UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

★★★★★★★★★★★★★★★

LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE ET DE BROMATOLOGIE

ANNEE UNIVERSITAIRE **N°043**
2016/2017

MASTER ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES ET MANAGEMENT DE LA QUALITE DES PRODUITS DE SANTE ET DES ALIMENTS

MEMOIRE

Contribution à l'étude du niveau de contamination par l'aflatoxine B1 des aliments pour volaille collectés à Dakar et environs : quantification par deux méthodes chromatographiques

Présenté et soutenu le 09 Janvier 2017

Par

Mlle Viviane CHATCHUENG SANDEFO

Née le 06/07/1986 à Yaoundé (CAMEROUN)

Membres du Jury

Président	**M. Yerim Mbagnick DIOP**	**Professeur Titulaire**
Membres	**M. Amadou DIOP**	**Maître de Conférences Agrégé**
	Mlle Rokhaya GUEYE	**Maître-Assistante**
Directeur de mémoire	**M. Babacar BEYE**	**Chercheur à l'ITA**
Co-directeur	**Mlle Rokhaya GUEYE**	**Maître-Assistante**

DEDICACES

*A **l'Eternel Dieu ;***

*A feu mon père : **SANDEFO CHATCHUENG Joseph;***

*A ma mère : **KAMGNI Anne ;***

*A mes frères et sœurs : **FODJONG Sylvie, MOKO Huguette, KAMGUIA Adeline, KENMEUGNE Marius, YOUMBI Fabrice, GUIAKAM Laurence;***

*Et à mes nièces et neveux: **KEMDJO Séréna, NOGHA Mickaella, YOUMBI Stella, REININGER Josépha, GUIAKAM Christ-Johanne** et **DJOKO Maël.***

REMERCIEMENTS

La rigueur scientifique et les exigences d'un travail de recherche sont souvent au-delà des seules capacités de l'étudiant. Il serait audacieux pour nous d'entrer dans le vif du sujet sans nous acquitter d'une dette de reconnaissance auprès des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail. Je saisis l'occasion qui m'est offerte, pour exprimer ma profonde reconnaissance à toutes ces âmes généreuses qui m'ont aidée de près ou de loin à mener et à finaliser ce travail. J'exprime ainsi ma reconnaissance :

*Au **Pr Yerim DIOP**, responsable du Master pour avoir accepté ma candidature, vous m'avez offert l'opportunité d'enrichir mes connaissances dans le domaine de l'Analyses Physicochimiques et Management de la qualité des produits de Santé et des Aliments. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma plus haute reconnaissance et mon profond respect.*

*A Mr **Babacar BEYE** pour m'avoir accepté dans votre laboratoire, pour la confiance que vous m'avez accordé en me donnant ce sujet de recherche. Vos qualités humaines font de vous un homme admirable. Un grand merci à vous !*

A toute l'équipe académique et administrative du Master Analyses physicochimiques et management de la qualité des produits de santé et des aliments.

*A tous mes camarades de promotion du Master, plus particulièrement à **Karelle MOUTSINGA, Edmond FOTSO, Ariel TCHASSOM, Lucien MURHULA** et **Abdoul WAHAB** pour leur franche collaboration et leurs encouragements.*

*A mes amis et amies **Nelly BOUCHE, Aimé SADO, Dédé BAGLO, Hassatou DIARRA, Alhassane TOURE, Souleymane GONI, Nadège HOUACHE, Wilfried POKAM, Aristid EKOLLO** et **Abel AKPOVO** votre aide à l'accomplissement de ce travail est inestimable.*

*A **Nadège MINOUGOU**, merci pour tout que le Seigneur te rende au centuple tout ce que tu as eu à m'apporter pour la réalisation de ce travail.*

A tous ceux ou celles qui de près ou de loin et de quelques façons que ce soit ont œuvré à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent pas ici, soyez convaincus de ma profonde gratitude.

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre maître et président de jury
Pr. Yerim mbagnick DIOP

Vous nous faite un grand honneur en acceptant de présider notre jury de mémoire.

Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté spontanément de présider ce jury de soutenance.

Qu'il soit permis ici, cher maître de vous remercier chaleureusement et de vous témoigner notre profond respect.

A notre maître et juge
Pr. Amadou DIOP

C'est pour nous un réel plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury. Malgré vos multiples et importantes responsabilités, vous nous avez fait honneur en acceptant de juger ce travail.

Votre dynamisme, votre rigueur scientifique, votre engagement, en plus de votre sens de la perfection, font de vous une référence pour l'élite intellectuelle de votre pays.
Veuillez croire cher maître, à l'assurance de notre grande admiration.

A notre maître et codirecteur
Dr. Rokhaya GUEYE

Vous êtes la modestie, le progressisme, l'ambition, la persévérance et la générosité personnifiés.

Votre gout du travail bien fait, votre sens de la responsabilité, ainsi que votre esprit de partage et d'ouverture, pour lesquels nous vous estimons tant, n'ont pas déshonoré le nom que vous portez.

Veuillez trouver ici l'assurance de notre sincère reconnaissance.

A notre maître et directeur
Monsieur Babacar BEYE

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de nous confier ce travail, qui a été au début très angoissant, car vous sachant d'une rigueur scientifique difficilement satisfaisable, mais ce fut un travail très passionnant.

Votre présence effective, constante et permanente à nos côtés, nous ont permis de mieux aborder ce travail.

Vos qualités intellectuelles à la profondeur insondable et votre dimension spirituelle soutenue par une foi inébranlable, ne cesseront jamais de déteindre sur tous ceux et celles qui vous côtoie au quotidien.

Puisse ce travail combler un tant soit peu vos attentes et nous vous prions d'accepter l'expression de notre estime et de notre reconnaissance.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

A.O.A.C. : Association of Official Analytical Chemists
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFB1 : Aflatoxine B1
AFB2 : Aflatoxine B2
AFG1 : Aflatoxine G1
AFG2 : Aflatoxine G2
AFM1 : Aflatoxine M1
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN : Acide RiboNucléique
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CE : Communauté Européenne
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
DL_{50} : Dose Létale
F.A.O. : Food and Agricultural Organization
GMQ : Gain Moyen Quotidien
GST : Glutathion-S-Transférase
HBV : Virus de l'Hépatite B
I.T.A. : Institut de Technologie Alimentaire
IARC : International Agency for Research on Cancer
IgA : Immunoglobuline A
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
ISO : International Standardization Organisation
O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé
p.c. : poids corporel
ppb : partie par billion
U.C.A.D. : Université Cheikh Anta Diop
UV : Ultra-Violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des mycotoxines cancérogènes par l'IARC (IARC, 1993). 4
Tableau II : Mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine (Frémy *et al.,* 2009). 5
Tableau III : Propriétés physico-chimiques des aflatoxines (Castegnero et *al*., 2002) 10
Tableau IV : Teneurs maximales en aflatoxine B1 en alimentation animale selon le règlement 2006/576/CE 17
Tableau V : Présentation des échantillons étudiés 23
Tableau VI : Teneurs moyennes en aflatoxine B1 dans les aliments pour volaille obtenues par CLHP 31
Tableau VII : Teneurs moyennes en aflatoxine B1 dans les aliments pour volaille obtenues par CCM 33

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique des aflatoxines B, G et M1 9
Figure 2 : Métabolisme de l'aflatoxine B1 11

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1 : Broyage au moulin……24
Photo 2 : Dispositif d'élution……24
Photo 3 : Dispositif de purification par la cartouche Florisil……25
Photo 4 : Dispositif d'élution ……...25
Photo 5 : Dispositif de purification par la cartouche C18……26

TABLE DES MATIERES

DEDICACES i
REMERCIEMENTS ii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS v
LISTE DES TABLEAUX vi
LISTE DES FIGURES vi
LISTE DES PHOTOGRAPHIES vi
INTRODUCTION 1
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 3
I.1- Généralités sur les mycotoxines 3
I.1.1- Définition 3
I.1.2- Analyse des mycotoxines dans les aliments 6
I.1.2.1- L'échantillonnage 6
I.1.2.2- Les méthodes analytiques de dosage 6
I.2- Généralités sur les aflatoxines 7
I.2.1- Définition 7
I.2.2- Structures et propriétés physico-chimiques 8
I.2.2.1- Structure chimique 8
I.2.2.2- Propriétés physico-chimiques 9
I.2.3- Ecotoxicogenèse 10
I.2.4- Devenir de l'aflatoxine B1 dans l'organisme 11
I.2.4.1- Chez l'homme 11
I.2.4.2- Chez les volailles 12
I.2.5- Toxicité 12
I.2.5.1- Mécanismes d'action toxique et effets biochimiques de l'aflatoxine B1 12
I.2.5.2- Toxicité aiguë 13
I.2.5.3- Toxicité chronique 13
I.1.5.4- Effets chez l'homme 14
I.1.5.5- Impacts de l'aflatoxine B1 en élevage aviaire 15
I.2.6- Réglementation 16
I.3- Généralités sur les aliments pour volaille 17
I.3.1-Problématique 17
I.3.2- Composition des aliments pour volaille 18

I.3.2.1- Matières premières d'origine végétale 18
I.3.2.2- Les matières premières d'origine animale 19
I.3.2.3- Les produits riches en matières minérales 19
I.3.2.4- Les additifs alimentaires 19
CHAPITRE II: TRAVAIL EXPERIMENTAL 21
II.1- Objectifs 21
II.1.1- Objectif général 21
II.1.2- Objectifs spécifiques 21
II.2- Cadre de l'étude : l'I.T.A. 21
II.2.1- Statuts et missions 21
II.2.2- Laboratoire de Mycotoxines 22
II.3- Matériel et méthodes 23
II.3.1- Echantillons de l'étude 23
II.3.2- Equipements, matériels et consommables de laboratoire 23
II.3.3- Méthodes 2
II.3.3.1- Traitement des échantillons 2
II.3.4.1- Extraction de l'aflatoxine 2
II.3.4.2- Purification de l'AFB1 par la cartouche Florisil 2
II.3.4.3- Purification de l'AFB1 par la cartouche C18 25
II.3.4.5- Quantification par chromatographie liquide haute performance 26
II.3.4.4- Quantification par chromatographie sur couche mince (AOAC 968.22 : 2000) 29
II.4- Analyses statistiques 30
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION 31
III.1- Teneur en AFB1 par CLHP 31
III.1.1- Résultats obtenus 31
III.1.2- Discussion 32
III.2- Comparaison des résultats des deux méthodes analytiques 33
III.2.1- Résultats de la quantification par CCM 33
III.2.2- Discussion 34
CONCLUSION 36
RECOMMANDATIONS 37
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 38

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les aflatoxines sont définies comme étant des métabolites secondaires produits par les moisissures appartenant au genre *Aspergillus spp.* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*), qui sont des champignons pouvant se développer et produire les aflatoxines plus facilement dans des pays tropicaux à climats chauds et humides **(Kurtzman *et al.*, 1987)**.

Ces espèces fongiques sont ubiquitaires et peuvent se développer sur les aliments si la température et l'humidité leur sont favorables, au champ, pendant le stockage ou lors de la transformation.

Plusieurs aflatoxines sont présentes dans les aliments ; la plus fréquente est l'aflatoxine de type B1, reconnue comme étant l'un des plus puissants cancérogènes d'origine naturelle et ayant pour organe cible le foie **(IARC, 1993)**.

Selon les études épidémiologiques, il a été constaté que les carcinomes hépatocellulaires qui se développent après une exposition à l'aflatoxine de type B1, surviennent quasi exclusivement chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B ; ce qui suggère un effet synergique entre l'aflatoxine B1 et l'infection par le virus de l'hépatite B **(Sudakin, 2003)**.

On comprend donc aisément pourquoi la question des mycotoxines préoccupe les hygiénistes et les toxicologues.

La contamination des aliments pour volaille par les aflatoxines constitue un problème de plus en plus préoccupant en élevage. S'il apparaît que les niveaux de contamination ont peu évolué au cours de ces dernières années (ou même largement diminué du fait de l'amélioration des techniques de récolte et de stockage **(Tandon *et al.*, 1978)**, le développement de méthodes analytiques de plus en plus sensibles et rapides, associé à l'augmentation des coûts de production et une légitime inquiétude du consommateur quant à la salubrité des aliments qu'il ingère, conduisent éleveurs et industriels à se préoccuper de l'effet de niveaux de contamination bas, considérés jusqu'alors comme «acceptables».

Un certain nombre de travaux scientifiques **(Kane *et al.*, 1993 ; Dia, 1997 ; Bathily, 1998 ; Sall, 1998 ; Diouf, 2001 ; Sylla, 2014)** menés à Dakar font mention de la contamination des denrées alimentaires sénégalaises par les aflatoxines.

Cependant, la contamination des aliments par les aflatoxines n'implique pas forcément un risque pour le consommateur. De même, leur absence ne signifie pas nécessairement l'innocuité de la denrée. D'une part, la synthèse d'une aflatoxine nécessite un substrat et des conditions environnantes favorables; d'autre part, l'aliment peut avoir subi des traitements qui ont fait disparaître le micro-organisme producteur sans autant éliminer la toxine déjà produite.

Seule donc la recherche des aflatoxines peut apporter une information décisive.

Afin de préserver la santé des populations, il convient d'améliorer la qualité des denrées alimentaires. Dans cette optique, nous nous sommes proposé de rechercher les aflatoxines dans les aliments pour volaille distribués dans la zone de Dakar et dans la zone péri-urbaine de Dakar par le biais de deux méthodes d'analyses couramment utilisées à savoir la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie sur couche mince (CCM).

Ainsi la première partie de ce travail est consacrée à une synthèse bibliographique des aflatoxines et des aliments pour volaille. La deuxième partie présente notre travail personnel comportant le dosage des aflatoxines dans les aliments pour volaille par les deux méthodes analytiques.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1- Généralités sur les mycotoxines

I.1.1- Définition

Les mycotoxines peuvent être définies comme étant des produits du métabolisme secondaire des moisissures pouvant se développer sur les plantes au champ, avant et pendant la récolte ou en cours de stockage, et qui présentent des effets toxiques à l'égard de l'homme et des animaux **(Moreau, 1994).**

Le terme mycotoxine est dérivé du grec *Mykes* (champignons) et *Toksikon* (poison). Les mycotoxines sont synthétisées par les moisissures (champignons microscopiques) dans les aliments consommés par l'homme et les animaux **(Bennet, 1983)**.

La présence de moisissures ne signifie pas nécessairement la formation de mycotoxines ; il existe des souches produisant des mycotoxines et des souches qui n'en produisent pas ou peu **(Pfohl-Leszkowicz, 1999)**.

Plusieurs espèces de moisissures, appartenant aux trois principaux genres *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* ou *Penicillium spp.*, sont présentes dans l'air ambiant, le sol et les cultures. Elles synthétisent les mycotoxines et sont capables de se développer sur différents types d'aliments tels que les oléoprotéagineux, les fruits, les noix, les amandes, les graines, les fourrages et en particulier les céréales telles que le maïs, le blé, le sorgho et le mil **(Castegnaro *et al.,* 2002)**.

Seule une vingtaine de mycotoxines possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes **(Saine, 2001 ; Adebanjo et Bankole, 2003)**. Parmi les groupes de mycotoxines considérés comme importants du point de vue agro-alimentaire et sanitaire, on distingue les aflatoxines de type B1, B2, G1, G2, et M1 ; les ochratoxines dont l'ochratoxine A ; la patuline ; les fumonisines dont le fuminosine B1 ; la zéaralénone et les trichothécènes de type A et B **(Frémy, 2009)**.

Certaines de ces mycotoxines possèdent des effets à court terme ainsi que des effets chroniques à long terme chez l'homme et peuvent être ingérées, inhalées ou absorbées par voie cutanée **(Moll, 1995 ; FAO, 1999)**.

On rencontrera des effets immunotoxiques causés par la patuline et la fumonisine; des effets hépatotoxiques causés par les aflatoxines de type B1 et M1 et la fumonisine B1 ; des effets cancérogènes dus aux aflatoxines, à l'ochratoxine A et à la fumonisine B1 et des effets

néphrotoxiques dus à l'ochratoxine A **(Saine, 2001)**. Il a été également mentionné des effets neurotoxiques causés par la patuline et la fumonisine B1 ; des effets immunosuppresseurs dus aux trichothécènes des groupes A et B, à la fumonisine B1 et à la patuline et enfin les effets œstrogéniques et tératogènes causés par la zéaralénone **(Saine, 2001)**.

Du fait de leur forte présence et de leur concentration élevée dans les aliments, les mycotoxines sont considérées comme des substances dangereuses et potentiellement cancérogènes pour l'homme. C'est pourquoi, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) *ou International Agency for Research on Cancer (IARC)* a évalué la cancérogénicité des mycotoxines et a fait leur classement suivant le préambule des monographies IARC établi en 1993 comme indiqué dans le **tableau I**.

Tableau I : Classification des mycotoxines cancérogènes par l'IARC (IARC, 1993).

Groupes de classification de la cancérogénicité des mycotoxines	**Types de mycotoxines**	**Caractéristique de groupe des substances cancérogènes**
Groupe 1	Aflatoxine B1	L'agent (ou le mélange) est fortement cancérogène pour l'homme
Groupe 2A	–	L'agent (ou le mélange) est probablement cancérogène pour l'homme
Groupe 2B	Aflatoxine M1, Ochratoxine A et Fumonisine B1	L'agent (ou le mélange) est peut être cancérogène pour l'homme
Groupe 3	Aflatoxine G1, Patuline, Zéaralénone	L'agent (le mélange, les circonstances d'exposition) ne peut être classé quant à sa cancérogénicité pour l'homme
Groupe 4	–	L'agent (le mélange) n'est probablement pas cancérogène pour l'homme

Les mycotoxines produites par les moisissures appartenant notamment aux genres *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* et *Fusarium spp.* sont présentées dans le **tableau II**.

Tableau II : Mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine (Frémy *et al.*, 2009).

Mycotoxines	Moisissures productrices
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	*Aspergillus flavus,* *A. parasiticus, A. nomis*
Ochratoxine A	*Penicillium verrucosum,* *Aspergillus ochraceus,* *Aspergillus carbonarius*
Patuline	*Penicillium expansum,* *Aspergillus clavatus,* *Byssochlamys nivea*
Fumonisines B1, B2, B3	*Fusarium verticillioides,* *F. proliferatum*
Trichothécènes (groupe A et B)	*Fusarium langsethiae,* *F. sporotrichioides, F. poae,* *F. graminearum, F. culmorum,* *F. crookwellense,* *F.tricinctum, F. acuminatum*
Zéaralénone	*Fusarium graminearum,* *F. culmorum,* *F. crookwellense*

I.1.2- Analyse des mycotoxines dans les aliments

I.1.2.1- L'échantillonnage

Le but de cette opération est de produire un échantillon représentatif d'un lot de matière en vue de le soumettre au laboratoire pour subir l'analyse. La procédure d'échantillonnage est ainsi primordiale dans l'évaluation de la qualité sanitaire d'un lot dont les conséquences sont à la fois commerciales (déclassement du produit) et sanitaires (mise sur le marché d'un produit présentant un risque pour le consommateur).

Un nombre suffisant d'échantillons élémentaires est vital pour obtenir un échantillon représentatif. L'importance du nombre d'échantillons élémentaires détermine la représentativité et par voie de conséquence, un résultat lors de l'analyse quantitative se rapprochant le plus de la réalité **(Gardner *et al.*, 1968)**.

I.1.2.2- Les méthodes analytiques de dosage

Pour l'analyse des mycotoxines, habituellement présentent à l'état de traces, il existe une panoplie de méthodes analytiques basées, essentiellement, sur la séparation chromatographique des molécules puis leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Pour quantifier les mycotoxines présentes dans les aliments, elles sont d'abord extraites puis purifiées avant d'être détectées **(Gauthier, 1986)**.

Certaines méthodes de détection comme la chromatographie sur couche mince (CCM) et les méthodes immunochimiques à l'instar de l'« *Enzyme-Liked ImmunoSorbent Assay* » (ELISA) permettent une détection qualitative et semi-quantitative. Elles ont l'avantage d'être rapides et permettent de traiter plusieurs échantillons en parallèle. Les techniques immunochimiques reposent sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la mycotoxine recherchée. Ces méthodes peuvent créer des faux positifs qui entraînent une surestimation des résultats. Les limites de détection sont en général de moins de 1ppb **(Garnier, 1975)**.

Les méthodes de référence, à savoir la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les composés volatils et la chromatographie liquide haute performance (CLHP), permettent de quantifier de façon précise les mycotoxines. La CPG est réservée à l'étude de mycotoxines qui peuvent être volatilisées par dérivation comme les trichothécènes **(Langseth et Rundberger, 1998).**

La CLHP est la méthode la plus utilisée. Grâce au couplage avec la fluorimétrie, elle peut atteindre des limites de détection très faibles (de l'ordre de 10 ng/kg). Lorsqu'elle est combinée à une étape préalable de purification par chromatographie d'immunoaffinité, cette méthode est validée au niveau international et fait l'objet de normes. La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS) est de plus en plus utilisée pour identifier les mycotoxines ou métabolites associés **(Monbaliu *et al.*, 2009)** car elle permet une détection simultanée de plusieurs mycotoxines. La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC/MS) peut elle aussi être utilisée pour détecter plusieurs mycotoxines simultanément **(Tanaka *et al.*, 2000)**.

- **Les méthodes immunologiques**

Les méthodes immunologiques s'appuient sur la reconnaissance plus ou moins spécifique de l'analyte à doser (ici l'antigène Ag) par un anticorps produit et caractérisé pour interagir avec ce dernier. Ce principe est utilisé à la fois pour purifier les analytes cibles (colonnes d'immunoaffinité) mais également pour doser rapidement les mycotoxines **(Sharman et Gilbert, 1991)**.

- **Les méthodes physico-chimiques**

Ces méthodes, à la fois utilisées à des finalités séparatives (extraction et purification de l'échantillon) ou analytiques (identification et dosage des analytes), s'appuient sur les caractéristiques structurales de la molécule, à savoir sa polarité, sa taille ou sa capacité à absorber dans l'UV ou à produire des signaux spectrométriques caractéristiques **(Garnier, 1975)**.

I.2- Généralités sur les aflatoxines

I.2.1- Définition

Les aflatoxines sont définies comme étant des métabolites secondaires produits par les moisissures appartenant au genre *Aspergillus spp.* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*), qui sont des champignons pouvant se développer et produire les aflatoxines plus facilement dans des pays tropicaux à climats chauds et humides **(Kurtzman *et al.*, 1987)**.

Les principales molécules d'aflatoxine sont : l'aflatoxine B1, l'aflatoxine B2, l'aflatoxine G1 et l'aflatoxine G2 qui sont de formules chimiques voisines **(Asao *et al.*, 1963)**.

Depuis leur découverte en 1961, les aflatoxines ont été recherchées dans de nombreuses denrées alimentaires d'origine végétale et animale.

Comme denrées alimentaires d'origine végétale, citons les cacahuètes et autres graines oléagineuses, y compris les graines de cotonnier et de maïs, les productions de coprah et de noix de coco, les noisettes et les pistaches **(OMS, 1980)**.

Concernant les produits d'origine animale, des enquêtes menées dans plusieurs pays ont montré que l'aflatoxine M1 (métabolite de l'aflatoxine B1) peut contaminer le lait liquide ou en poudre et les produits laitiers **(Dabbre, 1987)**. De même des résidus d'aflatoxine ont été détectés dans les tissus animaux, des œufs et de la volaille après alimentation expérimentale des animaux avec des produits contaminés d'aflatoxine **(Sanders *et al.,* 1967)**.

I.2.2- Structures et propriétés physico-chimiques

La première purification d'aflatoxine pure a été obtenue en 1961 par Sargeant. Au cours de la même période, Asao et ses collaborateurs établirent la structure chimique des aflatoxines B1 et G1 puis celle de leurs dérivés hydrogénés B2 et G2.

I.2.2.1- Structure chimique

Parmi les nombreux composés isolés, tous dénommés aflatoxine, seules quatre toxiques ont été trouvés comme contaminants naturels : les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 **(Figure 1)**. Ces quatre molécules sont des métabolites de la bis-furanocoumarine et se distinguent les uns des autres par leur fluorescence et leur mobilité chromatographique **(Drorecjova, 1977)**. Les composés B sont bleus et les G sont verts (green). Les indices 1 et 2 sont associés leur mobilité chromatographique relative.

AF= aflatoxine

Figure 1 : Structure chimique des aflatoxines B, G et M1

I.2.2.2- Propriétés physico-chimiques

Les aflatoxines se présentent sous forme de poudre cristalline jaune paille ou incolore si la purification est suffisante **(Monjour, 1968)**. Elles sont solubles dans les solvants organiques tels que le chloroforme, le méthanol, l'acétone, le benzène et le propylène glycol **(Gauthier, 1986)**. Cette solubilité permet leur isolement en vue d'un dosage. Elles sont peu solubles dans les monoglycérides, les triglycérides, le savon ainsi que l'eau. Elles sont insolubles dans certains solvants des lipides tels que : l'hexane, l'éther de pétrole et l'éther éthylique **(FAO, 1992)**. A l'état pur sous forme cristallisée, l'aflatoxine est un produit particulièrement stable.

Les aflatoxines sont résistantes jusqu'à 250°C et ne sont, de ce fait, pas détruites dans les conditions usuelles de cuisson ou de chauffage en vue d'une pasteurisation **(Northdt *et al.*, 1976)**. Cependant, la torréfaction des cacahuètes abaisse sensiblement les teneurs en aflatoxines, ces molécules sont même susceptibles d'être totalement détruites par un traitement énergique : passage à l'autoclave en présence de l'ammoniaque ou traitement à l'hypochlorite par exemple **(Kurata *et al.*, 1984)**.

Quelques propriétés physico-chimiques des aflatoxines énoncées ci-avant sont présentées dans le **tableau III**.

Tableau III : Propriétés physico-chimiques des aflatoxines (Castegnero et *al*., 2002)

Aflatoxines	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Longueurs d'onde maximales d'absorption λ_{max} (nm)
B1	$C_{17}H_{12}O_6$	312,3	268-269	223 265 362
B2	$C_{17}H_{14}O_6$	314,3	287-289	222 265 363
G1	$C_{17}H_{12}O_7$	328,3	244-246	243 257 264 362
G2	$C_{17}H_{14}O_7$	330,3	237-239	241 265 363
M1	$C_{17}H_{12}O_7$	328,3	–	–

I.2.3- Ecotoxicogenèse

On distingue plusieurs conditions favorables au développement de la moisissure du genre *Aspergillus spp.* et à la production des aflatoxines que sont **(Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002)** :

- **La température :** les températures minimales, optimales et maximales pour la prolifération d'aflatoxines sont respectivement de 12°, 26° et 40-42°C.
- **La teneur en O_2 et CO_2 et le pH du substrat :** la plupart des moisissures sont aérobies et nécessitent une bonne oxygénation et un taux de CO_2 inférieur ou égal à 10%. La tolérance au pH est assez grande (2 à 7,5).
- **L'activité de l'eau :** la valeur minimale nécessaire au développement d'*Aspergillus flavus* est de 0,80 tandis que le minimum pour la production de toxine est de 0,84.
- **La nature du substrat :** la production des aflatoxines par *Aspergillus flavus* est très minime si le substrat est d'origine animale alors qu'elle est optimale si elle se développe sur des céréales (riz) ou mieux encore sur l'arachide.

I.2.4- Devenir de l'aflatoxine B1 dans l'organisme

I.2.4.1- Chez l'homme

Une fois dans l'organisme, l'aflatoxine B1 (AFB1) subit plusieurs réactions d'élimination à plusieurs niveaux **(Figure 2)**. Ainsi, dans la cellule hépatique, l'aflatoxine est métabolisée par un arsenal enzymatique qui facilite son élimination par augmentation de ses propriétés hydrophiles.

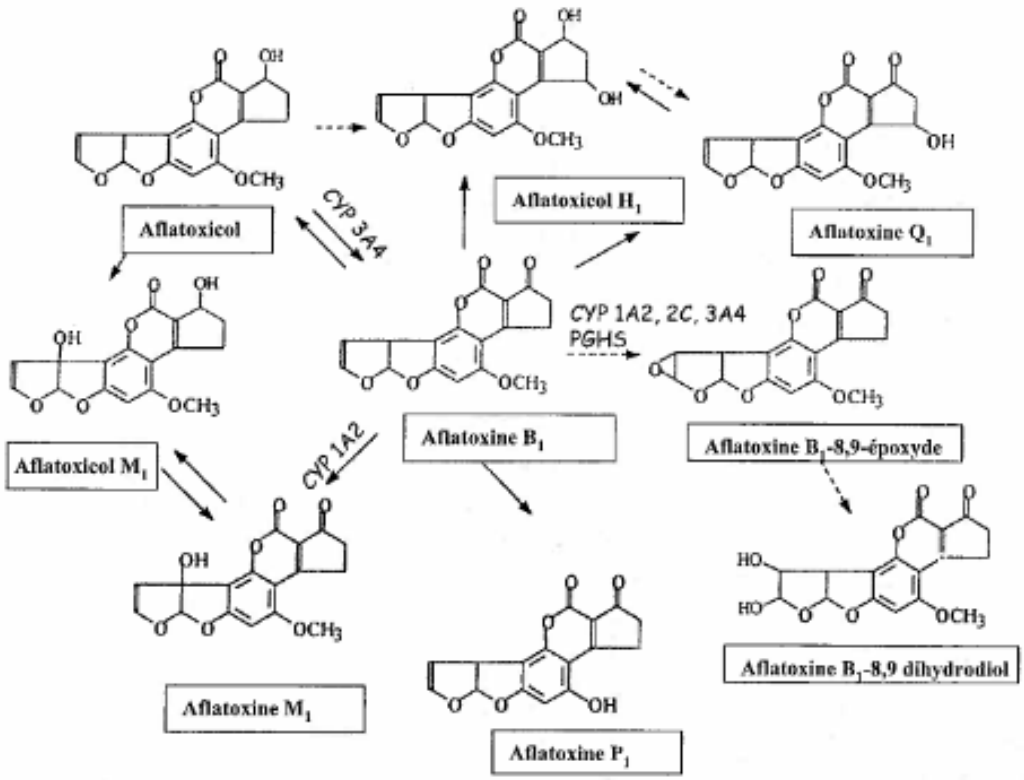

Figure 2 : Métabolisme de l'aflatoxine B1

Il existe deux méthodes de biotransformation de l'AFB1. Le processus d'hydroxylation constitue la voie principale qui conduit à la formation du dérivé hydroxylé de l'aflatoxine B1 qui est l'AFM1. Alors que par oxydoréduction, il y a formation de l'aflatoxicol qui est moins toxique et de pouvoir mutagène faible. D'autres aflatoxines peuvent être formées à partir de B1, il s'agit notamment des aflatoxines B2a, H1, P1 et Q1 **(Fremy, 1982)**.

Les aflatoxines ingérées sont rapidement absorbées par le tractus gastro-intestinal où elles vont commencer à être métabolisées ou détoxifiées au début dans les cellules mucosales.

L'AFB1 subit une bioconversion spécifique donnant formation à un métabolite majeur résultant d'une époxidation par le cytochrome P450-dépendant : l'AFB1-8,9-époxyde. Ce produit peut interagir avec l'ADN formant des adduits (AFB-N7-guanine) présumés impliqués dans l'activité carcinogène des aflatoxines **(Fink-Gremmels, 1998)**.

La fixation de cet époxyde sur les protéines joue probablement un rôle important dans la toxicité des aflatoxines. Le complexe « aflatoxine-époxyde » formé peut réagir spontanément avec le glutathion par une glutathion-S-transférase (GST). Cette conjugaison est généralement considérée comme une importante voie de détoxification à côté des autres mécanismes donnant naissance notamment à l'aflatoxicol et aux aflatoxines M1, P1 et Q1. L'élimination des aflatoxines de l'organisme inclut l'excrétion urinaire (AFM1, AFP1, AFQ1, AFB1-N7-guanine), l'excrétion biliaire (AFB1-glutathion) et l'excrétion laitière sous forme d'AFM1 chez les femelles des mammifères. Cette dernière constitue la principale voie d'exposition des nourrissons **(Richard, 1998)**.

I.2.4.2- Chez les volailles

Le métabolisme et surtout la bio-activation hépatique de l'AFB1 en AFB1-8,9-époxyde et en aflatoxicol joueraient un rôle déterminant dans l'apparition ultérieure de lésions hépatiques. Une forte bio-activation pourrait expliquer la plus grande sensibilité des canards aux aflatoxines alors que les cailles seraient plus résistantes en raison de faibles capacités métaboliques. Les voies métaboliques de phase II se déroulent de manière similaire à ce qui est décrit chez les mammifères : conjugaison de l'époxyde au glutathion et conjugaison à l'acide glucuronique des métabolites hydroxylés. Si la répartition entre espèces aviaires des enzymes de phase II est moins étudiée que celle de phase I, il semble que le niveau d'expression des GST soit déterminant pour expliquer les différences de sensibilités à l'AFB1 entre les espèces d'oiseaux **(Klein *et al.*, 2002)**.

I.2.5- Toxicité

I.2.5.1- Mécanismes d'action toxique et effets biochimiques de l'aflatoxine B1

La toxicité de l'AFB1 est liée aux effets biochimiques résultant de l'interaction de son dérivé époxyde et des cellules hépatiques. Les différentes perturbations métaboliques observées sont :

- L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines **(Wray, 1982)** ;

- La dégranulation précoce du réticulum endoplasmique de celui de l'hépatocyte ;
- La disparition du contrôle en retour de la synthèse de cholestérol considérée comme une caractéristique de l'état précancéreux ;
- L'augmentation de perméabilité cellulaire et l'interruption du transfert d'électrons au niveau des mitochondries, responsables de la forte baisse de la respiration cellulaire ;
- La perméabilité accrue des membranes lysosomiales conduisant à la fuite des hydrolases acides non liés **(Patterson, 1973)**.

I.2.5.2- Toxicité aiguë

Les études de toxicité aiguë montrent une grande variabilité d'une espèce animale à une autre. Ainsi la DL_{50} varie de 0,3 mg/kg de poids corporel (p.c.) pour le caneton à 9 mg/kg p.c. pour la souris. L'AFB1 est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité aiguë entraîne généralement la mort des animaux, qui présentent un foie décoloré et augmenté de volume et un ictère avec présence d'ascite. Lorsque l'animal ne meurt pas, il y a prolifération de cellules indifférenciées, au niveau des canalicules biliaires. Les reins présentent des glomérulonéphrites et les poumons sont congestionnés. Les signes comportementaux les plus caractéristiques précédant la mort sont une démarche chancelante, de la nervosité et des spasmes musculaires **(Wray, 1982)**.

I.2.5.3- Toxicité chronique

La toxicité chronique des aflatoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles. Ce type de toxicité peut apparaitre aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

- **Cancérogénicité**

Des études épidémiologiques menées dans le sud-est asiatique et en Afrique ont démontré que les cancers hépatiques sont beaucoup plus fréquents chez certains groupes de population humaine dont le régime alimentaire est élevé en aflatoxines **(Kurata *et al.*, 1984)**.

- **Mutagénicité**

Chez la cellule humaine, l'AFB1 n'est pas réactive ou mutagène par elle-même, mais elle peut être activée en époxyde très électrophile qui peut former des adduits à l'ADN. Ces adduits génèrent une mutation qui se situe sur le codon 249 et qui pourra être le point de départ d'un processus de cancérogenèse hépatique. Des résultats *in vivo* ont montré que l'AFB1 provoque très fréquemment cette mutation.

- **Tératogénicité**

D'après les expériences faites sur certaines espèces animales, l'aflatoxine B1 montre un effet tératogène se traduisant par les résorptions, les malformations fœtales avec un retard du développement embryonnaire. De plus, on observe chez les femelles gestantes des nécroses hépatiques et rénales.

- **Reprotoxicité**

Chez les rats femelles exposés quotidiennement aux aflatoxines, des effets nuisibles sur les gonades et une baisse rapide de la fertilité avec décès intra utérin et réduction de la taille des ovaires et de l'utérus ont été observés.

- **Immunosuppression**

L'AFB1 a un effet immunosuppresseur. Cela semble dû à l'altération de la synthèse d'acides nucléiques et de protéines, accompagnée d'une diminution de la prolifération, de la maturation et de la production de cytokines : la réactivation d'infections parasitaires et la diminution de l'efficacité vaccinale ont été mises en évidence expérimentalement chez le lapin, la souris et le porc **(AFSSA, 2006)**.

I.1.5.4- Effets chez l'homme

Deux syndromes humains d'intoxication aiguë mais d'étiologies indéfinies ont été reliés à l'ingestion d'aliments contaminés par les aflatoxines : le kwashiorkor et le syndrome de Reye. Le kwashiorkor associe hypo-albuminémie et immunosuppression. Le syndrome de Reye associe encéphalopathie et dégénérescence graisseuse des viscères.

Ces deux syndromes ont été associés à l'aflatoxine car aucune autre cause n'a pu être identifiée et parce que cette mycotoxine a été trouvée chez les patients. Néanmoins, ces cas ayant été observés chez des populations en malnutrition, le métabolisme de l'aflatoxine peut être modifié du fait de cet état.

La dernière intoxication aiguë reconnue s'est déroulée d'avril à septembre 2004 dans les provinces du centre et de l'est du Kenya durant laquelle 341 cas ont été diagnostiqués et ont été responsables de 123 décès.

La plupart des études épidémiologiques tendent à montrer qu'il existe une corrélation entre une exposition chronique à l'aflatoxine *via* le régime alimentaire et une prévalence du

cancer primitif du foie. Néanmoins, cette relation est modulée par d'autres facteurs qui influencent ce risque de cancer comme l'infection virale à l'hépatite B (HBV). La majorité des études épidémiologiques étayant la relation aflatoxine - cancer du foie provient de régions du globe (Asie du Sud-Est, Chine, Afrique Occidentale et Equatoriale) où la prévalence de l'HBV et de l'AFB1 est élevée. En Amérique Latine, la prévalence du cancer primitif du foie et de l'infection à l'HBV est faible alors que l'exposition à l'AFB1 est élevée. La conduite de nouvelles études épidémiologiques dans les régions dites à risque a été recommandée par le JECFA (*Joint Expert Committee For Food Additives*) en intégrant pour certains pays des campagnes de vaccination anti-HBV. Lorsque ces études auront été réalisées, une réévaluation des risques pour l'homme des aflatoxines pourra être réalisée **(Patterson, 1973)**.

I.1.5.5- Impacts de l'aflatoxine B1 en élevage aviaire

L'AFB1 a de nombreux effets sur la santé de la volaille ainsi que sur les performances zootechniques des animaux. En fonction de la dose absorbée et de la durée d'exposition, l'impact diffère.

I.1.5.5.1- Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë résulte de l'ingestion en une seule ou plusieurs fois rapprochées d'une dose assez importante d'aflatoxines et se traduit par la mort des animaux dans des délais variant selon la sensibilité spécifique.

L'intoxication aiguë par l'AFB1 se manifeste par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids, un ictère, une ascite et enfin la mort du sujet atteint.

Sur le plan histologique, on retrouve un foie décoloré, hypertrophié avec prolifération des canaux biliaires, des lésions de nécrose, d'infiltration graisseuse, des hémorragies hépatiques, pulmonaires, rénales et des glandes surrénales, une congestion des poumons, des lésions rénales compatibles avec une néphrite glomérulaire **(Moreau, 1994).**

I.1.5.5.2- Toxicité chronique

L'aflatoxicose chronique est la manifestation la plus fréquente ; elle apparait suite à une ingestion d'aliments contaminés pendant plusieurs semaines. Elle se caractérise par une baisse du gain moyen quotidien (GMQ), une chute de ponte associée à des lésions telles que des hémorragies et une carcasse décolorée à l'autopsie **(AFSSA, 2006)**.

En outre, les aflatoxines ont des effets immunotoxiques chez les volailles. En effet, pour des doses relativement importantes en aflatoxine (0,3-6 mg/kg de poids corporel), il apparaît une dépression de la réponse immunitaire. Il y a une baisse desimmunoglobulines (Ig) G et A, alors que les Ig M ne sont pas affectées **(Pier, 1986)**.

Chez le poussin, l'ingestion d'aliments contaminés par 2,5 ppm d'AFB1 pendant 3 semaines, provoque un ictère, un retard de croissance et des troubles de la coagulation sanguine **(Chattopadhyay *et al.*, 1985)**.

Tung et Hamilton (1971) ont observé chez le poussin des nécroses avec une accumulation de lipides dans le foie et une hyperplasie des canalicules biliaires ainsi qu'une dépigmentation.

I.2.6- Réglementation

La réglementation concernant les quantités maximales admissibles en aflatoxines varient d'un pays à un autre, d'un produit alimentaire à l'autre et d'une aflatoxine à une autre. Au Sénégal, il n'existe toujours pas de normes concernant les limites des aflatoxines dans les aliments.

Néanmoins, le règlement 1881/2006/CE fixant des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et la directive 2006/576/CE sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux fixent des teneurs maximales pour les aflatoxines en alimentation humaine et en alimentation animale. Les valeurs concernant l'alimentation animale sont présentées dans le **tableau IV** suivant :

Tableau IV : Teneurs maximales en aflatoxine B1 en alimentation animale selon le règlement 2006/576/CE

Types d'aliments	Teneur maximale (µg/kg)
Toutes les matières premières des aliments pour animaux	20
Aliments complets pour bovins, ovins et caprins	20
Aliments complets pour bétail laitier	5
Aliments complets pour veaux et agneaux	10
Aliments complets pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complets	10
Aliments complémentaires pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments complémentaires pour bétails laitiers, veaux et agneaux)	20
Aliments complémentaires pour porcs et volailles (à l'exception de jeunes animaux)	20
Autres aliments complémentaires	5

I.3- Généralités sur les aliments pour volaille

I.3.1-Problématique

L'aliment pour volaille communément appelé « provende » est l'intrant le plus important en aviculture en termes de coûts.

La disponibilité, la qualité et le prix de la provende sont des considérations incontournables dans le développement de l'industrie avicole.

La provende pour la volaille est formulée à partir d'ingrédients comprenant des céréales, des sous-produits céréaliers, des graisses, des protéines végétales, des sous-produits d'origine animale, des suppléments vitaminiques et minéraux, des acides aminés cristallins et des additifs alimentaires.

La contamination biologique et chimique des aliments pour la volaille peut avoir des conséquences graves sur les performances de la volaille et la sécurité des produits avicoles pour l'homme. Cela constitue un problème important, notamment dans les pays en

développement. Parmi les contaminants potentiels, les mycotoxines sont les plus répandues, en particulier dans des conditions chaudes et humides, et l'élimination des mycotoxines doit être inclue dans les stratégies d'alimentation de la volaille **(AFSSA, 2006).**

I.3.2- Composition des aliments pour volaille

Il est important de préciser, avant tout, que la plupart des produits entrant dans la fabrication des aliments de la volaille sont aussi directement consommables par l'homme.

I.3.2.1- Matières premières d'origine végétale

Ce sont essentiellement les céréales avec le maïs blanc, cultivé dans le Sud du pays et dans la région du Fleuve, ainsi que le mil et le sorgho cultivés partout au Sénégal.

Les disponibilités en ces céréales, quand elles existent, surviennent juste après la récolte.

Il s'agit de:

- **Tourteau d'arachide :** sous-produit issu du traitement industriel ou artisanal de l'arachide ;
- **Tourteau de coton :** résidu de la graine de coton après traitement industriel. Il est très mal connu des aviculteurs mais aussi très peu utilisé dans l'alimentation animale en général ;
- **Tourteau de Beref (melon sénégalais) :** il est produit en grande quantité au Sénégal où sa culture est très prisée ;
- **Drêches de brasseries :** issues du traitement de l'orge importée par les brasseries du pays, elles représentent également un sous-produit disponible localement ;
- **Sous-produits de rizières :** avec la farine de cône à blanchir et les fines brisures de riz ;
- **Son fin de blé :** tout comme l'orge, le blé est importé par les meuneries locales et ce sont les résidus de son traitement industriel qui sont réservés à l'alimentation animale ;
- **Son de mil :** c'est le résidu du mil après traitement artisanal en vue de sa consommation par les populations **(Diom, 1978)**.

Parmi les céréales importées, nous avons :

- **Le maïs jaune** dont une partie est réservée à l'alimentation humaine et l'autre à l'alimentation animale. Il semble que les industriels préfèrent ce maïs jaune au maïs blanc produit localement ;
- **Le sorgho** est également importé mais dans de faibles proportions ;
- **Le soja** dont l'importation est surtout accrue lors des années pluvieuses lorsque le tourteau d'arachide devient difficilement conservable avec notamment de hauts risques de contamination par *Aspergillus flavus* **(Diom, 1978)**.

I.3.2.2- Les matières premières d'origine animale

Nous retrouvons :

- **La farine de poisson:** le Sénégal, pays ouvert sur la mer, en produit des quantités considérables ;
- **La farine de viande et de sang**.

I.3.2.3- Les produits riches en matières minérales

Ces produits comprennent :

- **La poudre d'os et de viande osseuse** ;
- **La poudre de coquillages** (exemple des coquilles d'huitres pilées) ;
- **La farine d'os calcinés**, sources de supplémentation minérale importantes ;
- **Le sel marin** produit artisanalement en grande quantité.

Afin d'établir des rations parfaitement équilibrées, il est nécessaire de recourir à l'importation.

Le phosphate bicalcique : dont l'importation est apparue nécessaire devant la teneur élevée en fluor des phosphates tricalciques de Thiès et de Taïba.

I.3.2.4- Les additifs alimentaires

Ce sont les antioxydants, les antibiotiques et les vitamines qui sont importées par l'industrie de l'alimentation animale à l'état pur, sous forme de concentrés ou de pré mélangés.

Que ce soit par l'intermédiaire du secteur traditionnel ou du secteur moderne, l'aviculture sénégalaise met sur le marché un certain nombre de produits (œufs, poulets de chair, poules de réforme, ...) qui seront consommés en totalité par la population locale **(Diom, 1978)**.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

CHAPITRE II: TRAVAIL EXPERIMENTAL

II.1- Objectifs

II.1.1- Objectif général

L'objectif général de notre étude est de contribuer à la sécurité sanitaire des aliments par la détermination du niveau de contamination en aflatoxine B1 des aliments pour volailles couramment distribués à Dakar et environs (site de Gorom et Sangalkam).

II.1.2- Objectifs spécifiques

Spécifiquement, il s'agira de :

- Déterminer la teneur en aflatoxine B1 dans les aliments pour volaille par chromatographie liquide haute performance ;
- Déterminer la teneur en aflatoxine B1 dans les aliments pour volaille par chromatographie sur couche mince ;
- Comparer les résultats de ces deux méthodes chromatographiques.

II.2- Cadre de l'étude : l'I.T.A.

L'Institut de Technologie Alimentaire (I.T.A.) est un Établissement Public œuvrant dans le secteur de la Recherche-Développement en alimentation et nutrition.

II a été créé par la loi 63-11 du 5 février 1963 et n'a connu un véritable essor qu'à partir de 1968, avec l'assistance de la FAO (*Food and Agriculture Organization*). Cet organisme a fourni entre 1968 et 1974 des infrastructures (laboratoires et ateliers pilotes), des équipements et les experts nécessaires à la mise en route des programmes de recherche.

Depuis 1998, l'Institut jouit d'un statut d'Établissement Public à caractère scientifique et technologique. Il est actuellement placé sous la tutelle du Ministère du Commerce, de l'Industrie et du Secteur informel.

II.2.1- Statuts et missions

Ses principales missions sont :

- Générer une valeur ajoutée aux produits alimentaires locaux à travers leur transformation et l'assurance qualité pour atteindre la sécurité alimentaire et augmenter les exportations ;

- Développer des programmes destinés aux communautés locales, aux populations, en particulier en augmentant les transferts des résultats de recherche en produisant des supports techniques pour faciliter l'industrialisation ;
- Assurer la sécurité alimentaire, l'assurance et le contrôle de qualité des produits agroalimentaires ;
- Améliorer l'état nutritionnel des populations ;
- Assurer une formation aux professionnels, aux agents des corps de métiers, entre autres :

  ✓ Guider et coordonner les recherches et les études concernant le traitement, la transformation, le conditionnement, la conservation et l'utilisation des produits alimentaires locaux, principalement dans le but de promouvoir l'implantation d'industries correspondantes ;

  ✓ Développer de nouvelles ressources alimentaires dérivées des productions locales qui soient d'une bonne valeur nutritive et adaptées au goût ainsi qu'au pouvoir d'achat des consommateurs ;

  ✓ Aider au contrôle de la qualité des produits alimentaires aux stades de la production, de la commercialisation, de l'importation et de l'exportation ;

  ✓ Participer à la formation des Corps de Métiers de l'Alimentation.

Le Laboratoire de Mycotoxines où nous avons effectué notre stage est un laboratoire de référence pour le dosage des aflatoxines.

II.2.2- Laboratoire de Mycotoxines

Le Laboratoire est spécialisé dans l'analyse des aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) dans les produits arachidiers, le maïs, les aliments de bétail et de volaille et celle de l'aflatoxine M1 dans le lait. Sur demande et pour des besoins de recherche, il dose également d'autres mycotoxines, comme la fumonisine B1 dans le maïs, l'ochratoxine A dans le café et la zéaralénone dans les céréales.

Au niveau du secteur de la pêche, le laboratoire réalise des analyses de la teneur en histamine pour plusieurs sociétés soit pour l'autocontrôle, soit pour vérifier la conformité de leurs produits aux exigences normatives des pays importateurs.

II.3- Matériel et méthodes

Dans le cadre de cette étude, les aliments utilisés au cours de l'élevage des volailles ont été collectés dans les marchés de Dakar et dans les fermes avicoles la zone périurbaine de Dakar (Gorom et Sangalkam).

II.3.1- Echantillons de l'étude

L'étude porte sur trois (3) localités contenant chacun cinq (5) échantillons d'aliments administrés aux volailles à différents stades de leur élevage.

Tableau V : Présentation des échantillons étudiés

Numéro	Type d'aliment	Lieu de prélèvement	
1	Finition	Gorom	Gorom
2	Démarrage		Gorom 3
3	Ponte		Gorom 3
4	Croissance		Gorom 1
5	Poulette		Gorom 1
6	Poulette	Sangalkam	Sangalkam
7	Croissance		Sangalkam
8	Finition		Sangalkam
9	Ponte		Sangalkam
10	Démarrage		Sangalkam
11	Démarrage	Dakar	Marché Fass
12	Ponte		Marché Castors
13	Poulette		Marché Grand Yoff
14	Finition		Marché Tilène
15	Croissance		Marché Castors

II.3.2- Equipements, matériels et consommables de laboratoire

Nous avons eu à utiliser le matériel et les produits de laboratoire suivants :

- **Matériel de laboratoire**
- Agitateur Vortex
- Appareillage pour CLHP
- Balance de précision
- Cartouche de type Florisil® Sep-Pak n°51960, de Waters
- Cartouche de type C18 Sep-Pak n°51910, de Waters
- Lampe à UV
- Cuve chromatographique
- Eprouvettes de 100 ml ; 500 ml
- Evaporateur rotatif
- Fioles de 100 ml ; 250 ml
- Flacons
- Micropipettes
- Moulin
- Papier filtre Whatman n°18
- Pipettes de 5 ml ; 10 ml
- Plaque chromatographique en verre
- Seringues 5 µl ; 10 µl
- **Réactifs**
- Acétone
- Acétonitrile
- Célite® 545
- Chloroforme stabilisé à l'éthanol
- Eau distillée
- Méthanol CLHP
- Acide sulfurique concentré
- Bromure de potassium
- Acide nitrique

- Gaz inerte (azote)

II.3.3- Méthodes

II.3.3.1- Traitement des échantillons

Les échantillons ainsi collectés sont conditionnés, étiquetés et acheminés au Laboratoire de mycotoxines. Ils sont broyés en poudre fine et sont à nouveau conditionnés et étiquetés en vue du dosage de l'aflatoxine **(Photo 1 et 2)**.

Photo 1 : Broyage au moulin

Photo 2 : Produits d'aliments broyés en sachet

Prise de vue par : Chatchueng, 2016.

II.3.4.1- Extraction de l'aflatoxine

Peser, à 0,1 g près, 50,0 g de l'échantillon dans une fiole. Ajouter successivement 25 g de célite, 250 ml de chloroforme et 25 ml d'eau distillée. Boucher la fiole, agiter en la tournant et décompresser (dégazage). Reboucher et agiter pendant 30 min à l'agitateur mécanique. Filtrer ensuite à l'aide du papier filtre Whatman.

II.3.4.2- Purification de l'AFB1 par la cartouche Florisil

- **Préparation de l'ensemble colonne-cartouche**

Fixer l'embase la plus courte d'une cartouche Florisil sur un robinet d'arrêt. Laver la cartouche et éliminer l'air en prenant 10 ml de chloroforme et en faisant passer rapidement 8 ml, à l'aide d'une seringue, à travers la cartouche par l'intermédiaire du robinet d'arrêt.

Fixer l'embase la plus longue de la cartouche sur une colonne en verre et faire passer les 2 ml de chloroforme restants dans la colonne, en traversant la cartouche. Fermer le robinet d'arrêt. Retirer la seringue.

- **Purification proprement dite**

Ajouter 10 ml du filtrat recueilli après extraction, à l'ensemble colonne-cartouche et vidanger par gravité. Eluer avec 5 ml de chloroforme puis avec 20 ml de méthanol. Éliminer les éluats. Durant ces opérations, veiller à ce que l'ensemble colonne-cartouche ne soit pas mis à sec. Éluer l'aflatoxine B1 avec 50 ml de mélange acétone-eau (98 : 2) et recueillir l'éluat dans le ballon à fond rond de l'évaporateur rotatif.

Photo 3 : Dispositif de purification par la cartouche Florisil

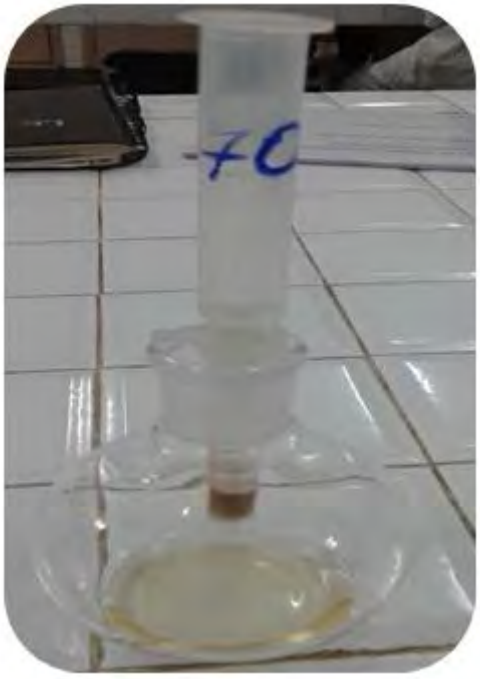

Photo 4 : Dispositif d'élution

Prise de vue par : Chatchueng, 2016.

II.3.4.3- Purification de l'AFB1 par la cartouche C18

- **Préparation de l'ensemble colonne-cartouche**

Fixer l'embase la plus courte d'une cartouche C18 sur un robinet d'arrêt. Amorcer la cartouche et éliminer l'air en faisant passer rapidement, à l'aide d'une seringue, 10 ml de méthanol à travers la cartouche par l'intermédiaire du robinet d'arrêt. Les bulles d'air dans la cartouche apparaissent sous la forme de points lumineux sur le fond grisâtre. Prendre 10 ml d'eau et en faire passer 8 ml à travers la cartouche. Éviter d'introduire de l'air dans la cartouche lors du passage du méthanol à l'eau.

Fixer l'embase la plus longue de la cartouche sur une colonne en verre et faire passer les 2 ml d'eau restants dans la colonne en traversant la cartouche. Fermer le robinet d'arrêt. Retirer la seringue.

- **Purification proprement dite**

Transvaser quantitativement l'extrait obtenu plus haut dans la colonne en verre, rincer le ballon qui contenait l'extrait deux fois avec 5 ml de mélange méthanol-eau (20 : 80) et vidanger par gravité.

Durant ces opérations, veiller à ce que l'ensemble colonne-cartouche ne soit pas mis à sec. Si des bulles d'air se développent dans l'étranglement voisin de la cartouche, arrêter l'écoulement et tapoter le sommet de la colonne en verre afin de supprimer les bulles d'air puis continuer.

Éluer l'aflatoxine B1 avec 2 ml de méthanol CLHP et recueillir l'éluat dans une fiole ambrée. La solution obtenue est évaporée sous azote.

Photo 5 : Dispositif de purification par la cartouche C18
Prise de vue par : Chatchueng, 2016.

II.3.4.5- Quantification par chromatographie liquide haute performance (ISO 14718 : 1998)

Les aflatoxines sont séparées par chromatographie liquide haute performance en phase inverse, en mode isocratique à température ambiante à l'aide d'une phase mobile adaptée

(H_2O-MeOH-acetonotrile (1300:700:400) contenant 286 mg de KBr et 152 µl de HNO_3 (Conc=4mol/l)). Le débit recommandé est de 1 ml par minute pour une colonne de longueur 25cm d'un diamètre interne de 4,6 cm et taille de particules de 5 µm. Les aflatoxines sont éluées dans un délai de 16 min. Le volume de l'extrait d'échantillon injecté V_{is} = 0,25 ml; le volume de filtrat utilisé pour la purification V_f = 50 ml ; le volume de solution d'étalonnage de référence injecté V_{ic} = 0,25 ml.

- **Injection des extraits de l'échantillon**

Injecter successivement la solution d'étalonnage de référence, l'extrait à blanc d'aliments, l'extrait à blanc d'aliments «dopé», la solution d'étalonnage de référence, l'extrait d'un matériau de référence certifié ou l'échantillon témoin, puis à nouveau la solution d'étalonnage de référence.

Injecter les extraits d'échantillon purifiés. Tous les deux extraits d'échantillons, renouveler l'injection de solution d'étalonnage de référence. Lorsque la série contient plus de 10 échantillons, il convient que les solutions d'étalonnage d'aflatoxine B_1 soient injectées en dernier.

- **Expression des résultats**

- **Calcul de la teneur en aflatoxine B1 de la solution étalon d'aflatoxine B_1**

Calculer la teneur en aflatoxine B_1 de la solution étalon d'aflatoxine B_1 à l'aide de l'équation suivante:

$$\rho = \frac{M * A}{d * k}$$

Où :

ρ est la teneur en aflatoxine B1 de la solution étalon d'aflatoxine B_1 en milligrammes par millilitre ;

M est la masse molaire de l'aflatoxine B_1 (M = 312 g/mol) ;

A est l'absorbance corrigée en fonction du blanc ;

d est le parcours optique de la cuve (d = 1 cm) ;

k est le coefficient d'absorption molaire de l'aflatoxine B_1 dans chloroforme à 363 nm (k = 22 300 $l \cdot mol^{-1}$ cm^{-1}).

- **Calcul de la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'étalonnage de référence injectée**

Calculer la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'étalonnage de référence injectée à l'aide de l'équation suivante :

$$m_c = f * \rho * V_{ic}$$

Où :

m_c est la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'étalonnage de référence injectée;

f est le facteur de correction de dilution et d'unités, en nanogrammes (f = 200 ng/mg) ;

ρ est la teneur en aflatoxine B_1 de la solution étalon d'aflatoxine B_1, calculée ci-avant en milligrammes par millilitre ;

V_{ic} est le volume de solution d'étalonnage de référence injecté (V_{ic} = 0,25 ml).

- **Calcul de la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'essai**

Calculer la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'essai à l'aide de l'équation suivante :

$$m_a = \frac{A_S * 2m_c}{A_{c1} + A_{c2}}$$

Où :
m_a est la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'essai;

A_s est l'aire de pic correspondant à l'aflatoxine B_1 dans la solution d'essai surface ;

m_c est la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'étalonnage de référence injectée, calculée en ci-avant, en nanogrammes ;

A_{c1} est l'aire de pic correspondant à l'aflatoxine B_1 résultant de l'injection précédente de solution d'étalonnage de référence en unités de surface ;

A_{c2} est l'aire de pic correspondant à l'aflatoxine B_1 résultant de l'injection suivante de solution d'étalonnage de référence en unités de surface.

- **Calcul de la teneur en aflatoxine B_1 de l'échantillon**

Calculer la teneur en aflatoxine B_1 de l'échantillon à l'aide de l'équation suivante :

$$w_a = \frac{m_a * V_s * V_c}{m_s * V_{is} * V_f}$$

Où :

w_a est la teneur en aflatoxine B_1 de l'échantillon pour essai, en microgrammes par kilogramme ou ppb ;

m_a est la masse d'aflatoxine B_1 dans la solution d'essai, en nanogrammes ;

V_s est le volume de l'extrait d'échantillon non dilué, et utilisé dans la procédure suivante, en millilitres (Vs = 50 ml s'il n'est pas nécessaire de diluer le filtrat) ;

m_s est la masse de l'échantillon pour essai, en grammes (m_s = 50,0 g) ;

V_{is} est le volume de l'extrait d'échantillon injecté, en millilitres (V_{is} = 0,25 ml) ;

V_f est le volume de filtrat utilisé pour la purification, en millilitres (V_f = 50 ml) ;

V_c est le volume de chloroforme utilisé pour l'extraction de l'échantillon, en millilitres (V_c = 250 ml).

II.3.4.4- Quantification par chromatographie sur couche mince (AOAC 968.22 : 2000)

Il faut préparer la phase mobile qui sera constituée de 5 ml d'acétone et 45 ml de chloroforme et reprendre le résidu sec obtenu après purification sur la cartouche C18 avec 100 µl de chloroforme.

Puis on procède au dépôt des extraits d'échantillons et du standard sous forme de spot sur la plaque préchauffée pour enlever l'humidité. Les spots seront au nombre de 9. Le standard va être déposé à des volumes croissants. Selon le nombre d'échantillons que l'on veut analyser, on dépose les extraits du standard en les intercalant entre ceux des échantillons de telle sorte qu'on puisse faire une comparaison au moment de la lecture.

Apres avoir déposé le standard et l'échantillon, la plaque (phase stationnaire) est plongée dans la phase mobile ; le tout est placé dans une cuve fermée hermétiquement à l'abri de la lumière pendant 45 minutes. Ainsi la migration va se dérouler et on aura une séparation bien distincte des 4 aflatoxines suivant leur poids moléculaire.

Au bout du temps de migration, on sort la plaque que l'on va lire sous lumière UV dans un chromato-vue (lampe à UV). La quantification va se faire en comparant les taches

émises par les aflatoxines des échantillons (s'il y'en a) avec celle du standard et avec l'aide de la formule ci-dessous l'on calcule la quantité d'aflatoxine contenu dans l'échantillon.

- **Expression des résultats**

$$Teneur\ en\ AFB1 = (S * Y * V)/(W * X)$$

Teneur en AFB1en ppb

S = concentration du standard (1 ppb)

Y = volume du standard comparé (µl)

V = volume de reprise de l'extrait (100 µl)

W = volume de reprise de l'extrait déposé en (5 µl)

X = poids de l'échantillon mis en colonne (10 g)

II.4- Analyses statistiques

Les logiciels **XLSTAT 6.1.9** et **Microsoft Excel 2010** pour Windows ont été utilisés pour l'analyse statistique des données des analyses chimiques (les résultats obtenus et présentés sous forme de moyenne, ont été analysés par ANOVA, au seuil de probabilité de 5%) et pour la construction des graphiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- Teneur en AFB1 par CLHP

III.1.1- Résultats obtenus

Les teneurs moyennes en aflatoxine B1 contenu dans les aliments pour volaille à différents stade de leur croissance sont rapportées dans **le tableau V** ci-dessous.

Tableau VI : Teneurs moyennes en aflatoxine B1 dans les aliments pour volaille obtenues par CLHP

Phase d'élevage / Lieu prélèvement	Démarrage	Croissance	Finition	Ponte	Poulette	Norme règlement 2006/576/CE
Gorom	$0,450^{ab}$	$0,800^{ab}$	$22,100^{e}$	$0,150^{ab}$	$1,300^{abc}$	20
Sangalkam	$0,650^{ab}$	$1,000^{abc}$	$2,050^{bc}$	$0,099^{a}$	$1,150^{abc}$	
Dakar	$0,200^{ab}$	$4,950^{d}$	$0,200^{ab}$	$2,900^{c}$	$0,099^{a}$	

Nb : les moyennes affectées de lettres différentes dans les mêmes lignes sont significativement différentes.

Il ressort de ce tableau que, les teneurs en AFB1 dans les aliments collectés dans la région de Gorom sont divisés en trois groupes significativement différents ($p<0,05$). Ces teneurs varient de 0,15 à 22,10 ppb. Ce qui n'est pas le cas des aliments de la région de Sangalkam qui eux ont des teneurs variant de 0,099 à 2,05 ppb. Pour les échantillons issus des marchés de Dakar, les teneurs en AFB1 varient de 0,099 à 4,95 ppb.

De façon générale, l'on constate la présence d'aflatoxine dans tous les aliments analysés bien que certains cas ce soit à l'état de traces. Aussi, les teneurs en AFB1 varient de 0,099 à 22,10 ppb et n'atteignent pas la valeur maximale acceptable qui est de 20 ppb établie par la communauté européenne pour les aliments pour animaux, excepté l'aliment de finition collecté dans la région de Gorom.

III.1.2- Discussion

De ces résultats, il ressort que les aliments pour animaux collectés dans ces trois localités sont très peu contaminés à l'exception de l'aliment pour finition collecté dans la localité de Gorom.

La teneur élevée en AFB1 dans ce dernier pourrait s'expliquer soit :

- Par une nouvelle contamination durant le stockage, vu que cet aliment a été stocké plus longtemps que les autres car il est administré aux volailles à la dernière phase de leur croissance.
- Par les mauvaises conditions de stockage et/ou d'entreposage entraînant une prolifération des moisissures faisant suite à une biosynthèse des aflatoxines.

La faible contamination observée pour l'ensemble des aliments pourrait s'expliquer par le fait que les industriels ont parfois recours durant la fabrication de ces aliments à des méthodes physiques et/ou chimiques de détoxification à savoir : l'inactivation par la chaleur, le traitement par l'irradiation ou le traitement soit par des agents oxydants, soit par les acides et/ou les bases **(Bennet *et al.,* 1983 ; Diop, 1995)**.

La présence de l'AFB1 dans tous les types d''échantillons n'est pas surprenant car ces aliments contiennent de l'arachide et/ou ces dérivés, étant donné la grande susceptibilité de celle-ci à l'infestation par les moisissures toxinogènes. En effet, plusieurs études déjà effectuées ont rapporté ce fait **(Kane *et al.,* 1993 ; Dia, 1997 ; Bathily, 1998 ; Sall, 1998 ; Diouf, 2001 ; Sylla, 2014)**. Ce qui constitue un grand risque étant donné que l'aflatoxine B1 est la plus toxique des quatre aflatoxine. En effet, des expériences réalisées sur toutes les espèces animales, à l'instar des volailles (exception faite de la souris), ont montré un effet hépatocarcinogène des aflatoxines par voie orale, principalement l'aflatoxine B1 **(Kurata *et al.,* 1984)**.

La contamination par les aflatoxines des aliments pour volaille, vendues dans les marchés et les fermes avicoles de Dakar, soulève encore une fois de plus l'épineux problème de la santé des consommateurs, compte tenu des risques que constitue l'ingestion répétée d'aflatoxine (dans notre étude matérialisée par la présence d'aflatoxine dans les aliments à différents stades de croissance des volailles). En effet, **Sanders *et al.* (1967)** avaient montré au cours de leur étude, la présence de résidus d'aflatoxine dans les tissus animaux et des œufs de la volaille après alimentation expérimentale de ces animaux avec des produits contaminés à

l'aflatoxine. Cette présence de résidu s'expliquerait par le fait que les aflatoxines présentent des caractéristiques chimiques qui leur confèrent une grande stabilité à l'origine de leur transfert dans la chaîne alimentaire.

L'AFB1 pose un sérieux problème de santé publique en raison de sa toxicité chronique (effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes,…) liée à l'ingestion répétée de faibles doses.

III.2- Comparaison des résultats des deux méthodes analytiques

Au cours de notre étude au Laboratoire de Mycotoxine de l'I.T.A., il est arrivé que la CLHP soit hors service dû à une panne. De ce fait, la quantification de l'AFB1 après extraction et purification était réalisée par CCM. Ainsi, il nous a été demandé d'effectuer cette quantification sur les mêmes échantillons précédemment analysés par CLHP.

III.2.1- Résultats de la quantification par CCM

Les teneurs moyennes en aflatoxine B1 contenu dans les aliments pour volaille à différents stade de leur croissance obtenues par CCM sont rapportées dans le **tableau VI** ci-après.

Tableau VII : Teneurs moyennes en aflatoxine B1 dans les aliments pour volaille obtenues par CCM

Phase d'élevage / Lieu prélèvement	Démarrage	Croissance	Finition	Ponte	Poulette	Norme règlement 2006/576/CE
Gorom	7,000^{ab}	1,980^{a}	6,000^{ab}	1,980^{a}	8,000^{abc}	20
Sangalkam	1,980^{a}	1,000^{abc}	10,000^{bc}	1,980^{a}	1,150^{abc}	
Dakar	12,000^{bc}	8,000^{abc}	1,980^{a}	14,000^{c}	8,000^{abc}	

Nb : les moyennes affectées des lettres différentes dans les mêmes lignes sont significativement différentes.

Il ressort de façon générale de ce tableau que les teneurs en aflatoxine montrent une certaine variabilité allant de 1 ppb à 14 ppb. En fonction du lieu de collecte des échantillons, l'on remarque que les aliments pour volaille collectés dans les marchés de Dakar présentent des teneurs plus élevées que dans les deux autres zones de collecte. Nous constatons aussi que

tous les échantillons sont contaminés par l'aflatoxine, mais aucun d'eux n'atteint la valeur maximale acceptable qui est de 20 ppb établie par la communauté européenne.

III.2.2- Discussion

Bien que moins couteuse, la CCM est une technique semi-quantitative permettant d'apprécier la présence ou non d'AFB1 dans nos échantillons. Les teneurs obtenues à l'aide de chaque méthode, nous révèle que la quantification de l'AFB1 est effectuée par la CCM est moins précise. Ce manque de précision pourrait trouver son explication dans le fait que comparée à la CLHP, la CCM est une méthode moins sensible.

En effet, la CLHP gagne en sensibilité grâce au couplage avec d'autres techniques de détection et permet d'atteindre des limites de détection très faibles. Le couplage est un outil performant pour l'identification et la quantification de l'AFB1 présente à l'état de traces dans les matrices simples et/ou complexes telles que les aliments pour volaille **(Monbaliu *et al.*, 2009)**.

De ces résultats, l'on constate que les deux méthodes de quantification utilisées à savoir la CCM et la CLHP permettent de révéler la présence d'AFB1 dans les échantillons collectés.

Par ailleurs, les résultats obtenus tant par CLHP que par CCM auraient pu être améliorés, si l'étude avait été faite : soit avec une quantité d'échantillons plus importante ; soit de sorte que chaque traitement soit répété au minimum trois fois (n=3) pour plus de certitude et de précision. Mais ceci aurait nécessité plus de moyens (solvants, cartouches de purification, …) qui nous faisaient défaut durant notre étude. D'autre part, lors de la quantification par CCM, nous nous sommes rendus compte que la solution standard d'AFB1 avait une teneur bien plus importante que celle retrouvée dans les échantillons. De ce fait, il aurait fallu réajuster la concentration de ce standard pour qu'elle soit dans le même ordre de grandeur que celle des échantillons.

CONCLUSION

CONCLUSION

La volaille est à la base de l'alimentation au Sénégal en général et à Dakar en particulier. Elle est utilisée dans de nombreux plats. Cette source de protéine, tant prisée par les dakarois, contient souvent des aflatoxines reconnues comme étant des toxiques redoutables dans nos aliments. Ces aflatoxines sont dues à la présence d'un champignon du nom d'*Aspergillus flavus* qui les produit lorsque les conditions sont favorables. L'ingestion d'une certaine dose de ces toxiques peut entraîner une intoxication aiguë (mort) ou chronique (cancer du foie).

Malheureusement, la plupart des consommateurs dakarois de volaille ignorent totalement la présence d'aflatoxine et les conséquences dramatiques que ces dernières peuvent avoir sur leur santé. De ce fait, le contrôle et la surveillance des aliments pour volaille et susceptibles d'être contaminés du point de vue de leur teneur en aflatoxine notamment la forme B1 s'avèrent indispensable. C'est dans le souci d'améliorer la qualité de la viande de volaille que ce travail a été élaboré.

Ainsi, des aliments pour volaille issue des fermes d'une part et des marchés de Dakar d'autre part ont été collectés dans le cadre de cette étude, pour y rechercher l'aflatoxine B1.

Les résultats obtenus ont montré que les échantillons analysés par CLHP avaient pour l'ensemble des teneurs très faibles n'atteignant pas la valeur maximale recommandée par la Communauté Economique Européenne. Excepté l'aliment pour finition collectés à Gorom qui présentait une teneur de 22,100 ppb. Sur un total de 15 échantillons que nous avons analysés, seul l'aliment pour finition issu de la ferme de Gorom présentait une teneur en aflatoxine B1 supérieure à la norme de la Communauté Economique Européenne de 20 ppb, norme retenue pour les aliments destinés à la consommation animale.

Tandis que ceux analysés par CCM issus des marchés de Dakar et de la zone de Gorom étaient les plus contaminés avec la teneur moyenne en aflatoxine B1 la plus élevée qui était de 14ppb. A l'exception faite de l'aliment de finition, les échantillons de Sangalkam quant à eux contenaient de très faibles teneurs en aflatoxine B1. Il est noté que les deux méthodes d'analyse permettent une détermination du point de vue qualitatif de l'AFB1. Mais du point de vue quantitatif on note que la quantification par la CCM est moins précise.

Au regard des résultats obtenus, les aliments pour volaille constituent une réelle source de contamination de l'alimentation humaine et la CLHP reste la technique de quantification la plus fiable pour le contrôle qualité des aliments pour animaux susceptibles d'être contaminés.

Au vu des résultats et constatations énumérés lors de cette étude, il serait important d'envisager dans les études futures d'agrandir l'échantillonnage à l'échelle nationale.

RECOMMANDATIONS

RECOMMANDATIONS

Notre étude a révélé une contamination des aliments pour volaille vendues dans nos marchés et fermes. Il convient donc, conformément aux vœux de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) et de la F.A.O., de mener des actions visant à résoudre le problème de l'aflatoxine.

Pour cela, les domaines cibles sont l'éducation et la sensibilisation ; la législation ; la recherche.

- **Sur le plan éducatif**, il faudrait initier des actions de sensibilisation au niveau des producteurs, au niveau des vendeurs dans les marchés et des consommateurs qui ignorent pour la plupart jusqu'à l'existence des aflatoxines.

L'éducation des industriels devrait se faire sous forme de visites par des équipes de formateurs sur les techniques d'entreposage et de stockage des matières premières entrant dans la fabrications de ces aliments et/ou des aliments proprement dits.

Ceci pourrait se faire par l'intermédiaire de moyens audiovisuels de communication.

- **Sur le plan de la législation,** le Sénégal doit mettre en place une législation visant surtout les denrées pour animaux fabriquées localement.

S'il est certes difficile d'appliquer cette réglementation à la vente libre de denrées artisanales, il est possible de créer ce cadre juridique imposant aux industriels la commercialisation de produits indemnes d'aflatoxines, non seulement pour les produits issus des dérivés arachidiers, mais aussi pour tous les aliments sujets à la contamination mycotoxinique.

Il est également urgent d'instaurer un contrôle systématique des produits livrés à la consommation animale et/ou humaine.

- **Sur le plan de la recherche**, il faut poursuivre les études sur les aliments pour animaux de façon générale ; étudier la corrélation entre la consommation régulière de denrées d'origine animale contaminées et la fréquence des cancers primitifs du foie chez l'homme ; doser les marqueurs biologiques de l'imprégnation de l'aflatoxine B1 dans l'organisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adebanjo A., Bankole S.A. 2003. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *Afr. J. Biotech.,* 2(9): 254-263.

AFSSA. 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaines alimentaires humaine et animale : rapport final.

Asao T., Buchi G., Abdel Kader M., Chang S.B., Wick E.L., Wogan G.N. 1963. Aflatoxins B and G. *Journal. Am. Chem. Soc.,* 85: 1706-1707.

A.O.A.C. 2000. Aflatoxins in Peanuts and peanuts products. Official method of analysis 968.22, 17th edn.

Bathily A. **1998.** Aflatoxines dans les aliments : recherche et dosage dans les huiles de pression artisanale et leurs résidus d'extraction. Essai de détoxification. Thèse Pharm., Dakar, n°50.

Bennett J.W., Dynn J.J., Goldman C.J. 1983. Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Envir. Microbiol.,* 46: 503-505.

Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. 2002. Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. In : M. Moll, N. Moll (Eds) La sécurité alimentaire du consommateur, Tec & doc, Lavoisier, Londres, Paris, New York, 127-179.

Cigic I.K., Prosen H. 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.,* 10(1): 62-115.

Dabbre C. 1987. L'aflatoxine M1 dans le lait et les produits laitiers. Dosage et plan de décontamination. Thèse Pharm., Dakar, n°05.

Dia Y. 1997. Recherche et dosage des aflatoxines dans l'huile d'arachide de pression préparée artisanalement dans les régions de Diourbel et Kaolack (Sénégal). Thèse Pharm., Dakar, n°62.

Diom M. 1978. Etude des problèmes posés par les aflatoxines dans les aliments du bétail et de l'homme. Thèse Vet., Dakar, n°12.

Diouf M.L. 2001. Aflatoxine dans l'arachide : essai de décontamination de l'huile d'arachide de pression artisanale par exposition aux rayons solaires. Thèse Pharm., Dakar, n°35.

Diop Y.M. 1995. Intérêt des traitements ionisants pour la conservation des aliments dans les pays en développement, cas du Sénégal. Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, 158p.

Droreckova I., Kusak V., Vesely D., Vesela J., Nesnidal P. 1977. Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). *Ann. Nutr. Aliment.,* 31: 977-989.

FAO. 1992. Normes sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. Cours de formation sur l'analyse des mycotoxines. Etude FAO-ROME, 14-10: 143.

FAO. 1999. Prévenir la contamination par les mycotoxines. Alimentation, nutrition et agriculture No. 23, Division alimentation et nutrition, FAO, Tunis.

Fink-Gremmels J. 1998. Mycotoxins : mechanisms of action at the molecular level mycotoxins and phycotoxins. Developments in chemistry, Toxicology and food safety, ed by M. Miraglia ; USA: 247-261.

Frémy J.M., Galtier P., Le Bizec B., Leblanc J.C., Oswald I., Burel C., Etienne M., Grosjean F., Jouany J-P., Paragon B.M., Dragacci S., Guerre P., Hossen V., Janin F., Parent Massin D., Thouvenot D., Gallotti S., Tard A. 2009. Evaluation des risques liés à la présence des mycotoxines dans les chaînes alimentaires et animale. Rapport AFSSA, 12-28.

Gardner H., Koltun S., Vix H. 1968. Solvent extraction of aflatoxin from orkeedmeals. *J. Agric. Food Chem.*, 16(6): 990-993.

Garnier R.C. 1975. Aflatoxin separation by High Pressure Liquid Chromatograph. *J. Chromatogr*., 103:186-188.

Gauthier G. 1986. Les aflatoxines dans les aliments: leur toxicité. Etude des méthodes de dosage et mise au point d'un programme de détoxification. Thèse Pharm., Dakar, n°05.

I.A.R.C. 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substances : some food items and constituent heterocyclic adromatic amins and mycotoxins. *Lyon IARC Publication*, 56: 362.

ISO. 1998. Aliments des animaux. Détermination de la teneur en aflatoxine B1 dans les aliments composés. Méthode par chromatographie liquide à haute performance. Norme internationale, ISO 14718. 1st ed. 8-13.

Kane A., Diop N., Diack T.S. 1993. Decontamination and detoxifications. *African News lett. an Occup. Health and Safety,* Suppl 2: 43-47.

Kurata H. 1984. Toxigenic fungl. Their toxins and health hazard. Developments in food science n°07, Elsevier edit, Amsterdam, oxford, New-York, Tokyo, 363p.

Langseth W., Rundberget T. 1998. Instrumental methods for determination of non-macrocyclic tricothenecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chromatogr. A.*, 815: 103-121.

Moll M., Moll N., 1995. Sécurité alimentaire du consommateur. Chapitre 3 : les mycotoxines : des contaminants omniprésents dans l'alimentation humaine et animale, risque et prévention, 300p.

Monbalui S., Van Poucke C., Van Peteghen C., Van poucke K., Heugens K., De Saeger S. 2009. Development of multi-mycotoxins liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid commun. Mass spectrom*., 23: 3-11.

Monjour L. 1968. Les aflatoxines. Aliment-Vie, 56: 229-249.

Moreau. 1994. Moisissures toxiques dans l'alimentation. Pologne, *Masson et Cie.* Pologne, 322.

Northdt M.D., Verhulsdonk C.A.H., Soentoro P.S.S., Paulsch W.E. 1976. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Milk Food Technol.,* 39: 170-174.

OMS. 1980. Résumé de mycotoxine. Critères d'Hygiène et de l'Environnement, Genève, n°11, 142p.

Patterson D.S.P. 1976. Structure, metabolism and toxicity of the aflatoxins. *A Review Cah. Nutr. Diet, II* (suppl 2): 71-76.

Pfohl-Leszkowicz A. 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. Editions TEC & DOC, Lavoisier, Chapitre XI, 299: 307-310.

Règlement N°576/CE. 2006. Règlement (CE) N° 576/2006 de la Commission du 17 Août 2006 concernant la présence de deoxynivalenol, de zearalénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à l'alimentation animale. *Journal officiel de l'Union Européenne* L 229/7-L229/9. Disponible sur :< http://eur-lex.europa.eu/>.

Richard J.I. 1998. Mycotoxins, toxicity and metabolism in animals-system approach overview. Mycotoxins and Phycotoxins, developments in chemistry toxicology and food safety, Ed by M.Miraglia, Van Egmong H., Brera C. USA: 363-397.

Saine J. 2001. Aflatoxines dans l'huile de pression artisanale d'arachide. Essaie de décontamination par filtration sur du charbon de bois. Thèse Pharm., Dakar, n°40.

Sall A. 1998. Recherche et dosage des aflatoxines dans les pâtes d'arachide alimentaires à Dakar. Thèse Pharm., Dakar, n°58.

Sanders T.H., Davis N.D., Djerner U.L. 1967. Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Asperglilus flavus*. *Mycopathol Mycol. Appl.,* XXXJII: 49-55.

Sharman M., Gilbert J. 1991. Automated aflatoxins analysis of foods and feeds using immunoaffinity column clean up and High Performance Liquid Chromatographic determination. *J. Chromatograh.*, 543: 220-225.

Sylla A.N. 2014. Dosage des aflatoxines dans l'huile « Segal » et essais de détoxification par le kaolin. Mémoire Master de Biotoxicologie appliquée à l'industrie, l'environnement et la santé, Dakar.

Tanaka T., Yoneda A., Inoue S., Sugiura Y., Ueno Y. 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins an zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 882: 23-28.

Tandon H., Tandon B.N., Ramalin-Gaswami V. 1978. Epidemy of toxic hépatitis in India of possible mycotoxic origin. *Arch. Pathol. Lab. Méd*, 102: 372-376p.

Tung H.T., Hamilton P.B. 1971. Aflatoxicosis and bruising in the chicken, *Poult.Sci.,* 50: 796.

Wray B.B. 1982. Aflatoxins, hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *N. Engl J. Med.*, 305: 833.

TITRE : Contribution à l'étude du niveau de contamination par l'aflatoxine B1 des aliments pour volaille collectés à Dakar et environs : quantification par deux méthodes chromatographiques.

RESUME

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine pouvant contaminer une large variété de denrées alimentaires. L'ingestion d'aliments contaminés par des volailles peut entraîner l'altération de leur santé et de leurs performances zootechniques ainsi qu'un problème de sécurité sanitaire des aliments lié à la présence de résidus de mycotoxines dans les produits d'origine animale. Ce travail, nous a permis d'étudier la contamination des aliments pour volaille commercialisés dans la zone de Dakar et dans la zone péri-urbaine (Sangalkam et Gorom) par l'aflatoxine B1. Pour cela, un total de 15 échantillons d'aliments de volailles a été collecté dans certains marchés de Dakar et dans certaines fermes avicoles de la région de Gorom et de Sangalkam. La quantification de l'aflatoxine B1 a été faite par CLHP et CCM. Les résultats du dosage par CLHP ont montré que l'ensemble des échantillons était contaminé à l'aflatoxine B1 avec des teneurs qui variaient de 0,15 ppb à 22,00 ppb, de 0,099 ppb à 2,05 ppb et de 0,099 ppb à 4,95 ppb respectivement pour Gorom, Sangalkam et Dakar. Les résultats obtenus ont montré que seul l'aliment de finition issue de Gorom présentait un taux d'aflatoxine B1 supérieur à la limite maximale fixée par la réglementation européenne. Les résultats de la quantification par CCM nous ont permis quant à eux de constater que cette méthode permet de révéler la présence d'aflatoxine B1 dans les différents échantillons analysés. Mais nous avons remarqué une surestimation des valeurs obtenues par cette méthode de quantification. Ces résultats suggèrent que, les aliments pour volaille constituent une réelle source de contamination de l'alimentation humaine et la CLHP reste la technique de quantification la plus fiable pour le contrôle qualité des aliments pour animaux susceptibles d'être contaminés.

Mots-clés : Aflatoxine ; aliments ; CCM ; CLHP ; Dakar ; quantification ; volaille.