



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Amel SEIFIA et Ahlem DERFALOU

Le : mercredi 7 octobre 2020

Thème

Recherche d'AFB1 et de la Caféine dans le café dans la région de Constantine par chromatographie sur couche mince.

Jury :

Mme. Sara REDOUANE SALAH	MCA	Université de Biskra	Rapporteur
M. Yacine DARRADJI	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Imene MERZOUGUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciement

J'exprime toute ma reconnaissance envers mon Encadreuse de mémoire, **RADOUANNE Salah Sara**, Enseignante à la Faculté des Sciences de Med Khaider. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude pour avoir dirigé ce travail. Ses encouragements, ses conseils et sa patience m'ont beaucoup aidé à surmonter toutes les difficultés. Nous remercions vivement d'avoir suivi et orienté ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes meilleures considérations.

Nous remercions les ingénieurs de laboratoire de biologie (Med Khaider Biskra) qui nous ont aidés pour rédiger notre pratique spécialement madame Sara, aussi nous remercions les membres de jury.

Remerciement s'adresse également au dirigeant du laboratoire de chimie et d'agronomie.

A toute personne qui a participé de près ou loin, directement ou indirectement à réaliser notre travail.

Dédicace

**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.**

Amel

À ma sœur Yasmine ;

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 mère et mon père

À mes sœurs soundous et khadidja , mes frères hamza, mahfoud, mohamed, okba, ala adinne, ilyes ;

À ma famille seifia ; mes cousins et cousines ;

À mes amés sohila khaiar, djinidi daouia, hadji imene, hamani monia ;

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

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

Ahlem

À ma mère et mon père

À ma famille

À mes sœurs Soumia et Sara , mes frères Akram. ; Aymen ,Walid et Bilal

À mes amis Souhila khair, Djinidi daouia, Hadji imene, Hamani monia ; Gharbi souhila

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

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Table des matières	I
Liste des Tableaux	II
Liste des Figures	III
Liste des Annexes	IV
Liste des abréviations	V
Introduction	1
Chapitre 1 : Généralités sur moisissures et les mycotoxines	2
I.1. Historique	2
I.2. Moisissures toxigènes	2
I.2.1. genre <i>Aspergillus</i>	2
I.2.2. <i>Aspergillus flavi</i> et la production des aflatoxines	3
I.2.3. Autre classification	4
I.3. Mycotoxine	5
I.3.1. Définition	5
I.3.2. Production des mycotoxines	5
I.3.3. Facteurs influençant la production d'aflatoxines	6
I.3.4. Voie de biosynthèse des aflatoxines	7
Chapitre 2 : Aflatoxines	9
II.1. Aflatoxine	9
II.1.1. Définition et structure chimique	9
II.1.2. Propriétés physique-chimiques	10
II.1.3. Cinétique et devenir dans l'organisme	13
II.1.3.1. Absorption	13
II.1.3.2. Distribution	13
II.1.3.3. Métabolisme	13
a. Phase I	14
b. Phase II	14
II.1.3.4. Elimination	14
II.1.4. Mécanisme d'action	16
II.1.4.1. Formation d'adduits à l'ADN	16
II.1.4.2. Métabolisme des protéines	16
II.1.5. Toxicité	17

II.1.5.1.	Toxicité aiguë	17
II.1.5.2.	Intoxication chronique.....	17
II.1.6.	Réglementation des aflatoxines	17
II.1.6.1.	A l'échelle nationale.....	17
II.1.6.2.	A l'échelle internationale	18
II.2.	Caféine.....	19
II.2.1.	Définition et structure chimique	19
II.2.2.	Propriétés physiques et chimiques	19
II.2.3.	Toxicité	20
II.2.4.	La caféine dans les cafés et leur métabolisme	20
II.3.	Définitions des types de café utilisées	21
Chapitre 3 :	Matériel et méthodes.....	9
III.1.	But de travail.....	23
III.2.	Échantillonnage.....	23
III.3.	Méthode chromatographie monodimensionnelle sur couche mince.....	23
III.3.1.	Protocole d'AFB1	23
III.3.1.1.	Préparation de l'échantillon et extraction de l'AFB1	24
III.3.1.2.	Chromatographie sur couche mince	25
a.	Préparation de la phase stationnaire.....	25
b.	Préparation de la phase mobile.....	26
c.	Vérification des standards	26
d.	CCM des échantillons	28
e.	Révélation des taches d'AFB1	28
III.3.2.	Recherche de la Caféine.....	29
A.	Extraction	29
B.	Standard de caféine	29
C.	Révélation des taches de caféine.....	29
III.3.3.	Précaution de manipulation et décontamination du matériel utilisé	30
Chapitre 4 :	Résultats et discussions.....	5
IV.1.	Recherche et détection de l'AFB1 par CCM	31
IV.2.	Représentation graphique des résultats de l'AFB1.....	37
IV.3.	Recherche et détection de la caféine par CCM	38
IV.4.	Représentation graphique des résultats de la Caféine.....	44
IV.5.	Discussions des résultats de l'AFB1	45
IV.6.	Discussions des résultats de la Caféine.....	46
Conclusion.....		48

Bibliographie.....	50
Annexes.....	56
Résumés	60

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques d' <i>A.flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> (Hocking, 2006).	3
Tableau 2 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production.(Caruso <i>et al.</i> , 2013).	6
Tableau 3 : Le Poids moléculaire (PM), facteur de rétention (RF) calculé sur gel de silice 60 (0.25 mm), points de fusion et spectre d'absorption sous Ultra-violet des aflatoxines (Krivobok, 1983). ...	12
Tableau 4 : Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (Fao, 2003).	18
Tableau 5 : Les teneurs maximales en AFs exprimées en µg/kg dans l'alimentation humaine et animale dans l'Union Européenne (Réglementation (CE) No 1881, 2006).	18
Tableau 6 : Le taux de caféine dans les cafés (Charrier et Berthaud, 1975).	20
Tableau 7 : Les échantillons du café et leurs codages.	23
Tableau 8 : Essai des standards et des systèmes.	28
Tableau 9 : Comparaison entre les trois types de café.	37
Tableau 10 : Comparaison entre les trois types de café.	45

Liste des Figures

Figure 1: <i>A. parasiticus</i> , A et B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X (Hocking, 2006).....	3
Figure 2 : <i>A.flavus</i> , A : Conidiophores 250X, B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X (Hocking, 2006).....	4
Figure 3 : Voies de biosynthèse de quelques mycotoxines (Guerre <i>et al.</i> , 1996).....	7
Figure 4 : Cascade enzymatique conduisant à la synthèse des aflatoxines B1, B2 G1 et G2 et représentation des gènes du cluster codant les enzymes intervenant dans chacune des conversions (A. El Khoury, 2007) ,(Sweeney et Dobson, 1999).....	8
Figure 5 : Structure générale des aflatoxines (Gauthier, 2016).....	9
Figure 6 : Les structures chimiques d'aflatoxine M1 et M2 (Nikiéma, 1993).....	10
Figure 7 : Biodégradation de l'aflatoxine B1 (Krivobok, 1983).....	13
Figure 8 : Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie (El Assaoui, 2018).....	15
Figure 9 : Mécanisme d'action AFB1 (Guerre <i>et al.</i> , 1996).....	16
Figure 10 : Structure chimique de la caféine (Binder et Kraska, 2012).....	19
Figure 11 : Métabolisme de la caféine (Coelho, 2014).....	21
Figure 12 : Café vert (Houessou, 2007).....	21
Figure 13 : Café torréfié (Bibal, 2019).....	22
Figure 14 : Café moulu (Arrington, 2019).....	22
Figure 15 : Schéma du protocole d'extraction d'AFB1.....	25
Figure 16 : Plaque CCM gel de silice 60.....	26
Figure 17 : Standard AFB1 BIO-SHIELD B1 ES.....	27
Figure 18 : Standard AFB1 ALEXIS biochemicals.....	27
Figure 19 : Lampe UV 365nm et 254nm (département de Chimie Biskra).....	29
Figure 20 : Calcul de rapport frontal.....	30
Figure 21 : Révélation des plaques CCM d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).....	31
Figure 22 : Révélation des plaques CCM1 jusqu'à 4 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).....	32
Figure 23 : Révélation des plaques CCM5 jusqu'à 7 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).....	34
Figure 24 : Révélation des plaques CCM8 jusqu'à 11 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).....	35
Figure 25 : Révélation des plaques CCM12 jusqu'à 14 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).....	36
Figure 31 : Graphe représente les résultats de la contamination par AFB1.....	37
Figure 27 : Révélation des plaques CCM1' jusqu'à 4' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).....	39
Figure 28 : Révélation des plaques CCM6' et 7' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).....	40
Figure 29 : Révélation des plaques CCM8' jusqu'à 11' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).....	41
Figure 30 : Révélation des plaques CCM12' jusqu'à 14' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).....	42
Figure 32 : Graphe représente les résultats pour Caféine.....	44

Liste des Annexes

Annexe 1 Rapport frontaux des échantillons et du standard AFB1 avec l'intensité du fleurissances. ...	56
Annexe 2 Rapport frontale des échantillons et du standard de caféine avec l'intensité du fleurissances.	57
Annexe 3 : Protocol Bio-Shield de B1 ES (B2948 / B2996), ProGnosis Biotech, NOVAkits, version 1.	59

Liste des abréviations

A. flavus : *Aspergillus flavus*

A. nomius : *Aspergillus nomius*

A. parasiticus : *Aspergillus parasiticus*

ADN : acide désoxyribonucléique

AFB1 : aflatoxine b1

AFs : aflatoxines

CCM : chromatographie sur couche mince

CE : Café moulu Emballé

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer :

CT : Café torréfié

CV : café vert

C : Codage utilisé dans les plaques CCM

DMSO : diméthyl-sulfoxyde

DZ1: AOAC (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products – CB method Food and Drug Laboratories – Canada – Best food method.

DZ2: NF-VF (1980). Animal feed – aflatoxins measurement B1, June 1980:18-200.

FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et agriculture

GST : Glutathion S-Transférase

NaOCl : l'hypochlorite de sodium

NH₄OH : l'ammoniaque

PM : Poids moléculaire

RF : facteur de rétention

UV : ultra violet

Introduction

Introduction

Les mycotoxines sont des contaminants chimiques naturels produits par les moisissures toxigènes dans les produits alimentaires. Leur présence dans les aliments peut engendrer des effets néfastes sur la santé humaine et animale (Mahnine, 2017).

Parmi les mycotoxines les plus redoutables « les aflatoxines » qui se développent sur une large variété de denrées alimentaires et particulièrement sur le café (Binder et Krska, 2012).

Ces mycotoxines sont élaborées à partir de champignons microscopiques ou moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui prolifèrent surtout dans les régions chaudes et humides (Diakite *et al.*, 2017).

Ces mycotoxines sont caractérisées par leur fluorescence sous les rayons UV et par leur thermo résistance (Kurtzman *et al.*, 1987).

L'aflatoxine B1 (AFB1) est considéré comme étant le plus puissant cancérigène naturel pour l'homme (Patrick *et al.*, 2004).

Le café est l'un des principaux produits du commerce mondial, puisque c'est la seconde marchandise échangée dans le monde, derrière le pétrole. C'est –à-dire l'exploitation des caféicultures. Entre outre, l'industrie du café, dont plus d'une centaine de millions de personnes dépendent pour leur subsistance, est maintenant le plus grand employeur mondial et est vitale pour nombre de pays du Tiers Monde (Chetatha, 2013).

En générale, l'Afrique à une faible consommation intérieure en café, par rapport l'Afrique du nord où la tradition du café est installée.

En Algérie Le café possède un pouvoir nutritionnel important. Le café est un produit largement consommé à tout moment et dans toutes les occasions.

Le présent document comporte : Un premier chapitre consacré d'une part à une revue bibliographique sur les mycotoxines principalement les aflatoxines susmentionnées "origine, structure chimique, propriétés physico-chimiques et toxicité, présence dans les aliments ainsi que le volet réglementaire" et d'autre part sur leur impact et effets néfastes. La deuxième chapitre présente l'approche expérimentale utilisée pour l'analyse des mycotoxines et du caféine y compris la description de l'échantillonnage et les méthodes du dosage. Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus et leur discussion scientifique. Enfin une conclusion générale qui résume l'ensemble de travail.

Chapitre 1 : Généralités sur moisissures et les mycotoxines

I.1. Historique

En 1960, l'Angleterre a été exposée à une importante épidémie touchant les volailles et plus particulièrement les dindons. Cette maladie était caractérisée par une dégradation rapide de l'état de santé, des hémorragies sous-cutanées et la mort des milliers volailles appelée maladie X des dindons "Turkey X disease". Après l'étude de composition de leur nourriture qui est les tourteaux d'arachides provenant du Brésil (Yiannikouris et Jouany, 2002). On découvrit que ces tourteaux étaient contaminés par une moisissure, *Aspergillus flavus*, et, en 1961, des chercheurs anglais du Tropical Product Institute ont montré que *A. flavus* produisait une substance toxique une mycotoxine. Le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle matière toxique (Krivobok, 1983).

I.2. Moisissures toxigènes

Les champignons majeurs connus comme précurseur de l'AFB1 qui sont impliqués dans la chaîne alimentaire humaine et animale, appartiennent principalement aux genres : *Aspergillus* (Richard et Thurston, 1986).

I.2.1. genre *Aspergillus*

Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embranchement des *Ascomycotina* par leur mode de reproduction sexuée. Selon Klich (2002), la classification de l'*Aspergillus* est comme suit :

Règne : Mycota

Embranchement : Eumycota

Sous-embranchement : Ascomycotina

Classe : Euascomycetes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichocomaceae

Genre : *Aspergillus*

(Mosbah et Kacem Chaouche, 2017).

La plupart des *Aspergillus* sont saprophytes. Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Mais ils sont aussi présents sur la surface des graines (Dieme *et al.*, 2017). Dans les mauvaises conditions de stockage (Magan *et al.*, 2003).

Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont des contaminants plus fréquents des climats chauds comme les régions tropicales et subtropicales (Dieme *et al.*, 2017).

I.2.2. *Aspergillus flavi* et la production des aflatoxines

Trois souches de cette section sont principalement connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. parasiticus* (figure1), produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2). *A. flavus* (figure 2) produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2 alors qu'il ne produit habituellement ni l'aflatoxine G1 ni l'aflatoxine G2. Enfin, *A. nomius*, une souche rare très proche d'*A. flavus*, est capable de produire certaines aflatoxines (Faria *et al.*, 2017), (A. El Khoury *et al.*, 2011). Aussi elles se différencient morphologiquement d'après le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques d'*A. flavus* et *A. parasiticus* (Hocking, 2006).

Espèces	Tête conidienne	Présence de Sclérotés	Diamètre Des conidies (µm)	Formes et ornementation des conidies	Conidiophore
<i>A. flavus</i>	Unisériée et Bisériée	Production par certains isolats	3.5-4.5µm	Globuleuses Echinulées	400-1000µm à paroi échinulée
<i>A. parasiticus</i>	Unisériée	Occasionnellement	4-6µm	Sphériques	250-500µm à paroi échinulée

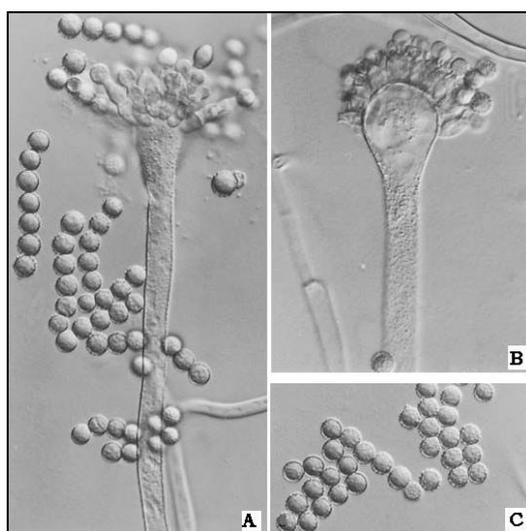


Figure 1: *A. parasiticus*, A et B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X (Hocking, 2006).

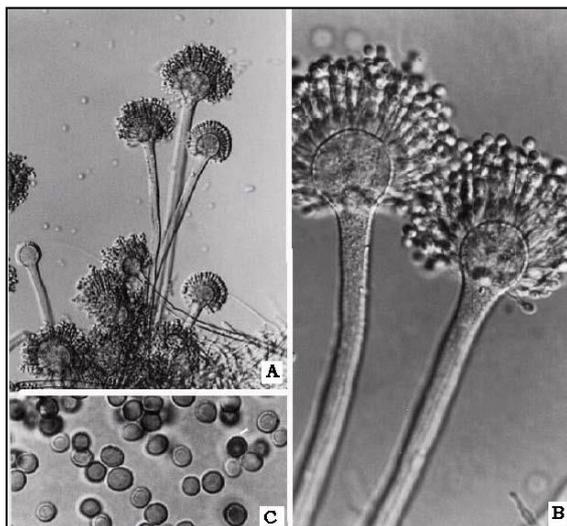


Figure 2 : *A.flavus*, A : Conidiophores 250X, B : Conidiophores 900X, C : Conidies 1470X (Hocking, 2006).

I.2.3. Autre classification

Les champignons toxigènes sont classés en deux groupes majeurs : (i) les contaminants du champ pouvant infecter les plantes vivantes et (ii) ceux du stockage capables de se développer après la récolte, au cours du séchage, du stockage, du transport et de la distribution (Guezlane Tebibel, 2016) .

A. flavus, produisant les aflatoxines, est également considéré comme un contaminant pouvant coloniser les plantes au champ. Toutefois, ce dernier est aussi capable de produire des mycotoxines pendant le stockage (R. El Khoury, 2016).

I.3. Mycotoxine

I.3.1. Définition

Le terme mycotoxine est une combinaison du mot Grec *mykos* (champignon) et du Latin *toxicum* (poison). Les mycotoxine sont des molécules capables, a de faible concentration, d'induire un effet toxique (Bourais et Amine, 2006) .

Ces toxines sont des métabolites secondaires élaborées par diverses moisissures filamenteux (à faible poids moléculaire $PM < 1000$ Da), plus particulièrement par ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps* (A. El Khoury, 2007).

Elles sont très stables dans les milieux acides et aux températures élevées, peu solubles dans l'eau et difficilement métabolisées par les organismes vivants (Gacem et A, 2011).

Ces métabolites sont non-essentiels au cycle de vie du champignon mais une fois produits, ils pourraient lui conférer certains avantages compétitifs (A. El Khoury, 2007).

I.3.2. Production des mycotoxines

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Les plus importantes sont : les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique, les fumonisines (Dieme *et al.*, 2017), (Tableau 2).

Il convient également de souligner que, dans la majorité des cas, les consommateurs humains et animaux sont exposés à plusieurs mycotoxines. Ce constat est lié à trois raisons principales : (i) une mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes, (ii) inversement, une même espèce est parfois capable de produire simultanément plusieurs mycotoxines, (iii) les repas (ou rations chez les animaux) sont généralement constitués de plusieurs aliments ou d'aliments préparés à partir de plusieurs matières premières, chacune pouvant être une source d'une toxine différente (Binder et Krska, 2012).

Tableau 2 : Mycotoxines et champignons responsables de leur production. (Caruso *et al.*, 2013).

Champignons	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Claviceps</i>
Toxines	Aflatoxine Stérigmatocytine Ochratoxine A	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, ochratoxine A	Trichothécènes (DON, NIV, Toxine T-2, DAS) Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine	Alternariol Acide Ténuazonique	Alcaloïdes De l'Ergot

I.3.3. Facteurs influençant la production d'aflatoxines

Les stress thermique, hydrique (sècheresse) et physique (lésions causées par les insectes) favorisent la contamination par les moisissures et la synthèse de mycotoxines.

Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A.flavus* et la production des aflatoxines sont :

- Température comprise entre 25 et 40°C ;
- Présence d'oxygène ;
- Développement du champignon sur des plantes stressées ;
- Présence d'insecte et de graines abimées ;
- Stockage en milieu chaud et humide (Ellis *et al.*, 1993).

La Composition du substrat : en effet la composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines.

La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*. En effet la présence de l'acide phytique complexe le zinc indispensable à la biosynthèse des aflatoxines, alors que la proline stimule cette production.

I.3.4. Voie de biosynthèse des aflatoxines

Les aflatoxines sont synthétisées à partir d'acétyl-CoA issu du catabolisme de glucose (figure 03). Leur synthèse implique 27 réactions enzymatiques. Le cluster de gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette voie métabolique est constitué de 30 gènes s'étalant sur une région de 75 kb du chromosome II (Butchko *et al.*, 1999).

Les étapes principales de la voie des aflatoxines ont été résumées dans les figures 3 et 4.

La biosynthèse est compartimentée dans des vésicules dites « aflatoxisomes » qui jouent également un rôle dans l'exocytose. Les aflatoxisomes sont transportés au niveau de la membrane plasmique et leur contenu pourrait être expulsé selon 3 mécanismes possibles: i) les aflatoxisomes sont entièrement transportés traversant la barrière plasmique ; ii) les aflatoxisomes fusionnent avec la membrane plasmique et des protéines transmembranaires agissent comme médiateurs pour expulser leur contenu dans le milieu extracellulaire ; iii) une protubérance des aflatoxisomes se crée au niveau de la membrane plasmique afin d'expulser leur contenu (Binder et Krska, 2012).

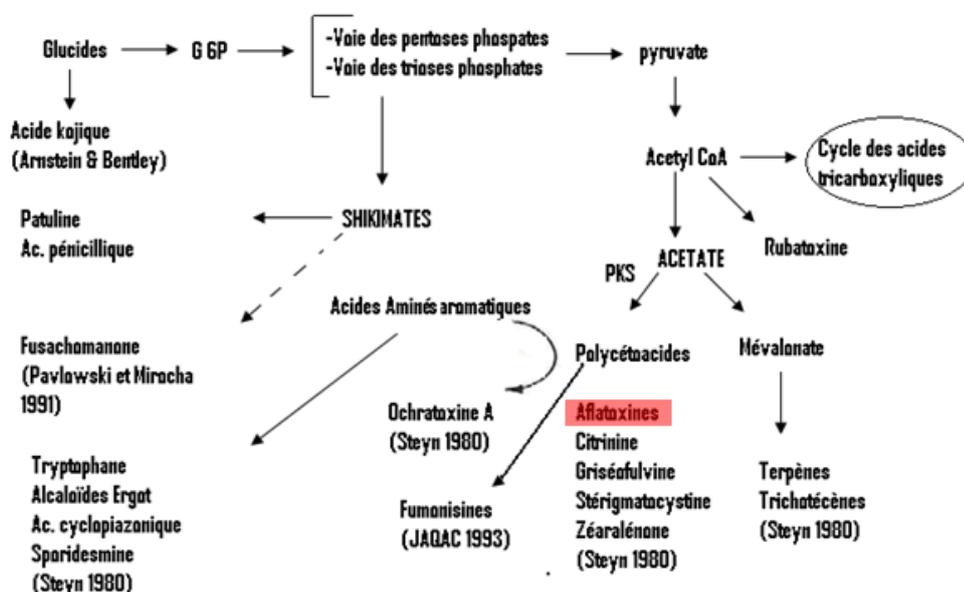


Figure 3 : Voies de biosynthèse de quelques mycotoxines (Guerre *et al.*, 1996).

G-6P : glucose 6 phosphate, PKS : polycétide synthase, CoA : Coenzyme A.

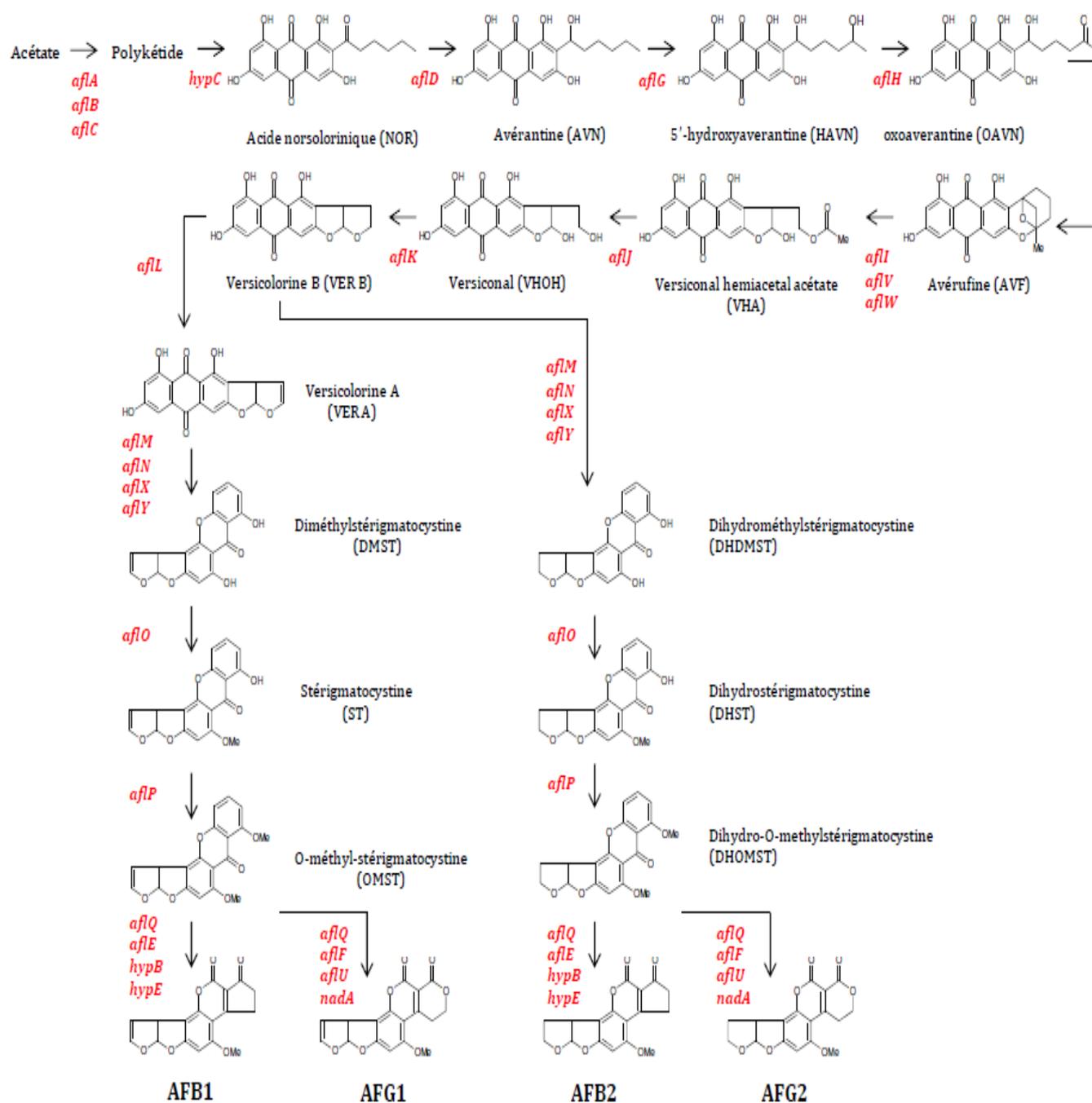


Figure 4 : Cascade enzymatique conduisant à la synthèse des aflatoxines B1, B2 G1 et G2 et représentation des gènes du cluster codant les enzymes intervenant dans chacune des conversions (A. El Khoury, 2007) ,(Sweeney et Dobson, 1999).

Chapitre 2 : Aflatoxines

II.1. Aflatoxine

II.1.1. Définition et structure chimique

Le nom aflatoxine est un acronyme formé de la combinaison de la lettre « A » pour *Aspergillus* et « FLA » pour *flavus*. Ce nom est issu de l'espèce impliquée dans la contamination des aliments responsables de la Turkey « X » disease : *Aspergillus flavus*. On y associe le mot anglais « TOXIN » signifiant poison (A. El Khoury, 2007) .

Les recherches menées sur les aflatoxines ont établi la prévalence de deux principaux types d'aflatoxines:

- Les aflatoxines du type B (AFB1 et AFB2)
- Les aflatoxines du type G (AFG1 et AFG2)

Les aflatoxines du type M, non moins importantes que les premières, ont été détectées pour la première fois dans le lait comme métabolites des aflatoxines du type B (Nikiéma, 1993).

Dans le groupe d'aflatoxine, environ 16 composés sont connus, mais seules les cinq AFs (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1) sont habituellement surveillées. Les autres AFs (par exemple, P1, Q1, B2a, et G2a) ont été décrites, particulièrement en tant que produits de biotransformation des métabolites principaux chez les mammifères (Mahnine, 2017) (Binder et Krska, 2012).

Une des plus célèbres mycotoxines est possédant le profil toxicologique le plus sérieux, l'aflatoxine B1 (AFB1) dont le nom chimique est le suivant :

6Méthoxydifurocoumarone2,3,6 α ,9 α -tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione (R. El Khoury, 2016).

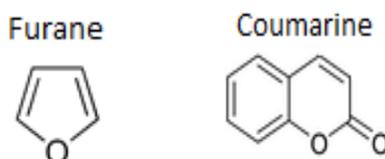


Figure 5 : Structure générale des aflatoxines (Gauthier, 2016).

Les aflatoxines sont caractérisés au niveau moléculaire par des cycles bifurane coumarine-Lactone/cyclopentanone (figure 5). Leur structure est un assemblage d'une coumarine et de 3 furannes. Les aflatoxines du type G possèdent un cycle lactone, tandis que celles du type B ont un cyclopentanone. Chaque type d'aflatoxines est subdivisé en deux groupes (1 et 2) ; les aflatoxines du groupe 1, à la différence de celles du groupe 2, sont caractérisées par la présence d'une double liaison en C8, 9 du premier anneau furane. Les aflatoxines du type M possèdent un anneau cyclopentanone comme celles du type B, mais sont hydroxylées en C10 (figure 06) (Coelho, 2014).

Le cycle lactone de l'AFB1 semble être responsable en majorité de sa toxicité (El Assaoui, 2018).

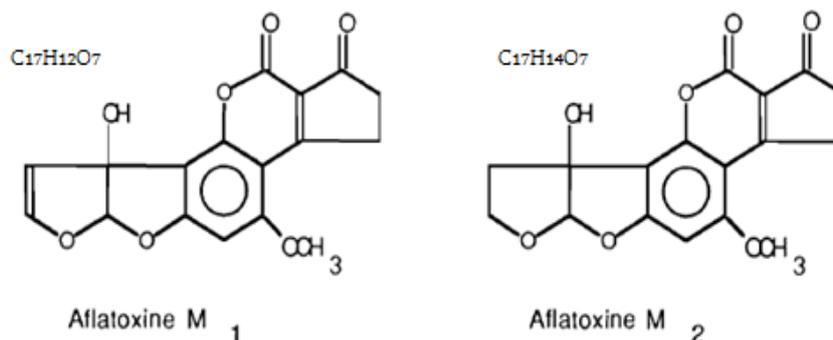


Figure 6 : Les structures chimiques d'aflatoxine M1 et M2 (Nikiéma, 1993).

II.1.2. Propriétés physique-chimiques

Les AFs purifiées se présentent sous forme de poudre cristallisée jaune paille ou incolore. Elles sont extrêmement stables thermiquement et ne sont guère détruites par les conditions usuelles de cuisson, de chauffage, traitements thermiques (stérilisation, pasteurisation, congélation, etc.) ou au séchage, stables au cours du stockage. La température minimale de décomposition s'élève à 237° (Redouane-Salah, 2016), (Binder et Krska, 2012).

Les aflatoxines sont relativement instables par exposition à la lumière surtout les ultraviolets (UV) et à l'air en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10). Tout provoquent l'oxydation du cycle lactone de l'aflatoxine devient sensibles à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer (Binder et Krska, 2012).

Les aflatoxines sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de cette dernière réaction l'AFB₁, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B₁ qui est directement génotoxique (R. El Khoury, 2016).

Les AFs, en solution dans un solvant fortement polaire. Leurs stabilité est très variée : dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10 à 30 µg/ml) (Gauthier, 2016). Elles sont très solubles dans les solvants modérément polaires comme le chloroforme, le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétonitrile (Mahnine, 2017) et surtout dans le diméthyl-sulfoxyde « DMSO » (solvant généralement utilisé comme vecteur pour administrer des aflatoxines aux animaux d'expérience) (Krivobok, 1983). Elles présentent une instabilité totale dans les solvants non polaires l'hexane, l'éther de pétrole et l'éther éthylique (Mahnine, 2017).

Les noms de ces AFs (B₁, B₂, G₁, et G₂) sont basés sur leur fluorescence sous la lumière UV (bleu « blue pour B₁ et B₂ » ou vert « Green pour G₁ et G₂ ») et sur la mobilité chromatographique relative à leur séparation (Tableau 3). Par contre les AFs (M₁ et M₂) ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait « *milk* » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Loic, 2008).

Les aflatoxines 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 (Redouane-Salah, 2016).

Tableau 3 : Le Poids moléculaire (PM), facteur de rétention (RF) calculé sur gel de silice 60 (0.25 mm), points de fusion et spectre d'absorption sous Ultra-violet des aflatoxines (Krivobok, 1983).

Aflatoxines		PM	RF	Point de fusion °C	Spectre	
Propriété	Type				max (nm)	ε
-Cristaux fluorescents.	B1	312	0,56	268-269 (décomposition) (cristallisation dans le chloroforme).	223	25 600
					265	13 400
					362	21 800
- Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines.	B2	314	0,53	287-289 (décomposition) (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de pentane).	222	17 000
					265	11 700
					363	23 400
	G1	328	0,48	244-246 (décomposition) (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol).	243	11 500
					257	9 900
					264	10 000
	G2	330	0,46	237-239 (décomposition) (cristallisation dans une solution d'acétate d'éthyle).	214	28 100
					265	11 600
					363	21 000
	M1	328	0,40	299 (décomposition) (cristallisation dans une solution de méthanol).	226	23 100
					265	11 600
					357	19 000
	M2	330	-	293	264	12100
					357	22900
	P1	298	-	> 320	267	11200
					342	14900
	Q1	328	-	-	362	15400
					267	11450
	Aflatoxicol	314	-	230 – 234	366	17500
					261	10800
	B2a	330	-	240	325	14100
					360	20400
	G2a	346	-	190	362	18000

II.1.3. Cinétique et devenir dans l'organisme

L'AFB1 est principalement transformée dans le foie en 8 métabolites: l'époxyde AFB1, l'AFM1, l'AFB2, l'AFQ1, l'AFP1, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H1 et l'aflatoxicol M1. Ces métabolites à l'exception de l'époxyde et de l'AFM1 sont généralement moins toxiques(El Assaoui, 2018).

II.1.3.1. Absorption

Leur absorption est possible par voie orale et trachéale. Elle est relativement rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle, plus précisément par diffusion passive au niveau du duodénum à travers de la membrane lipidique (El Assaoui, 2018), (Gauthier, 2016).

II.1.3.2. Distribution

Principalement au niveau du foie via la veine porte. Elle s'effectue à partir du plasma sanguin vers les hépatocytes. La forme circulante de l'AFB1 est majoritairement liée à l'albumine au début par des réactions réversibles, des liaisons covalentes ont été identifiées entre les résidus lysine de l'albumine sérique et les produits hydrolysés du métabolisme de l'aflatoxine B1 (figure 7), par formation d'une base de Schiff (Loic, 2008).

La distribution au sein même de la cellule se fait essentiellement au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique, du cytosol et des mitochondries (El Assaoui, 2018) ,(Gauthier, 2016).

II.1.3.3. Métabolisme

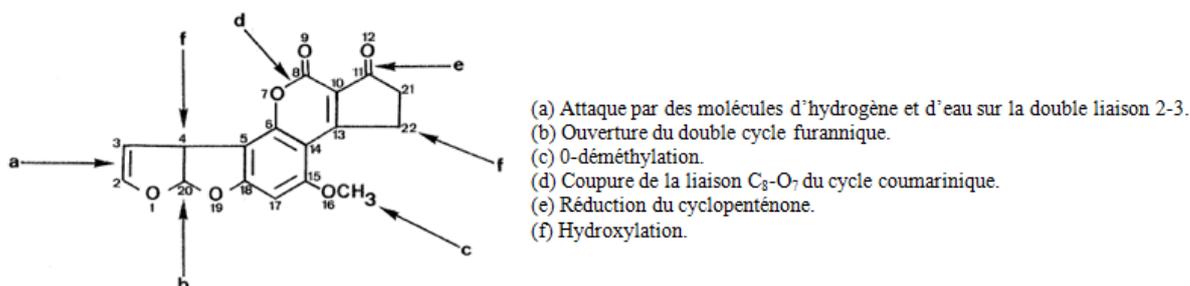


Figure 7 : Biodégradation de l'aflatoxine B1 (Krivobok, 1983).

a. Phase I

C'est la bio activation est principalement réalisée dans le foie mais la muqueuse gastro-intestinale possède aussi les enzymes capables d'activer l'AFB1 (Loic, 2008).

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

- Des réactions d'oxydation (via des mono-oxygénases à cytochrome P450) formant par hydroxylation l'AFM1 et par époxydation l'AFB1 8,9-époxyde.
- Une O-déméthylation pour former l'AFP1 qui est ensuite détoxifiée par une UDP-glucuronyl-transférase (Loic, 2008).
- Une réduction réversible de la fonction cétone (via une réductase NADPH dépendante cytosolique) pour former l'aflatoxicol (AFOL) (Krivobok, 1983), (El Assaoui, 2018).

b. Phase II

Métabolisme correspond à la détoxification de l'AFB1. Elle est principalement assurée par une réaction de conjugaison avec le glutathion réalisée par des Glutathion S-Transférase (GST) sur la fonction époxyde (figure 5).

L'AFB1 8,9 époxyde est aussi détoxifiée par des époxydes hydrolases conduisant à l'AFB1 Dialdéhyde ensuite transformé en AFB1-Dialcool par l'AFB1-Aldéhyde réductase (Krivobok, 1983),(Gauthier, 2016).

Bien que le métabolisme hépatique soit prédominant, un métabolisme pulmonaire est possible par l'intermédiaire d'enzymes oxydantes : la lipo-oxygénase et la prostaglandine-H-synthétase (El Assaoui, 2018).

II.1.3.4. Elimination

Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile sous forme conjuguée au glutathion ou de glucuro-conjugué.

Les glutathion-conjugués et glucurono-conjugués sont éliminés majoritairement dans la bile et aussi dans les urine (Krivobok, 1983), (Gauthier, 2016).

L'AFB1 est éliminé par voie urinaire sous forme inchangée ou sous forme métabolisée.

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 (figure 8) (Redouane-Salah, 2016).

Les adduits aflatoxine- guanine sont aussi retrouvés dans les urines et peuvent servir de bio-traceur comme les adduits aflatoxine-albumine plasmatiques (Loic, 2008).

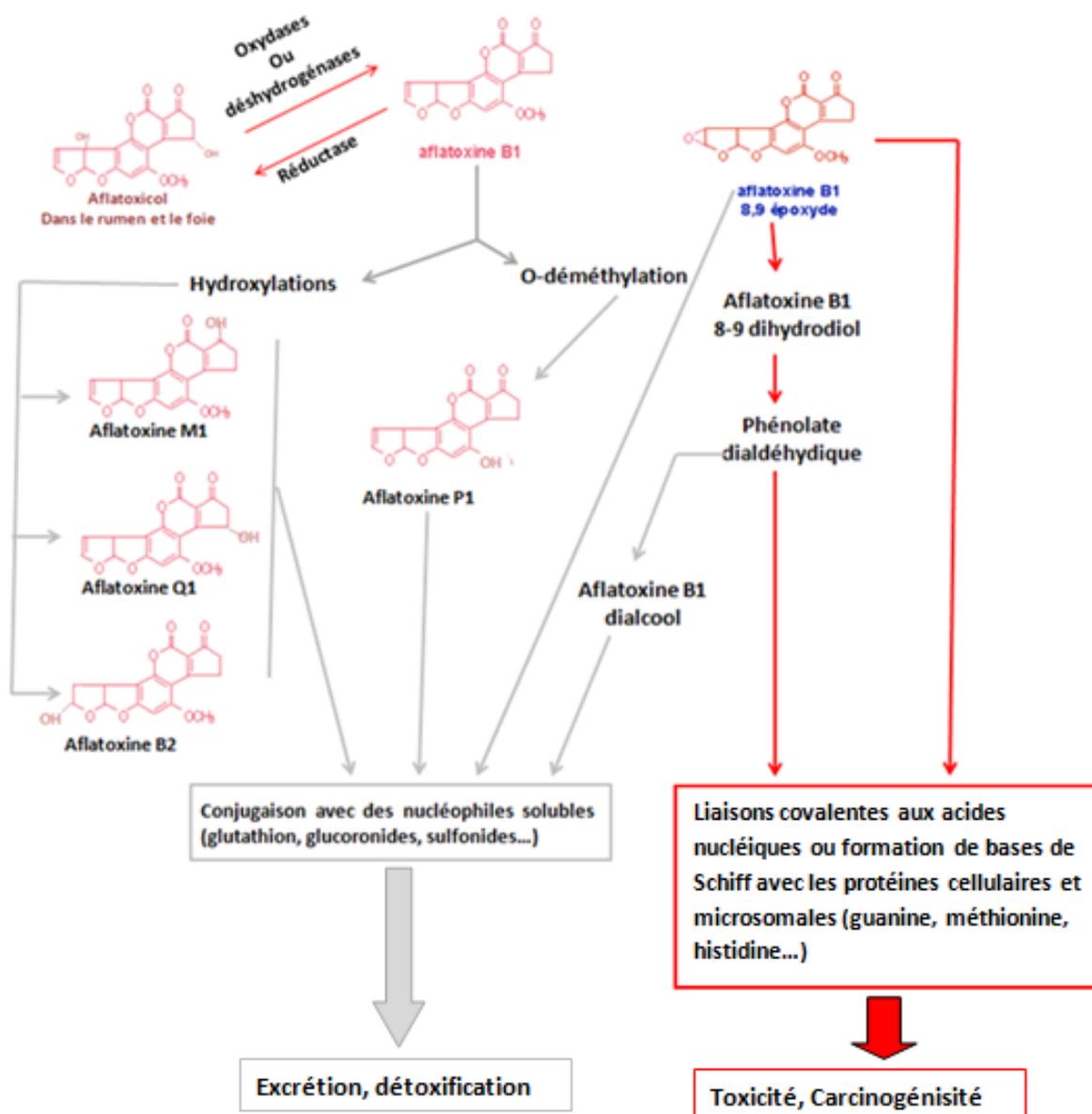


Figure 8 : Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie (El Assaoui, 2018).

II.1.4. Mécanisme d'action

II.1.4.1. Formation d'adduits à l'ADN

Les effets cancérigènes et mutagènes de l'AFB1 sont dus à sa biotransformation par les CYP450, ayant pour résultat la formation d'AFB1-8,9-époxyde. elle a une durée de vie courte mais est particulièrement réactif : il est considéré comme le principal métabolite génotoxique via sa fixation à l'ADN (figure 6). L'AFB1-8,9-époxyde va se lier de manière covalente à l'ADN, l'ARN et les protéines. Il a une affinité particulière pour l'azote N7 de la guanine. L'AFB1 est époxydée soit en dérivé exo, soit en dérivé endo. Seule la forme exo se fixe sur la guanine pour donner un adduit à l'ADN : le trans-8,9-dihydro-8 (7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (Guerre *et al.*, 1996).

C'est la présence de cet adduit qui est à l'origine des mutations (El Assaoui, 2018).

II.1.4.2. Métabolisme des protéines

L'effet immunosuppresseur semble être dû à l'altération de la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il a pour conséquences de provoquer une diminution de la prolifération, de la maturation et de la production des lymphocytes et cytokines (médiateurs de la signalisation cellulaire), une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages, ainsi qu'une diminution des fonctions neutrophile et inflammatoire (figure 9) (Gauthier, 2016).

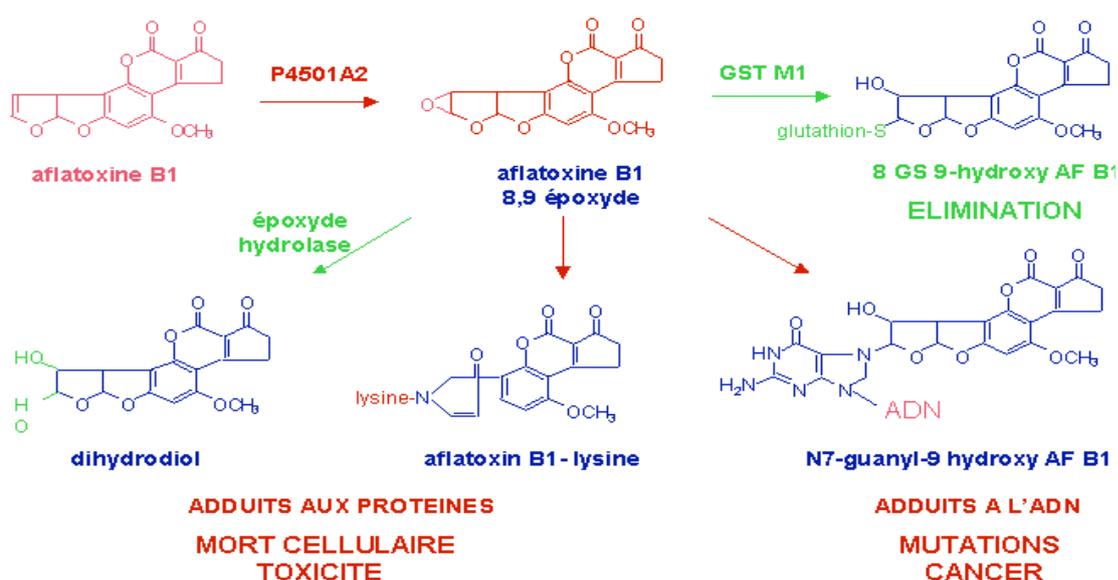


Figure 9 : Mécanisme d'action AFB1 (Guerre *et al.*, 1996).

II.1.5. Toxicité

L'Aflatoxine B1 est la seule mycotoxine ayant un rôle avéré dans l'apparition de certains cancers du foie. C'est la raison pour laquelle elle a été déclarée agent cancérigène pour l'Homme par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) (groupe 1) (Gauthier, 2016).

L'AFB1 possède des propriétés cancérigènes, hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques (Ahmadou, 2019).

II.1.5.1. Toxicité aiguë

Les effets d'une toxicité aiguë varient d'une espèce à l'autre suivant l'âge, le sexe, l'état général et le mode de contamination (Erastus, 2011).

Les cas de toxicité aiguë sont rares. Des cas d'intoxication aiguë remontent aux débuts des années 2000 au Kenya, et ont été attribués à l'ingestion de maïs contaminés. L'exposition à des doses massives d'Aflatoxines entraîne un ensemble de symptômes ressemblant à une hépatite aiguë : vomissements, ictère, douleurs abdominales, hépatomégalie et œdèmes (Erastus, 2011).

II.1.5.2. Intoxication chronique

Le foie est la cible privilégiée des Aflatoxines. Elle est fréquemment observée chez les animaux d'élevage (volailles, porcs, ruminants...). La toxicité chronique se manifeste par une diminution de la prise alimentaire, une asthénie voire un coma dans les cas très sévères. De même que pour une intoxication aiguë, le foie est pâle et présente des lésions de fibrose et parfois de cirrhose. Outre son rôle dans l'apparition d'hépatocarcinomes, l'exposition chronique aux Aflatoxines semble être à l'origine de troubles de la reproduction et de malformations fœtales (Meissonnier *et al.*, 2005).

II.1.6. Réglementation des aflatoxines

II.1.6.1. A l'échelle nationale

En Algérie, l'arrêté correspondant au 11 octobre 2006 rendant obligatoire la méthode de dosage de l'aflatoxine B1 et la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés (Journal officiel N°06/2007 du 11 Octobre 2006), (Tableau 4 ci-dessous).

Tableau 4 : Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (Fao, 2003).

Produits	Somme mycotoxines	Les Limites (µg/kg)	Méthodes d'échantillonnage	Méthode d'analyse
Produits d'alimentation humaine				
Arachide, fruits à coque, céréales	Aflatoxine B1	10	Non officielle	Officielle (DZ ₁)
	AFs : B1 B2 G1 G2	20		
Produits d'alimentation animale				
Aliments pour bétail	Aflatoxine B1	20	Non officielle	Officielle (DZ ₂)

Les données ont été fournies par le ministère du commerce algérien

DZ1: AOAC (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products – CB method Food and Drug Laboratories – Canada – Best food method.

DZ2: NF-VF (1980). Animal feed – aflatoxins measurement B1, June 1980:18-200.

II.1.6.2. A l'échelle internationale

Les pays de l'Union Européenne ont édité un règlement pour limiter la présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale (tableau 5).

Tableau 5 : Les teneurs maximales en AFs exprimées en µg/kg dans l'alimentation humaine et animale dans l'Union Européenne (Réglementation (CE) No 1881, 2006).

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.	2.5-8 (selon le produit et son stade de transformation).
Humaine	Aflatoxine B1	- Certaines épices.	5
		- Préparation à base de céréale et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge.	0.1
		- Arachides + autres graines + fruits sec.	4.1-15 (selon le produit et

	Aflatoxines B1+B2+G1+G2	- Céréales. - Certaines épices.	son stade de transformation). 4-10 (selon le produit et son stade de transformation). 10
--	------------------------------------	--	---

II.2. Caféine

II.2.1. Définition et structure chimique

La caféine a été découverte en 1819 par le chimiste allemand Friedlieb Ferdinand Runge qui la nomma "Kaffein" du fait de sa provenance du café, ce qui devint "caféine" en français. La caféine est présente dans les graines du caféier et dans les noix de cola (Coelho, 2014).

Pseudo-alcaloïde (1, 3, 7-triméthylxanthine) présent dans les boissons stimulantes et notamment dans le café (figure 10), le cacao et le thé (Moussaoui, 2013),(Coelho, 2014).

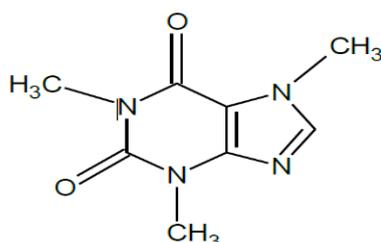


Figure 10 : Structure chimique de la caféine (Binder et Krska, 2012).

II.2.2. Propriétés physiques et chimiques

- La caféine se présente sous forme de poudre blanche ayant un goût extrêmement amer.
- La masse molaire de la caféine est égale à : 194 g/mol ;
- La température de fusion de la caféine est de 234 à 236,5 °C
- La caféine est stable dans les milieux acides et basiques, elle se présente sous forme d'une base faible et peut réagir avec des acides pour donner des sels, cependant dans une solution aqueuse neutre, elle n'est pas ionisée. Elle absorbe dans l'UV avec un maximum d'absorption à $\lambda = 274$ nm (Binder et Krska, 2012).

II.2.3. Toxicité

La caféine agit comme stimulant du système nerveux et peut entraîner des effets physiologiques importants. Son abus peut entraîner une intoxication appelée caféisme (Heath *et al.*, 2017).

Augmentant les perméabilités calciques membranaires et donc la concentration cytoplasmique de calcium, la caféine est une substance stimulante des systèmes nerveux, circulatoire et respiratoire; elle aussi diurétique. Par ces propriétés psychostimulantes, elle est connue pour accroître la vigilance, les capacités intellectuelles, diverses performances telles que l'acuité visuelle. En excès, elle est responsable de palpitations, insomnies, tremblements (Haler, 2013).

II.2.4. La caféine dans les cafés et leur métabolisme

- ✓ Le taux de caféine dans les cafés est sous la dépendance de facteurs génétiques

La teneur du café arabica est de l'ordre de 1%, celle du café robusta (*caniphora*) se situe environs de 2% (Charrier et Berthaud, 1975).

Tableau 6 : Le taux de caféine dans les cafés (Charrier et Berthaud, 1975).

Composants	Coffea arabica		Coffea robusta	
	Vert	Torréfié	Vert	Torréfié
Caféine	0,8- 1,4	0,9- 1,6	1,7- 4	1,2- 2,6

Cependant, il est possible d'éliminer la caféine ; le café ayant subi ce traitement s'appelle «décaféiné» (Chetatha, 2013),(Haler, 2013).

- ✓ La caféine est métabolisée, au niveau du foie, par le système enzymatique du

Cytochrome. Les cytochromes P450 sont une famille d'enzymes présentes au niveau hépatique ; ce sont eux qui métabolisent une grande partie des molécules, aussi diverses soient elles (Coelho, 2014).

Le processus de métabolisation passe notamment par trois étapes : l'oxydation, la déméthylation et enfin l'acétylation (Haler, 2013).

La caféine est éliminée très lentement (1/2 vie variable de 36 à 145 heures) dans les urines sous forme essentiellement inchangée (Haler, 2013).

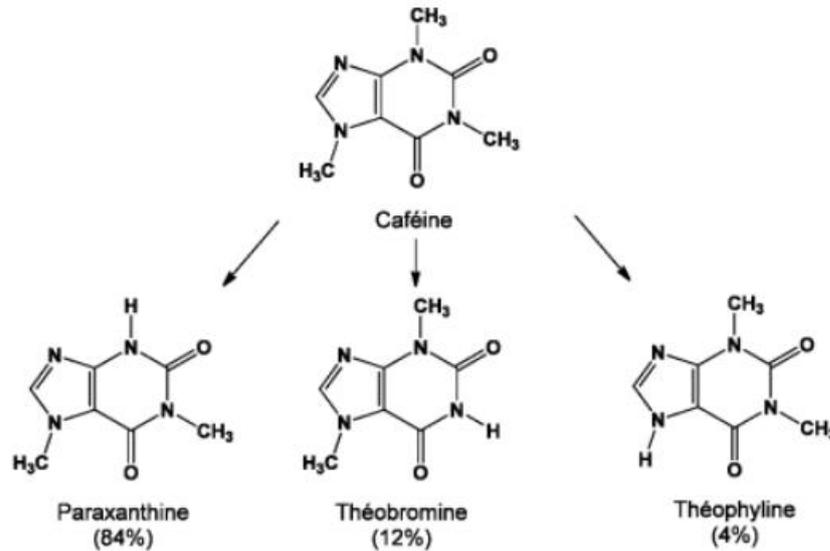


Figure 11 : Métabolisme de la caféine (Coelho, 2014).

II.3. Définitions des types de café utilisées

Café vert CV : la graine de café, avant d'être grillée est verdâtre, ce qui lui vaut le nom de café vert les graines sont brûlées pour dégager tout leur arôme puis moulues pour consommées n'étant pas torréfié, il conserve toutes les vertus originelles du caféier (Houessou, 2007).



Figure 12 : Café vert (Houessou, 2007).

Café torréfié CT : La torréfaction est une étape importante. Elle consiste à griller les grains afin de libérer les arômes du café. Le couple température-durée détermine les principales caractéristiques du café. Ainsi, la torréfaction dure de 10 à 20 minutes et s'effectue à des températures comprises entre 200 et 280 degrés (Bibal, 2019).



Figure 13 : Café torréfié (Bibal, 2019).

Café moulu emballé CE : Café torréfié réduit en poudre plus ou moins fin généralement à l'aide d'un moulin (Arrington, 2019).



Figure 14 : Café moulu (Arrington, 2019).

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

III.1. But de travail

Notre étude consiste à la recherche et la détection des AFB1 et la caféine dans le café commercialisé dans le marché de l'Est Algérien (Constantine).

III.2. Échantillonnage

Quarante quatre (44) échantillons de graines de café vert et torréfiées (3 cafés vert et 41 torréfiées) ont été collectés (Tableau7). Les échantillons du café ont été provenus de plusieurs supermarchés de Constantine. Les prélèvements ont été pris au hasard, ensuite ont été mis dans des sacs en plastique propres. Puis acheminés directement au laboratoire du département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khaider (Biskra), pour les analyses.

Tableau 7 : Les échantillons du café et leurs codages.

Echantillons	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE6	CE7	CE8	CE9
	CE10	CE11	CE12	CE13	CT14 (C1)	CT15 (C2)	CT16 (C3)	CT17 (C4)	CT18 (C5)
	CT19 (C6)	CT20 (C7)	CT21 (C8)	CT22 (C10)	CT23 (C3')	CT24 (C11)	CT25 (C12)	CT26 (C13)	CT27 (C14)
	CT28 (C15)	CT29 (C16)	CT30 (C17)	CT31 (C18)	CT32 (C19)	CT33 (C20)	CT34 (C21)	CT35 (C22)	CT36 (C23)
	CT37 (C24)	CT38 (C25)	CT39 (C27)	CT40 (C28)	CT41 (C29)	CV42 (C9)	CV43 (C5')	CV44 (C26)	

CE : Café moulu Emballé ; CT : Café torréfié ; CV : café vert.

C : Codage utilisé sur les plaques CCM.

III.3. Méthode chromatographie monodimensionnelle sur couche mince

III.3.1. Protocole d'AFB1

Le protocole que nous avons suivi est celui décrit par **Bio-Shield B1 ES (B2948 / B2996)**, **ProGnosis Biotech, NOVAKits**, version 14 (voir annexe 3).

III.3.1.1. Préparation de l'échantillon et extraction de l'AFB1

En général, les substances toxiques ne se trouvent pas à l'état libre dans les aliments, ils sont souvent liés à d'autres molécules adsorbants comme les prolines. L'extraction est une étape primordiale qui a pour but de récupérer ces substances des matrices analysées par un solvant approprié où ils sont habituellement plus solubles. Selon la liposolubilité de ces substances on utilise différents solvants purs ou un mélange de solvants.

L'extraction est une étape inévitable dans l'analyse des mycotoxines. Afin d'éliminer les impuretés et les autres substances gênantes qui peuvent interférer avec la toxine recherchée lors du dosage.

L'extraction est obtenue par agitation mécanique (ultra-turrax, blinder, agitateur, etc.) de l'échantillon finement broyé (échantillon solide) avec un solvant approprié et ceci pendant un temps suffisant pour que l'extraction soit aussi quantitative que possible.

Vingt grammes de café (vert ou torréfiés) finement broyés ont été mixés avec 100ml de solvant d'extraction (70% de méthanol, 30% d'eau distillé) pendant au moins 2 minutes. Le rapport échantillon /solvant d'extraction est 1/5.

Laisser les particules se déposer. Ensuite l'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Wattman n°1. Après filtration, un aliquote de 5 à 10 ml de ce filtrat est récupéré pour analyse par chromatographie sur couche mince (CCM), figure (15).

Remarque 1 : l'échantillon extrait doit avoir un pH de 6,2 à 7,5 (ProGnosis Biotech, 2015).

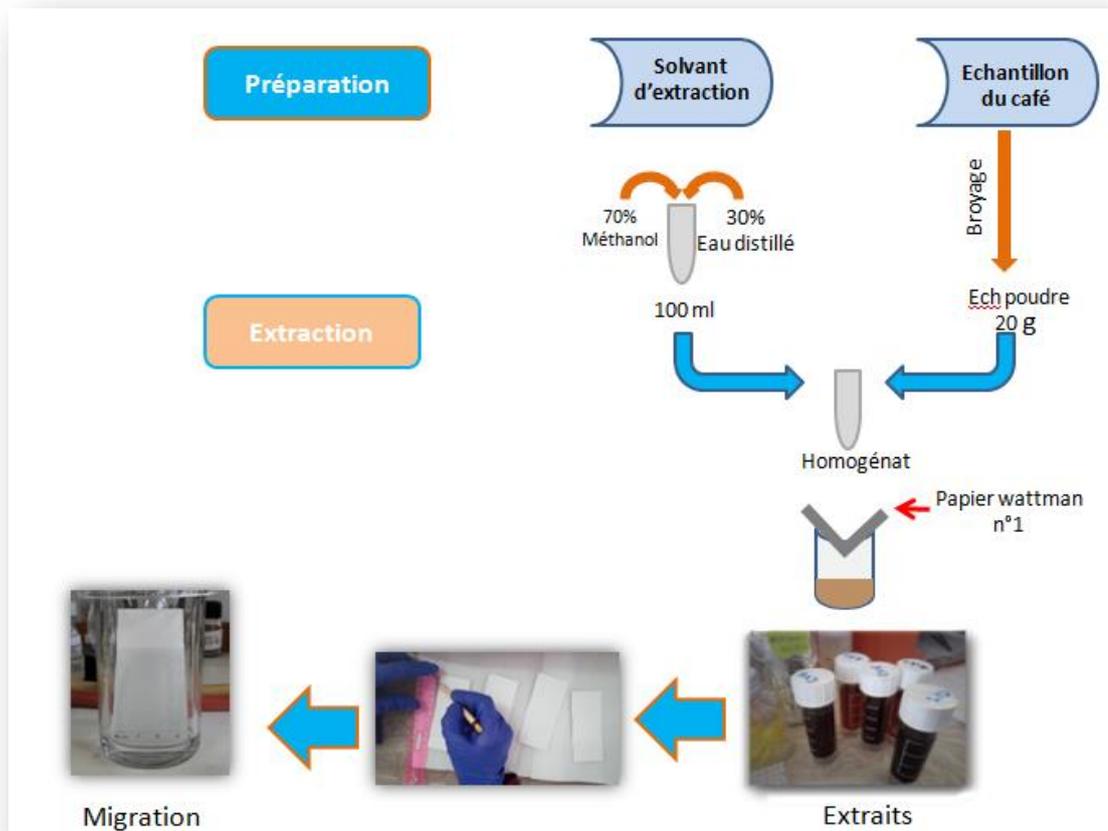


Figure 15 : Schéma du protocole d'extraction d'AFB1.

III.3.1.2. Chromatographie sur couche mince

La CCM est une technique analytique basée sur le partage des solutés entre un adsorbant fixe insoluble (phase stationnaire) et une phase liquide (phase mobile). Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre résultant aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation (Richard et Thurston, 1986).

La méthode permet de déterminer la teneur en aflatoxine B1 des échantillons. La limite inférieure du dosage est de 0,01 mg/kg (10 ppb) (Krivobok, 1983).

a. Préparation de la phase stationnaire

Nous avons utilisé une plaque gel de silice 60 (0,25 mm), (Figure 16). Après réactivation de la plaque CCM dans l'étuve à 107 °C pendant 30 minutes pour éliminer les molécules d'eau et faciliter la migration de l'AFB1, à 1 ou 1,5 cm du bord inférieur, tracer délicatement au crayon un trait fin (ligne de dépôt). La ligne de dépôt ne devra pas tremper dans l'éluant.

Marquer sur la ligne de dépôt les emplacements correspondant aux échantillons à déposer en gardant un espace entre les échantillons. Repérer par un chiffre ou une lettre les emplacements.



Figure 16 : Plaque CCM gel de silice 60.

b. Préparation de la phase mobile

- Système du solvant :

Système 01 : Chloroforme – acétone- eau (88/12/1,5), (Mahnine, 2017).

Système 02 : Chloroforme – acétone – hexane (85/ 15/20), (Krivobok, 1983).

- Choix de système :

Pour plaque CCM du gel de silice (Silice 60, épaisseur 0,25 mm). La phase mobile composée du système de solvants : chloroforme/acétone/eau (88/12/1,5), (Mahnine, 2017).

Sous la hotte, un mélange de 10 ml de système de solvant a été préparé (chloroforme/acétone/eau (88/12/1,5). L'utilisation du système du solvant doit être pendant 3 jours au maximum et la conservation à 4°C dans une boîte de verre couverte par un papier aluminium.

c. Vérification des standards

- Standards AFB1

Afin de vérifier nos standards et choisir le meilleur système de solvant, nous avons testé deux systèmes et essayé plusieurs concentrations des deux marques de standard (Tableau 8).

1. Standard Bio-Shield B1 ES avec plusieurs concentrations S1: 0,2 ng/ml S2: 0,5 ng/ml S3: 2 ng/ml S4: 0,1 ng/ml S5: 00 ng/ml (Figure 17).

Remarque

Tous les standards d'AFB1 doivent être réchauffés à température ambiante avant utilisation et couverts lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

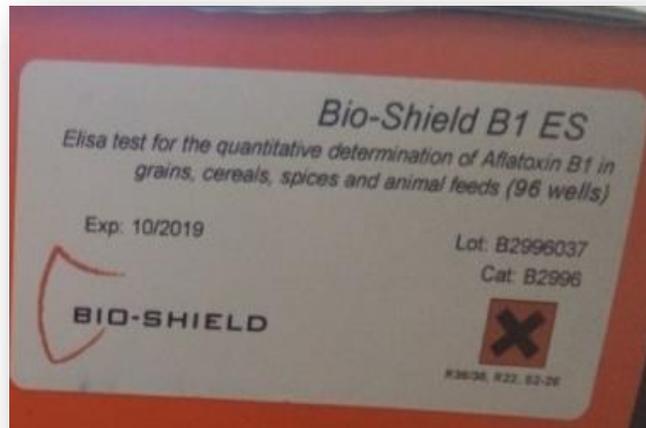


Figure 17 : Standard AFB1 BIO-SHIELD B1 ES.

2. Standard ALEXIS : Standard ALEXIS 1 : 50 μ g/ml et Standard ALEXIS 2 : 100 μ g/ml

La poudre d'AFB1 a été solubilisée dans le DMSO (Figure 18).



Figure 18 : Standard AFB1 ALEXIS biochemicals.

Tableau 8 : Essai des standards et des systèmes.

Numéro d'essai	Plaque De silice	Système du solvant	Standards	Travail Au L'obscurité	Quantité déposée
Essai N : 01	la plaque gel de silice 60 (0,25 mm)	Chloroforme acétone eau (88 /12/1,5)	Bio-Shield B1 ES	NON	2µl
Essai N : 02		chloroforme acétone hexane (85/15/20)		OUI	10µl
Essai N : 03			ALEXIS		5µl

d. CCM des échantillons

Déposer ponctuellement sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, à 1,5 cm du bord inférieur et à des intervalles de 0,5 à 1 cm, les volumes indiqués ci-après de la solution standard et de l'extrait:

1 ; 2 et 5µl de la solution standard d'aflatoxine B1.

25µl de l'extrait obtenu.

Introduire délicatement la plaque dans la cuve et veiller à ce que la ligne de dépôt ne soit pas au contact de l'éluant.

Laisser évaporer les solvants à l'abri de la lumière. Faire toutes les étapes en basse lumière.

e. Révélation des taches d'AFB1

Irradier par la lumière UV en plaçant la plaque à 365nm (Figure19). Les taches d'aflatoxine B1 donnent une fluorescence bleue. L'intensité d'irradiation doit permettre de distinguer encore nettement une tache de 1,0 ng d'aflatoxine B1 sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, à une distance de 10 cm de la lampe.



Figure 19 : Lampe UV 365nm et 254nm (département de Chimie Biskra).

III.3.2. Recherche de la Caféine

A. Extraction

L'extraction de la caféine a été réalisée par le méthanol 70%, suivant le même protocole décrit par Bio-Shield B1 ES (B2948 / B2996), ProGnosis Biotech, NOVAKits, version 14.

B. Standard de caféine

Dissoudre 0.2 mg de caféine dans un mélange de 4 ml de méthanol et 6 ml de chlorure de méthylène, compléter à 10 ml avec le même mélange de solvants (Saddoun *et al.*, 2018).

On faire un essai (Essai 4) pour vérification du standard.

Remarque

On faire les même étapes que l'AFB1 et la déposition des même quantités sur une plaque pour chromatographie sur couche mince.

C. Révélation des taches de caféine

La révélation des taches de caféine a été faite sous la lumière UV en plaçant la plaque CCM à 254 nm. Les taches de caféine donnent une fluorescence brune.

On appelle rapport frontal, RF (ou référence front, coefficient de migration) le rapport suivant :

Distance parcourue par le soluté / Distance parcourue par le solvant

La figure ci-dessous montre comment calculer le RF :

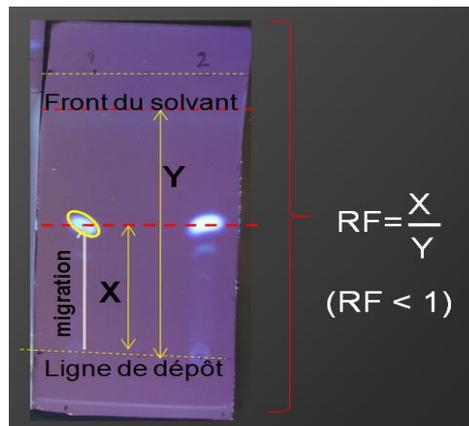


Figure 20 : Calcule de rapport frontal.

III.3.3. Précaution de manipulation et décontamination du matériel utilisé

Les mycotoxines et surtout les aflatoxines sont des substances très toxiques, leur pouvoir à introduire le cancer a été confirmé (IARC, 1993). Leur manipulation doit se faire avec le maximum de précaution. Le manipulateur doit porter des gants de protection en évitant tout contact cutané. En cas de contact laver abondamment avec de l'eau. Toute manipulation de ces standards doit être effectuée avec le maximum de précaution sous une hotte de sécurité chimique.

La décontamination du matériel contaminé par les mycotoxines est faite selon les procédures internationales de l'IARC. A la fin de chaque série d'analyse, tout le matériel utilisé doit être décontaminé par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) pendant toute la nuit sous une hotte de sécurité chimique. Un lavage normal par un détergent suivi par un rinçage avec de l'eau distillée doivent être effectués après décontamination.

Chapitre 4 : Résultats et discussions

Afin de pouvoir rechercher et détecter l'AFB1 et la caféine dans le café, un total de 44 échantillons de café (café vert, café moulu et graines de café) commercialisé dans le marché de l'Est- Algérien (Constantine) en Décembre 2019, nous avons effectué dans un premier temps une recherche de l'AFB1 par une CCM. Dans un deuxième temps, nous avons essayé de rechercher et détecter la caféine dans les différents échantillons collectés toujours par CCM.

IV.1. Recherche et détection de l'AFB1 par CCM

La fluorescence bleue observée est caractéristique de celle de l'AFB1 sous lumière UV (365 nm) et était comparable au témoin obtenu par dépôt direct d'un standard pur d'AFB1 (Richard et Thurston, 1986).

La comparaison de la fluorescence des échantillons contaminés et des Rf par rapport à ceux du témoin d'AFB1 ou caféine permet de valider la positivité ou la négativité de nos résultats. (Annexe 1 et 2).

Les résultats obtenus après révélations sous UV (365 nm) ont été collectés dans les figures suivantes (21, 22, 23, 24 et 25).

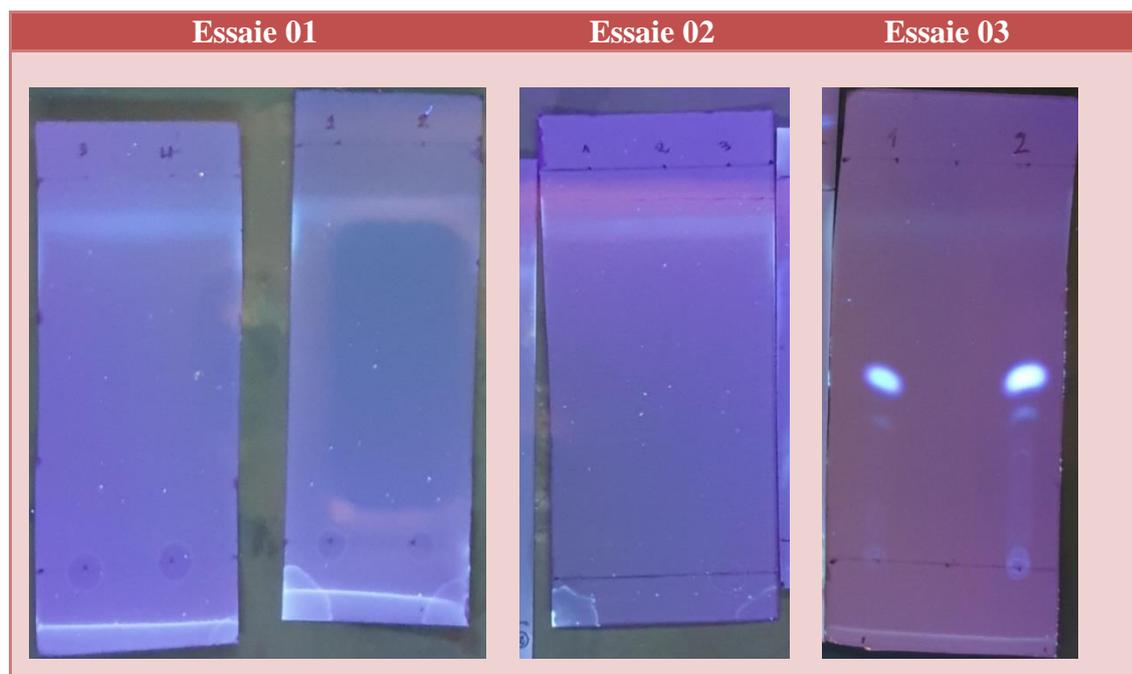


Figure 21 : Révélation des plaques CCM d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).

D'après la figure 21, on constate que l'essai 03, présente des spots clairs et fluorescents en bleu qui est relatif au standard AFB1, la révélation a été faite sous une lampe UV. Les essais 01 et 02 ne présentent aucune tache du standard d'AFB1 car le standard a été utilisé sous forme diluée.

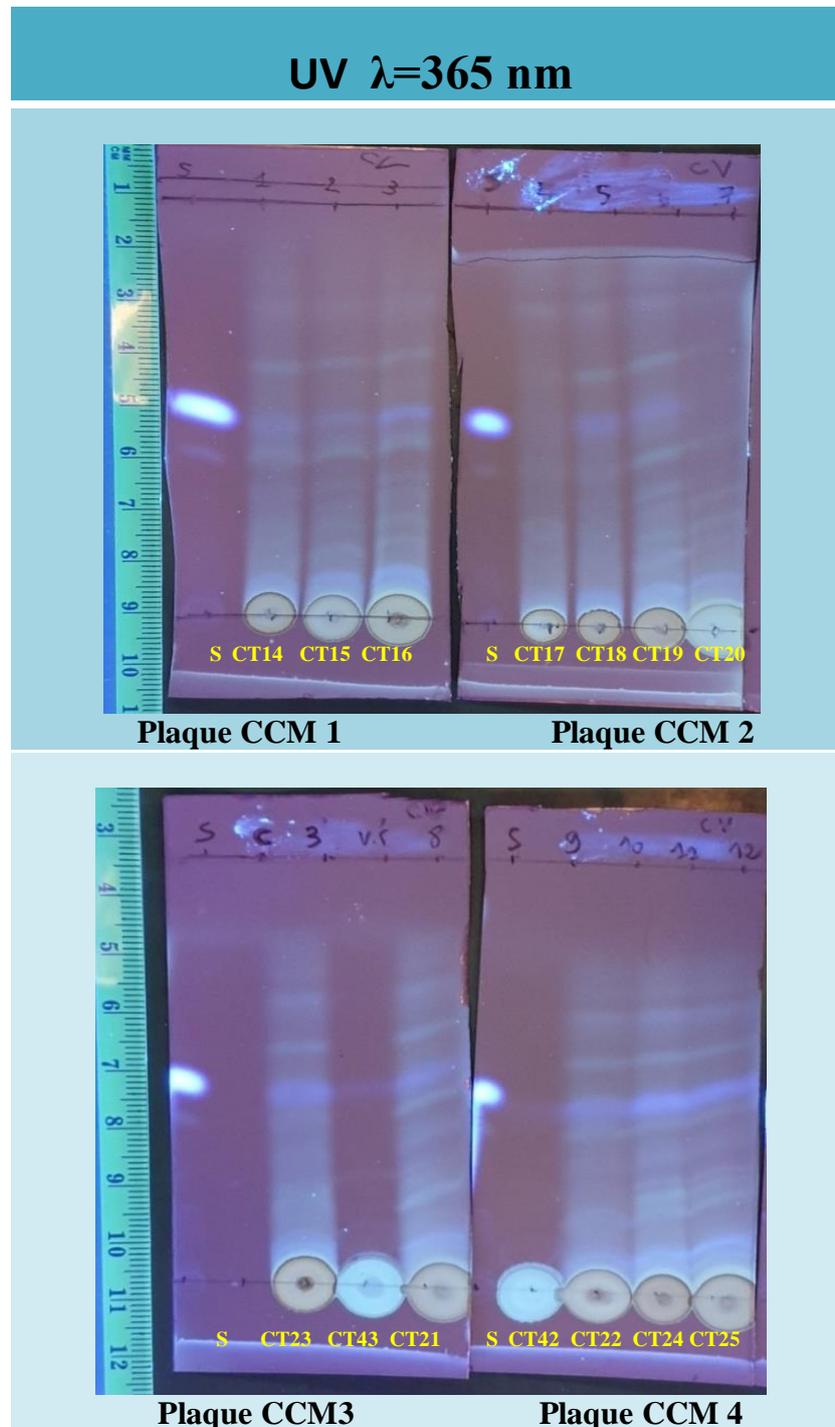


Figure 22 : Révélation des plaques CCM1 jusqu'à 4 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).

D'après la figure 22 et annexe 1, on constate bien que toutes les taches fluorescentes visibles sont sur la même hauteur ce qui nous permet d'affirmer que cette substance est bien de l'AFB1. Nous avons pris soin de calculer le rapport frontal ainsi obtenu $R_f 0,6$.

On constate également l'absence du spot fluorescent en bleu, dans les échantillons (CT17/CT20/CV43/CV42) et ceci en comparant avec le spot du standard d'AFB1.

Par conséquent, on peut confirmer qu'il n'y a pas des contaminations d'AFB1. Les échantillons (CT14/CT15/CT19/CT22) présentent une intensité claire en bleue. Les échantillons (CT16/CT18/CT21/CT25) présentent une intensité plus importante en comparant avec le spot du standard d'AFB1. En revanche, L'échantillon CT24 présente le spot le plus intense de tout les échantillons, ce qui nous permis de confirmer qu'il s'agit de l'échantillon le plus contaminée par rapport aux autres échantillons.

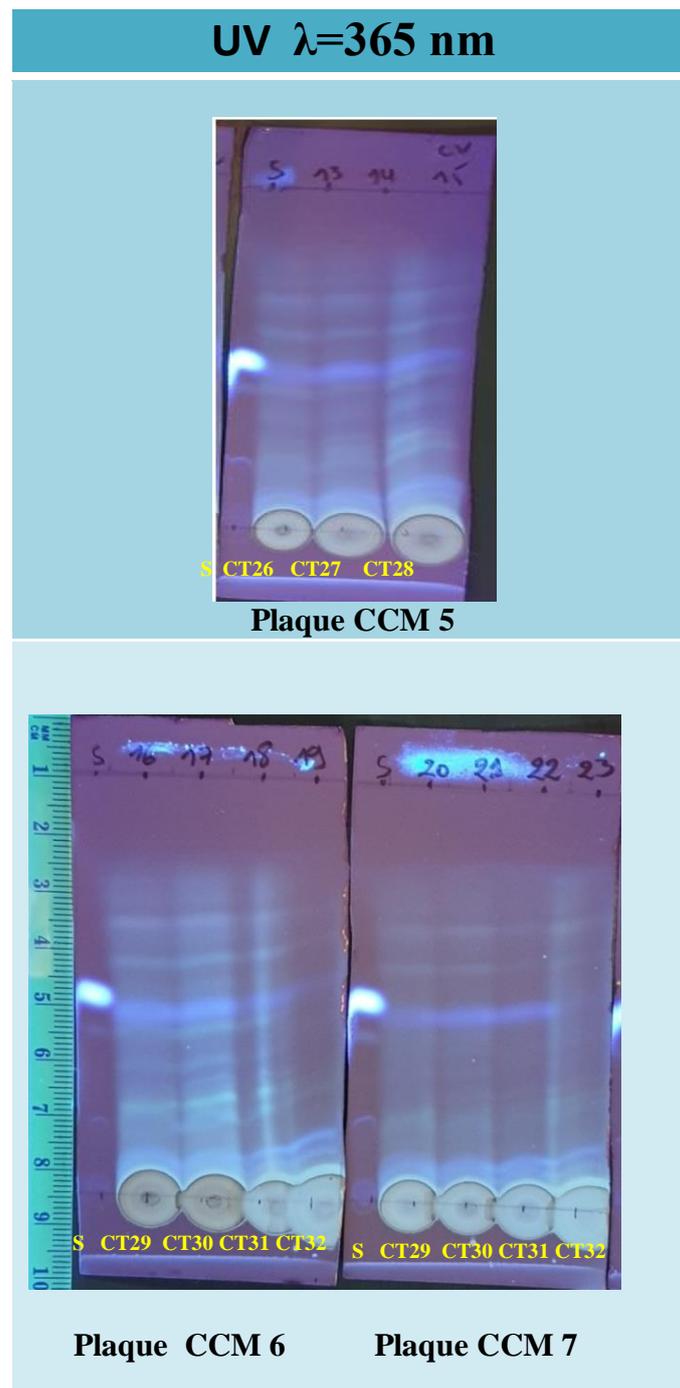


Figure 23 : Révélation des plaques CCM5 jusqu'à 7 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).

On constate l'absence du spot fluorescent en bleu, dans les échantillons (CT 36/CT32) et ceci en comparant avec le spot du standard d'AFB1. Par conséquent, on peut confirmer qu'il n'y a pas des contaminations d'AFB1.

Les échantillons (CT27/CT28/CT31/CT33/CT34) présentent une fluorescence moins importante en bleue, par rapport les échantillons (CT29/CT30/CT35), qui présentent une intensité plus importante en comparant avec le spot du standard d'AFB1.

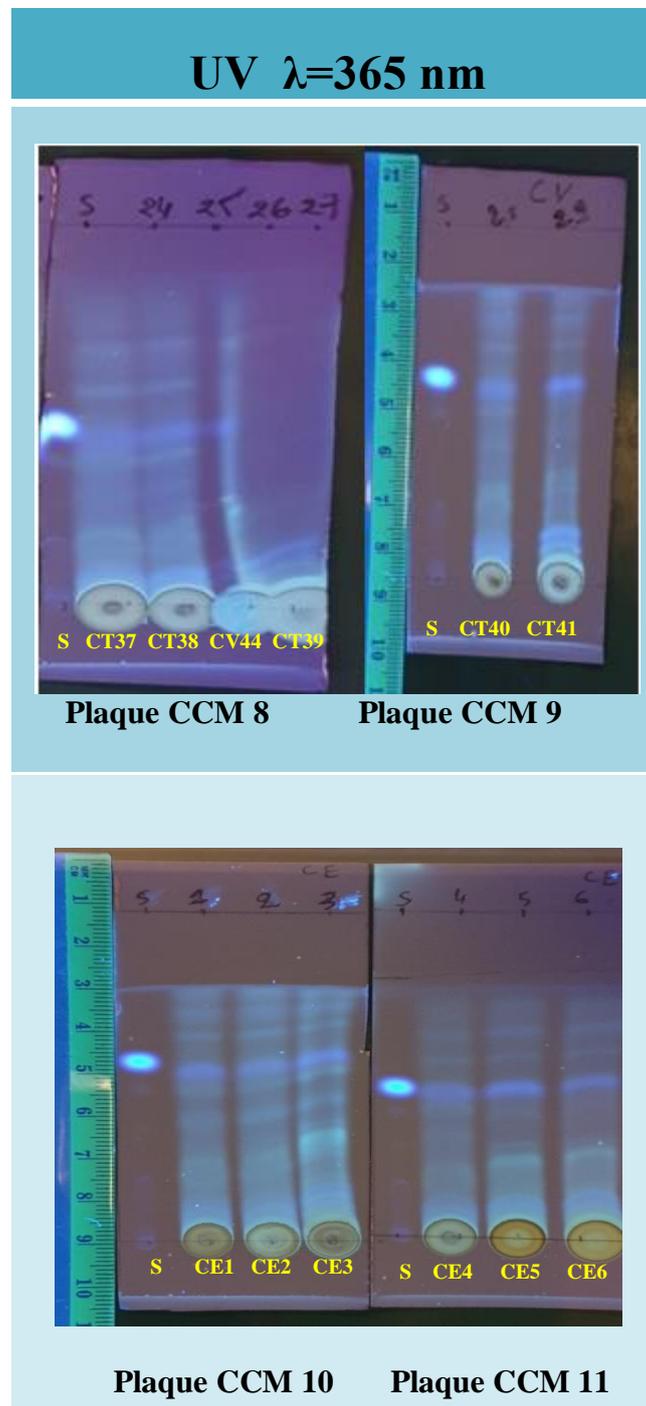


Figure 24 : Révélation des plaques CCM8 jusqu'à 11 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365$ nm).

D'après la figure 24 et annexe 1, on constate que les échantillons (CV44/CT39) ne présentent aucune contamination par l'AFB, ceci est justifier par l'absence du spot fluorescent sur la plaque CCM 8.

Les échantillons (CT37/CT38/CT39/CT40/CT41/CE1/CE2/CE3/CE4/CE5/CE6) semble être contaminés par l'AFB1, car ils dévoilent une intensité plus au moins importante, en comparant avec le standard.

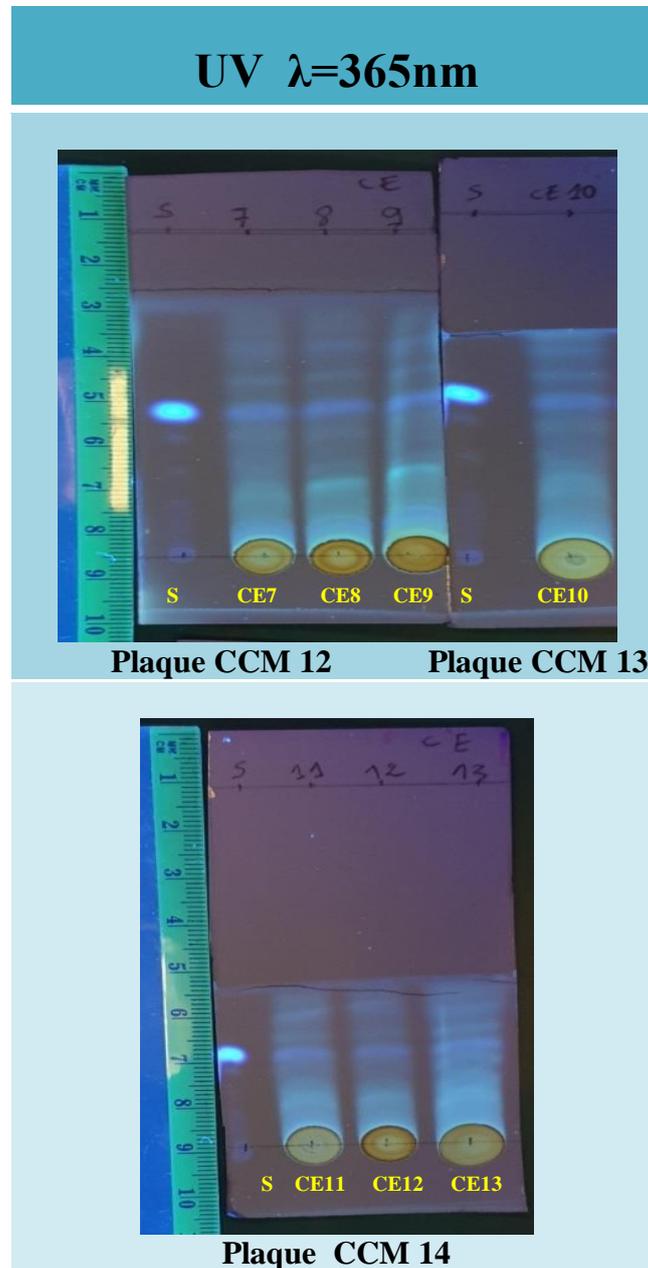


Figure 25 : Révélation des plaques CCM12 jusqu'à 14 d'AFB1 sous UV ($\lambda=365\text{ nm}$).

D'après la figure 25 et annexe 1, on remarque que tous les échantillons sont contaminés par l'AFB1 mais avec des concentrations plus au moins variables comme il est indiqué sur les plaques CCM 12, 13 et 14.

IV.2. Représentation graphique des résultats de l'AFB1

Afin de mieux présenter nos résultats, nous avons essayé de les représenter sous forme de camemberts ci-dessous.

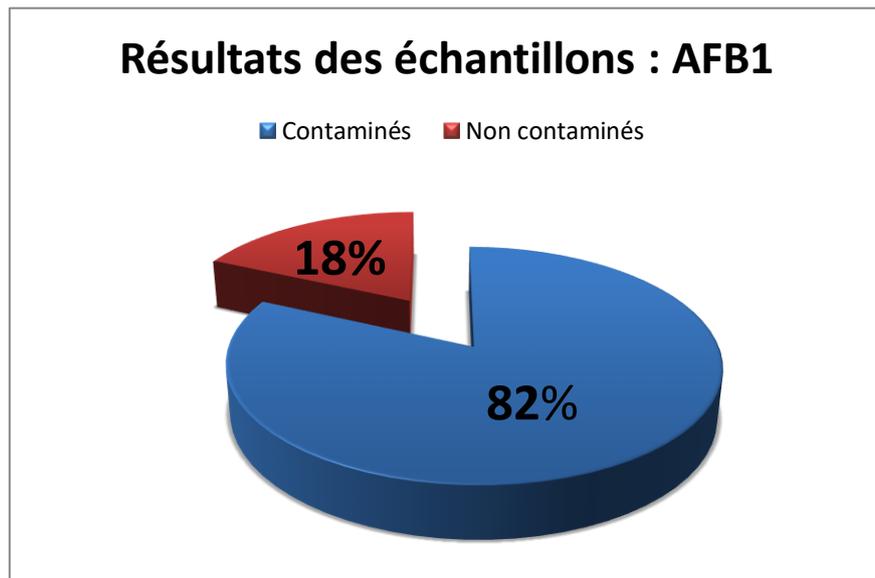
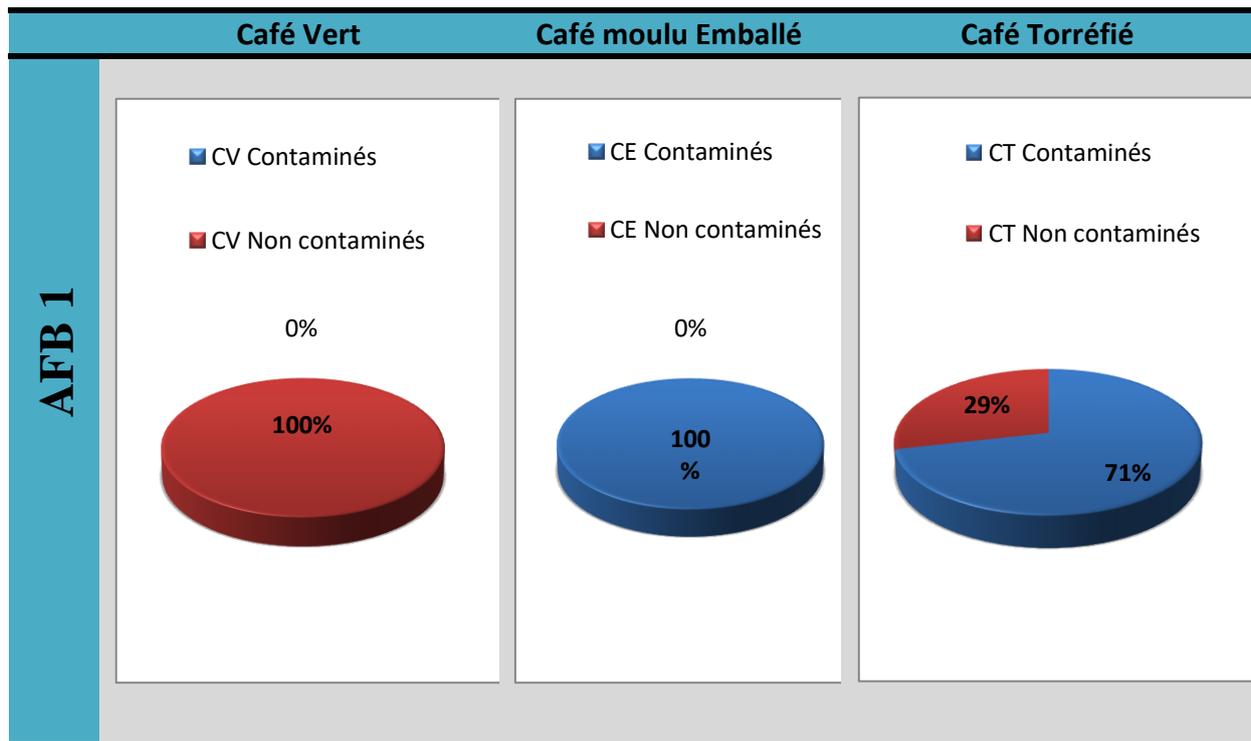


Figure 26 : Graphe représente les résultats de la contamination par AFB1.

Tableau 9 : Comparaison entre les trois types de café.



IV.3. Recherche et détection de la caféine par CCM

Les résultats des chromatogrammes obtenus après la migration des échantillons du café avec le témoin de caféine à la longueur d'onde 254 nm sont présentés ci-dessous.

La fluorescence brune observée est caractéristique de celle de caféine sous lumière UV (254 nm) et était comparable au témoin obtenu par dépôt direct d'un standard pur de caféine (Huyghe, 2014).

L'essai 4, présente un spot clair et fluorescent en brune qui est relatif à la standard caféine (figure 26).

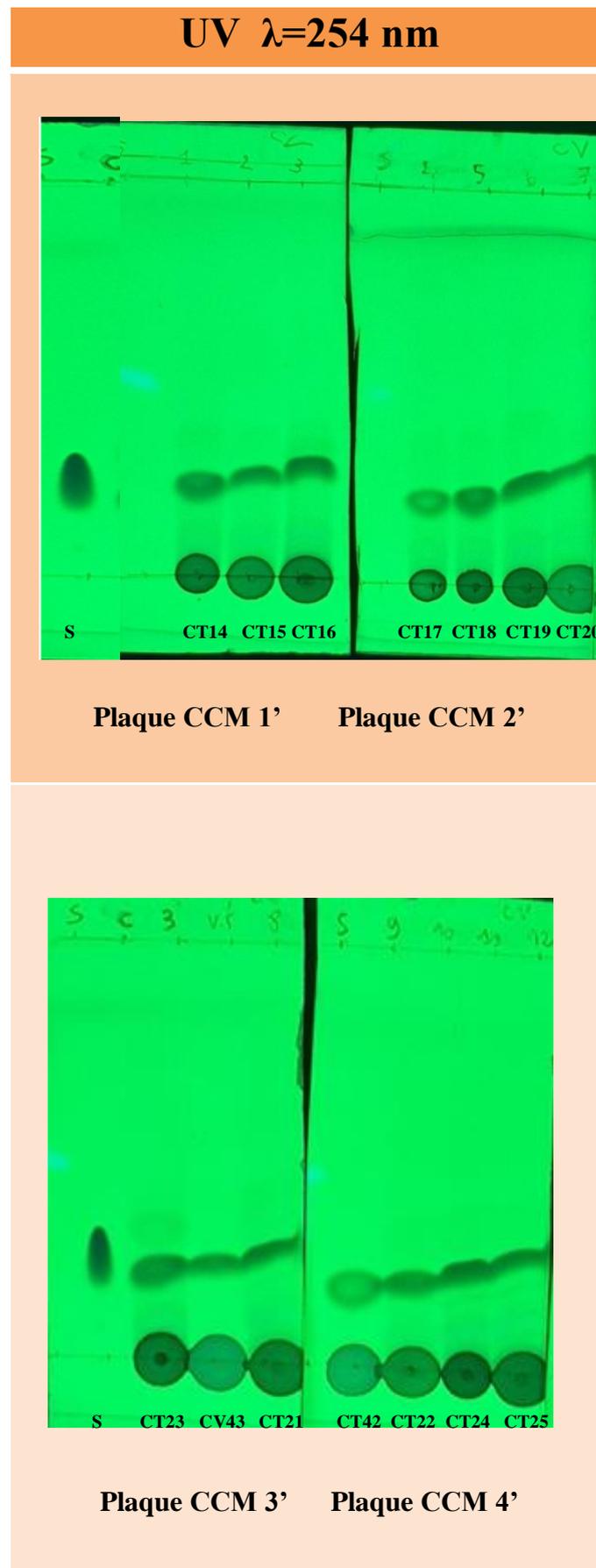


Figure 27 : Révélation des plaques CCM1' jusqu'à 4' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).

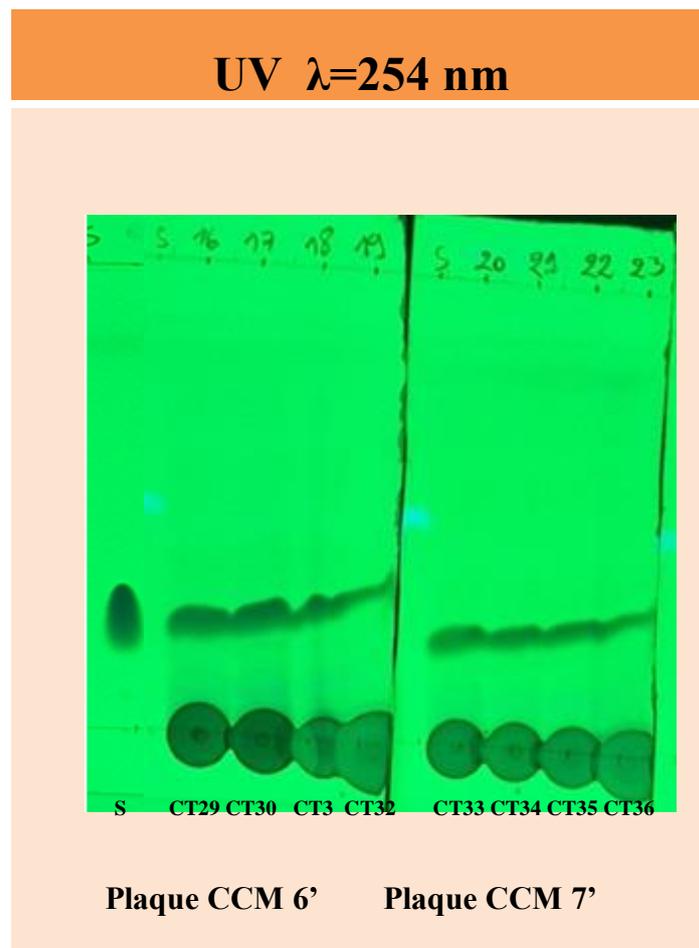


Figure 28 : Révélation des plaques CCM6'et7' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).

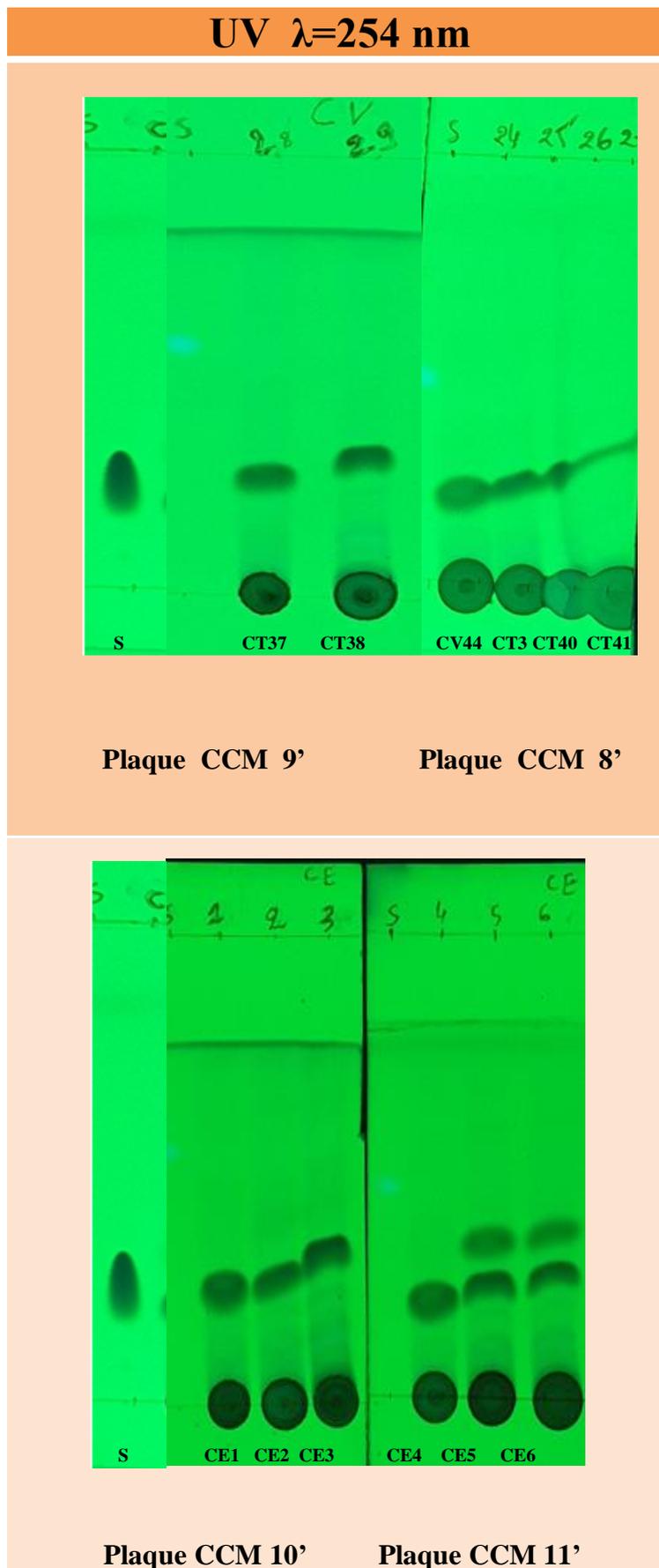


Figure 29 : Révélation des plaques CCM8' jusqu'a 11' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).

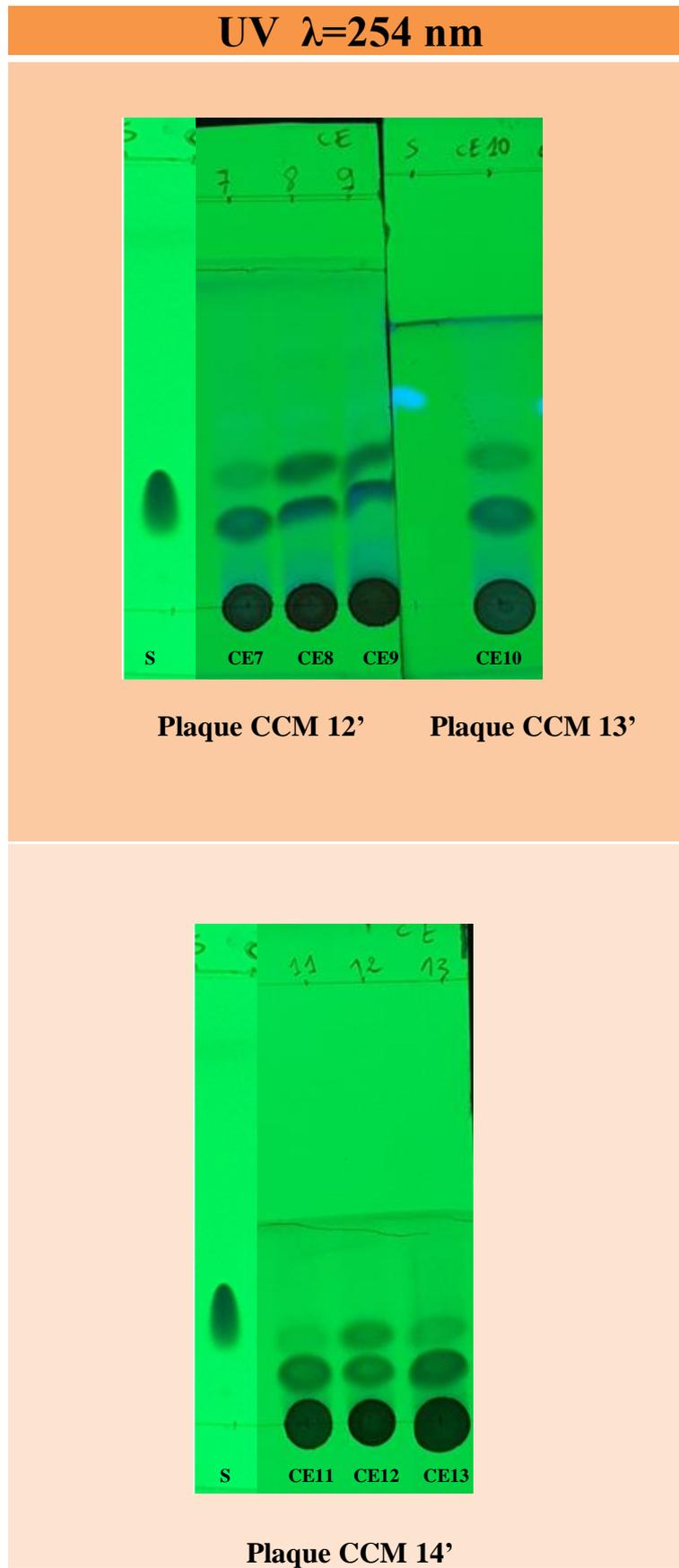


Figure 30 : Révélation des plaques CCM12' jusqu'à 14' de caféine sous UV ($\lambda=254$ nm).

D'après les figures 27, 28 et les plaques CCM 8', 9' et 10' de la figure 29, nous pouvons constater la présence des taches bien distinctes à la même hauteur que la tache de la caféine de référence (standard), pour confirmer que ces taches correspondent à la caféine nous avons calculé le rapport frontal Rf.

D'après l'annexe 2, La moyenne de RF du standard de la caféine = 0,33 Et le Rf des échantillons entre 0,27 et 0,36

Nous pouvons remarquer que les rapports frontaux des échantillons et du standard sont très proches, ce qui nous permet d'affirmer qu'il s'agit de la même espèce chimique et que cette substance est bien de la caféine.

Nous avons également constaté que les taches de caféine extraite de certains échantillons semblent plus foncées que d'autres, ceci est expliqué par la concentration de la caféine dans l'échantillon du café. Les échantillons (CT21/CT22/CT24/CT25/ CE7/CE 8/CE 9/CE 13) contiennent une intensité plus foncée semblable au standard.

Nous avons également noté la présence de faible tache au dessus de celle de la caféine, malheureusement nous n'avons pas pu les identifier.

IV.4. Représentation graphique des résultats de la Caféine

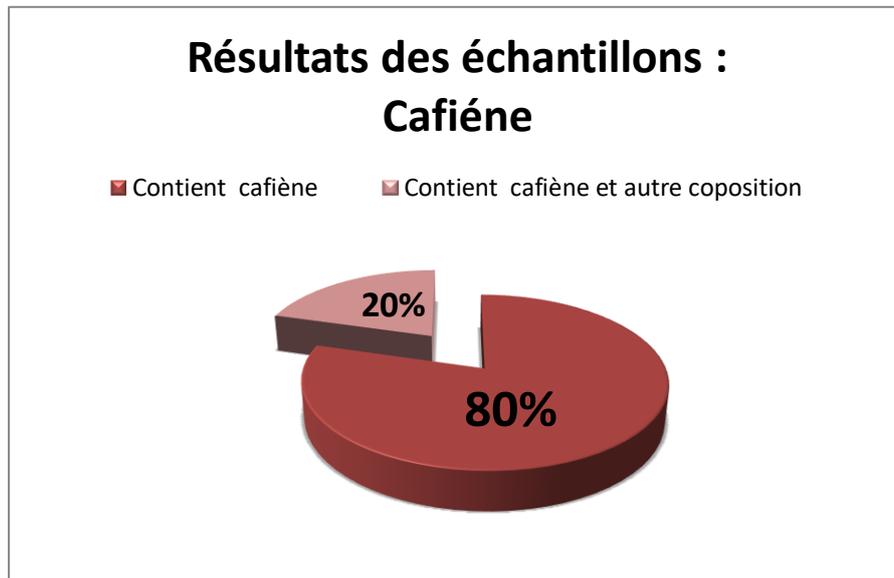
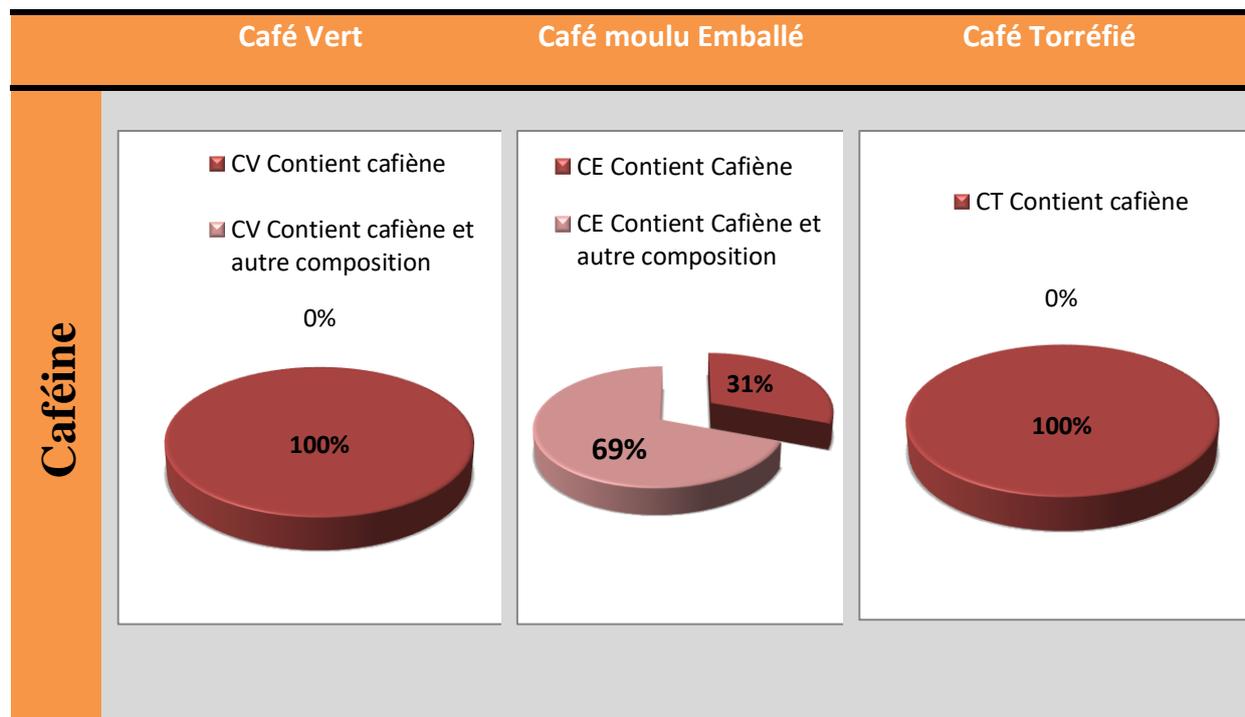


Figure 31 : Graphe représente les résultats pour Caféine.

On a 35 échantillons contiennent caféine et 9 échantillons contiennent caféine et autre composé.

Tableau 10 : Comparaison entre les trois types de café.



IV.5. Discussions des résultats de l'AFB1

D'après la figure 31, on constate que 82% des échantillons de café analysés sont contaminés par les AFB1, contre 18% non contaminés.

Parmi les échantillons contaminés, 100% des échantillons du café emballé sont contaminés par les AFB1, 71% des échantillons de graines de café torréfiées sont contaminés, en revanche les graines de café vert sont exemptes de toute contamination par les AFB1 (Tableau 9).

82% des échantillons contaminés est un pourcentage très important pour donner un indice du danger sur la qualité de nos cafés.

L'absence d'AFB1 dans le café vert CV, n'est pas vraiment représentative, vu le nombre des échantillons analysés (trois échantillons est un nombre insuffisant). Ce résultat ne semble pas corroborer les résultats trouvés par Chetatha, (2013), qui a montré la présence de

l'AFB1 en quantité considérable dans le café vert de l'ordre de 1,683 jusqu'à 6,778ppb, en utilisant la technique immuno-enzymatique ELISA.

Selon Ahmadou, (2019) le café est considéré comme un substrat favorable au développement des *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* et par conséquent la production des AFB.

Les conditions de conservations mal contrôlées posent aussi un risque majeur pour la formation des mycotoxines et la durée de stockage à une grande influence sur le développement de la flore fongique et la contamination par mycotoxines (Ahmadou, 2019).

IV.6. Discussions des résultats de la Caféine

D'après la figure 32, on constate que 80% des échantillons de café analysés contiennent la caféine, par contre 20% restant contiennent la caféine et autre composition.

Plusieurs paramètres influent sur la concentration en caféine de la café boisson : la variété de café, son origine géographique, la quantité de café employée, le mode de préparation choisi, le volume de café boisson préparé ou encore la durée de préparation.

Notamment la caféine puisque cette molécule est peu affectée par l'étape de torréfaction et qu'elle est présente en teneurs sensiblement plus élevées dans le café vert robusta que dans l'arabica (le café Arabica contient en moyenne deux fois moins de caféine que le café Robusta) (Charrier et Berthaud, 1975).

Des études ont montré que la caféine est d'une grande importance dans le café, en raison de ses propriétés physiologiques et de son caractère amer. C'est l'une des molécules les plus étudiées. On lui confère de nombreuses propriétés sur les systèmes neurologiques, cardiovasculaires, digestifs et moindre occurrence du cancer du colon ou du rectum (Heath *et al.*, 2017).

Au contraire une analyse dit qu'une consommation modérée, inférieure ou égale à 400 milligrammes par jour soit l'équivalent de 4 tasses de café par jour, n'entraîne en général pas de modification de l'organisme pouvant conduire à diverses maladies. Une telle consommation tend même à prévenir certaines pathologies de type maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, certains cancers... (Nehlig, 2012).

Il faut, en revanche, prêter une attention particulière à certaines populations. On remarque que les enfants, tout comme les adolescents, consomment de plus en plus de caféine, notamment à travers les boissons au cola et les boissons dites énergisantes.

Les recommandations en termes de consommation de caféine sont de 2,5 mg/kg de caféine maximum par jour pour les enfants. De même, les femmes enceintes ou allaitantes devront limiter leur consommation à 250 milligrammes de caféine, tout en sachant que le café décaféiné est préférable (Nehlig, 2012).

Enfin, il peut être conseillé de limiter la consommation notamment en ce qui concerne les pathologies cardiaques, les personnes souffrant de troubles du sommeil, de troubles anxieux, et de verser périodiquement le type de café.

Conclusion

Conclusion

Les mycotoxines sont des composés issus du métabolisme secondaire des moisissures et sont dotées d'un potentiel toxique réel à l'égard de l'Homme et de l'animal. Les toxines fongiques se retrouvent à l'état de contaminants naturels dans de nombreuses denrées destinées à l'alimentation animale et humaine (Okonofua, 2015).

L'aflatoxine B1 (AFB1), est classée dans le groupe 1 (cancérogène pour l'Homme), par le CIRC (1) en 1993.

Il est considéré comme l'un des plus puissants cancérogènes génotoxiques naturels. Son organe cible est le foie.

82% des échantillons du café analysés par CCM sont contaminées par l'AFB. On peut conclure que la chromatographie sur couche mince est très concluante comme une analyse qualitative et rapide mais il est nécessaire d'aller vers d'autres techniques quantitatives.

La consommation du café contaminé par les mycotoxines, notamment l'aflatoxine B1, pourrait mettre en danger la santé des consommateurs, et même provoquer des dégâts économiques graves.

En perspective de :

- ✓ Effectuer d'autres études plus approfondies et élargies sur tout le territoire national ;
- ✓ Introduire les analyses mycotoxicologiques (AFB1), comme paramètre d'analyse permanent et de routine à l'échelle national ;

- ✓ Recherche des techniques plus faciles, avec des résultats plus fiables et précis pour la détection des AFs ;
- ✓ Maintenir un bon niveau de contrôle des aliments (café, céréales, maïs, blé, etc.)
Surtout lorsque les aliments importer en grands quantités et contient une pouvoir nutritionnelle grands.
- ✓ 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 ; surtout climatiques sont favorables aux contaminations par les moisissures (au champ ou au stockage) ;

- ✓ Nous appelons à une réflexion sérieuse et urgente sur l'élaboration de normes algériennes relatives à la contamination par les mycotoxines.

- ✓ Qu'elle que soient les effets de la caféine bénéfiques ou négatifs finalement le consommateur qui choisira, le plus important c'est le taux de caféine doit être indiquée sur l'emballage de café.

Bibliographie

Bibliographie

- Ahmadou, A. (2019). Réduction de la mycotoxicité dans l'agriculture malienne à partir de l'utilisation de biochar obtenu des sous-produits de la filière cajou [Thèse pour le diplôme d'état de docteur, Sciences et techniques de l'agriculture École doctorale GAIA.]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02542237>
- Arrington, M. (2019, octobre 14). Natural Appetite Suppressants : The Best Ways to Eat Less & Lose Weight. Table for Change. <https://tableforchange.com/natural-appetite-suppressants-the-best-ways-to-eat-less-lose-weight/>
- Binder, E. M., & Krska, R. (2012). Romer Labs guide to mycotoxins.
- Bourais, I., & Amine, A. (2006). Aflatoxines toxiques redoutables dans nos aliments. Technologies de Laboratoire.
- Butchko, R., Adams, T., & Keller, N. (1999). *Aspergillus nidulans* mutants defective in *stc* gene cluster regulation. *Genetics*, 153, 715-720.
- Caruso, D., Talamond, P., & Moreau, Y. (2013). Mycotoxins and fish farming : A risk left behind? *Cahiers Agricultures*, 22(3), 165-173. <https://doi.org/10.1684/agr.2013.0627>
- Charrier, A., & Berthaud, J. (1975). Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. 14
- Chetatha, M. (2013). Contribution à l'étude mycologique et mycotoxicologique du café commercialisé dans la région de Laghouat [Mémoire].
- Coelho, A. (2014). Rôle des Cytochromes P450 dans la perception sensorielle et le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster* [These pour obtenir le grade de Docteur, Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne,]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01128320>
- Diakite, A., Irie, M. G. B., N'Dri, D. K., & Yapo, J. A. (2017). Détermination de la contamination par l'Aflatoxine B1 de la pâte d'arachide consommée par la population

- en Côte d'Ivoire : Intérêt de la Chromatographie sur Couche Mince. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(4), 1646.
<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i4.19>
- Dieme, E., Fall, R., Sarr, I., Sarr, F., Traore, D., & Seydi, M. (2017). Contamination des céréales par l'aflatoxine en Afrique : Revue des méthodes de lutte existantes. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(5), 2285.
<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i5.27>
- El Assaoui, M. (2018). Contamination des aliments par les mycotoxines : Méthodes de prévention, de lutte et de décontamination. [Thesis].
<http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/16443>
- El Khoury, A. (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine [Phd].
<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000575/>
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., & Lebrihi, A. (2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of Food Science*, 76(4), M247-M253.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02153.x>
- El Khoury, R. (2016). Maîtrise du risque aflatoxique : Utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action [Thesis, Toulouse, INPT]. In [Http://www.theses.fr](http://www.theses.fr). <http://www.theses.fr/2016INPT0058>
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., Khanizadeh, S., & Oldham, J. H. (1993). Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere

- packaging (MAP) conditions. *Food Microbiology*, 10(1), 9-21.
- <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1002>
- Erastus, K. (2011). REPORT FAO/WHO Regional Conference on Food Safety for Africa ((CAF 05/2)). <http://www.fao.org/3/a0215e/A0215E24.htm>
- Fao. (2003). FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003.
- <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e0b.htm#bm11.3.1>
- Faria, C. B., Santos, F. C. dos, Castro, F. F. de, Sutil, A. R., Sergio, L. M., Silva, M. V., Machinski Junior, M., & Barbosa-Tessmann, I. P. (2017). Occurrence of toxigenic *Aspergillus flavus* in commercial Bulgur wheat. *Food Science and Technology*, 37(1), 103-111. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09316>
- Gacem, M. A., & A, O. E. H.-K. (2011). Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. [Memoire]. <http://dspace.univ-ouargla.dz:8080/jspui/handle/123456789/487>
- Gauthier, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé.
- <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01315198>
- Guerre, P., Galtier, P., & Burgat, V. (1996). Les aflatoxicoses chez l'animal : Des manifestations cliniques aux mécanismes d'action. *Revue de médecine vétérinaire*, 147, 497-518.
- Guezlane Tebibel, N. (2016). LES MYCOTOXINES: UN DANGER DE SANTÉ PUBLIC [Review of LES MYCOTOXINES: UN DANGER DE SANTÉ PUBLIC, par N. Bouras & M. D. Ould EL Hadj]. *Algerian journal of arid environment*, 6, 18.
- Haler, P. N. G. (2013). Le café : Les effets bénéfiques et néfastes sur la santé [These pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie, Université de LORRAINE].

- http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
- <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>
- Heath, R. D., Brahmabhatt, M., Tahan, A. C., Ibdah, J. A., & Tahan, V. (2017). Coffee : The magical bean for liver diseases. *World Journal of Hepatology*, 9(15), 689.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i15.689>
- Hocking, A. D. (Éd.). (2006). *Advances in food mycology*. Springer.
- Houessou, J. K. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee : Development of analytical methods and study of the roasting process [Thesis, Life Sciences [q-bio].AgroParisTech]. NNT : 2007AGPT0002. pastel-00003108.
<https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003108>
- Huyghe, A. (2014). Bienfaits et limites de la consommation de caféine [Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille]. <http://pharmacie.univ-lille2.fr>
- Krivobok, S. (1983). Contribution à l'étude des mycotoxines (aflatoxines, ochratoxines, zéaralénone et trichothécènes) [Thèse d'exercice de pharmacie, Université Grenoble Alpes]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00745069>
- Kurtzman, C. P., Horn, B. W., & Hesseltine, C. W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(3). <https://doi.org/10.1007/BF00393843>
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. In X. Xu, J. A. Bailey, & B. M. Cooke (Éds.), *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi* (p. 723-730). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_7
- Mahnine, N. (2017). Etude de la contamination des produits céréaliers par les mycotoxines : Cas des aflatoxines, de l'ochratoxine A, des fumonisines et des mycotoxines

- émergentes [Thesis, Université Mohammed V, Faculté des sciences-Rabat].
<http://toubkal.imist.ma/handle/123456789/11312>
- Meissonnier, G. M., Oswald, I. P., & GALTIER¹, P. (2005). Aflatoxicoses chez le porc—
Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue Méd. Vét.*, 15.
- Mosbah, C., & Kacem Chaouche, N. (2017). Etude de l'effet antimycotoxinogène et
antihépatotoxique des extraits d'une plante utilisée dans la thérapie traditionnelle.
[Des frères Mentouri–Constantine 1]. ../theses/biologie/MOS7201.pdf
- Moussaoui, A. (2013). Mr. MOUSSA BOUDJEMAA. B Mr. ABDELOUAHID. D.E
Mr.LAZOUNI .H Mr. BENDAHOU. M [Memoire].
- Nehlig, A. (2012). Physiological effects of coffee and human health. A review. *Cahiers
Agricultures*, 21(2-3). <https://doi.org/10.1684/agr.2012.0549>
- Nikiéma, P. A. (1993). Etude des aflatoxines au Burkina Faso : Détermination quantitative et
qualitative des aflatoxines de l'arachide par des tests biochimiques et immunologiques
[Université de Ouagadougou].
<http://savoirs.cames.online/jspui/handle/20.500.12177/1148>
- Loic, Fangiant. 2008. Les mycotoxines chez les bovins. *These de doctorat vétérinaire*. [Thèse]. France :
Université Claude Bernard Lyon 1, 12 12 2008.
- Okonofua, F. (2015). *African Journal of Reproductive Health* : Vol.19, No.3 September
2015. Universal-Publishers.
- Patrick, R., Delfosse, P., & Jean-Louis, H. (2004). La contamination de la filière laitière par
les mycotoxines : Un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annales
de médecine vétérinaire*, 148, 141-146.
- ProGnosis Biotech. (2015). Mycotoxins Legislation | Bio-Shield | ProGnosis Biotech | Elisa
test. Prognosis Biotech. <https://www.prognosis-biotech.com/knowledge-center/mycotoxins-legislation/algeria-mycotoxins-legislation/>

- Redouane-Salah, S. (2016). Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : Étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé [Thesis, des Frères Mentouri-Constantine].
DOI10.1007/s10661-015-4627-y. <https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/RED6894.pdf>
- RÈGLEMENT (CE) No 1881/2006 DE LA COMMISSION du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). (2006). [EUR-Lex - 32006R1881 - EN - EUR-Lex]. <https://eur-lex.europa.eu/>. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32006R1881>
- Richard, J. L., & Thurston, J. R. (Éds.). (1986). *Diagnosis of Mycotoxicoses*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-4235-6>
- Saddoun, A., Tchoulak, M., & Moulai, A. (2018). Contrôle physico-chimique de la caféine obtenue par extraction [Thesis]. Mouloud Mammeri.
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175(2), 149-163. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13614.x>
- Yiannikouris, A., & Jouany, J.-P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals : A review. *Animal Research*, 51(2), 81-99. <https://doi.org/10.1051/animres:2002012>

Annexes

Annexes

Annexe 1 Rapport frontaux des échantillons et du standard AFB1 avec l'intensité du fleurissances.

Plaque	Echantillon	RF	Intensité	S AFB1	RF
1	CT14	0,48	+	Standard Du Plaques 1	0,51
	CT15	0,48	+		
	CT16	0,48	++		
2	CT17	0	-	SP2	0,55
	CT18	0,55	++		
	CT19	0,56	+		
	CT20	0	-		
3	CT23	0,58	++	SP3	0,6
	CV43	0	-		
	CT21	0,58	++		
4	CV42	0	-	SP4	0,61
	CT22	0,59	+		
	CT24	0,59	+++		
	CT25	0,61	++		
5	CT26	0,59	+	SP5	0,6
	CT27	0,59	++		
	CT28	0,6	++		
6	CT29	0,57	+++	SP6	0,59
	CT30	0,57	+++		
	CT31	0,57	++		
	CT32	0	-		
7	CT33	0,57	++	SP7	0,59
	CT34	0,57	++		
	CT35	0,57	+++		
	CT36	0	-		
8	CT37	0,59	++	SP8	0,6
	CT38	0,59	++		
	CV44	0	-		
	CT39	0	-		
9	CT40	0,65	++	SP9	0,68

	CT41	0,65	+++		
10	CE1	0,68	++	SP10	0,7
	CE2	0,68	+++		
	CE3	0,7	+++		
11	CE4	0,54	+++	SP11	0,56
	CE5	0,54	+++		
	CE6	0,54	+++		
12	CE7	0,55	+++	SP12	0,55
	CE8	0,55	+++		
	CE9	0,55	+++		
13	CE10	0,66	+++	SP13	0,66
14	CE11	0,6	++	SP14	0,6
	CE12	0,6	++		
	CE13	0,6	+++		

+++ plus foncé ++foncé +claire –absence du florescence
L'intensité des standards plus 10 fois que cet intensité (+++).

Annexe 2 Rapport frontale des échantillons et du standard de caféine avec l'intensité du fleurissances.

Plaque	Echantillon	RF 1S	Intensité	RF 2S	Intensité	
1	CT14	0,28	++			RF Standard Du Caféine 0,33 Intensité
	CT15	0,28	++			
	CT16	0,28	++			
2	CT17	0,27	+			
	CT18	0,27	++			
	CT19	0,30	++			
	CT20	0,32	++			
3	CT23	0,31	++			
	CV43	0,31	++			
	CT21	0,31	+++			
	CV42	0,34	+			
	CT22	0,34	+++			

4	CT24	0,36	+++			+++
	CT25	0,36	+++			
5	CT26	0,34	+++			
	CT27	0,34	+++			
	CT28	0,34	+++			
6	CT29	0,32	+++			
	CT30	0,32	+++			
	CT31	0,32	+++			
	CT32	0,32	+++			
7	CT33	0,32	+++			
	CT34	0,32	+++			
	CT35	0,32	+++			
	CT36	0,32	+++			
8	CT37	0,33	++			
	CT38	0,33	+++			
	CV44	0,34	++			
	CT39	0,34	++			
9	CT40	0,33	+++			
	CT41	0,36	+++			
10	CE1	0,34	+++			
	CE2	0,34	+++			
	CE3	0,37	+++			
11	CE4	0,29	+++			
	CE5	0,29	+++	0,35	++	
	CE6	0,29	+++	0,35	++	
12	CE7	0,28	+++	0,35	+	
	CE8	0,28	+++	0,35	++	
	CE9	0,28	+++	0,35	++	
13	CE10	0,30	++	0,34	+	
14	CE11	0,31	++	0,39	+	
	CE12	0,31	++	0,39	+	
	CE13	0,31	+++	0,39	+	

+++ plus foncé ++foncé +claire -absence de coloration

1S : Spot correspond à la caféine (en dessous) ; 2S : Spot non identifier (ou impureté, en dessus), dans les plaques CCM 11', 12', 13' et 14'.

Annexe 3 : Protocol Bio-Shield de B1 ES (B2948 / B2996), ProGnosis Biotech, NOVAKits, version 1.

Sample preparation :

Ground Samples Prepare the Extraction Solution (70% Methanol) by adding 30ml of distilled or deionized water to 70ml of methanol (reagent grade) for each sample to be tested.

The sample must be collected according to established sampling techniques. Grind a representative sample to the particle size of fine instant coffee (50% passes through a 20 mesh screen). Weigh out a 20g ground portion of the sample and add 100mL of the Extraction Solvent (70% meth- anol) and mix in a blender for a minimum of 2 minutes. The ratio of sample to extraction solvent is 1:5 (w/v). Allow the particulate matter to settle, then filter 5-10ml of the extract through a Whatman #1 filter paper (or equivalent) and collect the filtrate. Use 50µl of each filter directly in the immunoassay.

NOTE 1: The extracted sample should have pH value of 6.2-7.5. If the pH is less than 6.2 as for exam- ple happens on the silage samples, the pH should be neutralized using NaOH.

NOTE 2: In case the user make an additional dilution 1:1 of filtrate with 70% methanol the range of quantification becomes 0-20ppb. So, use also 50µl of each diluted filtrate directly in the immunoassay and multiply the final AFB1 ppb result x 2.

Résumés

Résumé :

L'aflatoxine B1 est considérée la plus toxique des aflatoxines à cause de ses dégâts pathologiques sévères. Elle est produite par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Elle peut induire un effet toxique au niveau de plusieurs organes humains ou animal. L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé l'aflatoxines parmi les cancérogènes.

La caféine agit comme stimulant du système nerveux et peut entraîner des effets physiologiques importants

L'objectif de la présente étude est la détection et la recherche d'aflatoxines B1 et de la caféine dans le café consommé à l'Est Algérien. Pour cela un total de 44 échantillons ont été analysés par CCM. La révélation par UV a permis de montrer 36 échantillons contaminés par l'AFB1 et 8 échantillons exempts de toute contamination par cette mycotoxine. Les résultats montrent que tous Les échantillons contiennent de la caféine.

Mots clés : l'aflatoxine B1, Café, Cancérogènes, Caféine, CCM.

Abstract :

Aflatoxin B1 is considered the most toxic of the aflatoxins because of its severe pathological damage. It is produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. They can induce a toxic effect on several human or animal organs. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified aflatoxin as carcinogens.

Caffeine acts as a stimulant of the nervous system and can cause significant physiological effects

The objective of this study is the detection and research of aflatoxins B1 and caffeine in coffee consumed in eastern Algeria. For this, a total of 44 samples were analyzed by TLC. UV detection showed 36 samples contaminated with AFB1 and 8 samples free from any contamination by this mycotoxin. The results show that all samples contain caffeine.

Keywords: Aflatoxin B1, Coffee, Carcinogens, Caffeine, TLC.

المخلص:

يعتبر الأفلاتوكسين ب1 أكثر أنواع الأفلاتوكسين سمية بسبب أضراره المرضية الشديدة. يتم إنتاجه عن طريق *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus*. يمكن أن تحدث تأثيرًا سامًا على العديد من الأعضاء البشرية أو الحيوانية. صنفت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) الأفلاتوكسين على أنها مواد مسرطنة.

يعمل الكافيين كمنشط للجهاز العصبي ويمكن أن يسبب تأثيرات فسيولوجية كبيرة.

الهدف من هذه الدراسة هو الكشف والبحث عن الأفلاتوكسينات ب1 والكافيين في القهوة المستهلكة في شرق الجزائر.

لهذا ، تم تحليل ما مجموعه 44 عينة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

أظهر الكشف عن الأشعة فوق البنفسجية 36 عينة ملوثة ب أفلاتوكسين ب1 و 8 عينات خالية من أي تلوث بواسطة هذا السم الفطري. أظهرت النتائج أن جميع العينات تحتوي على مادة الكافيين.

الكلمات المفتاحية: أفلاتوكسين ب 1 ، قهوة ، مواد مسرطنة ، كافيين ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .