à l'état de traces dans les aliments, il existe toute une panoplie de méthodes, fondées essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules puis de leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Les méthodes physico-chimiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie gazeuse (GC), ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permettent toujours la quantification des molécules (cf. Figure 12).

D'autres méthodes, de développement récent, utilisent le principe de l'immunoanalyse. Ainsi, les techniques immunochimiques de type ELISA autorisent, suivant leur configuration, soit une détection qualitative, soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine. Les techniques immunochimiques sont souvent qualifiées de rapides, car de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément, ou bien dites de terrain si leur utilisation est possible hors d'un laboratoire sans appareils de mesure particuliers ou sophistiqués (lecture visuelle de certains tests) (**Dragacci et Fremy, 1999**).

Ainsi, les différentes méthodes de référence sont classées soit selon leur principe fondamental de fonctionnement (techniques physico-chimiques ou immunochimiques), soit selon les performances qu'elles permettent d'atteindre (analyse qualitative ou quantitative) (**Lamrani, 2009**).

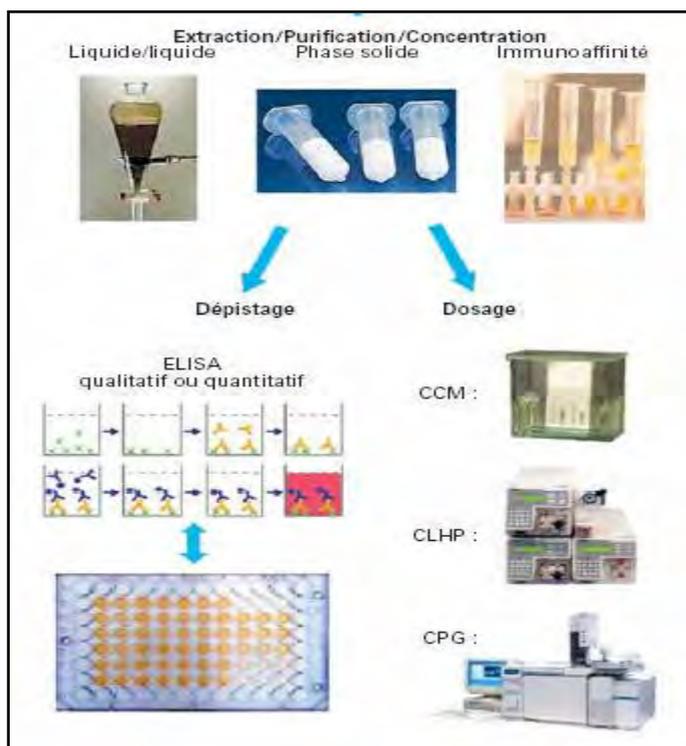


Figure 12 : les différentes étapes et techniques de la quantification des mycotoxines dans les aliments (Dragacci *et al.*, 2005).

Le tableau 10 présente les principales techniques utilisées pour le dosage des mycotoxines, avec leurs avantages et inconvénients.

Tableau 10 : avantages et inconvénients des principales techniques utilisées pour le dosage des mycotoxines (Lamrani, 2009).

Technique	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénient
HPLC/FLUO	++++	++	- Sensibilité.	- Dérivation. - Purification.
HPLC/UV	++	++	- Pas de dérivation.	- Peu spécifique. - Purification.
ELISA	+++	+++	- Coût.	- Peu spécifique.
CCM	+	+	- Simple.	- Peu sensible. - Peu spécifique.
GC/MS	++	+++	- Sensibilité.	- Dérivation. - Purification.
HPLC/MS/MS	++++	++++	- Sensible. - Spécifique.	- Coût appareil.

Partie pratique

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Analyse mycologique des aliments de bétail

1.1. Echantillonnage des aliments

Afin d'avoir un échantillonnage représentatif, **40** échantillons d'aliments de bétail ont été prélevés au hasard, en respectant certaines précautions d'échantillonnage :

- Prise de 8 à 12 échantillons provenant de la surface, des côtés ou des rebords (endroits plus propices à l'apparition de moisissures), et des couches profondes des lots d'aliment de stockage. Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'instruments stériles ;
- Mélange des échantillons avant la prise de **l'échantillon composite final** ;
- Mise de l'échantillon composite dans un contenant (sac en papier) propre, inerte et bien protégé contre la contamination extérieure ;
- Respect des règles d'hygiène générale pour la personne effectuant le prélèvement ;
- Acheminement rapide des échantillons vers le laboratoire et conservation dans un endroit frais et sec jusqu'à leurs analyses (**FAO, 2006 ; Anonyme 1, 2005 ; Anonyme 2, 2001 ; Miller, 1995**).

Les échantillons proviennent de dix types d'aliments différents (son de blé, pain racis, luzerne, paille, foin d'avoine, orge, rebuts de dattes, ensilage d'herbe, ensilage de maïs et concentré). La collecte a été effectuée en deux périodes (**froide** : Janvier-Février-Mars-Octobre-Novembre-Décembre, **chaude** : Avril-Mai-Juin-Juillet-Août-Septembre) pour certains échantillons, et pour d'autre en une seule période (soit chaude, soit froide) durant l'année 2011. L'aliment de pâturage n'a pas été analysé durant ce travail en raison du changement fréquent de l'endroit de pâturage pour les mêmes animaux.

L'échantillonnage a été réalisé auprès de deux fermes pilotes, et huit fermes traditionnelles, situées dans des régions de climat différent (cf. Tableau 11).

Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire de l'Université Mohamed Khider de Biskra dans les 24 h, stockés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse mycologique.

Au moment de la collecte, aucun échantillon n'a présenté de signes visibles de contamination par les moisissures.

Tableau 11 : origine et type des différents aliments étudiés.

Ferme	Abréviation	Date de prélèvement	Type d'aliment
Batna1 (Ft)	Bat1	21/03/2011	Paille, son de blé, pâturage
Batna2 (Ft)	Bat2	21/03/2011	Foin, son de blé, pain, pâturage
Batna3 (Ft)	Bat3	21/03/2011	Foin, son de blé, pâturage
Batna4 (Ft)	Bat4	21/03/2011	Paille, orge, pâturage
Batna1, 2, 3 et 4 (Ft)	Bat1-4	15/09/2011	Pâturage et paille
Constantine Kadri (Fp)	Cte1p1	16/02/2011	Concentré et paille
Constantine Kadri (Fp)	Cte1p2	14/05/2011	Foin d'avoine, luzerne, concentré et pâturage
Constantine Kadri (Fp)	Cte1p3	12/10/2011	Foin d'avoine, luzerne, concentré et pâturage
Constantine Baaraouia (Fp)	Cte2p1	17/02/2011	Ensilage d'herbe, concentré et paille
Constantine Baaraouia (Fp)	Cte2p2	14/05/2011	Ensilage d'herbe, concentré, foin et pâturage
Constantine Baaraouia (Fp)	Cte2p3	12/10/2011	Ensilage d'herbe, concentré, foin et pâturage
Biskra1 (Ft)	Bisp1	20/04/2011	Ensilage d'herbe, son de blé, Foin, concentré, rebuts de datte
Biskra2 (Ft)	Bisp2	16/10/2011	Ensilage de maïs, rebuts de datte et son de blé
Guelma (Ft)	Gue	01/04/2011	Pâturage et paille
M'sila (Ft)	M'sila	20/04/2011	Ensilage d'herbe, son de blé, luzerne et pâturage
Constantine Melha (Ft)	Cte3	06/05/2011	Pâturage et paille

Ft : Ferme traditionnelle, **Fp** : Ferme pilote.

Matériel et méthodes

1.2. Isolement, repiquage et purification des moisissures

1.2.1. Isolement

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés dans notre travail (PDA, CYA, MEA et Sabouraud) (cf. Annexe I). Le pH des milieux de culture a été ajusté à 5,6 et la stérilisation a été effectuée à 120°C pendant 20 minutes. Un antibiotique (chloramphénicol : 0,25g/l) a été ajouté aux différents milieux de culture utilisés pour inhiber toute prolifération bactérienne.

L'étude de la flore fongique a été réalisée par la méthode directe. Dans des conditions stériles et à l'aide d'une pince stérile, cinq échantillons de chaque aliment étudié ont été prélevés et déposés à cinq endroits différents dans une boîte de Pétri, contenant 15 à 20 ml du milieu de culture, de telle manière qu'ils soient suffisamment espacés. Les échantillons de la paille ont été découpés en petits fragments de 2 à 3 mm. Les boîtes de Pétri ont été ensuite fermées de parafilm, et incubées à 25°C pendant 3 à 5 jours, afin de favoriser la croissance des moisissures (**Pitt et Hocking, 2009 ; Davet et Rouxel, 1997 ; Botton *et al.*, 1990**).

1.2.2. Repiquage et purification

Après isolement, plusieurs repiquages des souches de moisissures ont été effectuées sur milieux de cultures cités au paravent dans les mêmes conditions d'incubation, jusqu'à l'obtention de souches pures. Le choix des souches de moisissures à prélever a été réalisé à l'œil nu, en tenant compte de la ressemblance des thalles.

Des observations macroscopiques et microscopiques quotidiennes ont été effectuées dès l'apparition des mycéliums sur le milieu de culture (**Davet et Rouxel, 1997 ; Botton *et al.*, 1990**).

1.3. Méthodes d'identification des moisissures

Classiquement, l'identification des moisissures repose sur les critères énumérés ci-dessous :

- Les caractères cultureux macroscopiques ; vitesse de croissance, couleur et texture de thalle, couleur du revers de la colonie, aspect de la spore (granuleux, poudreux), uniformité de la couleur des spores, présence de pigment diffusible, odeur et exsudats des moisissures ;

L'observation a été effectuée en deux temps ; sur une culture jeune d'environ 3 et 5 jours, puis sur une culture de 7 jours pour avoir des structures bien différenciées et caractéristiques de la souche. En effet, l'identification repose principalement sur la formation des spores qui se produit dans une culture jeune (**Pitt et Hocking, 2009 ; Botton *et al.*, 1990**).

Matériel et méthodes

- Les observations microscopiques ont été réalisées au grossissement (x40) et (x100). L'identification a été réalisée selon les clés d'identification de **Botton *et al.*, (1990)** ainsi que celle de **Pitt et Hocking (2009)**.

1.4. Expression des résultats

La fréquence d'isolement (**Fr**), et la densité relative (**Dr**) des espèces ont été calculées selon la méthode de **Gonzalez *et al.*, (1995)** et **Kollu *et al.* (2009)**.

$$\text{Fr (\%)} = \frac{\text{Nombre d'échantillons avec une espèce ou d'un genre}}{\text{Nombre totale des échantillons}} \times 100$$

$$\text{Dr (\%)} = \frac{\text{Nombre d'isolats d'une espèce ou d'un genre}}{\text{Nombre total de champignons isolés}} \times 100$$

2. Analyse mycotoxicologique du lait de vaches

2.1. Echantillonnage du lait

2.1.1. Le lait cru

Durant la période s'étalant de Février 2011 à Octobre 2011, un total de 22 échantillons de lait cru ont été collectés à partir de cinq régions de climat différent en Algérie (T°, humidité relative, etc.). Différents produits de l'agriculture ont été utilisés, durant la période de collecte des échantillons, pour l'alimentation des vaches laitières.

Les échantillons de lait ont été obtenus à partir du lait de mélange de deux fermes pilotes à Constantine (Est de l'Algérie) contenant 28 et 52 vaches laitières pour les fermes BAARAOUIA et KADRI respectivement, et de neuf fermes traditionnelles, situées à Constantine, Guelma (Est de l'Algérie), Batna (Sud-Est de l'Algérie), Biskra (Sud-Est de l'Algérie) et M'sila (centre-Est de l'Algérie). Dans ces fermes traditionnelles le nombre de vaches varie de 8 à 15 vaches. Les deux types de fermes (pilotes : étatiques, ou traditionnelles : privées) sont représentatifs du système de production laitière en Algérie.

Pour la même ferme nous avons essayé d'obtenir des échantillons représentatifs de chaque saison (chaude et froide). Néanmoins, en raison des difficultés rencontrées lors des visites sur terrains, nous avons considéré deux saison dans l'année ; la saison froide s'étalant du mois de Janvier au mois de Mars en ajoutant le mois d'Octobre, de Novembre et Décembre de la même année, et la saison chaude s'étalant du mois d'Avril au mois de Septembre.

Matériel et méthodes

Selon les fermes, nous avons effectué une, deux ou trois visites (cf. Tableau 12).

Tableau 12 : origine des échantillons de lait cru.

Ferme	Date de prélèvement	Nombre de vaches	Race des vaches	Nombre d'échantillons	Nombre de visites
Constantine Kadri (Fp)	16/02/2011	52	Pie noire	03	03
	14/05/2011	52			
	12/10/2011	40			
Constantine Baaraouia (Fp)	17/02/2011	28	Pie noire	03	03
	14/05/2011	28			
	12/10/2011	17	Tarentaise		
Batna 1, 2, 3 et 4 (Ft)	21/03/2011	04-06	Pie noire	08	02
	15/09/2011	04-06	Pie rouge		
Biskra	20/04/2011	15	Pie noire, Pie rouge et la brune	02	02
	16/10/2011				
M'sila	20/04/2011	17	Pie rouge, pie noire	01	01
Guelma	01/04/2011	06	Race locale	01	01
Constantine (Melha)	06/05/2011	07	Pie noire	01	01
Constantine*	19/03/2011	07	Race locale	03	03
	01/06/2011		Pie noire		
	15/10/2011				
Total				22	13

Ft : Ferme traditionnelle, **Fp** : Ferme pilote.

*Les aliments de cette ferme n'ont pas subi d'analyse mycologique.

Lors de chaque visite, un volume de 100 ml de lait a été prélevé à partir du lait cru de mélange de toutes les vaches de la ferme. Immédiatement après la collecte, chaque échantillon est conservé par l'addition de 1,5 µg / ml de sodium-Azid (NaN₃), transporté au laboratoire dans une glacière, puis stocké à -18°C jusqu'à l'analyse de l'Aflatoxine M₁.

Matériel et méthodes

2.1.2. Le lait pasteurisé

Onze échantillons de lait pasteurisé ont été achetés au hasard des marchés locaux. Le lait pasteurisé est produit dans différentes laiteries en Algérie. De chaque échantillon de 1 litre d'une marque donnée, 100 ml ont été prélevés, conservés par l'addition de 1,5 µg / ml de sodium-Azid et stocké à -18°C jusqu'à l'analyse. Les échantillons de lait pasteurisé comprennent deux types de lait ; le lait en poudre reconstitué et le cru partiellement écrémé (cf. Tableau 13).

Tableau 13 : origine des échantillons de lait pasteurisé.

Type	Provenance	Date de prélèvement	Marque (nom de la laiterie)	Nombre d'échantillons
L.r	Batna	04/10/2011	Aurès	01
L.r	Constantine	19/10/2011	Rhumel	01
L.r	Oum El-Bouaghi	10/10/2011	Elkahina	01
L.r	Constantine	15/10/2011	Dialy	01
L.r	Constantine	02/11/2011	Dialy	01
L.r	Constantine	15/10/2011	Grouz	01
L.c.p.é	Batna	04/10/2011	Aurès	01
L.c.p.é	Constantine	15/10/2011	Dialy	01
L.c.p.é	Constantine	02/11/2011	Dialy	01
L.c.p.é	Constantine	15/10/2011	Grouz	01
Lait stérilisé (UHT)	Béjaia	20/10/2011	Candia	01
Total				11

L.r : Lait reconstitué. **L.c.p.é** : Lait cru partiellement écrémé. **UHT** : Ultra Haute Température.

Matériel et méthodes

2.1.3. Le lait lyophilisé (en poudre)

Quatorze échantillons de lait de vache en poudre importé, de marques différentes, ont été analysés. Tous ces échantillons ont été achetés des marchés locaux de Constantine (Algérie) (cf. Tableau 14).

Tableau 14 : origine des échantillons de lait en poudre.

Origine	Emballé en	Date de fabrication	Marque	Nombre d'échantillons
Inconnue	Algérie	15/12/2010	Thika	01
France		25/05/2011	Celia	01
Suisse		25/09/2011	Loya	01
Argentine		14/02/2011	Superlait	01
Nouvelle Zélande	Malaisie	22/02/2011	Gloria	01
Argentine		31/03/2011	Candia	01
Nouvelle Zélande		14/06/2011	Nespray fortifié (nestlé)	01
Inconnue	Algérie	02/02/2011	Milk	01
Inconnue		00/01/2011	Dounia	01
Argentine		04/05/2011	Record	01
Danemark		00/02/2011	Dano	01
Argentine		07/09/2010	Willcrem	01
Inconnue	Algérie	00/02/2011	Milfo	01
Inconnue	Algérie	24/11/2011	Okids	01
Total				14

Matériel et méthodes

2.2. Méthode d'analyse de l'AFM₁

2.2.1. Préparation des standards (de la gamme de calibration)

La préparation de la solution standard d'AFM₁ a été effectuée selon les procédures décrites dans la méthode française officielle (**Dragacci et Grosso, 2001**).

La solution stock 1 (solution mère) de l'AFM₁ a été préparée par dissolution de 0,1 mg de poudre de l'AFM₁ (référence Sigma A6428 10 UG), dans 1 ml d'acétonitrile (qualité HPLC).

Cette opération a été réalisée la veille de la vérification au spectrophotomètre pour assurer une complète dissolution de la toxine. Cette solution a été vérifiée en réalisant un scan entre 200 et 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV pour vérifier le maximum d'absorption de l'AFM₁.

La concentration de la solution stock1 de l'AFM₁ a été déterminée par mesure de l'absorbance en UV à 350 nm et est calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{Concentration de l'AFM1 en } \mu\text{g/ml} = \frac{\text{Absorbance (A)} \times \text{poids moléculaire (PM)} \times 1000 \times \text{facteur de dilution}}{\varepsilon \text{ (coefficient d'absorption moléculaire)}}$$

Le coefficient d'absorption molaire d'AFM₁ ε est de 18300 cm²/mmol dans l'acétonitrile (**Trucksess, 2001**).

Une gamme de concentrations de la solution standard de 1 ; 2,5 ; 10 et 50 ng d'AFM₁ par ml d'acétonitrile a été préparée pour étalonner l'HPLC. Toutes les solutions standards préparées ont été recouvertes de papier aluminium, en raison de la photosensibilité de l'AFM₁. Après usage, les flacons ont été bien fermés et serti de parafilm et conservés à +4°C.

Pour éviter toute source d'erreur lors de manipulation (préparation des échantillons), des échantillons de contrôle qualité (CQ) ont été préparés à 2 niveaux de concentrations (CQ₁ à 0,05 ng/ml, CQ₂ à 1ng/ml) en surchargeant du lait de vache non contaminé avec des solutions pures d'aflatoxines. Les échantillons CQ ont été analysés quotidiennement pour mesurer les rendements de récupération, la précision, l'exactitude de la méthode et la stabilité des toxines durant la conservation.

L'AFM₁ est une substance potentiellement toxiques pour l'homme, la manipulation des standards a été effectuée dans un laboratoire spécialisé, équipé de matériel de protection adéquat (gants, hottes d'aspiration, masques etc.). Notre travail a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche sur les Herbivores (URH), équipe DIMA (Digestion Microbienne et Absorption), laboratoire de mycotoxicologie, INRA France.

Matériel et méthodes

2.2.2. Extraction de l'AFM₁

L'AFM₁ a été analysé par la méthode française officielle (**Dragacci et Grosso, 2001**). Après décongélation, 50ml de lait ont été prélevés de chaque échantillon de 100ml, centrifugés à froid à 4000g pendant 15 min pour faciliter l'élimination de la matière grasse, puis filtrés à travers un papier filtre (papier Whatman n°4).

Pour les échantillons de lait en poudre, ces derniers ont été reconstitués par mélange de 10g de poudre de lait avec 100 ml d'eau désionisée, puis mélangés à l'aide d'un agitateur pendant 5 min. Les mêmes étapes précédentes ont été suivies pour les échantillons de lait reconstitué (centrifugation puis filtration).

2.2.3. Purification de l'AFM₁

Le filtrat de chaque échantillon de lait a été ensuite chargé dans une colonne d'immunoaffinité (IAC, Aflaprep, R-Biopharm, Lyon, France) contenant un anticorps monoclonal spécifique d'AFM₁. L'IAC a été lavée avec 20 ml d'eau Milli-Q pour l'élimination des impuretés. L'AFM₁ a été ensuite éluée avec 4 ml d'acétonitrile. L'éluat a été évaporé à sec à 45°C sous un léger courant d'azote. Les résidus secs ont été redissouts dans 500 µl de phase mobile par incubation dans un bain à ultrasons pendant 3 min. Cinquante µl ont été ensuite prélevés et injectés dans le système de l'HPLC (**Dragacci et Grosso, 2001**).

2.2.4. Conditions chromatographiques

Le système de l'HPLC consiste en une pompe à AS3000 (Thermo Finnigan, San Jose, USA), un échantillonneur automatique (Spectra-Physics, France) équipé d'une boucle de 100 µl, et d'un détecteur de fluorescence (FL 3000, Thermo Finnigan, San Jose, États-Unis) (cf. Figure 13). Le photomultiplicateur de tension a été réglé à 1000 V. La séparation a été effectuée à température ambiante sur une colonne C18 à phase inverse (Nucleodur, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, France), en utilisant une solution eau-acétonitrile (75:25, v / v) comme une phase mobile à un débit de 1 ml/min.

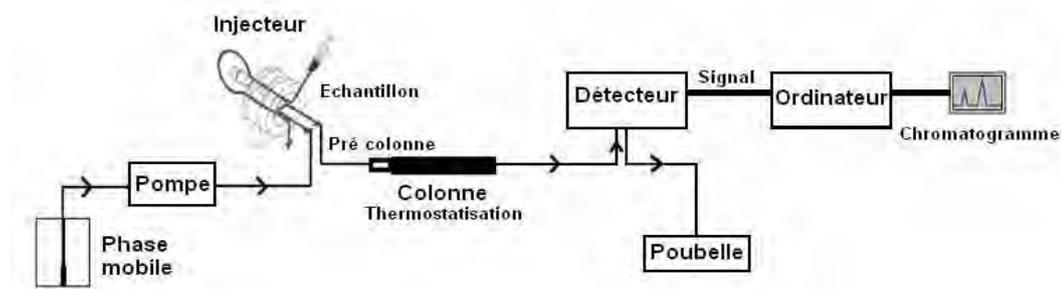


Figure 13 : schéma d'une chaîne HPLC (Nguyen, 2007).

Matériel et méthodes

La détection a été fixée à 366 et 438 nm pour l'excitation et l'émission, respectivement. Le temps de rétention d'AFM₁ est de 7min et 30 secondes. La courbe d'étalonnage a été incluse dans chaque série de l'analyse des échantillons du lait en utilisant une série de solutions étalons contenant des concentrations différentes d'AFM₁ (1 ; 2,5 ; 10 et 50 ng/ml) (cf. Annexe 2). La concentration d'AFM₁ a été calculée à l'aide de la formule suivante :

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

Où :

M est la masse d'aflatoxine M1 (ng) injectée dans le système HPLC ;

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

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

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

La méthode a été validée en termes de linéarité, de précision et d'exactitude, ainsi que de récupération. La stabilité de l'AFM₁ a été déjà testée au laboratoire et a été jugée stable après 6 mois de stockage à -20°C (Elmarnissi *et al.*, 2011).

2.2.5. Procédure de décontamination du matériel des mycotoxines

A la fin des analyses, tout le matériel utilisé pour l'extraction des mycotoxines a été décontaminé par immersion totale et pendant 30min, dans une solution de décontamination (NaClO 5%Cl, ou 5% v/v). Un lavage par un détergent (méthanol) suivi par un rinçage avec de l'eau distillée ont été effectués après décontamination pour enlever les résidus de détergent.

3. Analyses physicochimique et biochimique du lait

3.1. Analyse physicochimique

3.1.1. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable a été déterminée par titrage avec l'hydroxyde de sodium (NaOH, N/9 = 0,111N), en présence de phénophtaléine comme indicateur. Elle est exprimée en degré Dornic (°D) (AFNOR, 1999).

➤ Variation limites :

L'acidité titrable du lait cru varie normalement de 13 à 17°Dornic selon Vignola, (2002).

Matériel et méthodes

➤ Mode opératoire :

- Dans un bécher introduire 10 ml du lait frais bien homogénéisé ;
- Ajouter 0,1ml (2 à 3 gouttes) de phénolphtaléine.
- Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'au début de virage au rose, en comparant avec un témoin constitué du même lait (cf. Annexe 3).
- La lecture se fait directement sur l'acidimètre ou la burette.

Après le virage, la teinte rose disparaît progressivement. On ne tient pas compte de cette décoloration. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes (AFNOR, 1999).

➤ Expression des résultats :

L'acidité, exprimée en degrés Dornic (°D), est égale à : $V \times 10$

Où :

V : est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium versé.

$$1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g d'acide lactique par litre de lait (AFNOR, 1999)}.$$

3.1.2. Détermination de l'acidité ionique

Le principe de la mesure repose sur la lecture directe de la valeur de pH grâce à l'électrode du potentiomètre. Le pH du lait constitue un indice de son état de fraîcheur (Vignola, 2002).

➤ Variation limites :

Le lait frais contient peu d'acide, et son pH est voisin de la neutralité. Les valeurs normales de mesure du pH du lait cru sont comprises entre 6,6 - 6,8 (à 20°C) selon Vignola, (2002) et FAO, (1998).

➤ Mode opératoire :

- Le pH-mètre est étalonné à l'aide de solutions tampon (pH=4, pH=7, pH=9) ;
- Mise d'une quantité suffisante de lait dans un bécher pour la mesure.
- Immersion de l'électrode du pH-mètre dans le lait bien homogénéisé.

➤ Expression des résultats :

La lecture des résultats s'effectue directement sur l'écran du pH-mètre, dès la stabilité des valeurs affichées.

Matériel et méthodes

3.1.3. Détermination de la densité

La densité du lait est une grandeur sans dimension qui désigne le rapport entre la masse d'un volume donné de lait à 20°C et la masse du même volume d'eau à la même température (**Pointurier, 2003**). La densité a été mesurée à l'aide d'un thermo-lactodensimètre (marque Nahita®) (cf. Annexe 3). Si la détermination de la densité n'a pas été effectuée à la température de 20°C, le résultat doit être réajusté selon la formule suivante :

$$\text{Densité corrigée} = \begin{cases} \text{Densité lue} + 0,0002 \text{ pour chaque degré en plus (si la} \\ \text{température du lait est supérieure à } 20^{\circ}\text{C).} \\ \text{Densité lue} - 0,0002 \text{ pour chaque degré en moins (si la} \\ \text{température du lait est inférieure à } 20^{\circ}\text{C).} \end{cases}$$

La mesure de la densité du lait sert à l'étude de mouillage du lait (**AFNOR, 1999**).

➤ Valeurs limites :

La mesure de la densité du lait cru doit être comprise entre 1028-1033 à 20°C selon **FAO (1998)**.

➤ Mode opératoire :

- Remplir une éprouvette par un volume de 500ml de l'échantillon de lait cru bien homogénéisé préalablement ;
- Introduire le thermo-lacto-densimètre ;
- Après stabilité, lecture directe sur le thermo-lacto-densimètre.

L'introduction du lactodensimètre dans l'éprouvette pleine de lait doit provoquer un débordement de liquide ; ce débordement est nécessaire, il débarrasse la surface du lait des traces de mousse qui gêneraient la lecture et il place la zone de lecture au-dessus du plan supérieur de l'éprouvette (**AFNOR, 1999**).

3.2. Analyse biochimique

3.2.1. Détermination du taux butyreux

La teneur en matière grasse (taux butyreux) a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique de **Gerber**. Elle consiste en une attaque des protéines du lait par l'acide sulfurique, puis séparation de la matière grasse libérée par centrifugation du butyromètre (cf. Annexe 3), en présence de petite quantité d'alcool isoamylique (favorise la séparation) (**AFNOR, 2001**).

Matériel et méthodes

➤ Variations limites :

La matière grasse du lait doit être comprise entre 24 et 55 g/l selon **Vignola, (2002)**.

➤ Mode opératoire :

Dans le butyromètre introduire :

- 10 ml d'acide sulfurique ;
- 1 ml du lait cru à analyser de façon qu'il forme une couche au-dessus de l'acide ;
- 1 ml d'alcool iso amylique ;

En opérant de façon à ne pas mouiller le col du butyromètre ou n'entraîne pas d'air, ni mélanger les liquides préalablement.

- Bien boucher le butyromètre, puis l'agiter et le retourner convenablement jusqu'à ce que son contenu soit complètement mélangé, et jusqu'à ce que les protéines soient entièrement dissoutes (disparition de particules blanches) ;
- Centrifuger durant 5 min dès que la vitesse requise est atteinte (**AFNOR, 1999**).

➤ Lecture :

La lecture du résultat doit se faire rapidement après avoir retiré le butyromètre de la centrifugeuse et le placer verticalement, l'ampoule vers le haut et le bouchon vers le bas. Il faut ajuster le niveau inférieur de la phase lipidique en tirant ou en poussant légèrement sur le bouchon avant la lecture qui se fait directement sur le butyromètre.

➤ Expression des résultats :

Le taux de matière grasse du lait est exprimé en (g/l). Il est égal à la valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne grasse moins la valeur atteinte par le niveau inférieur de la colonne grasse.

$$\text{Le taux de matière grasse en g/l} = (n_2 - n_1) \times 10$$

- **n₂**: la valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne grasse.
- **n₁**: la valeur atteinte par le niveau inférieur de la colonne grasse (**AFNOR, 2001**).

Matériel et méthodes

3.2.2. Détermination du taux protéique et du taux de lactose

Le taux de protéines et celui du lactose sont déterminés à l'aide d'un **lactoscan®** (cf. Annexe 3). Le lactoscan® est un appareil analyseur à ultrasons de lait, il peut analyser les protéines totales, le lactose, la matière grasse, la conductivité et la température d'un seul et même échantillon de lait (la matière grasse, la conductivité et la température ne sont pas analysées par le lactoscan® dans ce travail).

Le lactoscan® est équipé d'une petite tasse en plastique qu'on doit remplir suffisamment et on la place à l'endroit de prise de la mesure. Faire attention à ce que la sonde soit plongée dans l'échantillon. Cet appareil possède plusieurs avantages :

- Temps pour réaliser l'analyse au bout de 50 seconds ;
- Permet de faire un grand nombre de mesures ;
- Pas besoin de chauffage des échantillons, mesures directement de lait froid à partir de 5°C ;
- Pas besoin de traitement et de réactifs ;
- Pas besoin d'étalonnage périodique ;
- Forte précision des analyses ;
- Nécessite de petites quantités de lait pour analyse.

➤ Variations limites :

Le taux de protéines doit être compris entre 29-50 g/l de lait, et celui du lactose entre 36 et 55 g/l selon (Vignola, 2002).

➤ Mode opératoire :

- Mettre 10ml de lait cru dans un bécher en plastique ;
- Introduire la sonde de lecture du lactoscan dans l'échantillon ;
- Lecture directe sur l'écran du lactoscan®.

Résultats et discussion

Résultats et Discussion

1. Résultats de l'analyse mycologique des aliments de bétail

Cette étude a été conduite dans le but d'isoler et d'identifier la microflore fongique qui contamine les aliments de bétail dans la zone étudiée.

1.1. Identification de la flore fongique contaminant les aliments de bétail

Pour des raisons matérielles, l'identification a été très délicate. Dans notre travail nous nous sommes limités à l'identification des genres et à quelques espèces.

Dans cette partie nous avons procédé à une identification morphologique, basée sur l'aspect macroscopique et l'aspect microscopique des moisissures. L'identification repose principalement sur le mode de formation des spores (conidies), de leur type de groupement, leur couleur et leur forme. Les conidies sont formées à partir des cellules conidiogènes, à l'extrémité d'un conidiophore. En se référant aux clefs d'identification de **Pitt et Hocking (2009)** et de **Botton *et al.*, (1990)**, nous avons pu identifier plusieurs genres et quelques espèces (cf. Figure 14 à 40).

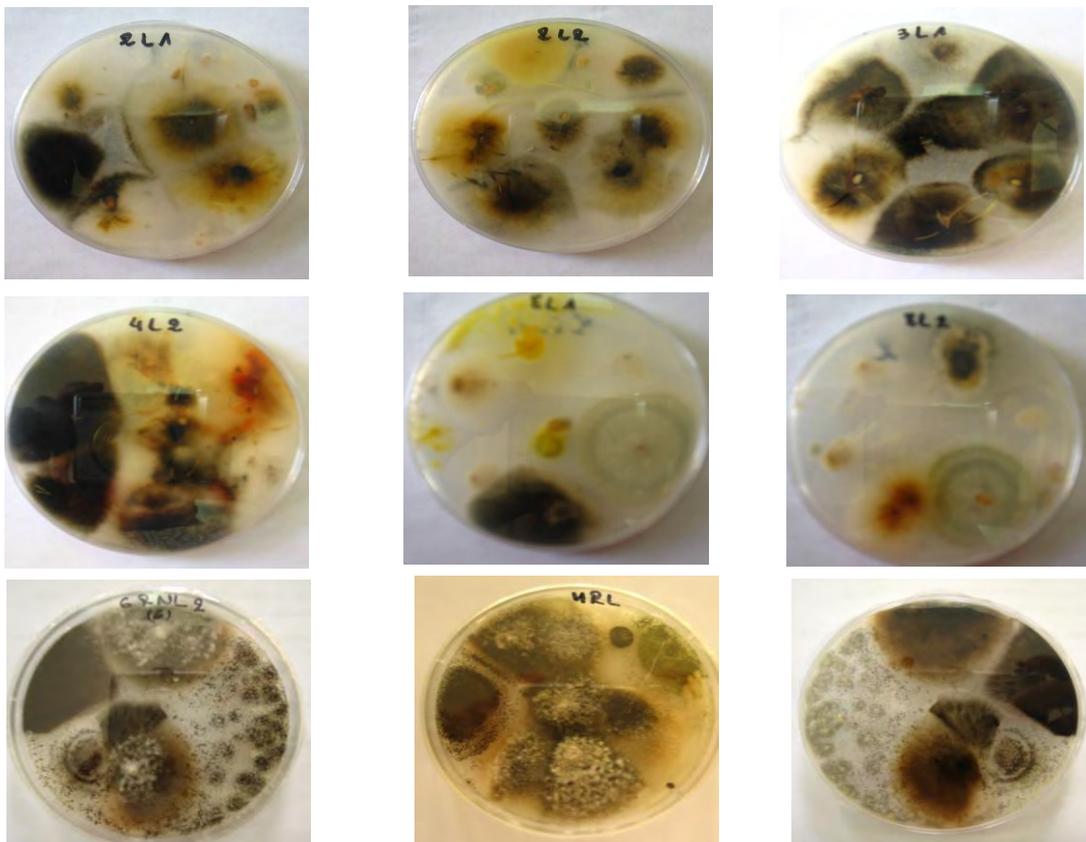


Figure 14 : colonies de moisissures poussant sur différents milieux de culture après 7 jours d'incubation à partir des aliments de bétail analysés (avant repiquage).

Résultats et discussion

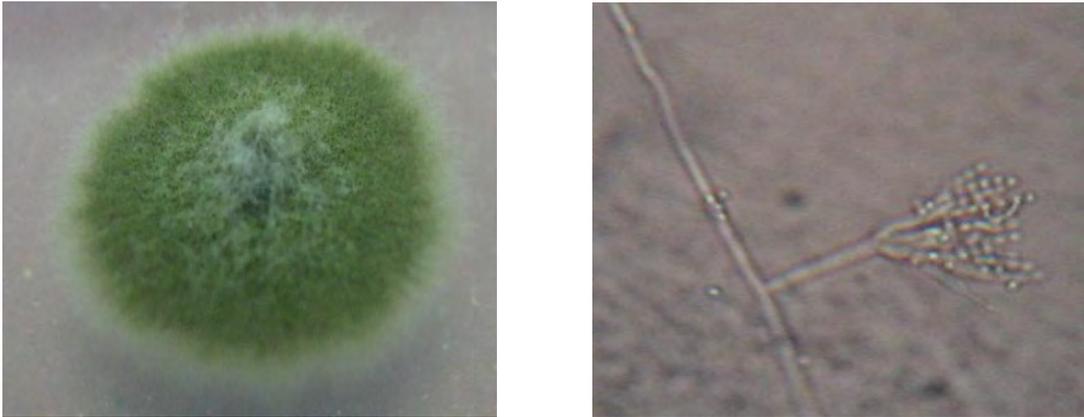


Figure 15 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de *Penicillium sp*₁ après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de rebuts de datte.

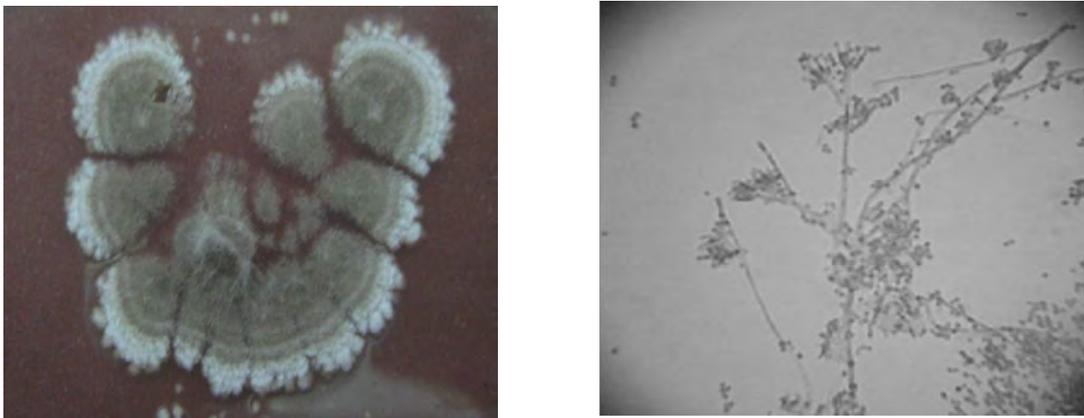


Figure 16 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de *Penicillium sp*₂ après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon d'Orge.

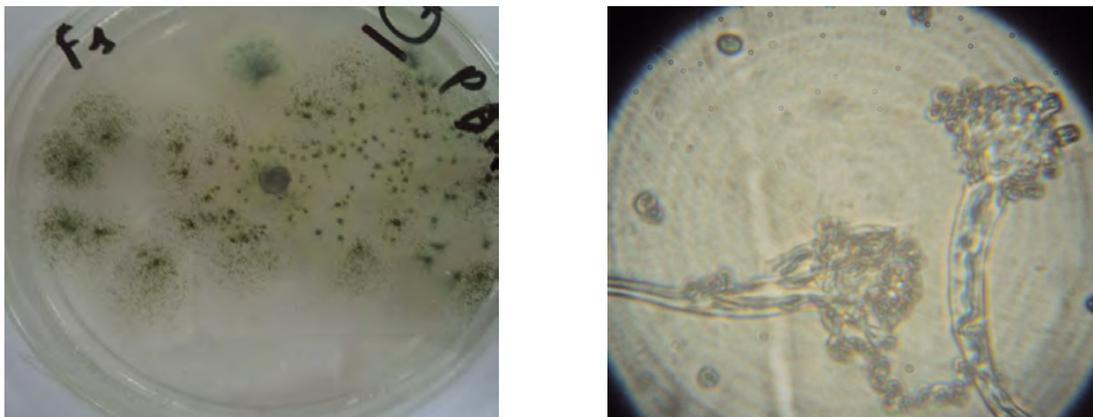


Figure 17 : aspect macroscopique et microscopique (x100) de *Penicillium sp*₃ après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de son de blé.

Résultats et discussion

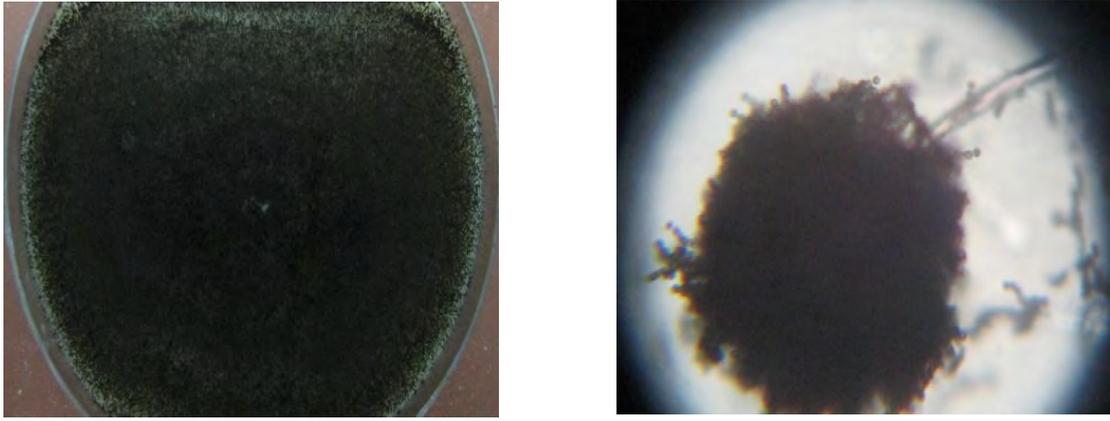


Figure 18 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus niger* après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon d'ensilage de maïs.

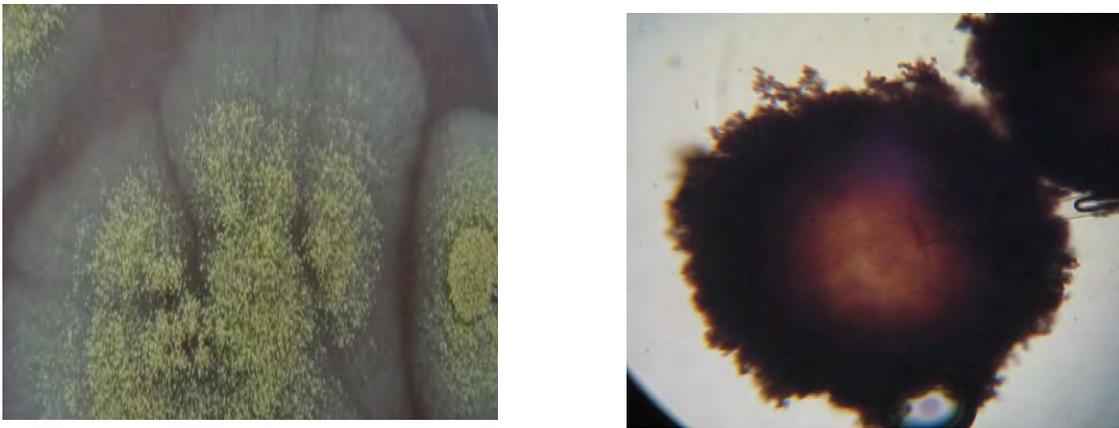


Figure 19 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus flavus* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de pain.

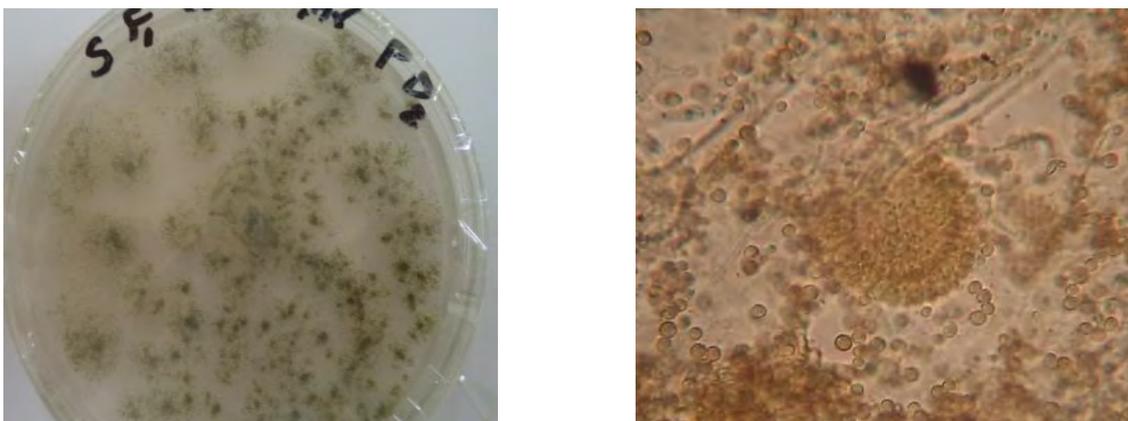


Figure 20 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus flavus* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de concentré.

Résultats et discussion

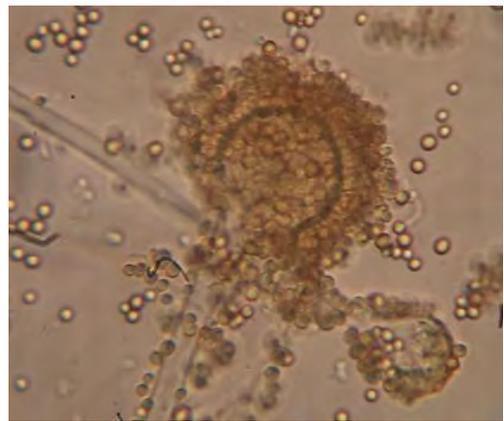


Figure 21 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus flavus* après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.

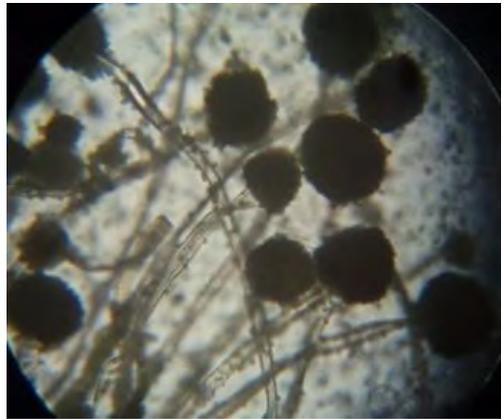


Figure 22 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus niger* après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de pain.

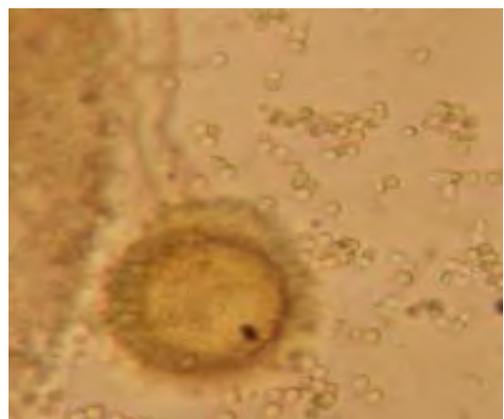
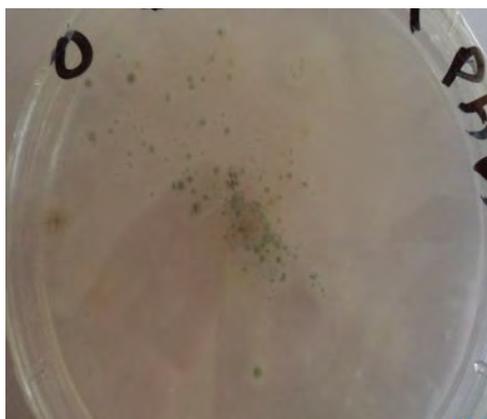


Figure 23 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus ochraceus* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de concentré.

Résultats et discussion



Figure 24 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus niger* après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de paille.

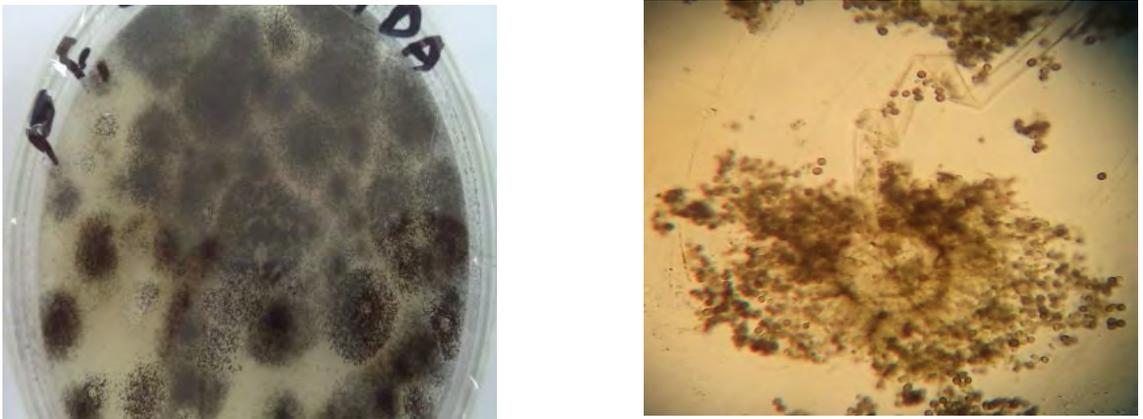


Figure 25 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus niger* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de concentré.

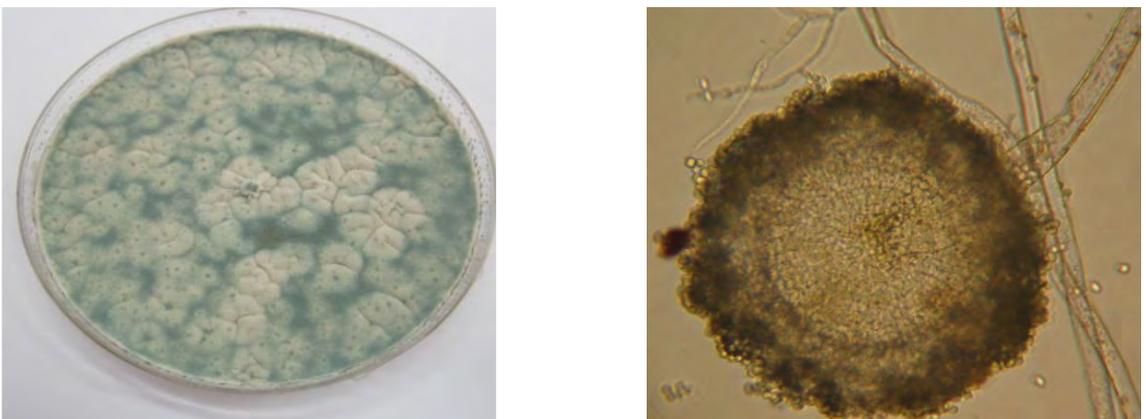


Figure 26 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus ochraceus* après 14 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.

Résultats et discussion



Figure 27 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus fumigatus* après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de paille.

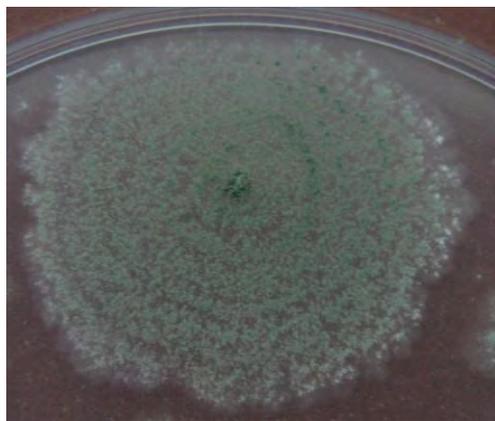


Figure 28 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus fumigatus* après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de paille.

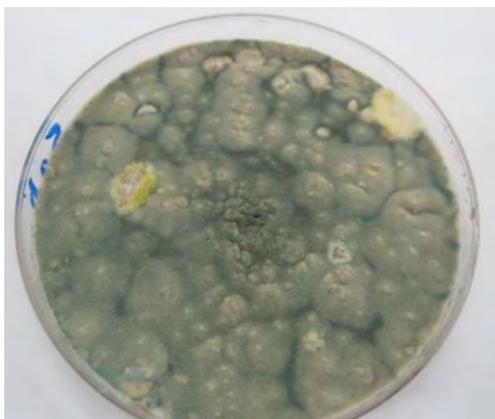


Figure 29 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Aspergillus* sp après 14 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de son de blé.

Résultats et discussion



Figure 30 : aspect macroscopique et microscopique (x100) d'*Alternaria alternata* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de son de blé.

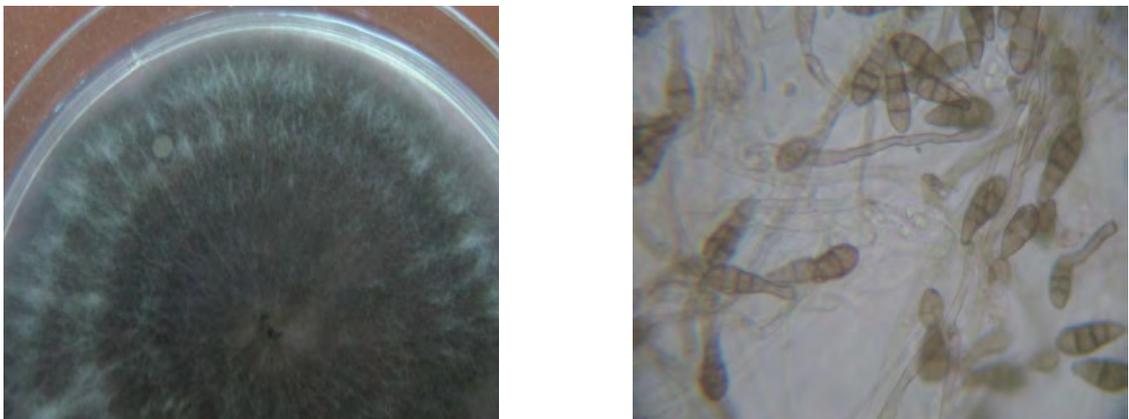


Figure 31 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Alternaria alternata* après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon de concentré.

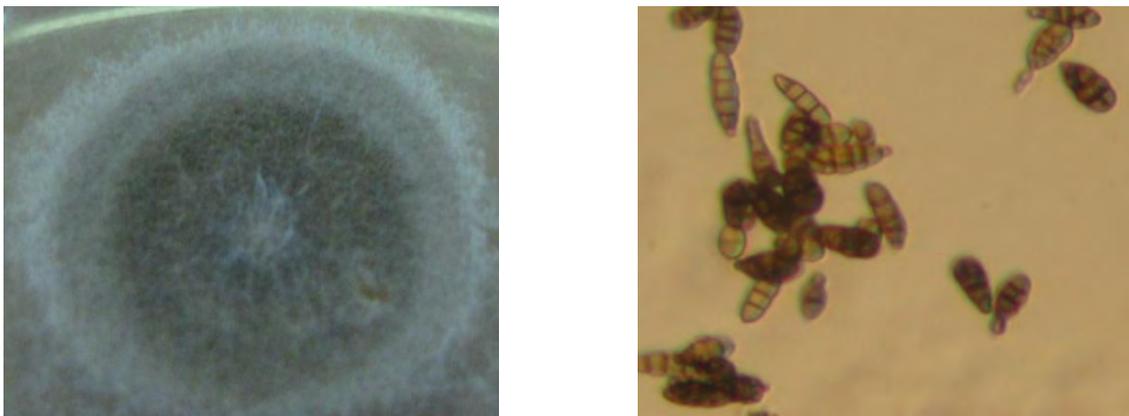


Figure 32 : aspect macroscopique et microscopique (x40) d'*Alternaria alternata* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.

Résultats et discussion

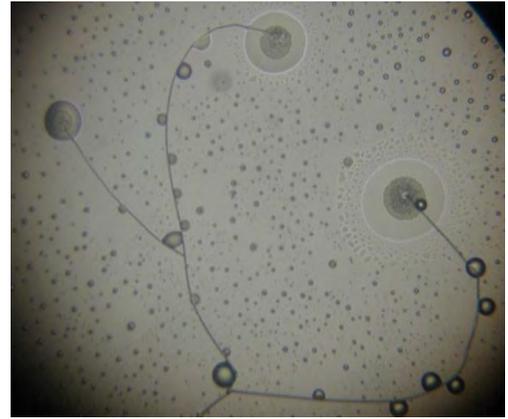
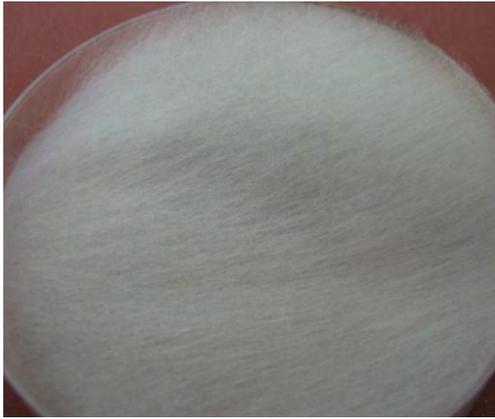


Figure 33 : aspect macroscopique et microscopique (x40) du genre *Mucor* après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon de concentré.

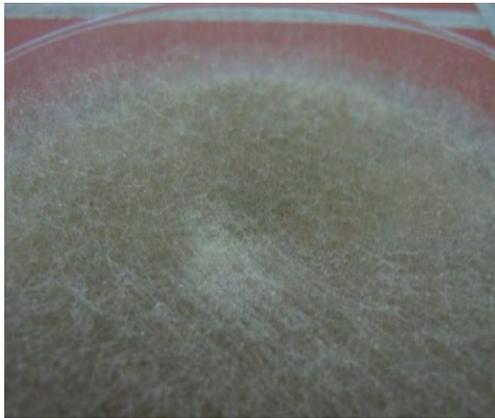


Figure 34 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de *Mucor* après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon d'ensilage de maïs.



Figure 35 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de genre *Rhizopus* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de Luzerne.

Résultats et discussion

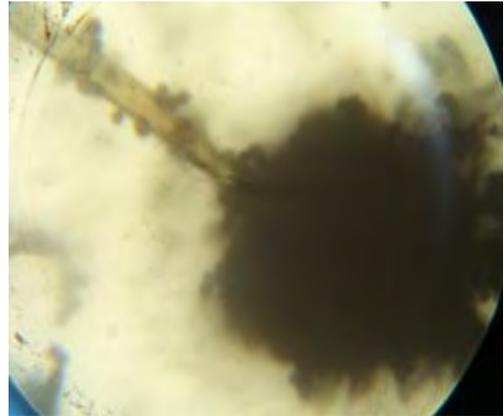


Figure 36 : aspect macroscopique et microscopique (x40) du genre *Rhizopus* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon d'ensilage d'herbe.

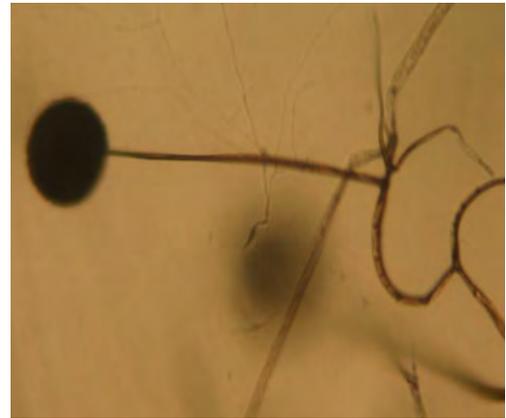
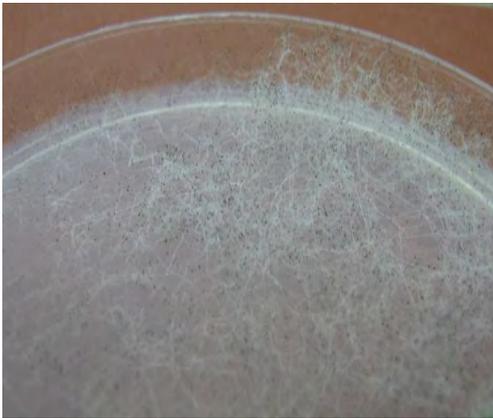


Figure 37 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de *Rhizopus* après 7 jours de culture sur milieu MEA, isolé d'un échantillon d'orge.



Figure 38 : aspect macroscopique et microscopique (x40) de *Rhizopus* après 7 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.

Résultats et discussion

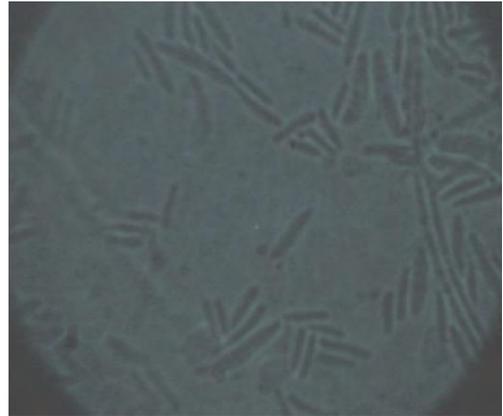
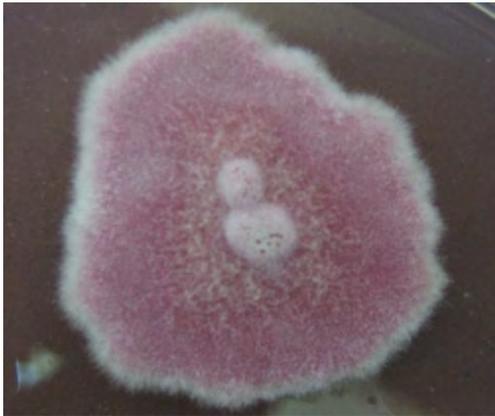


Figure 39 : aspect macroscopique et microscopique (x100) du genre *Fusarium* après 7 jours de culture sur milieu PDA, isolé d'un échantillon de paille.



Figure 40 : aspect macroscopique et microscopique (x100) du genre *Fusarium* après 7 jours de culture sur milieu CYA, isolé d'un échantillon de foin d'avoine.

Résultats et discussion

Une description morphologique des espèces fongiques isolées, basée sur les caractères cultureux est présentée dans tableau 15.

Tableau 15 : caractères cultureux de quelques espèces de moisissures isolées.

Genre	Mycélium	Couleur de colonie	Couleur de revers	Vitesse de croissance	Aspect des colonies
<i>Aspergillus</i>	Cloisonné, plus dense vers le centre, lâche en périphérie.	<i>Aspergillus flavus</i> -Vert-jaune sur milieu PDA. -Vert-olive sur milieu CYA.	-incolore -beige claire	Rapide	Poudreux
	Cloisonné, très haut au centre et plus claire	<i>Aspergillus fumigatus</i> - Vert-Grisâtre sur milieu Sabouraud. -Gris-Verdâtre sur milieu PDA.	-Gris-Pâle -incolore	Rapide	Velouté avec des bordures blanches
	Cloisonné	<i>Aspergillus niger</i> -Noir sur milieu PDA Sabouraud, CYA. -Gris-Verdâtre, sur milieu MEA, avec présence des points noirs.	-Grise-Pâle -Jaune-Pâle	Rapide	Granuleux
	Cloisonné	<i>Aspergillus ochraceus</i> -Ocre-jaunes à chamois sur milieu Sabouraud. -Jaune-vert sur milieu PDA.	-Jaune-Pâle -Jaune-Pâle	Lente	Poudreux
<i>Penicillium</i>	Cloisonné, présente une structure surélevée au centre	<i>Penicillium sp₁</i> -Vert-bleu avec contour gris-bleu sur PDA	-Jaune à gris	Lente	Velouté

Résultats et discussion

Tableau 15 : caractères cultureux de quelques espèces de moisissures isolées (suite).

Genre	Mycélium	Couleur de colonie	Couleur de revers	Vitesse de croissance	Aspect des colonies
<i>Penicillium</i>	Cloisonné	<i>Penicillium sp₂</i> - Vert grisâtre + contour blanc sur MEA	-Jaune pâle	Lente	Contour irrégulier
	Cloisonné	<i>Penicillium sp₃</i> - Vert sur PDA	-Jaune	Lente	
<i>Alternaria</i>	Cloisonné	<i>Alternaria alternata</i> - Brun-gris à noires avec une périphérie blanche	- Marron foncé à noir	Rapide	Laineux et veloutés
<i>Mucor</i>	Non cloisonné	<i>Mucor sp</i> -Blanche devenant brun gris en vieillissant sur milieu Sabouraud et MEA.	-Brun	Très rapide	Duveteux
<i>Rhizopus</i>	Non cloisonné	<i>Rhizopus sp</i> - Blanche puis devenant noire sur milieu PDA et MEA.	-Brun	Très rapide, envahissent de manière quasi-totale les boîtes de cultures	Filamenteux
		-Blanche puis devenant brun sur milieu Sabouraud	-Brun		
<i>Fusarium</i>	Cloisonné	<i>Fusarium sp</i> -Blanche, puis devenant rose saumon à violet avec contour blanc sur milieu PDA. -Blanche à rose pâle sur milieu CYA.	-Pourpre -Orange	Modérée	Cotonneux

1.2. Prédominance de la flore fongique totale isolée

Les analyses mycologiques montrent que tous les échantillons d'aliments de vaches analysés (n= 40) sont contaminés par différentes souches de moisissures. Au total, 247 souches fongiques ont été isolées à partir des aliments distribués aux animaux des 10 fermes situées dans différentes régions de l'Algérie. Ces fermes ont été visitées une, deux ou trois fois durant deux saisons différentes.

Résultats et discussion

Afin de caractériser cette mycoflore, des observations macroscopiques et microscopiques ont été réalisées. Elles ont permis d'identifier neuf genres fongiques (cf. Figure 41), présentés dans l'ordre décroissant de prédominance comme suit :

Aspergillus (27, 53%), *Penicillium* (24, 29%), *Alternaria* (13, 76%), *Mucor* (12, 95%), *Rhizopus* (12, 14%), *Fusarium* (6,07%), *Geotricum* (1,62%), *Cladosporium* (0, 81%) et *Helminthosporium* (0,81%).

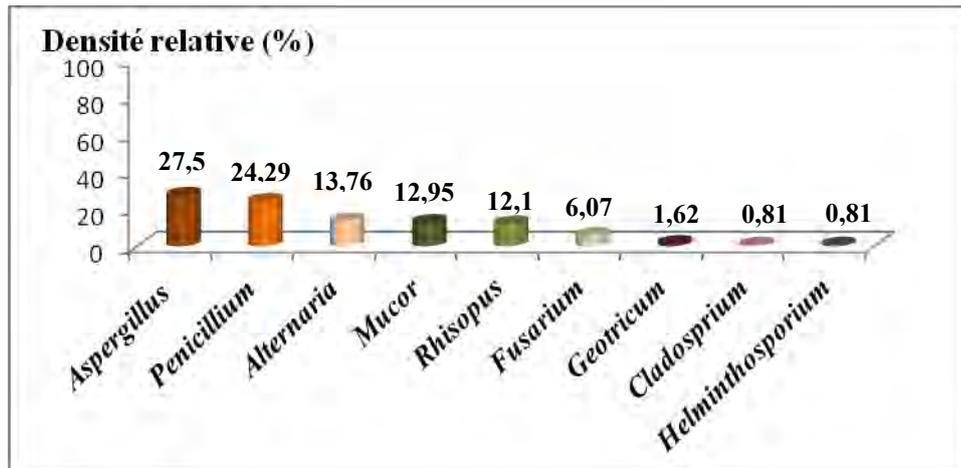


Figure 41 : densité relative des genres de moisissures isolés de l'ensemble des échantillons d'aliments de bétail analysés.

Nous avons classé les genres isolés selon leur prédominance en :

- 1. Genres dominants** : *Aspergillus* (27, 53%), *Penicillium* (24, 29%) ;
- 2. Genres moins dominants** : *Alternaria* (13, 76%), *Mucor* (12, 95%), *Rhizopus* (12, 14%) ;
- 3. Genre minoritaires** : *Fusarium* (6,07%), *Geotricum* (1,62%), *Cladosporium* (0, 81%) et *Helminthosporium* (0,81%).

Résultats et discussion

1.3. Résultats de l'analyse des échantillons d'aliment par ferme

1.3.1. Fréquence d'isolement (Fr)

Dans chacune des fermes étudiées, la flore fongique contaminant les différents aliments distribués a été identifiée, et la fréquence d'isolement pour chaque genre a été déterminée.

➤ Genres dominants :

En terme de fréquence d'isolement (**Fr%**), les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été fortement marqués dans tous les aliments de bétails analysés, avec des fréquences d'isolement qui varient de 50% à 100% pour *Aspergillus* et de 66,66% à 100% pour *Penicillium* (cf. Figure 42 et 43).

En revanche, les aliments analysés de la ferme de Guelma (Gue) sont dépourvus de toute contamination par le genre *Aspergillus*, tandis que les aliments des deux fermes situées dans la wilaya de Batna (Bat 2) et (Bat 3) sont dépourvus de toute contamination par le genre *Penicillium*.

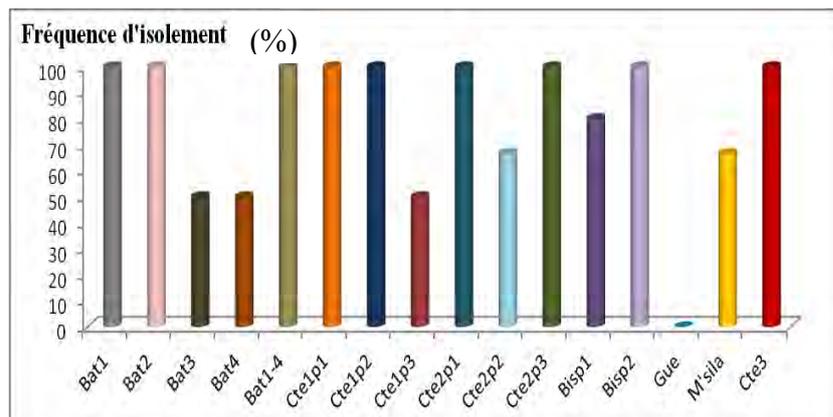


Figure 42 : fréquence d'isolement du genre *Aspergillus* dans tous les échantillons des fermes analysées.

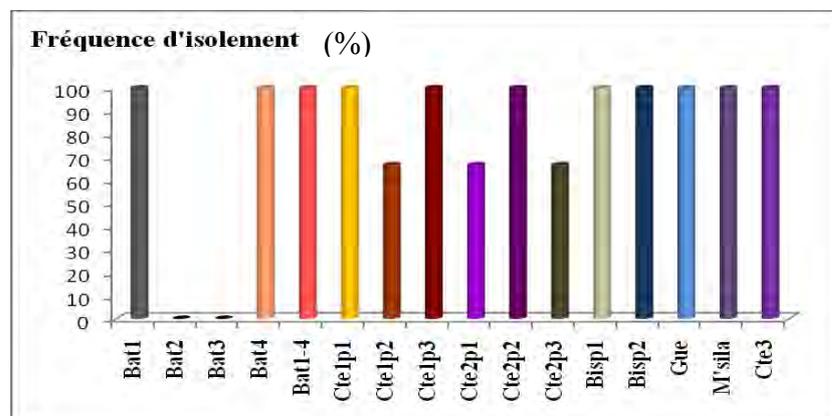


Figure 43 : fréquence d'isolement du genre *Penicillium* dans tous les échantillons des fermes analysées.

Résultats et discussion

➤ Genres moins dominants :

Tous les aliments analysés dans les différentes périodes de prélèvement se sont avérés contaminés par le genre *Mucor*, avec une fréquence qui varie de 20% à 100%, à l'exception des aliments de quatre fermes (Bat2, Gue, M'sila et Cte3), qui sont exempts de ce genre. On note également que le genre *Mucor* a été fortement isolé dans les aliments prélevés dans la période froide (Fr : 100%) (cf. Figure 44).

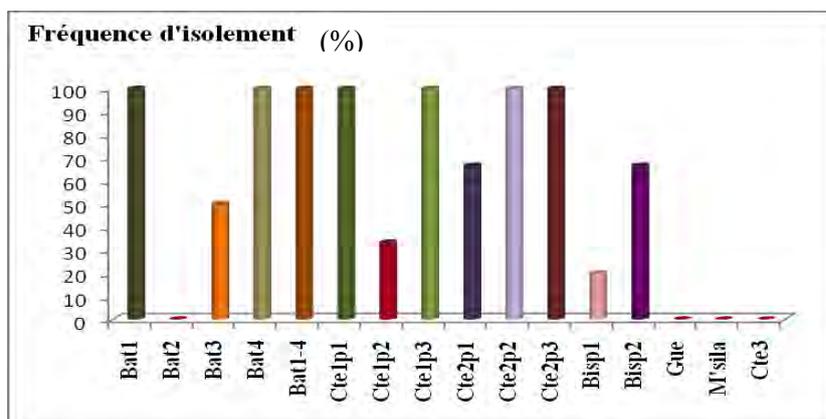


Figure 44 : fréquence d'isolement du genre *Mucor* dans tous les échantillons des fermes analysées.

Le genre *Alternaria* semble être présent dans tous les échantillons analysés, avec une fréquence qui varie de 33,33% à 100%, à l'exception des échantillons de la ferme de Cte3 (Fr : 0%) (cf. Figure 45).

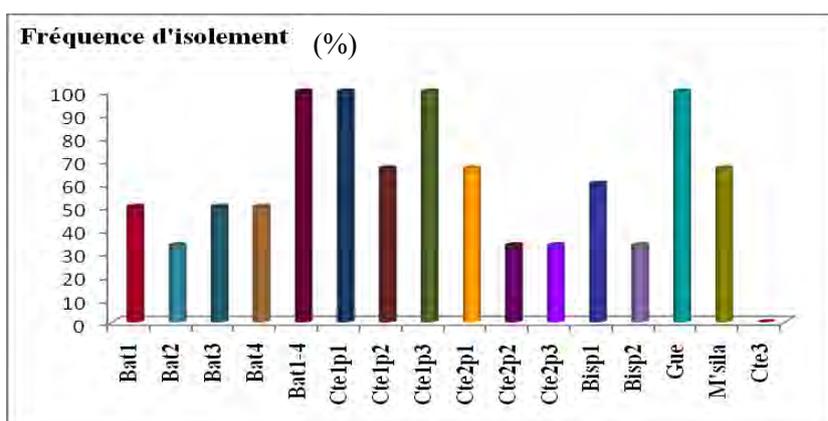


Figure 45 : fréquence d'isolement du genre *Alternaria* dans tous les échantillons des fermes analysées.

Résultats et discussion

Les aliments analysés des fermes de Bat2, Bat3 et Cte3 sont les plus contaminés par le genre *Rhizopus*, avec une fréquence de contamination de 100%. Par contre, les aliments de la ferme de M'sila et de Bat4 sont exempts de toute contamination par ce genre (cf. Figure 46).

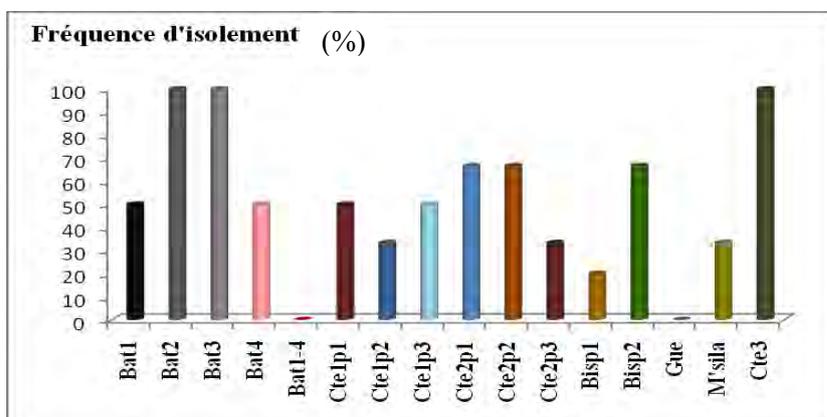


Figure 46 : fréquence d'isolement du genre *Rhizopus* dans tous les échantillons des fermes analysées.

➤ Genres minoritaires :

D'autres genres minoritaires, d'un point de vue fréquence d'isolement, ont été également identifiés : *Fusarium*, *Geotricum*, *Cladosporium* et *Helminthosporium*.

1.3.2. Densité relative (Dr)

D'un point de vue prédominance par ferme, le genre *Aspergillus* est le plus dominant dans les aliments analysés de la ferme de Bat2, par rapport aux aliments des autres fermes, avec une densité relative de 50% (cf. Figure 47).

En revanche, le genre *Penicillium* prédomine dans les aliments des fermes Bat1-4 et la ferme de Guelma (Gue) avec une Dr de 42,85% (cf. Figure 48).

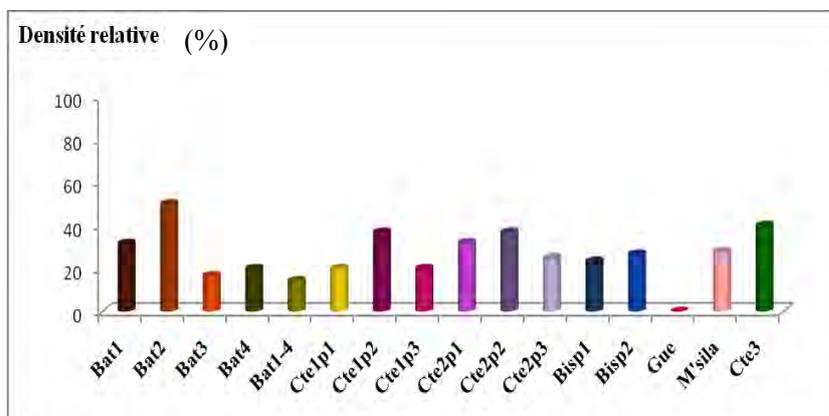


Figure 47 : densité relative du genre *Aspergillus* dans tous les échantillons des fermes analysées.

Résultats et discussion

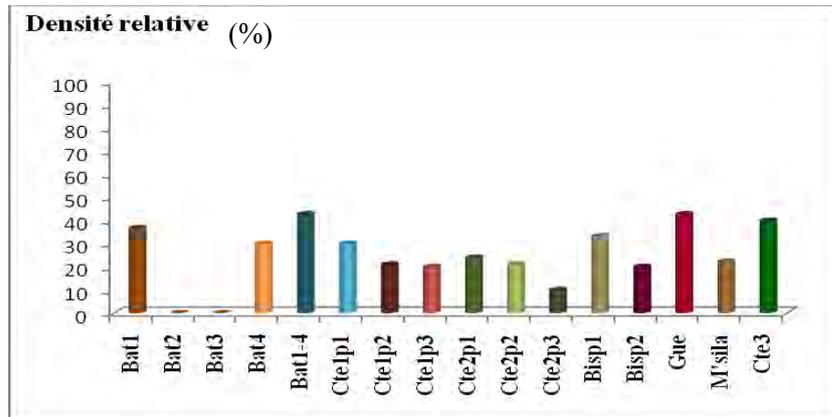


Figure 48 : densité relative du genre *Penicillium* dans tous les échantillons des fermes analysées.

D'autres genres présentent également des Dr importantes pour les aliments analysés de certaines fermes : *Alternaria* (Dr : 42,85% dans les aliments de la ferme de Gue), *Mucor* (Dr : 33,33% dans les aliments de la ferme Cte1p3), *Rhizopus* (Dr : 33,33% dans les aliments de la ferme de Bat2 et Bat3) et *Fusarium* (Dr : 22,22 % dans les aliments de la ferme de M'sila) (cf. Figures 49, 50, 51 et 52).

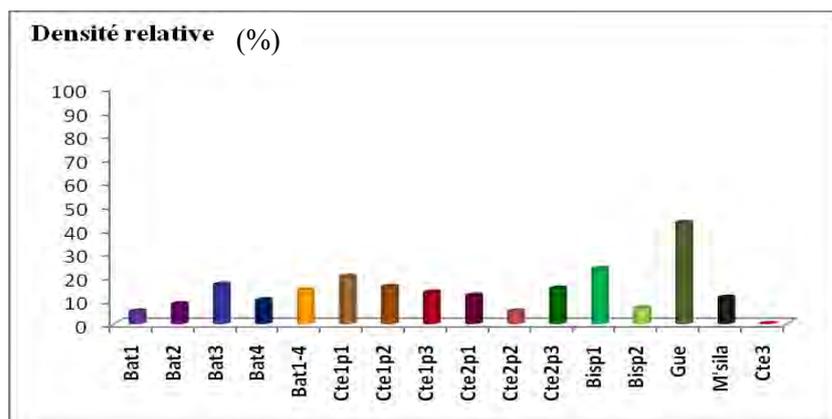


Figure 49 : densité relative du genre *Alternaria* dans tous les échantillons des fermes analysées.

Résultats et discussion

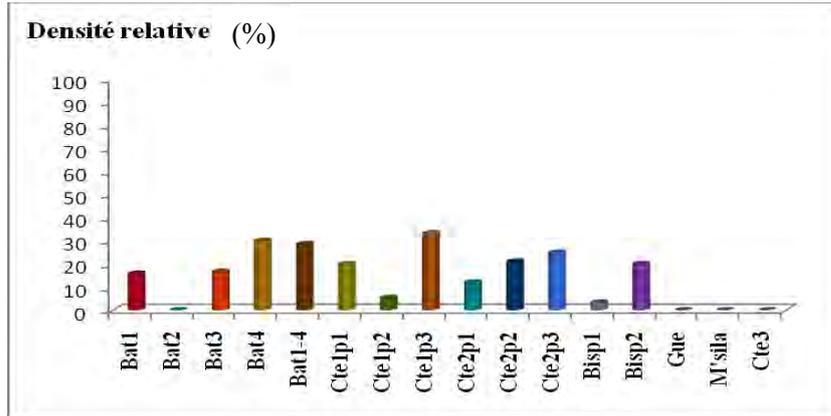


Figure 50 : densité relative du genre *Mucor* dans tous les échantillons des fermes analysées.

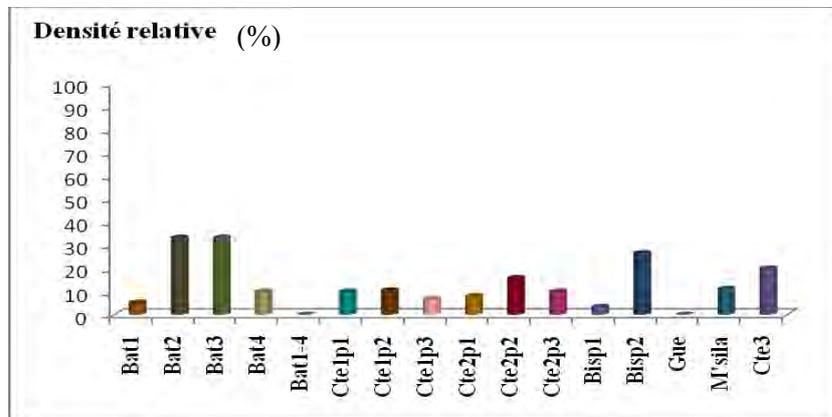


Figure 51 : densité relative du genre *Rhizopus* dans tous les échantillons des fermes analysées.

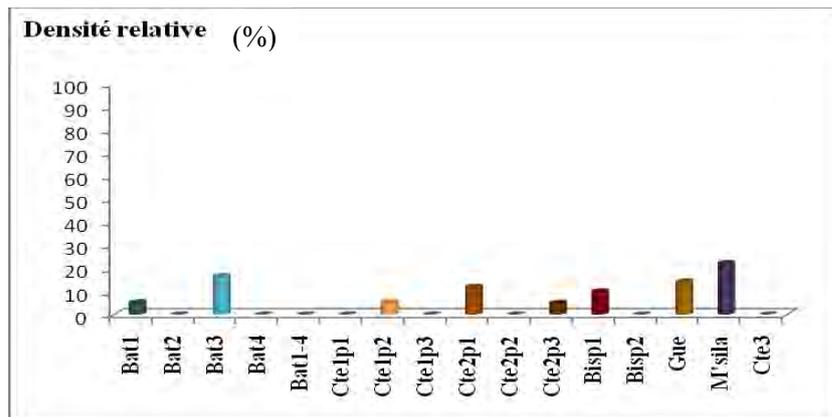


Figure 52 : densité relative du genre *Fusarium* dans tous les échantillons des fermes analysées.

Les genres *Geotricum*, *Cladosporium* et *Helminthosporium* sont toujours les moins contaminants de l'ensemble des aliments analysés, avec des Dr maximales de 8,33%, 6,66% et 5,55% respectivement.

Résultats et discussion

1.4. Résultats de l'analyse des échantillons d'aliment selon la saison

Nous avons noté qu'il y a une différence remarquable entre la contamination fongique des échantillons dans la période froide et la période chaude, car la plus grande charge fongique, du point de vue qualitatif et quantitatif, a été observée pendant la saison froide dans la quasi-totalité des échantillons analysés (191 isolats contre 56 isolats dans la saison chaude).

Les genres isolés étaient présents dans les échantillons des deux périodes (froide et chaude), mais avec un nombre de représentants plus élevé en période froide qu'en période chaude. C'est ainsi qu'on a observé une Dr de 15,78% en période froide contre 11,74% en période chaude pour *Aspergillus*. Pour *Penicillium* la Dr observée a été de 15,78% en période froide contre 8,5% en période chaude.

Un nombre d'isolat plus élevé a été observé également en période froide pour les genres suivants : *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium* et *Helminthosporium*, tandis que *Mucor* et *Cladosporium* ont été isolés avec un nombre d'isolat plus important dans les échantillons de la période chaude plutôt que la période froide (cf. Figure 53).

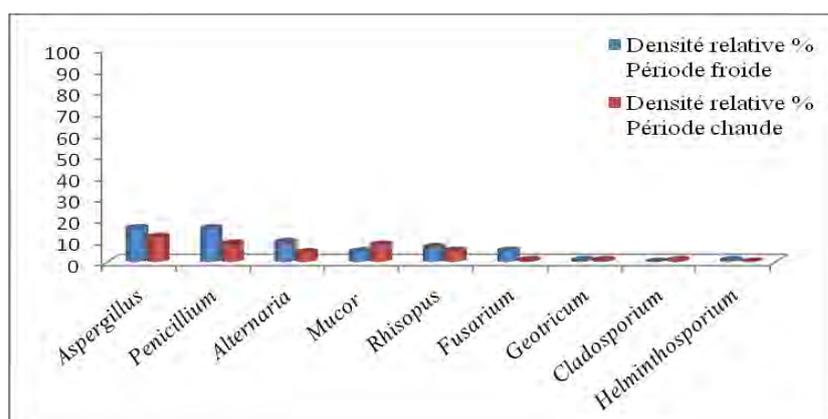


Figure 53 : densité relative pendant la période froide et la période chaude de tous les genres isolés.

1.5. Résultats de l'analyse mycologique par aliment

On se référant au tableau 16 on constate que le concentré possède la plus grande charge fongique du point de vue quantitatif et qualitatif. Avec 61 souches fongiques parmi 247 souches isolées, le concentré constitue un substrat favorable à la croissance des moisissures.

Résultats et discussion

Tableau 16 : nombre de souches de moisissures isolées par type d'aliments.

	Concentré	Paille	Foin d'avoine	Son de blé	Ensilage d'herbe	Luzerne	Rebuts de datte	Pain	Orge	Ensilage de maïs
<i>Aspergillus</i>	22	9	5	13	6	5	2	3	2	1
<i>Penicillium</i>	12	19	6	7	7	3	4	0	1	1
<i>Alternaria</i>	7	8	11	3	1	2	2	0	0	0
<i>Mucor</i>	11	5	5	3	5	0	1	0	0	2
<i>Rhizopus</i>	6	4	6	4	2	2	3	2	1	0
<i>Fusarium</i>	1	4	2	0	5	2	0	0	1	0
<i>Geotricum</i>	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Helminthosporium</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Nombre de contamination par aliment (nombre total 247 souches)	61	49	37	32	28	14	12	5	5	4

Dans le concentré, le genre *Aspergillus* présente une nette dominance avec une Fr de 100%, et une Dr de 36%, suivi du genre *Penicillium* avec une Fr de 71,42% et une Dr de 19,67%. Vient ensuite le genre *Mucor* avec une Fr de 85,71% et une Dr de 18%. (cf. Figure 54 et 55).

Dans la paille 49 souches fongiques ont été isolées ; *Penicillium* s'avère le genre majoritaire dans cet aliment, avec une fréquence d'isolement et une densité relative de 100% et de 38,77% respectivement (cf. Figure 56 et 57). D'autres genres minoritaires ont été également isolés dans la paille : *Alternaria* (Fr : 71,46% et Dr : 16,32%), *Mucor* (Fr : 42,85% et Dr : 10,2%), *Rhizopus* (Fr : 42,85% et Dr : 8,16%), *Fusarium* (Fr : 42,85% et Dr : 8,16%).

Le foin d'avoine a été révélé contaminé, avec 37 souches fongiques. Le genre *Alternaria* était fortement plus marqué avec une Fr de 85,71% et une Dr de 29,72% (cf. Figure 58 et 59).

Le son de blé semble être contaminé avec 32 souches fongiques. La dominance du genre *Aspergillus* est nettement claire, avec une Fr de 83,33% et une Dr de 40,62%, suivi du genre *Penicillium* avec une Fr de 66,66% et une Dr de 21,87% (cf. Figures 60 et 61).

Résultats et discussion

Concernant les échantillons de l'ensilage d'herbe, 28 souches de moisissures ont été isolées. Le genre majoritaire était *Penicillium* (Fr : 100% et Dr : 25%), vient en suite le genre *Aspergillus* (Fr : 60% et Dr : 21,42%) (cf. Figures 62 et 63).

Quant à la luzerne, rebuts de datte, pain, orge et ensilage de maïs, ces aliments étaient les moins contaminés avec des charges fongiques de 14, 12, 5, 5 et 4 souches isolées respectivement. Le genre *Aspergillus* était dominant dans la plupart de ces aliments (cf. Figures 64 - 73).

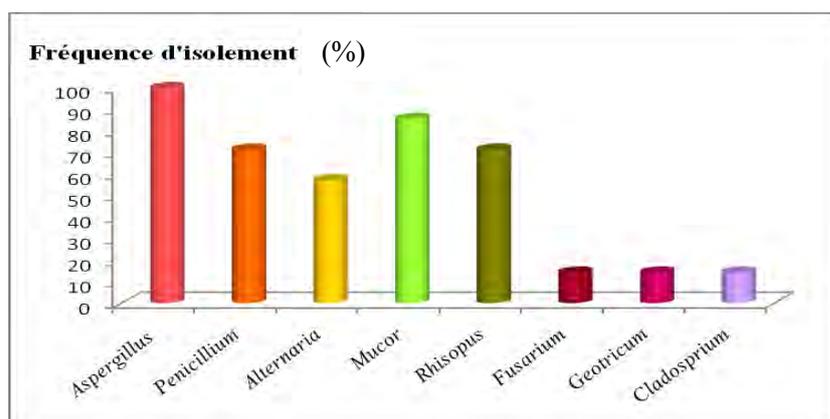


Figure 54 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolées à partir des échantillons de concentré.

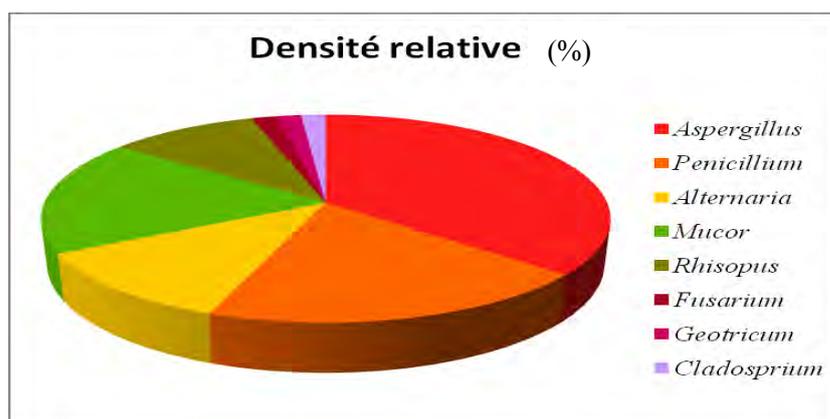


Figure 55: densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de concentré.

Résultats et discussion

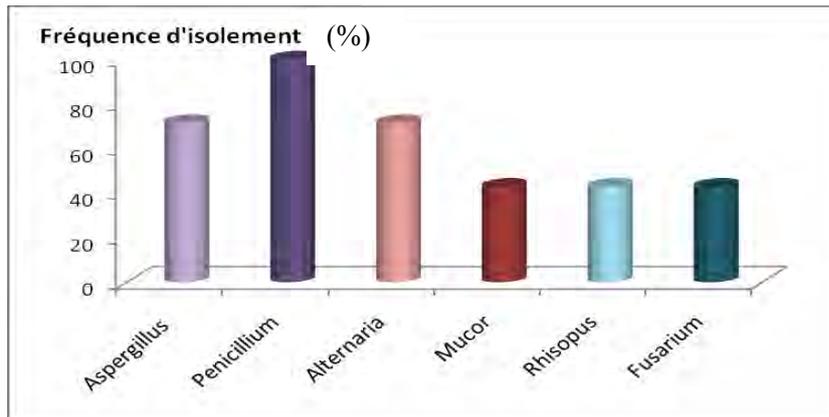


Figure 56 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de paille.

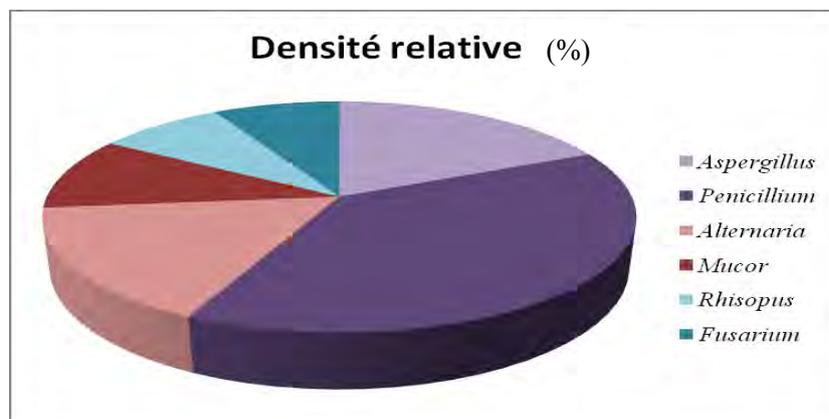


Figure 57: densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de paille.

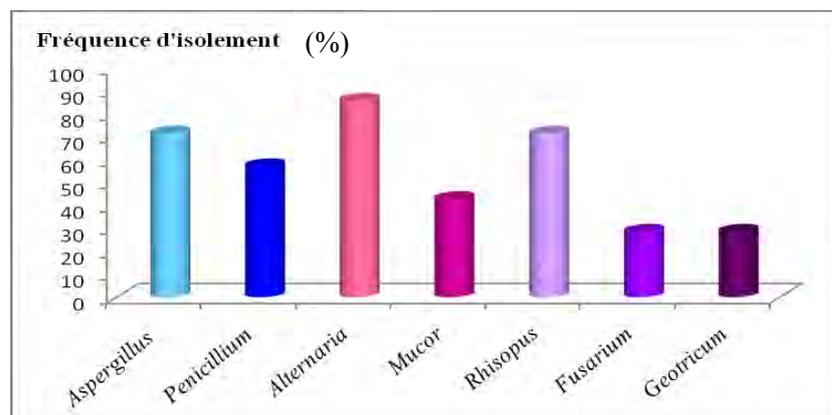


Figure 58 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de foin d'avoine.

Résultats et discussion

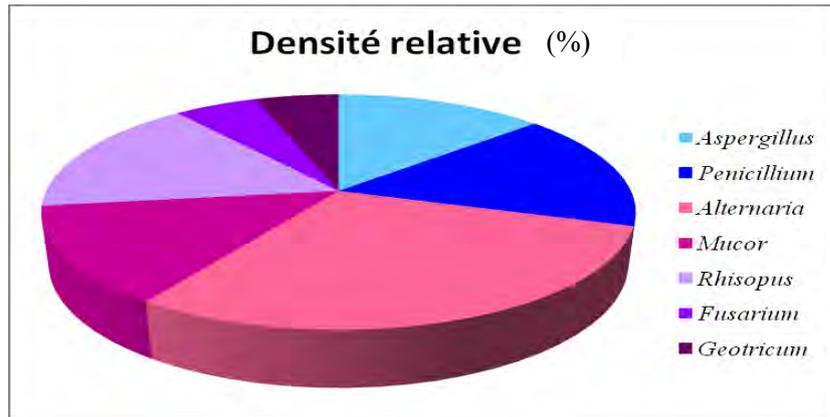


Figure 59 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de foin d'avoine.

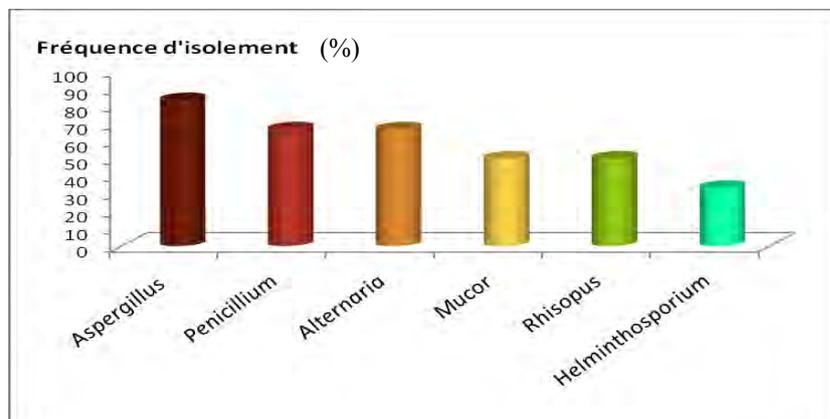


Figure 60 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de son de blé.

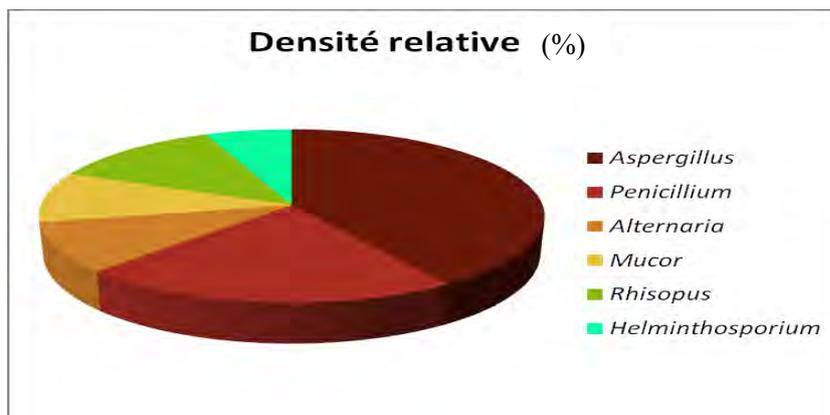


Figure 61 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de son de blé.

Résultats et discussion

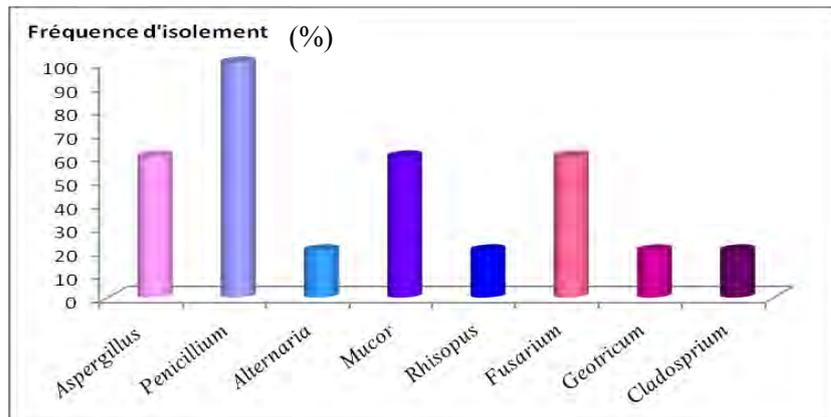


Figure 62 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage d'herbe.

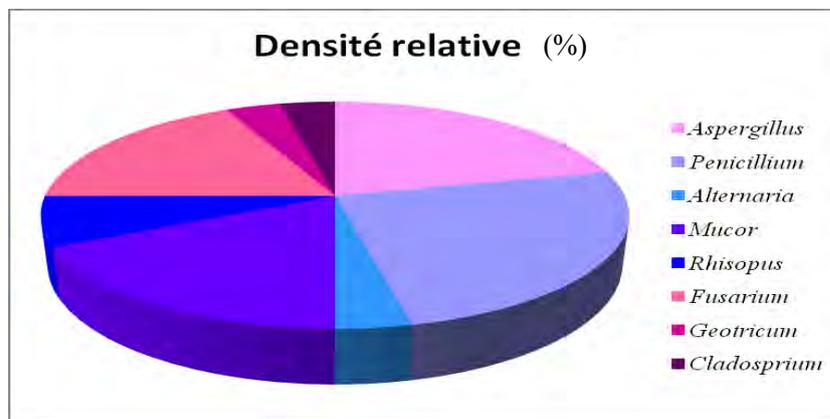


Figure 63 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage d'herbe.

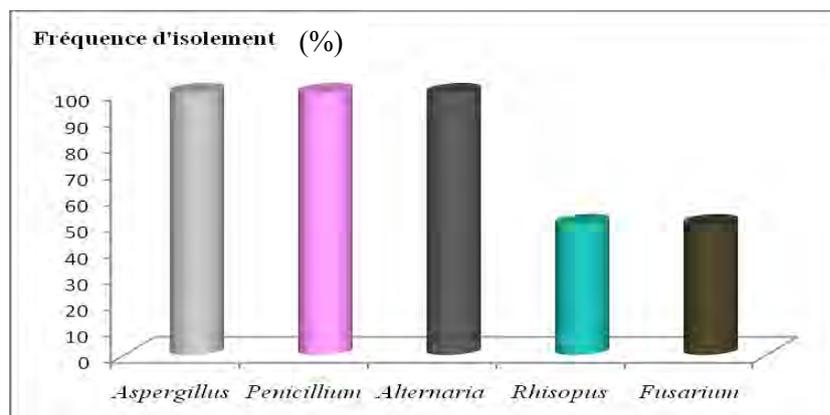


Figure 64 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de luzerne.

Résultats et discussion

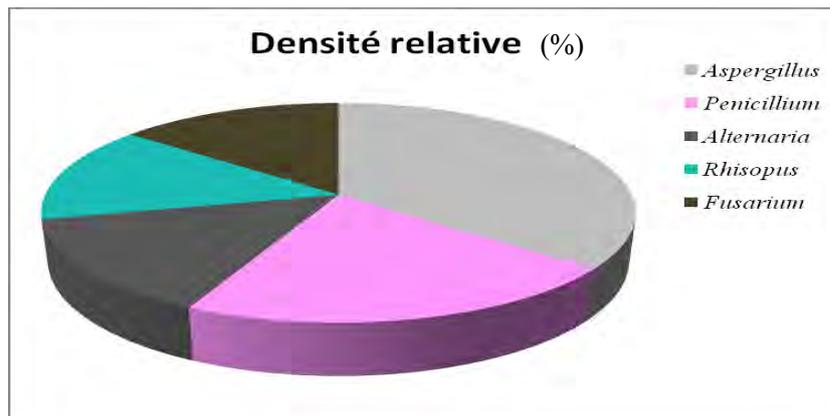


Figure 65 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de luzerne.

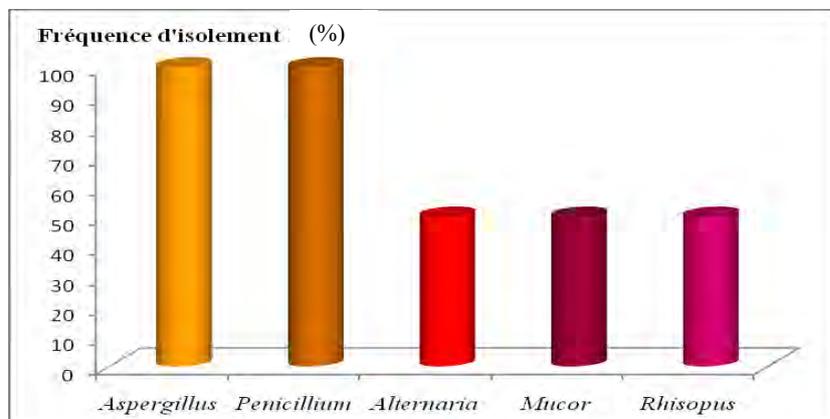


Figure 66 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de rebuts de datte.

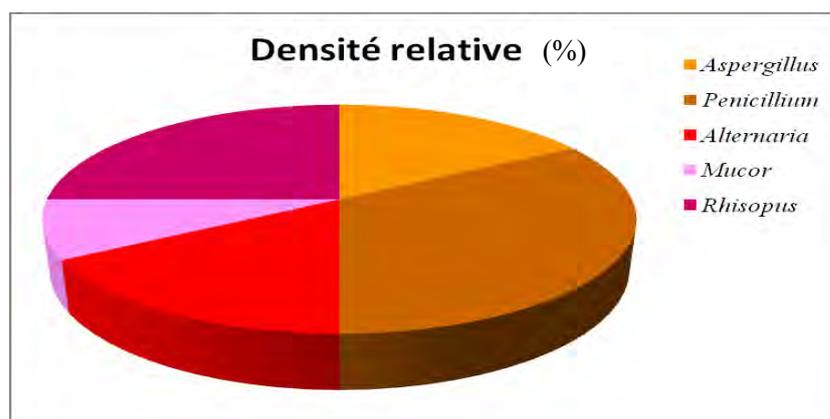


Figure 67 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de rebuts de datte.

Résultats et discussion

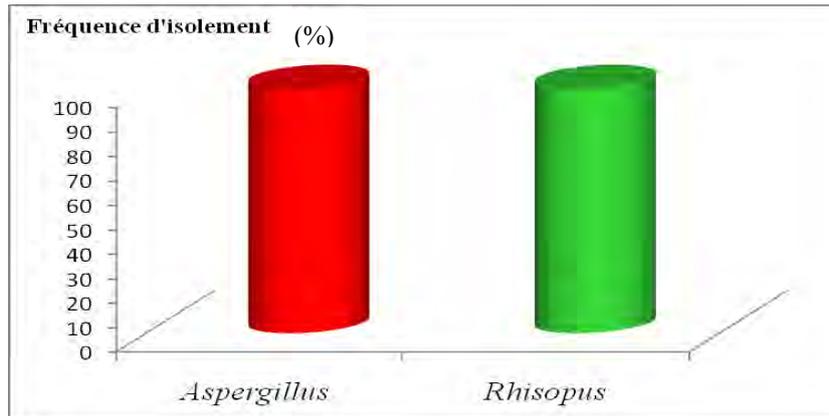


Figure 68 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de pain.

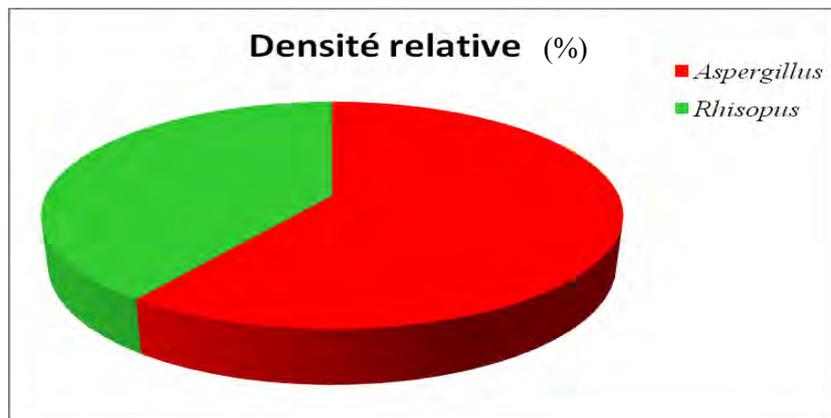


Figure 69 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons de pain.

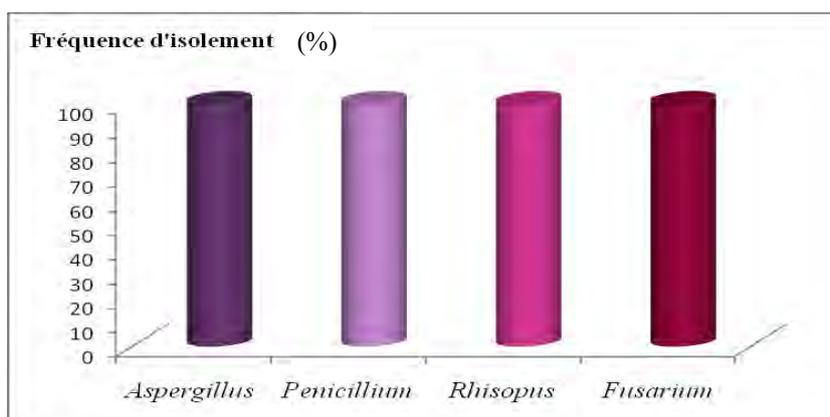


Figure 70 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'orge.

Résultats et discussion

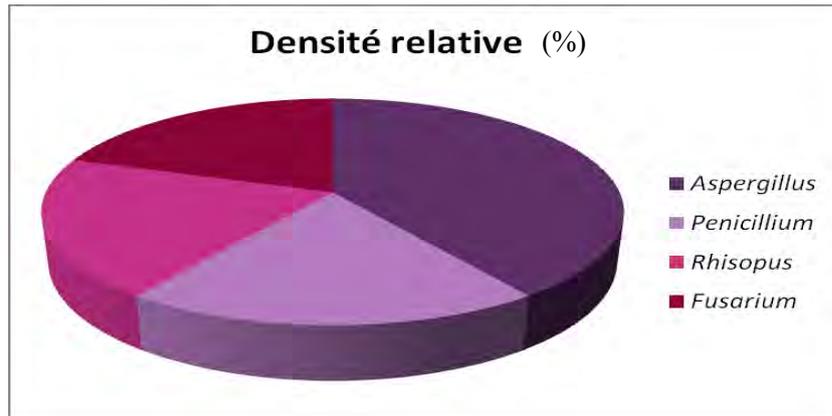


Figure 71 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'orge.

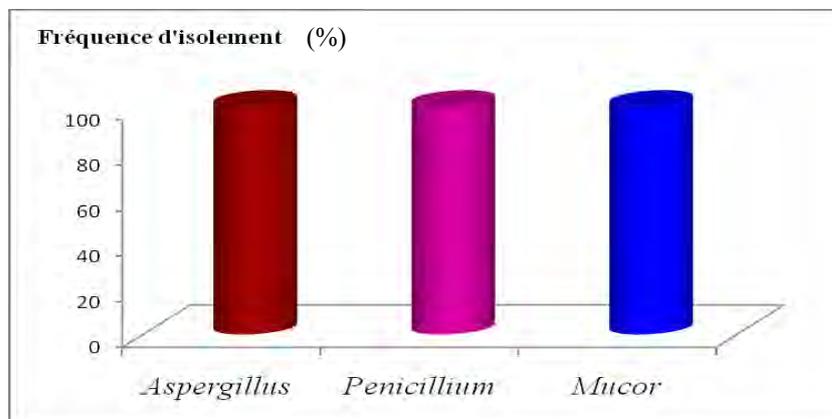


Figure 72 : fréquence d'isolement des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage de maïs.

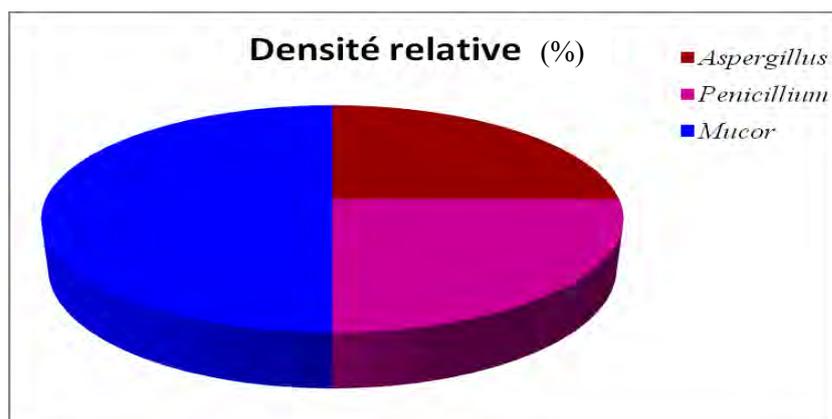


Figure 73 : densité relative des genres de moisissures isolés à partir des échantillons d'ensilage de maïs.

1.6. Discussion des résultats mycologiques

Les résultats obtenus ont montré que l'ensemble des aliments étudiés étaient contaminés. Au total, 247 souches fongiques ont pu être isolées, avec une densité variable suivant l'aliment considéré.

Selon **Sreenivasa et al. (2011)**, la densité relative des genres de moisissures indique l'étendue de la contamination avant et pendant le stockage, ainsi que les dommages des paramètres de qualité physiologiques, nutritionnels et biochimiques des grains des aliments de bétails. La détermination de la composition de la flore des fourrages secs peut être utilisée comme un critère d'évaluation de la conservation de ces aliments (**Boudra et al., 2002**). L'alimentation de bonne qualité est nécessaire pour le maintien des fonctions physiologiques et le système de défense des animaux contre les maladies et les parasites.

Dans la présente étude, deux types de moisissures ont été identifiés à partir d'échantillons d'aliments de bétails, les moisissures de stockage (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus*), qui sont généralement capables de se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales, au cours de stockage, et les moisissures de champs (*Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* et *Helminthosporium*) qui préfèrent le milieu dont l'activité de l'eau (Aw) est plus élevée (**Pitt et Hocking, 2009 ; Richard et al., 2003 ; Whitlow et Hagler, 2001**).

Ces champignons microscopiques filamenteux sont d'une grande importance en raison de la production potentielle de mycotoxines, ce qui peut contaminer de nombreux produits agricoles comme le blé, l'avoine, l'orge, le tournesol, le soja, etc (**Greco et al., 2014**). La probabilité de transfert de ces mycotoxines dans les produits d'origine animale, comme la viande ou le lait est considérable (**Greco et al., 2012 ; Ghiasian et Maghsood, 2011 ; Shareef et al., 2010**).

Notre étude a montré une fréquence et une dominance d'*Aspergillus*, suivi par *Penicillium*, dans la majorité des aliments des fermes visitées. La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant les céréales et les aliments de bétail a été rapportée dans plusieurs travaux (**Gadi, 2012 ; Gacem, 2011 ; Tabuc, 2007 ; Riba et al., 2008**).

La haute fréquence et l'abondance d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dans notre étude pourraient être dues aux pratiques agricoles non scientifiques et inadéquates, à une piètre qualité des aliments pour animaux, ainsi qu'à de mauvaises conditions de stockage (**Whitlow et Hagler, 2001**). Généralement, les conditions de stockage des ingrédients premières des aliments de bétail sont mauvaises, et souvent les grains des aliments de bétail sont déposés directement sur la terre sans protection contre les agents de détérioration et d'infection (insectes et acariens) (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**).

Résultats et discussion

Nous avons également constaté lors de la réalisation de ce travail qu'aucune mesure de précaution n'était prise contre les contaminations par les moisissures. Le séchage selon des méthodes traditionnelles et la conservation des aliments de bétail à l'intérieur des pièces humides et mal ventilées est une pratique courante dans les fermes traditionnelles. Les conditions défavorables pendant le transport et la commercialisation peuvent aussi contribuer à la croissance des moisissures et par conséquent, à la production des mycotoxines (**Wagara et al., 2014**). Le problème peut être encore plus complexe lorsque les lots de grains de céréales destinés à l'alimentation humaine sont infectés. Ces lots contaminés seront destinés à l'alimentation des bétails au lieu d'être détruits.

D'après nos résultats, *Aspergillus* est le genre le plus fréquent et le plus dominant dans les échantillons analysés de concentré, de son de blé, de luzerne, de pain et de l'orge. Le genre *Penicillium* est plus fortement marqué dans les échantillons analysés de paille et d'ensilage d'herbe. Dans ces mêmes échantillons, *Aspergillus* vient en deuxième position après *Penicillium*.

Dans une étude similaire à la notre, **Benkerroum et Tantaoui-Elarak, (2001)**, ont pu isoler 196 isolats de moisissures à partir de 70 échantillons d'aliments de bétail (concentré, maïs, orge, son de blé, tourteaux de colza, tourteaux de soja et de tournesol). Le genre *Penicillium* représente 35,7% du total des isolats, suivie d'*Aspergillus* représentant 20,4%. D'autres genres ont été également isolés. Par ordre de dominance, il s'agit de : *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria* et enfin *Cladosporium*.

Nos résultats montrent que le concentré, qui est un aliment composé de plusieurs matières premières (le maïs constitue la majeure partie), est un substrat favorable à la croissance des moisissures. Le genre le plus dominant est *Aspergillus* (Dr : 36,6%) suivi par *Penicillium* (Dr : 19,67%). Ces résultats rejoignent ceux de **Tabuc, (2007)**, qui a rapporté que les espèces de moisissures les plus fréquemment retrouvées dans les aliments composés appartiennent aux mêmes genres que ceux contaminant les céréales : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. L'auteur a rapporté également que les aliments composés pour les bétails peuvent être contaminés par les spores qui étaient initialement présentes dans les céréales, ou dans les autres ingrédients (oléagineux) qui entrent dans leur composition. La contamination par les moisissures peut survenir avant la récolte, elle peut être aggravée par les conditions d'entreposage, comme elle peut aussi survenir au cours du processus de fabrication ou pendant le stockage (**FAO et OMS, 2012**).

Résultats et discussion

Le maïs est le principal composé utilisé dans la formulation des concentrés. Selon **Krnjaja et al., (2013)**, les genres de moisissures les plus couramment identifiés dans les grains de maïs stockés sont : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. La prolifération de ces moisissures est stimulée par une teneur plus élevée en humidité des grains, une température plus élevée pendant le stockage, une longue période de stockage, une infection intensive par des moisissures avant le stockage et par une forte activité des insectes et des acariens. En ce qui concerne la présence de l'AFB₁, cette dernière a été détectée dans tous les échantillons testés avec une concentration moyenne de 1,39 pg/kg (allant de 0,33 à 2,40 pg/kg) **Krnjaja et al., (2013)**.

En Algérie, le maïs provient essentiellement de l'importation où il reste stocké durant de longues périodes avant d'arriver au marchés locaux (stockage dans les fermes productrices, les ports, etc). Les conditions de stockage ne sont pas toujours adéquates, et expliquent probablement la forte contamination du concentré par *Aspergillus* et autres types de moisissures de stockage. Cette fréquence de contamination importante par *Aspergillus* pourrait s'accompagner aussi par la production d'aflatoxine B₁.

D'un autre coté, **Kumar et al., (2008)**, qui ont montré que les grains de maïs constituent un substrat favorable aux infections fongiques et à la production potentielle de dangereux mycotoxines. La même étude a montré qu'*Aspergillus* (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) est le genre le plus dominant, et que le taux d'AFB₁ dans les échantillons de maïs collectés dans la période froide (47 %) est supérieur a celui trouvé dans les échantillons collecté dans la période chaude (17%).

Par ailleurs, des résultats similaires aux nôtres ont été cités par (**Ghiasian et Maghsood, 2011**). Les auteurs ont montré qu'*Aspergillus*, suivi par *Penicillium* et *Fusarium*, sont les principaux genres isolés à partir de 713 échantillons d'aliments de vaches prélevés de 93 fermes en Iran. Dans une autre étude menée sur trois types d'aliments de bétails en Argentine (son blé, grain de maïs et ensilage de maïs) afin de déterminer leur mycoflore, **Roigé et al., (2009)** ont montré que *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria* étaient les genres les plus souvent récupéré à partir de son de blé, alors que *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* étaient les plus fréquemment isolés à partir des grains de maïs. *Penicillium*, *Aspergillus* et *Scopulariopsis* étaient les genres les plus répandus dans les aliments fermentés (ensilage de maïs), ce qui est partiellement en accord avec nos résultats, qui indiquent que les genres majoritaires de l'échantillon de l'ensilage de maïs sont *Mucor* en premier lieu, suivi de *Penicillium* et d'*Aspergillus*.

Résultats et discussion

L'ensilage est l'un des procédés les plus anciennement appliqués dans la conservation des aliments de bétails pour prévenir la croissance de micro-organismes, y compris les champignons filamenteux. La conservation incorrecte de l'ensilage favorise l'apparition des moisissures et réduit leur valeur nutritionnelle.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, le genre *Aspergillus* est moins dominant dans les échantillons de la paille et dans l'ensilage d'herbe. Dans l'ensilage, le facteur limitant de la prolifération des moisissures est le pH. Toutefois, si l'ensilage est entreposée trop sec, ou s'il n'est pas suffisamment emballé et couvert, l'infiltration d'air permet une activité microbienne, laquelle épuise les acides de l'ensilage et permet ainsi l'augmentation du pH et la prolifération des moisissures.

Selon **Richard et al. (2003)** le genre *Aspergillus* se développe dans un climat chaud et humide, dont l'espèce *Aspergillus flavus* est prédominante sur tous les types d'aliments. En revanche, il semble qu'*Aspergillus flavus* ne prolifère pas bien dans le foin et l'ensilage, car l'acidité de ce dernier n'est pas favorable à la croissance de cette espèce et par conséquent à la production d'AFB₁ (**Boudra et al., 2002**).

Pour l'ensilage de maïs (distribué dans la ferme de la wilaya de Biskra), il semble qu'il a été correctement fabriqué, expliquant ainsi la faible charge de contamination par *Aspergillus*, en particulier.

Concernant le foin d'avoine et la luzerne, ces deux aliments ont montré une charge de contamination relativement importante par *Aspergillus* (Dr : 13.51% et 35.71% respectivement pour le foin d'avoine et la luzerne). Selon **Whitlow et Hagler, (2001)**, le facteur limitant de la prolifération des moisissures dans le foin est l'humidité ; les moisissures sont davantage susceptibles de survenir dans du foin entreposé trop humide.

Contrairement aux résultats de **Roigé et al., (2009)**, mais en parfait accord avec ceux de **Gadi, (2012)**, on note l'absence du genre *Fusarium* sur la totalité des échantillons de son de blé et ceux de l'ensilage de maïs. Le genre *Fusarium* est présent à la récolte, à la suite d'une contamination sur le champ ou au moment de l'ensilage, et ne peut plus survivre une fois l'oxygène est épuisée pendant la fermentation (**Roigé et al., 2009 ; Joshaghani et al., 2013**).

La plupart des animaux d'élevage se nourrissent de fourrage, soit dans des pâturages, soit sous forme de foin, concentré, son de blé ou d'ensilage durant la période de déficit fourrager (hiver et les saisons sèches). Pendant toute cette période, les cultures peuvent être envahies par des formes moisissures dont le développement dépend de l'écosystème ambiant.

Résultats et discussion

Il est à noter que la différence de contamination fongique a été remarquée entre les échantillons d'hiver et d'été. Tout d'abord, le nombre d'isolats d'été obtenu a été inférieur à celui d'hiver (56 contre 191). Deuxièmement, certains genres ont été présents dans les deux échantillons de la saison, mais avec un nombre d'isolats ou d'espèces plus élevé en hiver qu'en été, à l'exception du genre *Helminthosporium* qui a été rencontré seulement dans les échantillons hivernaux de son de blé (deux isolats).

Benkerroum et Tantaoui-Elarak, (2001), rapportent dans leur étude que la contamination en été est toujours minoritaire comparée avec celle en hiver (57 isolats contre 139 isolats), ce qui corrobore nos résultats.

À l'échelle mondiale, on estime qu'environ 25 % des récoltes sont infectées par des mycotoxines chaque année (**Whitlow et Hagler, 2001**). En Caroline du Nord, des échantillons d'aliments de bétail soumis par des producteurs agricoles sur une période de 9 ans, ont permis d'établir qu'il était courant que des mycotoxines soient présentes à des concentrations inadmissibles dans les aliments de bétail, y compris le maïs ensilé et le maïs-grain (**Whitlow et Hagler, 2001**).

D'après la présente étude, les aliments de bétail analysés, n'ayant présenté aucun signe de contamination fongique apparent, se sont avérés fortement contaminés par divers genres de moisissures mycotoxinogènes. De plus, l'absence de champignons visibles ne signifie pas que les aliments ne contiennent pas des toxines fongiques, qui peuvent persister sur le produit bien après la disparition des moisissures (**Fangeat, 2008**).

Par ailleurs, la contamination des aliments de bétail par des champignons filamenteux microscopiques ne conduit pas nécessairement à la présence de mycotoxines, car l'apparition de mycotoxines dépend de plusieurs facteurs tels que l'humidité relative, la température, la composition du substrat, et le degré de contamination (**Joshaghani et al., 2013**). Cependant, la formation de mycotoxines est conditionnée au préalable par la croissance du champignon (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**). L'identification des moisissures peut être utile pour tenter de déterminer quelles mycotoxines pourraient être présentes.

Dans ce travail nous sommes particulièrement intéressés au genre *Aspergillus*, dont certaines espèces produisent les aflatoxines (AFs), afin de déterminer les contaminations possibles des échantillons de lait de vache par l'aflatoxine M₁ (AFM₁).

2. Résultats de l'analyse mycotoxique du lait de vaches

2.1. Teneurs en AFM₁ dans les échantillons de lait

L'occurrence de l'AFM₁ dans le lait cru, le lait reconstitué, et le lait en poudre est présentée dans le tableau 17.

L'AFM₁ a été retrouvée dans 11% (5/47) des échantillons analysés, mais à des taux faibles, allant de 9 à 103 ng/l, et dans 23% (11/47) des échantillons, la contamination était sous forme de traces (moins de 8 ng/l).

La fréquence et le taux de contamination les plus élevés ont été observés dans le lait en poudre importé 29% (4/14), où un échantillon dépasse la limite européenne de 50 ng/l. Cependant, dans le lait cru, un seul échantillon s'est avéré positif, mais à une faible concentration (11 ng/L). Des traces d'AFM₁ (≤ 8 ng/L) ont été mises en évidence dans 36,36% (4/11) échantillons de lait pasteurisé.

Dans tous les cas, les niveaux de contamination obtenus étaient bien en dessous de la norme internationale fixée par la réglementation européenne.

2.2. Discussion des résultats mycotoxiques

En Algérie, plusieurs travaux ont étudié les propriétés microbiologiques et physico-chimiques du lait et produits laitiers. Aucune étude jusqu'à cette date n'a été effectuée pour la recherche et l'évaluation du niveau d'AFM₁ dans le lait. À notre connaissance, cette étude est le premier rapport rédigé sur la présence naturelle d'AFM₁ dans le lait cru, pasteurisé produit en Algérie, et lyophilisé importé.

Nos échantillons de lait ont été analysés par HPLC-FLD, qui s'avère la méthode quantitative et spécifique la plus adaptée au dosage d'AFM₁, après une extraction et purification à l'aide de colonne d'immunoaffinité (IAC) selon la norme Européenne.

Dans le lait cru produit localement, un seul échantillon contaminé a été mis en évidence, à un taux faible. Dans deux autres échantillons, l'AFM₁ a été détectée à l'état de traces. Ces échantillons ont tous été prélevés dans la période froide (l'automne/hiver), lorsque les rations de vaches laitières sont constituées de fourrages conservés (son de blé, concentré, paille, pain raci, etc.), durant des périodes de déficit fourrager. Ces fourrages conservés risqueraient d'être contaminés par l'aflatoxine B₁ (**Hussain et al., 2008**). Selon **AFSSA, (2009)**, les teneurs les plus hautes en AFB₁ sont retrouvées dans le germe et le son, issus d'une industrie semoulière, et qui sont des matières premières destinées à l'alimentation de bétail, et les plus basses dans la farine destinée à l'alimentation humaine.

Résultats et discussion

Tableau 17 : concentration d'AFM₁ dans le lait cru, pasteurisé et lyophilisé.

Type de lait	Saison	Échantillons analysés	Échantillons positifs	Taux d'AFM ₁ ng/l	Échantillons positifs >50ng/l
Lait cru					
Fermes pilotes					
Cte1p1, Cte1p3	Froide	02	0		
Cte1p2	Chaude	01	0		
Cte2p1	Froide	02	01	11	
Cte2p3	Chaude	01	0		
Fermes traditionnelles					
Bat1p1		01	0		
Bat2p1		01	0	(T)	
Bat3p1		01	0		
Bat4p1	Froide	01	0	(T)	
Bisp2		01	0		
Cte3p1		01	0		
Cte3p2		01	0		
Cte3p3		01	0		
Cte4		01	0		
Bisp1		01	0		
Gue	Chaude	01	0		
M'sila		01	0		
Bat1p1		01	0		
Bat2p1		01	0		
Bat3p1		01	0		
Bat4p1		01	0		
Total lait cru		22	01		
Total lait pasteurisé		11	0	(T, n=4)	
Lait lyophilisé					
Willcream (Argentine)		01	0	(T)	
Record (Argentine)		01	01	19	
Candia (Argentine)		01	01	20	
Superlait (Argentine)		01	01	103	103
Celia (France)		01	0		
Loya (Suisse)		01	0		
Nespray (Nlle Zélande)		01	0	(T)	
Gloria (Nlle Zélande)		01	0		
Dano (Danemark)		01	0		
Autre marque*					
Dounia		01	01	9	
Milfo		01	0	(T)	
Milk		01	0		
Okids		01	0	(T)	
Thika		01	0	(T)	
Total lait lyophilisé		14			
Total lait analysé		47			

*Autre marque dont l'origine n'est pas marquée sur la boîte

T : concentration en traces d'AFM₁, varie de 5 à inférieur à 8ng/l.

n : nombre des échantillons.

Résultats et discussion

Plusieurs études ont rapporté que le lait cru, collecté durant la saison froide est plus contaminé par l'AFM₁ par rapport au lait collecté durant la saison chaude. Les concentrations en AFM₁ peuvent même être supérieures à la norme européenne (50ng/l) (**Mahmoudi et Norien, 2014 ; Asi et al., 2012 ; Bilandzic et al., 2010 ; Herzallah, 2009 ; Tajkarimi et al., 2008 ; Bakirci, 2001**). Il a été démontré que l'AFM₁ pourrait rapidement apparaître dans le lait (à moins de 12 heures) après ingestion des vaches laitières d'aliments contaminés par l'AFB₁ (**Ertas et al., 2011 ; Fallah, 2010**), atteint un maximum en un ou deux jours (**AFSSA, 2009**), puis disparaît progressivement sous la limite de détection dans les 72 heures après le retrait de l'AFB₁ des aliments contaminés (**Rahimi et Karim, 2008 ; Gürbay et al., 2006**).

Le passage de l'AFM₁ dans le lait constitue pour l'animal un moyen de se protéger contre les toxines (**AFSSA, 2009**). Plusieurs travaux ont démontré que l'AFM₁ a une affinité à la caséine, protéine principale de lait, et que par conséquent elle est plus concentrée dans le fromage que dans le lait utilisé pour le produire (**Anfossi et al., 2011 ; Manetta et al., 2009 ; Prandini et al., 2009 ; Kamkar et al., 2008**).

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de **Sirma, (2013)** et de **Nuryono et al., (2009)**, qui ont analysé des échantillons de lait cru de vache. Cependant, aucun des échantillons testés n'a dépassé la limite maximale autorisée.

Différemment à nos résultats, **Assem et al., (2011)** au Liban, **Hussain et al., (2010)** à Pakistan, **Rahimi et al., (2010)** en Iran, **Ghanem et Orfi, (2009)** en Syrie et **Dashti et al., (2009)** au Kuwait, ont trouvé respectivement 60,7%, 20%, 36%, 7,2% et 59% des échantillons contaminés par l'AFM₁, dépassant la norme européenne (50ng/l).

Dans une étude visant à analyser la présence d'aflatoxines dans les denrées alimentaires destinées à des bovins laitiers, et dans le lait produit par ces animaux, **Sassahar et al., (2005)** ont montré que l'AFB₁ a été détectée dans 17% des aliments de bétail analysés, en particulier dans les aliments commercialisés, les aliments préparés à partir des matières premières et dans le son de maïs. Sur les 42 échantillons de lait cru analysés, 10 (24%) ont été contaminés par l'AFM₁ et 3 (7%) étaient au-dessus de la limite autorisée.

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

Résultats et discussion

Aussi la contamination par les aflatoxines B₁ (AFB₁) dans l'alimentation animale a été déterminée en même temps que l'échantillonnage du lait cru. La présence d'AFB₁ a été détectée à une concentration comprise entre 0,01 et 0,22 µg/kg.

La quantité d'AFM₁ retrouvée dans le lait est corrélée avec le niveau de contamination des aliments consommés par les animaux laitiers. Les taux d'aflatoxine M₁, correspondent approximativement à 1,7 % de la concentration en AFB₁ présente dans les aliments ingérés (**Whitlow et Hagler, 2001**). Cette valeur peut varier entre 1 % et 6 % (**Firmin, 2011 ; AFSSA, 2009 ; Boudra *et al.*, 2007**). Dans une autre étude, la valeur varie de 1 à 3 % (**Whitlow et Hagler, 2001**).

Ces pourcentages sont soumis à des variations individuelles dues à l'état physiologique et métabolique de l'animal (**AFSSA, 2009**). Selon la même étude, chez des vaches produisant 10 à 20 litres de lait par jour, on a mis en évidence des taux de transfert très faibles : 0,5 à 0,6%. En revanche, des vaches de forte production de lait (40 litres de lait/jour), ingérant une quantité importante d'aliments contaminés à la limite maximale réglementaire de 5 µg d'AFB₁/kg, et un ensilage de maïs, lui-même contaminé à la même teneur, avec un taux de transfert de l'AFB₁ de 6% dans le lait, il est possible de dépasser les teneurs maximales de 0,05 µg et de 0,025 µg d'AFM₁/l dans le lait destiné à l'alimentation des adultes et des enfants, respectivement (**AFSSA, 2009**).

Bien que, les bovins constituent un filtre très efficace contre l'AFM₁, en ce qui concerne le lait, puisque son taux de transfert est faible, et que cette voie d'excrétion reste très minoritaire, la présence de toxines fongiques dans le lait représente un risque pour la santé humaine (**Fangeat, 2008**).

Le taux de contamination du lait cru par l'AFM₁ dans la présente étude est inférieur à celui rapportée dans les régions voisines, avec un climat similaire. Au Maroc, **El Marnissi *et al.* (2012)** ont trouvé que 27% des échantillons analysés de lait cru étaient contaminés, dont 8% dépassant la norme européenne. De même, l'incidence de contamination par l'AFM₁ en Libye était de 71% (**El Gerbi *et al.*, 2004**). Une autre étude menée en Egypte par **Ghareeb *et al.*, (2013)**, montre que 47 échantillons sur 48 échantillons analysés de lait de vache cru ont été contaminés (incidence de 98%), avec des taux d'AFM₁ allant de 2 ng/l à 110 ng/l.

Dans les enquêtes menées en Europe, où le contrôle est plus strict, l'incidence de contamination par l'AFM₁ est beaucoup plus faible (~ 1%) (**Boudra *et al.*, 2007 ; Velasco *et al.*, 2003**). Dans une récente étude réalisée en Italie, l'incidence est de 2,2%, dont 0,5% des échantillons ont été trouvé non conforme à la limite réglementaire de l'union européenne (**Bellio *et al.*, 2016**).

Résultats et discussion

Les mesures réglementaires en vigueur dans l'Union européenne sont des plus sévères au monde. Des plans de surveillance et de contrôle rigoureux permettent de maîtriser le risque à un niveau très faible (AFSSA, 2006).

Pour le lait reconstitué, bien qu'il soit produit majoritairement à partir du lait en poudre importé, aucune contamination n'a été détectée (à l'exception de quelques traces dans 4 échantillons). L'Aflatoxine M₁ est insensible aux processus de reconstitution, notamment la pasteurisation. L'absence dans notre étude d'échantillons contaminés de lait pasteurisé pourrait être simplement expliquée par l'utilisation de lots non-contaminés de lait en poudre.

Certains auteurs ont observé une incidence de contamination par l'AFM₁ plus élevée dans le lait reconstitué (89%) dont 7,4% dépasse le seuil fixé par la réglementation européenne (Zinedine *et al.* 2007). En Iran, plusieurs études ont évalué le niveau d'AFM₁ dans le lait reconstitué (Behfar *et al.*, 2012 ; Fallah, 2010 ; Sani *et al.*, 2010 ; Tajkarimi, 2007) ; le taux de contamination varie de 0,45 ng/l à 528,5ng/l. En Syrie, Ghanem et Orfi, (2009) ont rapporté que le lait pasteurisé est contaminé avec des taux allant de 8 à 765 ng/kg. Il est à noter que le lait pasteurisé en Syrie est un lait cru, collecté à partir de plusieurs fermes. Par contre, au Liban, où le lait pasteurisé est reconstitué à partir de la poudre importé des pays arabes ou européens, 68% des échantillons sont contaminés avec des taux variant de 3,27 à 84,4 ng/l (Assem *et al.*, 2011).

En revanche, en Italie la contamination du lait pasteurisé par l'AFM₁ est de (1,6%) dont 0,5% dépasse la norme recommandée par la Communauté Européenne (Nachtmann *et al.*, 2007).

Dans notre étude, l'AFM₁ a été détecté dans 4 sur 14 (29%) échantillons de lait en poudre. Selon Pfohl-Leszkowicz, (1999) l'AFM₁ se retrouve dans la poudre du lait avec un facteur de concentration de 10, après l'élimination de l'eau, lors du procédé de déshydratation. Ainsi un lait liquide contaminé à 0,05µg d'AFM₁/litre donnera un lait en poudre contaminé à 0,5µg/kg.

Contrairement à ce qu'on a trouvé dans notre étude, en Egypte, Ghareeb *et al.*, (2013), ont montré que 60% (18/30) des échantillons analysés de lait en poudre étaient contaminés. Le taux d'AFM₁ varie de 0,5 à 4ng/kg. En Syrie, Ghanem et Orfi, (2009) ont rapporté qu'un seul échantillon de lait en poudre sur huit échantillons testés a montré un faible taux d'AFM₁ (12 ng/kg). Au Liban, 5 sur 13 (35,7%) échantillons de lait en poudre importé, étaient contaminés par AFM₁ à des taux variant entre 9,18 à 16,5 ng/l (Assem *et al.*, 2011).

Résultats et discussion

Au Brésil, **Shundo et al., (2009)**, ont trouvé que 41,5% des échantillons analysés de lait en poudre sont supérieurs à la norme. Dans notre travail un seul échantillon positif qui dépasse la norme (103 ng/l), ce qui est en parfait accord avec nos résultats.

Dans les pays industrialisés, des normes strictes sur les produits importés ont été adoptées. En raison de ces mesures, les produits plus contaminés risquent d'être orientés vers les marchés où la législation est moins contraignante (**Blanc, 2001**).

3. Résultats de l'analyse physicochimique et biochimique du lait cru

Au cours de cette partie, nous avons mesuré quelques paramètres physicochimiques, à savoir l'acidité titrable ($^{\circ}\text{D}$), l'acidité ionique (pH) et la densité. Une étude biochimique a été également réalisée, pour la détermination du taux butyreux, le taux de lactose et celui des protéines totales, afin d'évaluer la qualité nutritionnelle du lait cru collecté de différentes fermes étatiques et privées. En fin, nous avons comparé les résultats obtenus avec les normes et la réglementation qui l'entoure. Les résultats sont montrés ci-dessous.

3.1. Résultats de la mesure de l'acidité titrable

La figure 74 démontre clairement que les valeurs de l'acidité titrable se situent dans la fourchette de 13,5-19 $^{\circ}\text{D}$.

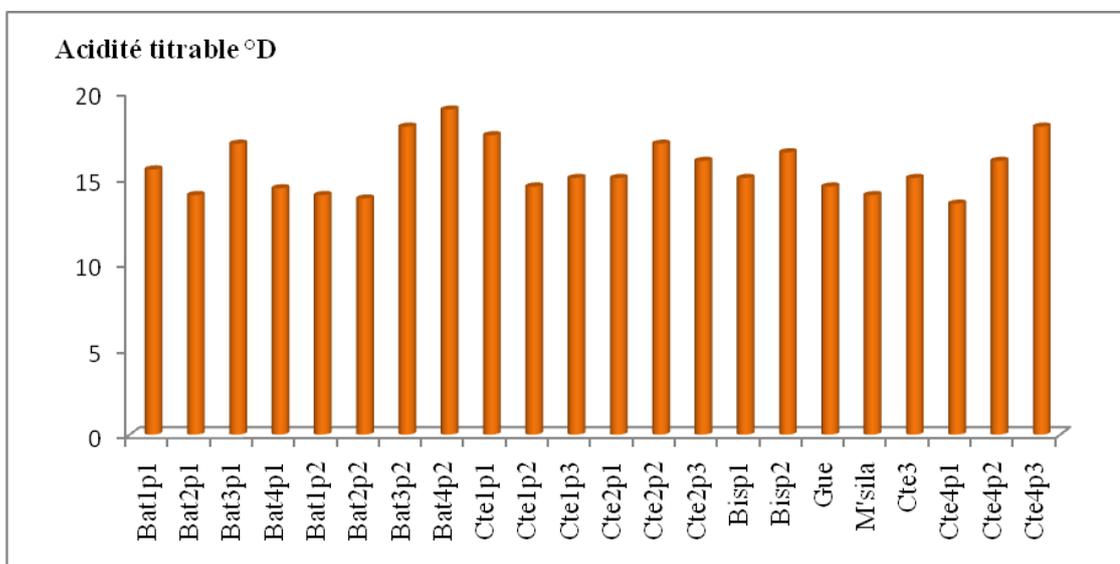


Figure 74 : variation de l'acidité titrable de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.

Résultats et discussion

Quatre échantillons de lait présentent une légère augmentation de l'acidité par rapport aux valeurs normes, qui sont comprise entre 13 et 17°D édictées par **FAO, (1998)** et **Vignola, (2002)**. Il s'agit des fermes **Bat3p2** : 18°D, **Bat4p2** : 19°D, **Cte1p1** :17,5°D et **Cte4p3** : 18°D. On peut juger donc que l'ensemble des résultats obtenus de l'acidité titrable répondent aux normes pré-citées.

Il est à noter que deux échantillons différents de lait frais peuvent avoir la même valeur de pH, mais des acidités différentes et inversement. C'est à dire qu'il n'y a pas de relation d'équivalence réelle entre le pH et l'acidité de titration.

3.2. Résultats de la mesure du pH

Les résultats de l'acidité ionique obtenus varient de 6,2 à 6,7. On constate que dans l'ensemble, les résultats de mesure du pH, illustrés dans la figure 75, répondent aux normes de **FAO, (1998)**.

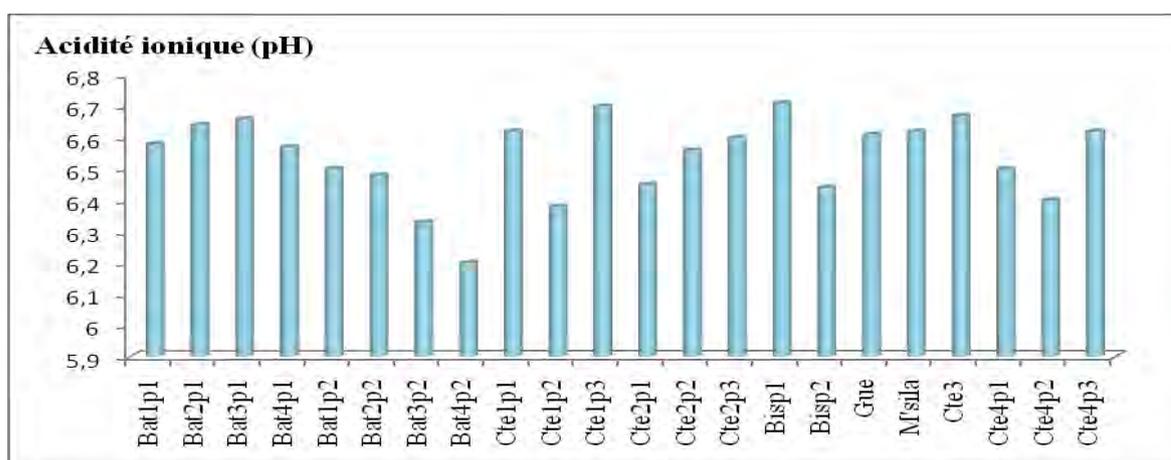


Figure 75 : variation du pH de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.

Un léger abaissement des valeurs de pH a été observé pour les prélèvements des fermes suivantes : **Bat2p2** : 6,48 ; **Bat3p2** : 6,33 ; **Bat2p2** : 6,2 ; **Cte1p2** : 6,38 ; **Cte2p1** : 6,45 ; **Cte4p2** : 6,4 ; **Bisp2** : 6,44.

3.3. Résultats de la mesure de la densité

D'après les résultats obtenus, figurés ci-dessous (cf. Figure 76), on constate que la densité varie de 1,028 (**Bat2p2**) à 1,035 (**Bat1p2**). Une légère augmentation de la densité a été observée dans le lait des fermes suivantes : **Bat1p2** (1,0352), **Bisp1** (1,034), **Cte4p1** (1,0345).

Résultats et discussion

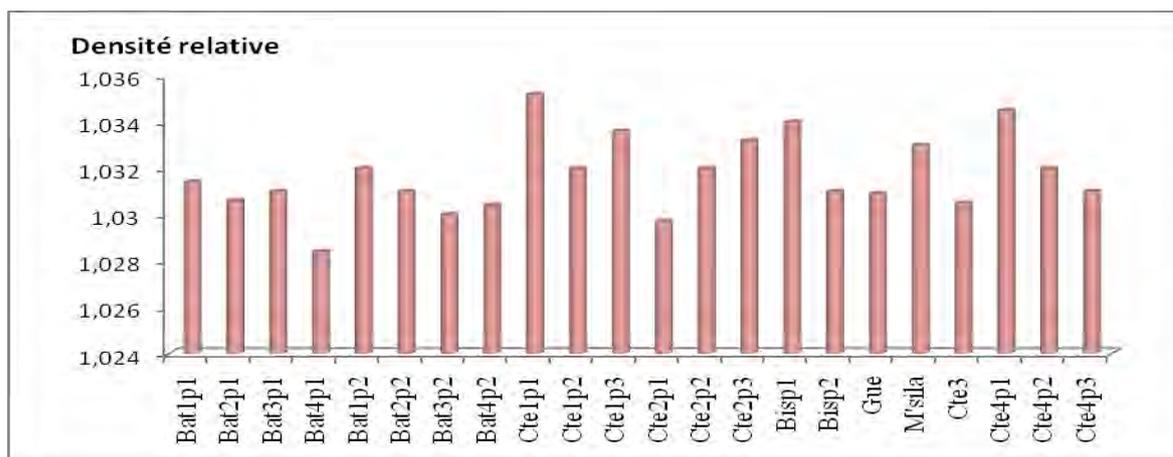


Figure 76 : variation de la densité relative de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.

D'une manière globale, les valeurs de densité trouvées sont conformes aux normes édictées par la réglementation **FAO, (1998)**, (1,028 à 1,033). Nos résultats s'avèrent en parfait accord avec les normes citées par **Vignola, (2002)**, qui sont comprises entre 1,028 et 1,035.

3.4. Discussion des paramètres physicochimiques

3.4.1. Acidité titrable

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait présente une certaine acidité. Cette dernière est due principalement à la présence de protéines (surtout les caséines et la lactalbumine), de substances minérales (phosphates et CO_2), d'acide organiques (le plus souvent, l'acide citrique) (**Vignola, 2002**), et de l'acide lactique résultant de la dégradation du lactose par l'activité microbienne. Cette dernière se nomme *acidité développée*, par opposition aux trois premières qui définissent l'acidité naturelle (**Ndiaye, 1991**).

L'augmentation de l'acidité dans quatre échantillons de lait cru, observée dans notre étude, peut être attribuable à la mauvaise hygiène lors de la traite et au problème de refroidissement, car un lait mal refroidi permettra la prolifération des bactéries lactiques responsables de la production de l'acide lactique par fermentation du lactose. Il est primordial de refroidir rapidement le lait à 4°C , après la traite afin de stopper leur croissance et éviter l'amorce de toute dégradation (**Grenon, 2004**).

Nos données se rapprochent de ceux évoquées par **Debouz et al., (2014)** ; **Belhadi, (2010)**, qui ont signalé une légère augmentation de l'acidité titrable (respectivement 18°D et $19,20^\circ\text{D}$). **Aggad et al., (2009)**, ont trouvé une fourchette de $16-19^\circ\text{D}$. En revanche **Mekroud, (2011)** dans son étude a trouvé des valeurs de $22,62^\circ\text{D}$, ce qui dépasse nos valeurs.

Résultats et discussion

D'autres études, réalisées dans des pays voisins, ont mis également en évidence des valeurs d'acidité titrable qui répondent aux normes, mais inférieures à nos résultats. C'est ainsi qu'au Maroc, **Ouazzani-Taybi et al., (2014)**, ont signalé une fourchette de 14,50-16,5°D. Toujours dans le même pays, **Labioui et al., (2009)** ont trouvé des valeurs entre 15°D et 17,5°D. En Tunisie, **Sboui et al., (2009)**, ont trouvé une moyenne d'acidité titrable de 17,12°D.

3.4.2. Acidité ionique

Le pH du lait ne change théoriquement pas, et constitue un indice de son état de fraîcheur, plus particulièrement en ce qui concerne sa stabilité, car c'est le pH qui influence la solubilité des protéines. Une légère acidification modifie suffisamment leur structure micellaire (**Vignola, 2002**).

En effet, lors d'un manque de fraîcheur, les bactéries lactiques transforment le lactose en acide lactique qui diminue le pH du lait (par augmentation de la concentration d'ions hydronium H_3O^+ selon l'équation $pH = \log 1/[H_3O^+]$) (**Cazet, 2007**).

Les valeurs de pH du lait cru, analysé dans notre études, sont légèrement acides en comparant avec les normes **FAO, (1998)**, mais généralement acceptables. Selon **Chethouna, (2011)** et **Labioui et al., (2009)**, les variabilités sont liées au climat, au stade de lactation, à la nature des fourrages et à la disponibilité de l'eau, à l'état de santé des vaches et aux conditions de la traite. De même, comme le colostrum est acide, un lait au pH trop faible peut aussi être le révélateur de la présence de colostrum, c'est à dire d'une traite trop précoce après le part (**Cazet, 2007**).

Les valeurs de pH obtenues dans la présente étude se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs ; **Labioui et al., (2009)** qui ont signalé une fourchette de 6,4-6,7. D'autres auteurs ont mentionné des valeurs de pH inférieurs aux nôtres. **Ouazzani-Taybi et al., (2014)**, rapportent une fourchette de 6,18-6,56. **Sboui et al., (2009)**, ont signalé une moyenne de 6,41 $\pm 0,18$.

3.4.3. Densité

La densité est une propriété physique qui varie selon la température (**Vignola, 2002**). Elle varie en fonction de la composition du lait, notamment de sa teneur en matière grasse qui a un effet prépondérant en raison de sa variabilité suivant la race et l'alimentation (**Croguennec et al., 2008**).

Résultats et discussion

Sur la base des valeurs de densité obtenues, on peut juger que le lait analysé dans notre étude n'est pas frelaté, signifiant qu'il n'a subi, ni mouillage, ni écrémage. La valeur de densité de 1,028 est peut être reliée au taux butyrique observé (55g/l) au niveau de la même ferme (**Bat1p2**). Selon **Vignola, (2002)**, plus un lait contient un pourcentage élevé en matière grasse, plus sa densité sera plus basse. De plus, un lait très riche en solides non gras (matière sèche) possède une densité élevée. Un lait écrémé pourra donc avoir une densité supérieure aux valeurs usuelles et l'adjonction d'eau fait tendre la densité vers la valeur 1. Cependant, un lait écrémé mouillé n'aura pas une densité normale (**Cazet, 2007**).

Il est à noter que les résultats obtenus dans notre étude sont généralement conformes à la réglementation en vigueur.

Nos valeurs se retrouvent au-dessus de ceux rapportées par plusieurs auteurs. En Algérie, **Debouz et al., (2014)** ont cité des valeurs de l'ordre de $1,028 \pm 0,00$; **Mekroud, (2011)**, a cité une fourchette de 1,028-1,032 ; **Belhadi, (2010)**, a trouvé des valeurs entre 1,026 et 1,033 ; **Boubezari, (2010)** a cité des valeurs entre 1,015 et 1,033.

Au Maroc, **Ouazzani-Taybi et al., (2014)**, ont trouvé une densité du lait cru qui varie entre 1,024 et 1,0325 ; **Labioui et al., (2009)** ont signalé des valeurs entre 1,028 et 1,032. **Anonyme 3 (2006)**, a cité des valeurs comprises entre 1,022 et 1,034.

Dans une étude qui évalue la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien **Aggad et al., (2009)**, ont signalé des valeurs de densité entre 1,020 et 1,037, ce qui ne concorde pas avec les nôtres.

3.5. Résultats de la mesure du taux butyreux

La figure 77, nous indique que la teneur en matière grasse du lait de vache analysé est comprise entre 27 et 55g/l. Selon (**Vignola, 2002**), les teneurs en matière grasse de 22 échantillons analysés sont bonnes, comparativement aux normes (24-55 g/l).

Résultats et discussion

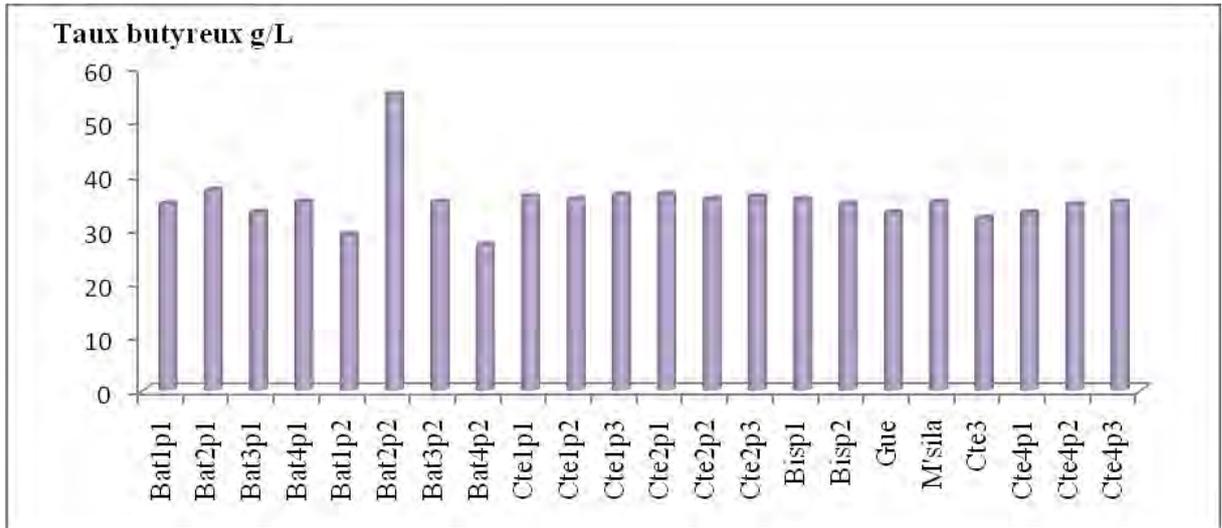


Figure 77 : variation du taux de butyreux de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.

3.6. Résultats de la mesure du taux de protéines totales

Selon la figure 78, le taux de protéines totales (TP) oscille entre 25,6 g/l et 36 g/l. On constate que certaines teneurs sont inférieures aux normes citées par **Vignola, (2002)** [29 - 50 g/l].



Figure 78 : variation du taux de protéines totales de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.

Résultats et discussion

3.7. Résultats de la mesure du taux de lactose

D'après la figure 79, les valeurs du lactose varient entre 35 g/l à 48 g/l. Ces résultats sont en accord avec ceux cités par (Vignola, 2002).

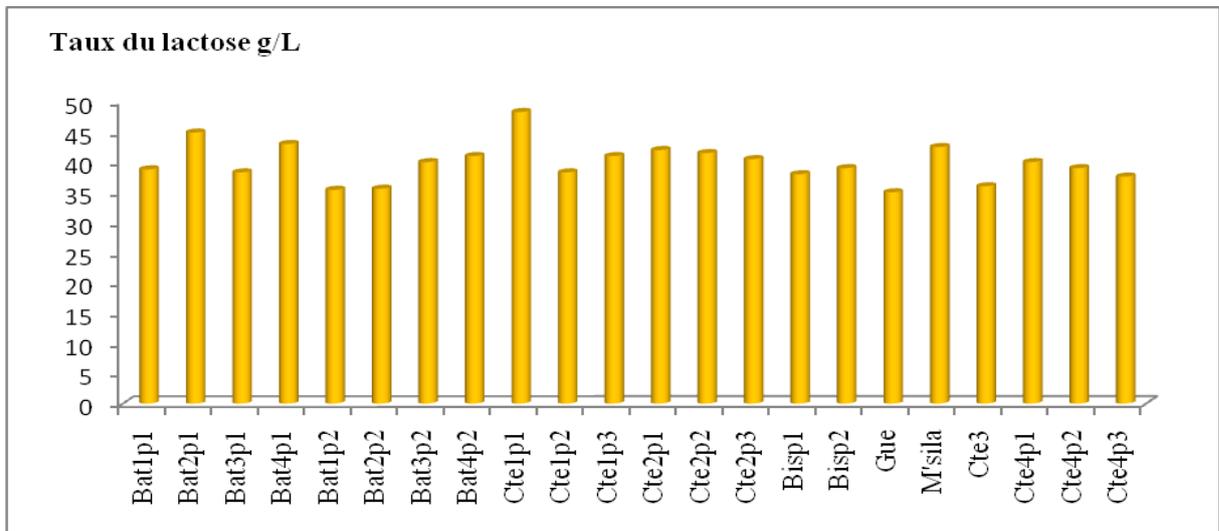


Figure 79 : variation du taux de lactose de lait cru bovin dans tous les échantillons des fermes analysés.

3.8. Discussion des paramètres biochimiques

3.8.1. Taux butyreux (Matière grasse)

Le taux butyreux (TB) du lait est considéré avec les protéines comme la matière noble du lait, car ils font la qualité du lait (Voisin, 2010). La matière grasse se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable, constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (Vignola, 2002). Elle est présente dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras.

Les teneurs en matière grasse obtenus dans notre étude sont en parfait accord avec les normes citées par Vignola, (2002). La matière grasse est le plus variable des constituants du lait, tant quantitativement que qualitativement. Elle varie en fonction de la race et de la génétique de la vache, en fonction du stade de lactation, au cours de la traite, en fonction de la photopériode et enfin en fonction de l'alimentation (Croguennec *et al.*, 2008).

Enfin, il convient de noter que l'éleveur est payé en fonction de la qualité du lait (Taux Butyreux et Taux de protéines), et aussi en fonction de critères microbiologiques (nombre de germes totaux par ml, nombre de cellules somatiques).

Résultats et discussion

Nos données en matière grasse sont supérieures à celles rapportées par **Debouz *et al.*, (2014)** ($35,66 \pm 1,15$ g/l) ; **Mekroud, (2011)** (32,75-44,50) ; **Belhadi, (2010)** (32-50 g/l) ; **Labioui, (2009)** (29,5-33,5), mais inférieures à celles mentionnées par **Boubezari, (2010)** (2,7-88,7 g/l).

3.8.2. Protéines totales

Le lait possède globalement une très bonne valeur protéique, en raison de son équilibre remarquable en acides aminés indispensables et grâce à la bonne digestibilité de ses acides aminés. La majeure partie des protéines est représentée par les caséines (à 80%) et le reste est représenté par les protéines du lactosérum (20%) (**Cazet, 2007**).

Les taux protéiques que nous avons obtenus lors de la présente étude se situent entre 25,6 et 36,2 g/l. Ils se rapprochent de la fourchette des travaux cités par **Debouz *et al.*, (2014)** ($34,97 \pm 1,27$ g de protéines/l) ; **Boubezari, (2010)** (20,7-37,8 g/l). Ce taux varie selon la saison, le stade de lactation et le nombre de mises en bas (**Labioui *et al.*, 2009**).

Le taux protéiques (TP) est une caractéristique importante du lait. Le TP conditionne la valeur marchande du lait, plus le TP sera élevé par rapport à une référence et plus le lait sera payé cher au producteur (paiement du point de TP). En effet plus le taux protéique (TP) est élevé et plus le rendement de transformation fromagère sera bon (**Courtet-Leymarios, 2010**).

3.8.3. Lactose

D'après nos résultats les teneurs en lactose du lait analysé sont comprises entre 35 g/l et 48 g/l. Ces teneurs paraissent en parfait accord avec les normes citées par **Vignola, (2002)**. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par (**Labioui *et al.*, 2009**), qui ont signalés des taux variant de 42,72 à 44,74 g/l, et inférieurs à ceux cités par **Debouz *et al.*, (2014)** ($50,47 \pm 2,06$ g/l).

Le lactose joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité (**Croguennec *et al.*, 2008**). Le lactose, principal sucre présent dans le lait, est un substrat de fermentation lactique pour les bactéries lactiques.

Publication

Presence of aflatoxin M₁ in raw, reconstituted, and powdered milk samples collected in Algeria

S. Redouane-Salah · D. P. Morgavi · R. Arhab ·
A. Messai · H. Boudra

Received: 27 March 2015 / Accepted: 19 May 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract Aflatoxins are potent toxic metabolites produced by *Aspergillus* spp. Aflatoxin M₁ (AFM1) is a metabolite of aflatoxin B₁ that can be present in milk, and it is a public health concern. There is scarce information on the incidence of aflatoxin M₁ contamination in milk consumed in Algeria. The presence of AFM1 was investigated in raw milk samples collected between February and October 2011 from 11 dairy farms representative of Algerian production conditions and that were located around Constantine city. Reconstituted and powdered milk samples were purchased from local supermarkets. The analysis was performed by liquid chromatography-fluorescence detection after immuno-affinity purification. AFM1 was detected in 5 out of 47 samples (11 %) at levels ranging from 9 to 103 ng/L, with one sample exceeding the limit of 50 ng/L set by European regulations. Traces of AFM1 (less than 8 ng/L) were also found in 11 other samples. The incidence of

AFM1 contamination was higher in imported powdered milk (29 %) than in raw milk (5 %). Although the concentration of AFM1 in contaminated samples was low, the relatively considerable prevalence found in this exploratory study justifies more detailed and continuous monitoring to reduce consumers' exposure to AFM1.

Keywords Aflatoxin M₁ · Algerian traditional dairies · Milk products · Milk safety

Introduction

Aflatoxins are secondary toxic metabolites, mainly produced by *Aspergillus* of Flavi section. Aflatoxins are predominantly produced in tropical and warm regions. Cereals and silage are the major source of mycotoxin contamination (Scudamore et al. 1998), particularly when produced and consumed on the farm and not correctly conserved. When ingested, aflatoxin B₁ (AFB1) is absorbed in the gastrointestinal tract and mainly metabolized in the liver into aflatoxin M₁ (AFM1) that is then excreted in urine but also found in the milk of dairy animals. The amount of AFM1 found in milk normally represents 1 to 2 % of the AFB1 ingested. AFM1 is considered to be a potential carcinogen for animals and humans (Cavaliere et al. 2006). The presence of AFM1 in milk and dairy products may have negative health implications for consumers, particularly for infants and children, a part of the population that have a proportionally higher consumption of milk. There is a link between growth impairment in children

S. Redouane-Salah · A. Messai
Department of Agricultural Sciences, University of Biskra,
BP 145 RP, 07000 Biskra, Algeria

R. Arhab
Department of Natural and Life Sciences, University of
Oum-EL-Bouaghi, BP 358, 04000 Oum El Bouaghi, Algeria

D. P. Morgavi · H. Boudra (✉)
INRA, UMR1213 Herbivores, 63122 Saint
Genès-Champagnelle, France
e-mail: abdelhamid.boudra@clermont.inra.fr

D. P. Morgavi · H. Boudra
Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP
10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

and exposition to mycotoxins shown in several epidemiological studies (Khlanguiset et al. 2011) Due to the recognized harmful effect of AFM1, its presence in milk and milk products is regulated and closely monitored in many countries. The European Union fixed the limit of AFM1 in milk at 50 ng/L (EFSA 2004). However, there is no regulation in Algeria. The presence of AFM1 in milk is regularly investigated in EU countries but, to our knowledge, this information is lacking in Algeria. Milk consumption in Algeria was ~140 kg per capita per year in 2013 (faostat3.fao.org), a high consumption compared with other countries of the region. The present study examines the presence of AFM1 in raw, reconstituted, and powdered milk, collected from traditional dairies and local supermarkets over several months in 1 year.

Materials and methods

Sample collection

A total of 47 milk samples (22 raw, 11 reconstituted, and 14 powdered) were collected from February to October 2011 in and around the city of Constantine located at 36°

21' N 6° 36' E, Algeria. Raw bulk milk samples were collected from two state-owned pilot farms that had more than 25 cows of the Holstein and Tarentaise breeds (Baaraouia $n=28$ cows, Kadri $n=52$ cows) and from nine privately owned farms that had between 6 and 15 dairy cows. Collected milk samples (100 mL) were preserved by adding 1.5 µg/mL of sodium azide, kept on ice during transport from the farm to the laboratory, and stored at -20 °C until analysis. Analyses were done within 6 months as we previously tested that AFM1 was stable for up to 6 months. The powdered milk samples originated from Argentina, New Zealand, and three European countries (France, Switzerland, and Denmark), while reconstituted and pasteurized milk samples were prepared exclusively from imported powdered milk. These powdered and reconstituted milk samples were purchased from different local supermarkets around the city.

Aflatoxin M₁ analysis

Before analysis, powdered milk samples were reconstituted by mixing 10 g with 100 mL of deionized water in a horizontal shaker for 5 min. AFM1 was analyzed using the official French method NF EN ISO 14501 (Dragacci and Grosso 2001). The method had

Table 1 AFM1 concentrations in Algerian raw, reconstituted, and powdered milk samples

Milk samples	Collection season	Number of samples	Number of positive samples (AFM1, ng/L)
Raw milk			
Dairy 1	Autumn-winter	2	0
	Spring-summer	1	0
Dairy 2	Autumn-winter	2	1 (11)
	Spring-summer	1	0
Small farms ($n=9$)	Autumn-winter	7	0 (T, $n=2$)
	Spring-summer	9	0
All		22	1
Reconstituted milk		11	0 (T, $n=4$)
Powdered milk			
Argentina		4	3 (T, 19, 20, and 103)
Denmark		1	0
France		1	0
New Zealand		2	0 (T)
Switzerland		1	0
Other ^a		5	1 (T, $n=3$ and 9)
All		14	4
Total		47	5

Samples collected in and around Constantine between February and October 2011. Dairy 1 (28 cows) and 2 (52 cows) are state-owned farms; the rest are private farms with less than 15 cows

T AFM1 trace concentrations that ranged from 5 ng/L to less than 8 ng/L (limit of quantification)

^aCountry of origin not stated in the label

been validated in a previous study (El Marnissi et al. 2012) in terms of linearity, precision, accuracy, recovery, as well as stability after 6 months of storage at -20°C . Variability of the method expressed in terms of precision and accuracy was less than 16 %. The limit of quantification of AFM1 was 8 ng/L, and it was calculated by using a signal-to-noise ratio of 3:1.

Results

The occurrence of AFM1 in raw, reconstituted, and powdered milk is shown in Table 1. Five out of 47 samples (11 %) were contaminated with AFM1 at low levels, ranging from 9 to 103 ng/L, while 11 samples (23 %) contained traces (less than 8 ng/L). The greatest incidence and level of AFM1 contamination was observed in imported powdered milk 29 % (4/14) with one sample exceeding the European limit of 50 ng/L, while only one positive raw milk sample was found albeit at low concentration. Traces of AFM1 (≤ 8 ng/L) were found in 11 samples without any particular predominance for raw, reconstituted, or powdered milk.

Discussion

In this study, AFM1 was detected in 11 % of milk consumed in the city of Constantine, notably in powdered milk samples. No contaminated samples were found in reconstituted milk although it is produced from imported powdered milk. Aflatoxin M_1 is not affected by the reconstitution process, including pasteurization, and the absence of positive samples may be simple explained by the use of non-contaminated powdered milk batches. Local raw milk had only one contaminated sample at low level and two more samples at trace levels. These samples were all collected in autumn-winter when diets are more complemented with barley, bran wheat, and dry bread than during spring-summer season. The sampling area has a characteristic Mediterranean climate, and both types of farms, state-owned or private, are representative of the Algerian milk production system. To our knowledge, this study is the first report on AFM1 contamination in Algeria.

The incidence of AFM1 contamination in the present study is lower than that reported in neighboring regions with a similar climate. In Morocco, authors observed a higher incidence of AFM1 contamination in

reconstituted milk (89 %) (Zinedine et al. 2007) than in raw milk (27 %) (El Marnissi et al. 2012). Similarly, the incidence of AFM1 contamination in Libya was 71 % (Elgerbi et al. 2004) and in Egypt was 98 and 60 % for raw and powdered milk, respectively (Ghareeb et al. 2013). High incidence of contamination of processed milk has also been observed in other countries where control is absent or inefficient. In Lebanon, 5 out of 13 imported powdered milk samples were contaminated with AFM1 in the range of 9.18 to 16.5 ng/L (Assem et al. 2011). Studies undertaken in various regions of Iran showed a high incidence of AFM1 in raw milk (57 %) (Mahmoudi and Norian 2014) and pasteurized milk (72 to 100 %) (Tajkarimi et al. 2007; Fallah 2010). In contrast, in surveys conducted in Europe where the control is stricter, the incidence of AFM1 contamination is much lower at ~ 1 % (Boudra et al. 2007; Velasco et al. 2003).

Conclusion

This study demonstrated a moderate incidence of AFM1 contamination of imported milk consumed in the north-east of Algeria. Although the level of contamination was generally below the EU regulation limit, the results demonstrate the insidious presence of AFM1 in consumed milk and highlight the need for continuous monitoring to decrease risk for consumers.

Acknowledgments The authors thank all the staff from Baaraouia and Kadri in Constantine for their assistance in providing milk samples. We also thank the personnel of UMRH-Dima for their technical assistance.

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Assem, E., Mohamad, A., & Oula, E. A. (2011). A survey on the occurrence of aflatoxin M_1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, 22(12), 1856–1858. doi:10.1016/j.foodcont.2011.04.026.
- Boudra, H., Bamouin, J., Dragacci, S., & Morgavi, D. P. (2007). Aflatoxin M_1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3197–3201. doi:10.3168/jds.2006-565.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., & Lagana, A. (2006). Liquid chromatography/tandem mass spectrometric

- confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk—comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *Journal of Chromatography A*, 1101(1–2), 69–78.
- Dragacci, S., & Grosso, F. (2001). Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84(2), 437–443.
- EFSA. (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *The European Food Standard Agency Journal*, 39, 1–27.
- El Marnissi, B., Belkhou, R., Morgavi, D. P., Bennani, L., & Boudra, H. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2819–2821. doi:10.1016/j.fct.2012.05.031.
- Elgerbi, A. M., Aidoo, K. E., Candlish, A. A. G., & Tester, R. F. (2004). Occurrence of aflatoxin M-1 in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Additives and Contaminants*, 21(6), 592–597. doi:10.1080/02652030410001687690.
- Fallah, A. A. (2010). Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 988–991. doi:10.1016/j.fct.2010.01.014.
- Ghareeb, K., Elmalt, L. M., Awad, W. A., & Böhm, J. (2013). Prevalence of aflatoxin M1 in raw milk produced in tropical state (Qena, Egypt) and imported milk powder. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 3(1–2), 1–4.
- Khlangwiset, P., Shephard, G. S., & Wu, F. (2011). Aflatoxins and growth impairment: a review. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(9), 740–755. doi:10.3109/10408444.2011.575766.
- Mahmoudi, R., & Norian, R. (2014). Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food and Agricultural Immunology*, 26(1), 131–137. doi:10.1080/09540105.2013.876977.
- Scudamore, K. A., Nawaz, S., & Hetmanski, M. T. (1998). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Additives and Contaminants*, 15(1), 30–55.
- Tajkarimi, M., Shojaee Aliabadi, F., Salah Nejad, M., Pursoltani, H., Motallebi, A. A., & Mahdavi, H. (2007). Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3), 346–349.
- Velasco, M. L. R., Delso, M. M. C., & Escudero, D. O. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M-1 in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants*, 20(3), 276–280. doi:10.1080/0265203021000045208.
- Zinedine, A., Gonzalez-Osnaya, L., Soriano, J. M., Molto, J. C., Idrissi, L., & Manes, J. (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 25–29. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.001.

Conclusion

Conclusion et perspectives

La consommation du lait contaminé par les mycotoxines, notamment l'aflatoxine M₁, pourrait mettre en danger la santé des consommateurs, et même provoquer des dégâts économiques graves. L'AFB₁, produite par des espèces appartenant au genre *Aspergillus*, et leur métabolite AFM₁ issue de son transformation chez les ruminants, sont les plus toxiques pour l'homme et les animaux.

A travers notre étude, modeste et originale, nous avons étudié la qualité mycologique des aliments de bétail, se répercutant directement sur la qualité biochimique et mycotoxicologique du lait, suivie d'une étude mycotoxicologique de différents types de lait consommé dans la région d'étude.

L'étude de la biodiversité des champignons filamenteux, à partir des aliments de bétail, a permis d'isoler 247 souches fongiques. Ces dernières appartiennent à neuf genres identifiés morphologiquement par des clefs d'identification. Par ordre décroissant de prédominance, il s'agit de : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Geotricum*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*. L'analyse mycologique a permis de montrer que le concentré est l'aliment de bétail le plus contaminé.

La forte dominance et la fréquence du genre *Aspergillus*, réputé comme toxigène, dans les aliments étudiés nous a poussé à quantifier par HPLC, l'AFM₁ dans le lait cru de certaines fermes pilotes et traditionnelles dans l'Est algérien, ainsi que le lait pasteurisé et le lait lyophilisé importé et vendu sur le marché.

La quantification de l'AFM₁ par HPLC, assisté d'un détecteur de fluorescence, après une purification par une chromatographie d'immunoaffinité, nous a permis de mettre en évidence : un seul échantillon positif de lait cru (11ng/L), quatre échantillons positifs de lait lyophilisé, dont un seul dépassant la norme (103ng/L), et quatre échantillons de lait pasteurisé contaminés à l'état de trace.

Malgré, les faibles taux de contaminations mis en évidence dans la présente étude, ces quantités peuvent constituer un sérieux problème de santé publique, à cause de leur effet cumulatif après une exposition répétée même à faibles doses (intoxication chronique).

A la lumière de ces résultats on peut conclure que la présence de l'AFM₁ dans le lait en Algérie n'est pas alarmante, mais elle le deviendra si on n'envisage pas un contrôle permanent d'AFM₁ dans le lait et les produits laitiers. Il convient également de noter que cette modeste étude n'est qu'une contribution à l'évaluation d'AFM₁ dans le lait, et ne reflète pas la situation réelle dans tous le pays.

L'analyse physico-chimique et biochimique du lait cru de vache, collecté dans plusieurs régions de l'Algérie, a présenté globalement une composition physicochimique et biochimique qui répond aux normes. Il est à noter également que le lait analysé est caractérisé par un apport protéique et butyrique appréciable. La maîtrise de l'alimentation des animaux peut donc être un moyen efficace pour améliorer la qualité du lait en matière grasse et en matière protéique.

Il serait intéressant, en perspective, de :

- Effectuer d'autres études plus approfondies et élargies sur tout le territoire national ;
- Introduire les analyses mycotoxicologiques (recherche d'AFM1 notamment), comme paramètre d'analyse permanent et de routine, au niveau de toutes les laiteries à l'échelle nationale ;
- Etendre l'analyse de recherche d'AFM1 sur toute la gamme des produits laitiers (fromage, yaourt, leben, etc) ;
- Etendre l'analyse de recherche d'AFM1 sur le lait lyophilisé importé, surtout pour le lait destiné aux bébés ;
- Recherche des techniques plus faciles, avec des résultats plus fiables et précis pour la détection des AFs ;
- Maintenir un bon niveau de contrôle des matières premières des aliments de bétail (céréales, maïs, foin, etc) et des aliments élaborés, surtout lorsque les conditions climatiques sont favorables aux contaminations par les moisissures (au champ ou au stockage) ;
- Faire un plan de surveillance et contrôle orienté, en ciblant par exemple une région suivie sur plusieurs années, permettra de surveiller l'évolution des teneurs en aflatoxines dans les matières premières végétales en fonction des conditions climatiques ;
- Organiser des formations spécifiques au profit des éleveurs, en ce qui concerne les bonnes pratiques de cultures et de stockage (l'alimentation destinée aux bétails doit se conserver dans de bonnes conditions et dans des locaux de stockage adéquats) ;
- Sensibiliser les consommateurs et les éleveurs des risques de contamination par les AFs.
- Enfin, nous appelons à une réflexion sérieuse et urgente sur l'élaboration de normes algériennes relatives à la contamination par les mycotoxines, en tenant compte de notre régime alimentaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **AFNOR. 1999.** Lait et produits laitiers. Volume 1 : lait. Edition AFNOR. 109-164pp.
2. **AFNOR. 2001.** Lait : détermination de la teneur en matière grasse - Méthode gravimétrique (méthode de référence). NF EN ISO 1211, décembre 2001, 21 p.
3. **AFSSA. 2006.** Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique". AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines.pdf>
4. **AFSSA. 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique. <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>.
5. **Aggad H., Mahouz F., Ahmed-Ammar Y., Kihal M. 2009.** Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Revue Méd. Vét.*, **160** (12) : 590-595.
6. **Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., Giraudi G. 2011.** Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products, Aflatoxins - Detection, Measurement and Control, Dr Irineo Torres-Pacheco (Ed.), ISBN : 978-953-307-711-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detectionmeasurement-and-control/occurrence-of-aflatoxin-m1-in-dairy-products>.
7. **Anonyme 1. 2005.** Fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs des denrées alimentaires en toxines de Fusarium. Journal officiel de l'Union européenne. Directive 2005/38/CE de la commission du 6 juin 2005.
8. **Anonyme 2. 2001.** Manuel des systèmes d'échantillonnage. Commission canadienne des grains. Services à l'industrie. Publications.gc.ca/collections/Collection/A93-24-2001F.pdf.
9. **Anonyme 3. 2006.** Qualité globale du lait cru de vache au Maroc : concepts, état des lieux et perspectives d'amélioration. Transfert de Technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA N° 137, ISSN :1114-0852.
10. **Asi M-R., Shahzad Zafar Iqbal., Agustín A., Altaf H. 2012.** Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control.*, **25** : 34-38.
11. **Assem E., Mohamad A., Oula E-A. 2011.** A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, **22** (12) : 1856–1858.
12. **Atoui A-K. 2006.** Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius* : étude moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat, institut national polytechnique de Toulouse, 1-10p.

Références bibliographiques

- 13. Azzoune N. 2011.** Etude des populations du genre *Aspergillus* et *Penicillium* et de leurs mycotoxines isolées des épices et des légumes secs. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister. Option : biochimie et microbiologie appliquée. Université M'hamed Bouguerra de Boumerdès.
- 14. Bakirci I. 2001.** A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food control.*, **12** : 47-51.
- 15. Behfar A., Khorasgani Z. N., Alemzadeh Z., Goudarzi M., Ebrahimi R., Tarhani N. 2012.** Determination of Aflatoxin M₁ Levels in Produced Pasteurized Milk in Ahvaz City by Using HPLC. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, **7(2)**:80-84.
- 16. Belhadi N. 2010.** Effets des facteurs d'élevage sur la reproduction et la qualité du lait de vache en région montagnaise. Mémoire en vue d'obtention du diplôme de Magister en agronomie. Option : alimentation animale et produits animaux. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- 17. Bellio A., Bianchi D. M., Gramaglia M., Loria A., Nucera D., Gallina S., Gili M., Decastelli L. 2016.** Aflatoxin M₁ in Cow's Milk: Method Validation for Milk Sampled in Northern Italy. *Toxins.*, **8**, 57; doi:10.3390/toxins8030057.
- 18. Benkerroum S., Tantaoui-Elaraki A. 2001.** Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feed. *Revue Méd. Vét.*, **152** (4) : 335-342.
- 19. Berthier J., Valla G. 2002.** Moisissures-Mycotoxines et Aliments : Du risque à la prévention. Université Claude Bernard Lyon I. Page web consultée le 13 Janvier 2008 <http://handy.univ-lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.
- 20. Bilandzic N., Varenina I., Solomun B. 2010.** Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. *Food Control.*, **21** : 1279-1281.
- 21. Blackwell M., Vilgalys R., James T-Y., Taylor J-W. 2012.** Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.. Version 30 January 2012. <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- 22. Blanc M. 2001.** Nouvelles exigences en matière de sécurité sanitaire dans le commerce international des produits agricoles et agroalimentaires : incidence pour les pays d'Afrique exportateurs de produits oléagineux. *Ol. Corps gras Lipides.*, **8** : 246-250.
- 23. Bognanno M., La-Fauci L., Ritieni A., Tafuri A., De-Lorenzo A., Micari P., Di-Renzo L., Ciappellano S., Sarullo V., Galvano F. 2006.** Survey of the occurrence of Aflatoxin M₁ in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS, *Mol. Nutr. Food Res.* **50** (3) : 300-305.

Références bibliographiques

24. **Boiron P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Edition : NATHAN, Paris, 11-16, 28-39, 99-101.
25. **Boquet J. 1993.** Généralités sur les microorganismes 'Biotchnologie' Eds. R. Sriban. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. pp : 38-46.
26. **Botton B., Breton A., Fevre M., Guy P.H., Larpent J.P., Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2^{ème} édition : MASSON, (Paris). P : 26, 442.
27. **Boubezari M-T. 2010.** Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en médecine vétérinaire. Université Mentouri de Constantine - Faculté des Sciences Département des Sciences Vétérinaires.
28. **Boudih S. 2011.** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*. Thèse Présentée pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université Paris EST.
29. **Boudra H. 2009.** Mycotoxins : an insidiously menacing factor for the quality of forages and the performances of the ruminants. *Fourrages.*, **199** : 265-280.
30. **Boudra H., Morgavi D-P., Galtier P., Michael-Doreau B. 2002.** Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in conserved forage : Significance and pevention. 9^{ème} *Rencontres Recherches Ruminants*, 17-23.
31. **Boudra H., Barnouin J., Dragacci S., Morgavi D-P. 2007.** Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in rawbulkmilk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science.*, **90** (7) : 3197–3201.
32. **Bourgeois C-M., Mescle J-F., Jucca J. 1996.** Microbiologie alimentaire. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France.
33. **Bousseboua H. 2004.** Cours de microbiologie générale. Edition : Université Mentouri-Constantine, 9-13 p.
34. **Branger A., Richer M-M., Roustel S. 2007.** Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Edition : Educagri. pp : 38.
35. **Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Frémy J-M., Hennebert G-L., Lesage-Meessen L., Multon J-L., Richard-Molard D., Roquebert M-F. 1998.** Moisissures des aliments peu hydratés. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. 225p.
36. **Carip C. 2008.** Microbiologie, hygien, bases microbiologiques de la diététique. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. P : 123-128, 318.

Références bibliographiques

- 37. Carvajal M., Bolaños A., Rojo F., Méndez I. 2003.** Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico., *J. Food Prot.* **66** (10) : 1885-1892.
- 38. Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. 2002.** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. La sécurité alimentaire du consommateur. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France.
- 39. Cazet L-D-M. 2007.** Bilan du taux de contamination et étude préparatoire au dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le lait de grand mélange bovin. Thèse Présentée à l'Université Claude-Bernard - LYON I (Médecine - Pharmacie), pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. www2.vetagro-sup.fr/bib/fondoc/th_sout/dl.php?file=2007lyon074.pdf.
- 40. Chethouna F. 2011.** Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologiques du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en biologie. Université Kasdi Merbah. Ouargla.
- 41. Codex Alimentarius. 2003.** Code d'usages en matière de prévention et réduction de la contamination des céréales par les mycotoxines. CAC/RCP 51-2003. Adopté en 2003. Révisé en 2014. www.fao.org/input/download/standards/406/CXP_051f_2014.pdf.
- 42. Cotty P-J., Cardwell K-F. 1999.** Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section Flavi. *Applied and environmental microbiology*, **65** (5) : 2264-6.
- 43. Courtet-Leymarios F. 2010.** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse Présentée à la faculté de médecine de Créteil, pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. École nationale vétérinaire d'Alfort.
- 44. Croguennec T., Jeantet R., Brulé G. 2008.** Fondements physicochimiques de la technologie laitière. Edition Lavoisier, pp 6-7.
- 45. Dashti B., Al-Hamli S., Alomirah H., Al-Zenki S., Bu-Abbas A., Sawaya W. 2009.** Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control.*, **20** : 686-690.
- 46. Davet P., Rouxel F. 1997.** Détection et isolement des champignons du sol, techniques et pratiques. Edition : INRA, pp 27, 32, 33.
- 47. Debouz A., Guerguer L., Hamid-Oudjana A., Seydaek H. 2014.** Etude comparative de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait de vache et du lait camelin dans la wilaya de Ghardaïa. *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes.*, **7** (2) : 10-17.

Références bibliographiques

- 48. De-Sylos C-M., Rodriguez-Amaya D-B., Carvalho P-R. 1996.** Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Addit. Contam.*, **13** (12) : 169-172.
- 49. Dragacci S., Frémy J. 1999.** Techniques pour la recherche des mycotoxines dans les aliments. In : "Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion de risque". Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Edition : TEC & DOC. pp : 140-169.
- 50. Dragacci S., Grosso F. 2001.** Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International.*, **84** : 437-443.
- 51. Dragacci S., Grosso F., Frémy J. 2005.** Analyse et détection des mycotoxines. Edition : TI Sciences et Techniques. P 3330.
- 52. EFSA. 2009.** Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. www.biofuelscoproducts.umn.edu/.../biodieselfeeds.../cfans_asset_413776.
- 53. Elgerbi A-M., Aidoo K-E., Candlish A-A., Tester R-F. 2004.** Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit. Contam.*, **21** (6) : 592-597.
- 54. El Khouri A. 2007.** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse Présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- 55. El Marnissi B., Belkhou R., Morgavi D-P., Bennani L., Boudra H. 2012.** Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food and Chemical Toxicology.*, **50** : 2819–2821.
- 56. Elzupir A-O., Elhoussein A-M. 2009.** Determination of Aflatoxin M1 in Dairy Cattle Milk in Khartoum State, Sudan. *Food Control.*, DOI : 10.1016/j.foodcont.2009.11.013.
- 57. Ertas N., Gonulalan Z., Yildirim Y., Karadal F. 2011.** A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control.*, **22** : 1956-1959.
- 58. Fallah A-A. 2010.** Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control.*, **21** : 1478-1481.
- 59. Fangeat L. 2008.** Les mycotoxines chez les bovins. Thèse Présentée à l'Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie), pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire.

Références bibliographiques

- 60. F.A.O. 1984.** Pertes de qualité des grains alimentaires après la récolte. Édition ROME, 37, 41- 42 p.
- 61. F.A.O. 1998.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition n° 28 ISBN 92-5-20534-6. www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f04.htm.
- 62. F.A.O. 2003.** Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale à l'échelle mondiale en 2003. ISSN 1014-2908. Etude FAO alimentation et nutrition 81. www.fao.org/docrep/007/y5499f/y5499f00.htm.
- 63. F.A.O. 2006.** Document de travail sur le Déoxynivalénol (DON). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Comité du codex sur les additifs alimentaires et les contaminants. Trente-huitième session. La Haye, Pays-Bas. CX/FAC 06/38/25.
- 64. F.A.O et O.M.S. 2012.** Prévention et réduction de la contamination des produits de consommation humaine et animale. Codex Alimentarius. Première édition. ROME.
- 65. Firmin S. 2011.** Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal.
- 66. Fremy J-M. 1982.** Aflatoxines et produits laitiers. *Bull Lab Vét.*, **6** : 57-64.
- 67. Fremy J-M., Thomann C. 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments. p 8-10, 13, 14, 23, 47, 79, 127, 149, 179.
- 68. Freyssinet C. 1982.** Céréales, oléagineux, protéagineux aliments pour animaux. Edition : JL. MULTON, Lavoisier. Paris.
- 69. Gacem M-A. 2011.** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Magister en biologie. Université Kasdi-Merbah. Ouargla.
- 70. Gadi O. 2012.** Identification des Espèces de Moisissures Toxinogène dans l'Alimentation du Bétail et Détection des Aflatoxines et l'Ochratoxine A. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister Option : Maîtrise de la qualité microbiologique et du développement microbien. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.
- 71. Gallot J., Abenhaïm L., Guillou M. 2000.** Guide de bonnes pratiques d'hygiène dans l'industrie de semoulerie de blé dur. Édition : Les journaux officiels, 105- 108 p.
- 72. Galtier P. 1998.** Biological fate of mycotoxins in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire.*, **149** : 549-554.

Références bibliographiques

- 73. Galtier P., Loiseau N., Oswald I-P., Puel O. 2006.** Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bull. Acad. Vét.*, Tome 159 - N°1.
- 74. Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., De Angelis A., Galvano G. 2001.** Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit. Contam.*, **18** (7) : 644-646.
- 75. Garrido N-S., Iha M-H., Santos-Ortolani M-R., Duarte-Fávaro R-M. 2003.** Occurrence of aflatoxins M(1) and M(2) in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil., *Food Addit. Contam.*, **20** (1) : 70-73.
- 76. Ghanem I., Orfi M. 2009.** Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control.*, **20** : 603-605.
- 77. Ghareeb K., Elmalt L-M., Awad W-A., Böhm J. 2013.** Prevalence OF Aflatoxin M₁ in Raw Milk Produced in Tropical State (Qena, Egypt) and Imported Milk Powder., *J. Vet. Anim. HSci.*, **3** (1-2) : 1-4.
- 78. Ghiasian S-A., Maghsood A-H. 2011.** Occurrence of aflatoxigenic fungi in cow feeds during the summer and winter season in Hamadan, Iran. *African Journal of Microbiology Research.*, **5** (5) : 516-521.
- 79. Gonzalez H-H-L., Resnik S-L., Boca R-T., Marasas W-F-O. 1995.** Mycoflora of Argentinean corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia.*, **130** : 29-36.
- 80. Greco M-V., Pardo A-G., Ludemann V., Martino P-E., Pose G-N. 2012.** Mycoflora and natural incidence of selected mycotoxins in rabbit and chinchilla feeds. *Sci. World J.* **2012** : 1–9.
- 81. Greco M-V., Franchi M-L., Rico Golba S-L., Pardo A-G., Pose G-N. 2014.** Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. *Sci. World J.* **2014** : 1–9.
- 82. Grenon C. 2004.** Lait de qualité. Conférence exposée dans le symposium sur les bovins laitiers CRAAQ. https://www.agrireseau.net/bovinslaitiers/.../Grenon_Claude.pdf
- 83. Guiraud J-P. 1998.** Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 7-9, 98-100 p.
- 84. Gürbay A., Aydin S., Girgin G., Engin A-B., Şahin G. 2006.** Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control.* **17** : 1-4.
- 85. Hadjeba-Medjdoub K. 2012.** Risque de multi-contaminations en mycotoxines et moyens de désactivation par les parois de levures et levures enrichies en glutathion ou sélénométhionine. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse délivrée par Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).

Références bibliographiques

- 86. Heritage J., Evans E-G-V., Killington R-A. 1996.** Introductory microbiology. Edition : Cambridge University Press, pp : 8-18-23.
- 87. Herzallah S-M. 2009.** Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry.*, **114** : 1141-1164.
- 88. Heshmati A., Milani J-M. 2010.** Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. *Food Control.*, **21** : 19-22.
- 89. Hussain I., Anwar J., Munawar M-A., Asi M-R. 2008.** Variation of levels of aflatoxin M1 in raw milk from different localities in the central areas of Punjab, Pakistan. *Food Control.*, **19** : 1126–1129.
- 90. Hussain I., Anwar J., Asi M-R., Munawar M-A., Kashif M. 2010.** Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control.*, **21** : 122–124.
- 91. IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002.** Aflatoxins. In : IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, World Health Organization Vol. 82. IARC, Lyon, France.
- 92. Jaquet J., Lafont J., Lafont P. 1982.** La contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française.*, **42** : 63-67.
- 93. Joshaghani H., Namjoo M., Rostami M., Kohsar F. 2013.** Mycoflora of Fungal Contamination in Wheat Storage (Silos) in Golestan Province, North of Iran. *Jundishapur J Microbiol.*, **6** (4) : e6334. DOI: 10.5812/jjm.6334.
- 94. Kamkar A., Karim G., Aliabadi F-S., Khaksar R. 2008.** Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology.*, **46** : 2236–2238.
- 95. Kendrick B. 1999.** The fifth kingdom. 2nd édition. Mycologue publications. <http://www.mycolog.com/fifhtoc.html>.
- 96. Kollu N-R., Girisham S., Reddy S-M. 2009.** Incidence of toxigenic fusaria in feeds of Godavari belt area of Pradesh, India. *African Journal of microbiology research.*, **3** (3) : 119-122.
- 97. Krnjaja V., Lević J., Stanković S., Petrović T., Tomić Z., Mandić V., Bijelić Z. 2013.** Moulds and mycotoxins in stored maize grains. *Biotechnology in Animal Husbandry.*, **29** (3) : 527-536.
- 98. Kumar V., Basu M-S., Rajendran T-P. 2008.** Mycotoxin research and mycoflor in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection.*, **27** : 891–905.
- 99. Labioui H., El-Moualdi L., Benzakour A-R., El-Yachioui M., Berny E-H., Ouhssine M 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*, **148** : 7-16.

Références bibliographiques

- 100. Lamrani K. 2009.** Etude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc. Thèse de doctorat d'état. Discipline : Biologie., Spécialité : Microbiologie. Université Mohamed V – AGDAL. Faculté des Sciences. Rabat.
- 101. Leveau J-Y., Bouix M. 1993.** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition : Tec&Doc Lavoisier et APRIA. France. p114-115.
- 102. Leyral G., Vierling E. 2001.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 3^{ème} Edition, DOIN, Paris, 15-20, 268p.
- 103. Mahmoudi R., Norian R. 2014.** Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food and Agricultural Immunology.*, **26** (1) : 131–137.
- 104. Manetta A-C., Giammarco M., Giuseppe L-D., Fusario I., Gramenzi A., Formigoni A., Vignola G., Lambertini L. 2009.** Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry.* **113**: 595-599.
- 105. Marasas W-F-O., Kellerman T-S., Gelderblom W-C-A., Coetzer J-A-W., Thiel P-G., Vander-Lugt J-J. 1988.** Leucoence phalomalacia in a horse induced by Fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **55** : 197-203.
- 106. Marie A., Jean M-L., Norman K., Marcel B., Michel L. et Yves F. 2002.** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut National de Santé Publique Quebec. P : 3-19.
- 107. Martins M-L., Martins H-M. 2000.** Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit. Contam.*, **17** (10) : 871-874.
- 108. Mekroud H. 2011.** Effet de la température sur la production laitière dans la région de Sétif. Mémoire en vue d'obtention du diplôme de Magister en agronomie. Option: Amélioration de la Production Animale. Université Ferhat Abbas- Sétif.
- 109. Miller M-G. 1995.** Analyse des résidus de pesticides dans les laboratoires de contrôle de la qualité des aliments. *In* : Manuel sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. ISSN : 1014-2908.
- 110. Motawee M-M., Bauer J., McMahan D-J. 2009.** Survey of Aflatoxin M1 in Cow, Goat, Buffalo and Camel Milks in Ismailia-Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol.*, DOI 10.1007/s00128-009-9840-3.
- 111. Nakajima M., Tabata S., Akiyama H., Itoh Y., Tanaka T., Sunagawa H., Tyonan T., Yoshizawa T., Kumagai S. 2004.** Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season., *Food Addit. Contam.*, **21**(5) : 472-478.

Références bibliographiques

- 112. Ndiaye M. 1991.** Contribution à l'étude comparée de la qualité microbiologique des laits crus, laits caillés, laits en poudre et laits caillés commercialisés dans la région de Dakar, Sénégal. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Université Cheikh Antadiop- Dakar
- 113. Nguyen M-T. 2007.** Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 23- 28, 32- 35p.
- 114. Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000.** L'essentiel en microbiologie. Édition BERTI, Paris, 209- 213, 215- 217, 231- 235 p.
- 115. Nuryono N., Agus A., Wedhastri S., Maryudani Y-B., Sigit Setyabudi F-M-C., Böhm J., Razzazi-Fazeli E. 2009.** A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control.*, **20** : 721–724.
- 116. Oki F. 2014.** 50% du lait consommé est importé ; Quotidien d'information indépendant - n° 4919. Lundi 21 Avril 2014.
- 117. Oliveira G-R., Ribeiro J-M., Fraga M-E., Cavaglieri L-R., Direito G-M., Keller K-M., Dalcero A-M., Rosa C-A. 2006.** Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia.*, **162**(5) : 355-362.
- 118. Oruc H-H., Sonal S. 2001.** Determination of aflatoxin M1 levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey., *Vet. Hum. Toxicol.*, **43**(5) : 292-293.
- 119. Ouazzani-Taybi N., Arfaoui A., Fadli M. 2014.** Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. *International Journal of Innovation and Scientific Research* 9 (2): 487-493.
- 120. Pantaya D., Morgavi D-P., Silberberg M., Martin C., Suryahadi., Wiryawan K-G., Boudra H. 2014.** Low pH Enhances Rumen Absorption of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Sheep. *Global Veterinaria.*, **13** (2): 227-232.
- 121. Pfohl-Leszkowicz A. 1999.** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Edition : Tec&Doc.
- 122. Pitt J-I., Hocking A-D. 2009.** Fungi and Food Spoilage. Third edition. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- 123. Pointurier H. 2003.** La gestion matière dans l'industrie laitière. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. 64 (388 p).

Références bibliographiques

- 124. Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva G. 2009.** Review on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology.*, **47** : 984–991.
- 125. Prescott L-M., Harley J-P., Klein D-A. 2007.** Microbiologie. 2^{ème} édition française. Edition : DE BOECK, Bruxelles, 553- 558 p.
- 126. Quillien J-F. 2002.** Les mycotoxines. Edition : INRA, Paris, 4- 12 p.
- 127. Rahimi E., Karim G. 2008.** Determination of aflatoxin M1 in raw milk producing in dairy farms in Chahar-Mahal-Bakhtiari province using ELISA. *The Journal of Food Science and Technology.*, **5** : 51–59.
- 128. Rahimi E., Bonyadian M., Rafei M., Kazemeini H-R. 2010.** Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology.*, **48**: 129–131.
- 129. Repussard C., Zbib N., Tardieu D., Guerre P. 2013.** Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française. *Revue Méd. Vét.*, **164** (12) : 583-606.
- 130. Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2008.** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology.* **122** : 85–92.
- 131. Richard J-L., Payne G-A., Desjardins A-E., Norred W-P., Pestka J-J., Phillips T-D., Van Egmond H-P., Vardon P-J., Whitaker T-B., Wood G. 2003.** Mycotoxins : Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Edition : Library of Congress Cataloging–in–Publication Data, Task Force Report No. 139. January 2003.
- 132. Roigé M-B., Aranguren S-M., Riccio M-B., Pereyra S., Soraci A-L., Tapia M-O. 2009.** Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev Iberoam Micol.*, **26** (4) : 233–237.
- 133. Roquebert M-F. 1984.** Introduction à la mycologie : morphologie et systématique des principales espèces de moisissures. In : Multon et Cahagnier. Les mycotoxines : connaissances actuelles et risques pour la santé publique dans la chaîne alimentaire. Edition : APRIA, Paris, 3- 8 p.
- 134. Roussi V., Govaris A., Varagouli A., Botsoglou N-A. 2002.** Occurrence of aflatoxin M(1) in raw and market milk commercialized in Greece., *Food Addit. Contam.*, **19** (9) : 863-868.
- 135. Ruppel P., Delfosse P., Hornick J-L. 2004.** La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne *Ann. Méd. Vét.*, **148** : 141-146.

Références bibliographiques

- 136. Sani A-M., Nikpooyan H., Moshiri R. 2010.** Aflatoxin M1 contamination and antibiotic residue in milk in Khorasan province, Iran. *Food and Chemical Toxicology.*, **48** : 2130-2132.
- 137. Sassahara M., Pontes Netto D., Yanaka E. K. 2005.** Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state., *Food and Chemical Toxicology.*, **43**, 981-984.
- 138. Sboui A., Khorchani T., Djegham M., Belhadj O. 2009.** Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique SCIENCE* **05** (2) : 293 – 304. ISSN 1813-548X
- 139. Shareef A-M. 2010.** Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential Mycotoxicosis. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences.*, **24** (1) : 17-25.
- 140. Sirma A-J. 2013.** Sources and levels of human exposure to aflatoxins in nandi county, KENYA. Thèse présentée à l'Université de Nairobi en exécution partielle des exigences pour maîtrise en santé publique vétérinaire. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Nairobi.
- 141. Snini S. 2014.** Elucidation de la voie de biosynthèse d'une mycotoxine, la patuline: caractérisation du cluster de gène et étude de la régulation. Thèse Présentée pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Toulouse.
- 142. Sreenivasa M-Y., Dass R-S., Charith-Raj A-P., Janardhana G-R. 2011.** Mycological evaluation of Maiz grains produced in Karnataka (India) for the post harvest fungal contamination. *World Applied Sciences Journal.*, **13** (4) : 688-692.
- 143. Srivastava V-P., Bu-Abbas A., Alaa-Basuny., Al-Johar W., Al-Mufti S., Siddiqui M-K. 2001.** Aflatoxin M1 contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait., *Food Addit. Contam.*, **18** (11) : 993-997.
- 144. Suliman S-E., Abdallah M-A. 2013.** Presence Of Aflatoxin M1 In Dairy Cattle Milk In Khartoum State-Sudan. *Agriculture & Forestry.*, **59** (2) : 199-204.
- 145. Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
- 146. Tajkarimi M., Aliabadi-Sh F., Salah-Nejad M., Pursoltani H., Motallebi A-A., Mahdavi H. 2007.** Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. *International Journal of Food Microbiology.*, **116** (3) : 346–349.
- 147. Tajkarimi M., Aliabadi-Sh F., Salah Nejad M., Pursoltani H., Motallebi A-A., Mahdavi H. 2008.** Aflatoxin M1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control.*, **19** : 1033–1036.

Références bibliographiques

- 148. Tap J., Royer G. 2003.** Les mycotoxines. Institut Universitaire Professionnalisé, Paris, 1-5p.
- 149. Trucksess M-W. 2001.** Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In W. J. de Koe, R. A. Samson, H. P. van Egmond, J. Gilbert, & M. Sabino (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium* (pp. 29-40). Wageningen: Ponsen & Looyen.
- 150. Unusan N. 2006.** Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey., *Food Chem. Toxicol.*, **44** (11) : 1897-1900.
- 151. Velasco M-L-R., Delso M-M-C., Escudero D-O. 2003.** ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M-1 in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants.*, **20** (3) : 276-280.
- 152. Vignola C-L. 2002.** Science et technologie du lait, transformation du lait. Edition Presses Internationales Polytechnique.
- 153. Voisin A. 2010.** Influence du type d'alimentation sur la texture et la flaveur du fromage. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse.
- 154. Wagara I-N., Matasyoh J-C., Nakavuma J-L. 2014.** Isolation of mycotoxigenic moulds contaminating Maize and groundnuts in selected districts of Kenya. *Research Journal of Microbiology.*, **9** (4) : 177-188.
- 155. Whitlow L-W., Hagler W-M-J. 2001.** La contamination des aliments par les mycotoxines : un facteur de stress additionnel pour les bovins laitiers. Conférence exposée dans le 25^{ème} symposium sur les bovins laitiers CRAAQ-2001. http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/Documents/2001_Whitlow.pdf.
- 156. Whitlow L-W., Hagler W-M-J. 2010.** Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle : Effects, Prevention and Treatment. Dairy July 19, 2010. North Carolina State University.
- 157. Yiannikouris A., Jouany J-P. 2002.** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal, *INRA Prod. Anim.*, **15** (1) : 3-16.
- 158. Zbib N., Repussard C., Tardieu D., Guerre P. 2014.** Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Revue Méd. Vét.*, **165** (3-4) : 116-135.
- 159. Zinedine A. 2004.** Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.
- 160. Zinedine A., González-Osnaya L., Soriano J-M., Moltó J-C., Idrissi L., Mañes J. 2007.** Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int. J. Food. Microbiol.*, **114** (1) : 25-29.

Annexes

Annexes

Annexe I : composition des milieux de cultures des moisissures.

➤ MEA (Malt Extract Agar) :

- Composition pour 1 litre :

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose	20 g
Peptone.....	20 g
Agar- agar.....	15 g
Eau distillée..... Qsp.....	1L

Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

➤ PDA (Potato dextrose agar)

Pour la préparation, laver et couper en petits morceaux 200gr de pomme de terre. Les mettre dans 700ml d'eau distillée et porter à ébullition. Ensuite, filtrer et compléter jusqu'à 1 litre.

Extrait de pomme de terre (200g).....	1L
Agar-agar.....	20g
Glucose	20g
pH	5-6

Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

➤ Sabouraud

Peptone de viande.....	5g
Peptone de caséine.....	5g
Maltose	20g
pH.....	6,3
Eau distillée..... qsp.....	1L

Autoclaver à 120°C pendant 20 min.

➤ Czapek Yeast Extract Agar (CYA)

K ₂ HPO ₄	1 g
Solution trace des métaux	1 ml
Czapek concentré	10 ml
Extrait de levure.....	5 g
Saccharose.....	30 g
Agar.....	15 g
Eau distillée..... Qsp.....	1L

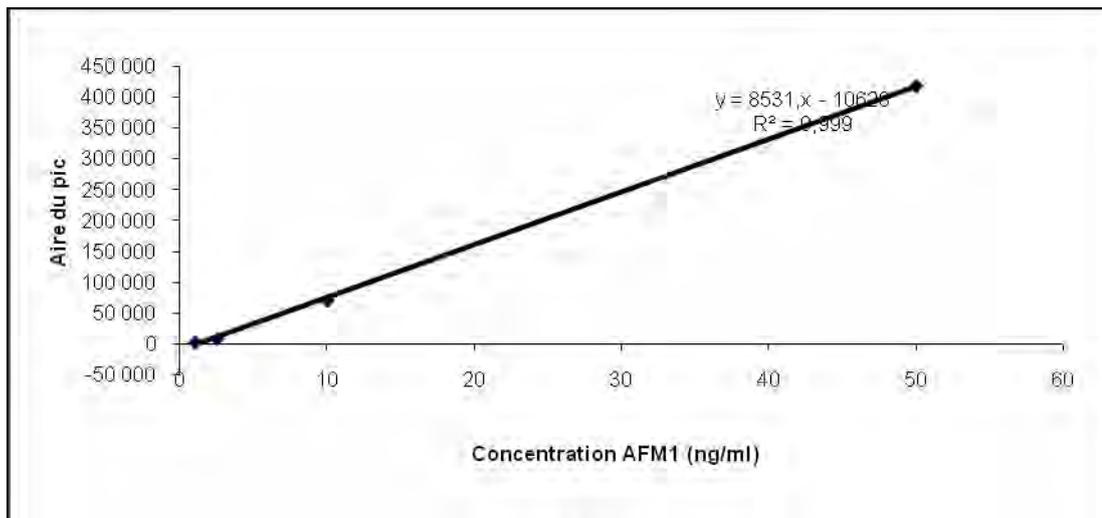
Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 min; le pH final est 6,7.

➤ Czapek concentré

NaNO ₃	30 g
KCl.....	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
Eau distillée.....	100 ml

Annexes

Annexe II : courbe d'étalonnage de solutions étalons d'AFM₁.



Annexe III : appareillage utilisé dans l'analyse physicochimique et biochimique du lait.



Le lactodensitometre (Photo originale).



Le butyrometre (Photo originale).



Le lactoscan® (Photo originale).

Résumés

Résumé :

Dans le but d'évaluer la contamination mycologique des aliments de bétail, et la recherche d'aflatoxines M₁ dans le lait consommé en Algérie, nous avons réalisé ce travail dans la zone de l'Est algérien. Les résultats mycologiques ont montré la présence de 247 souches fongiques appartenant à 9 genres (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Geotricum*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*), avec une dominance de *Aspergillus*, suivi par *Penicillium*. Parmi les aliments analysés, le concentré semble être le substrat le plus contaminé. L'étude mycotoxilogique, réalisée par HPLC, et portant sur un total de 47 échantillons de lait (22 échantillons de lait cru, 11 échantillons de lait pasteurisé et 14 échantillons de lait lyophilisé), a révélée 5 échantillons contaminés dont un seul dépassant la norme décrite par la réglementation Européenne (lait lyophilisé : 103ng/L). Les analyses biochimiques et physicochimiques du lait cru ont montré que les échantillons analysés répondent aux normes.

Mots clé : Aliments de bétail, Flore fongique, *Aspergillus*, Aflatoxine M₁.

Absract :

In order to assess the mycological contamination of cattle feed, and the search for aflatoxin M₁ in milk consumed in Algeria, we realized this work in eastern Algeria zone. Mycological results showed the presence of 247 fungal strains belonging to 9 genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Geotricum*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*), with a dominance of *Aspergillus*, followed by *Penicillium*. Among the foods analyzed, the concentrate appears to be the most contaminated substrate. The mycotoxicological study by HPLC, and involving a total of 47 milk samples (22 raw milk samples, 11 samples of pasteurized milk and 14 samples of dry milk), revealed five contaminated samples only one exceeding the standard described by European regulations (lyophilized milk 103ng/L). Biochemical and physicochemical analysis of raw milk showed that the samples tested meet the standards.

Key Words : Cattle Feed, Fungal flora, *Aspergillus*, Aflatoxin M₁.

ملخص:

من أجل تقييم تلوث غنماق ماشية بليفطويات، اُلبحت عن ألافاتل كس ي ن M_1 في محل بي بال مسيلك في لجازائر، أجين ا هذلل لدراس في من طق قلاش رقال لجازائر ي. وأظه رتق قلا وال ل فطريات وجود 742 لسلالاتل فطرية لتيت تمي إلى أجناس 9) لبي لوج لوس بلن سللي وم لل تونزا ي امي كوس، ريزوبوس، فلي وزايوم، جي رتي كوم، فم رش بوي م، ال دوس بوي وم،) مع ده ي منة ال سيوج يلوس، تلي هبلن سللي وم. ومن ي ن أ ل طع م لتي ت ل ي له، خ ل ي طاع ل ف لذي غي ل ي ب د و ل م ا د ا ل ك ث و ت ل ي ث ا. لدراسة لكشف عن ال فلو ك س ي ن ل م ن ج ز ق ب و س ط ق ن ية CLPH لل تي مس ت 42 ع ي نة م ن ل ل ي ب (77 ع ي نة ل ل ي ب ل ط ا ز ج ، 11 ع ي نة م ن ل ل ي ب ل ي س ت ر و 14 ع ي نة م ن ل ل ي ب ال م خ ف ل ك ش ف ت ع ن خ م س ع ن ا ت ل ي ثة و ا ح ن ق ق ط ا ت ج ا و ز م س ت و م ع ا ي ي ر ال أن ظ مة الأ و و ب ية (ل ل ي ب ل م ج ف ف ال ي ت ج ي د 101 g / P) وأظه ر ل ت ا ل ي ل ب ل و ك م ي ا ي ية و ل ف ي ن ي و ل ي م ي ط ية ل ل ي ب ل ط ا ز ج ا ظ ه ر ت ا ن ل ل ي ع ن ا ت ال م و و ق ت س ت ج ل ل م ع ا ي ي ر ال م ع م و ل ب ه ا.

لتي ل ف ت ا ح ية: ا غة ال ن ع ا م , ل ف ط ي ا ت , *Aspergillus*, ا ت و ك س ي ن M_1 .

Nom : REDOUANE-SALAH	Date de soutenance : 14 / 06 / 2016
Prénom : Sara	

Thème :

Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé.

Résumé :

Dans le but d'évaluer la contamination mycologique des aliments de bétail, et la recherche d'aflatoxines M1 dans le lait consommé en Algérie, nous avons réalisé ce travail dans la zone de l'Est algérien. Les résultats mycologiques ont montré la présence de 247 souches fongiques appartenant à 9 genres (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Geotricum*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*), avec une dominance de *Aspergillus*, suivi par *Penicillium*. Parmi les aliments analysés, le concentré semble être le substrat le plus contaminé. L'étude mycotoxécologique, réalisée par HPLC, et portant sur un total de 47 échantillons de lait (22 échantillons de lait cru, 11 échantillons de lait pasteurisé et 14 échantillons de lait lyophilisé), a révélée 5 échantillons contaminés dont un seul dépassant la norme décrite par la réglementation Européenne (lait lyophilisé : 103ng/L). Les analyses biochimiques et physicochimiques du lait cru ont montré que les échantillons analysés répondent aux normes.

Mots clé : Aliments de bétail, Flore fongique, *Aspergillus*, Aflatoxine M₁.

Président :	BOULAHROUF A-Rahmene	Professeur	Université Frères Mentouri. Constantine
Directeur de thèse	ARHAB Rabah	Professeur	Université Larbi Ben M'hidi. Oum el-Bouagui
Examineur :	HAMIDCHI A-Hafid	Professeur	Université Frères Mentouri. Constantine
Examineur :	BRANES Zidane	Professeur	Université Badji Mokhtar. Annaba
Examineur :	BELHAMRA Mohamed	Professeur	Université Mohamed Khider. Biskra
Examineur :	MECHAI A-Basset	M.C "A"	Université Larbi Tebessi. Tebessa