



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
«BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires»

**Evaluation de la contamination de l'alimentation animale par
les mycotoxines à la société Alf Al Maghrib**

Présenté par :

Oumaima Elaaboudi

Encadré par :

-Pr. Lotfi Aarab (Fst Fès)

-Mme. Mechatte Asmae (Société Alf Al Maghrib)

-Mme. Massouab Ouafae (Société Alf Al Maghrib)

Soutenu le 12 juin 2019 devant le jury composé de :

-Pr. Lotfi Aarab

Encadrant

-Pr. Samir Ananou

Examineur

Année Universitaire : 2018/2019



REMERCIEMENT

Avant d'entamer la rédaction de mon rapport j'adresse mes vifs remerciements à Dieu et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation et à l'élaboration de ce travail ce qui m'a permis de connaître et découvrir de nouveaux horizons sur le plan professionnel.

*Tout d'abord, je tiens à remercier **Mr. Berbich Ali** le directeur de la société **Alf El Maghrib Fès** qui m'a donné l'opportunité de passer mon stage au sein de leur société.*

*De même, je tiens à présenter mes sincères remerciements à **Mme Mechatte Asmae**, le responsable de laboratoire, de m'avoir m'accueilli comme stagiaire au sein de son département.*

*Un profond remerciement pour **Mme Massouab Ouafae** pour leur soutien louable qu'elle m'a apporté ainsi que les conseils précieux qui m'a offert durant cette période de stage.*

*Je saisis l'occasion pour rendre un vibrant hommage à **Mr. Lotfi Aarab** notre coordonnateur de filière et mon encadrant qui a dirigé et guidé ce travail avec patience, pour leur aide et soutien inconditionnels et leurs inestimables conseils et contribution.*

*Finalement, je voudrais remercier infiniment **Mr. Samir Ananou** pour avoir accepté de juger notre travail.*



DÉDICACE

- *Je dédie ce travail en premier lieu à mes **chers parents**, nulle dédicace n'est susceptible de vous exprimer ma profonde affection, mon immense gratitude pour tous les sacrifices que vous avez fait et que vous allez faire pour mon éducation et mes études.*
- *je le dédie aussi à :*
 - *Mon cher frère et à ma famille.*
 - *Tous mes enseignants.*
 - *Mon cher ami Ali Dadouch*
 - *Mes camarades de stage.*

SOMMAIRE

PAGE

Introduction	1
Partie1 : partie théorique	2
A. Présentation de la société.....	3
1. Historique.....	3
2. Activités.....	4
3. Les produits de la société.....	4
4. Processus de fabrication.....	7
5. Présentation du laboratoire interne de la société.....	8
B. Les mycotoxines dans les céréales.....	9
1. Définition des mycotoxines.....	9
2. Les conditions de toxinogènese.....	9
3. Les types des mycotoxines affectant les céréales.....	10
Partie2 : matériels et méthodes	14
A. Processus d'échantillonnage.....	15
1. Objet.....	15
2. Domaine d'application.....	15
3. Equipement.....	15
4. Types d'échantillonnage et exécution.....	15
• Echantillonnage des matières premières en vrac.....	15
• Echantillonnage des matières premières en sac.....	16
• Echantillonnage des produits finis à l'ensachage.....	16
• Echantillonnage des matières premières de l'unité prémix.....	17
B. Matériels utilisés.....	17

C. La détection des mycotoxines par la méthode d'ELISA.....	18
1. Principe.....	18
2. Avantages.....	18
3. Inconvénients.....	18
4. mode opératoire.....	18
Partie 3 : résultats et discussions.....	20
I. Résultats du Maïs.....	21
II. Résultats du blé.....	24
III. Résultats du produit fini à base du Maïs.....	25
Conclusion.....	26
Références.....	27
Annexes.....	28

LISTE DES TABLEAUX

N°	INTITULÉ	PAGE
1	Fiche technique de la société.	4
2	Exemples de matières premières de la société.	5
3	Exemples de quelques produits finis et leur présentation.	6
4	Résultats d'analyse à la réception des échantillons de Maïs.	21
5	Résultats d'analyse du premier échantillon du Maïs après un mois de stockage.	23
6	Résultats d'analyse des échantillons du blé à la réception.	24
7	Résultats d'analyse d'un produit fini à base de Maïs.	25

LISTE DES FIGURES

N°	INTITULÉ	PAGE
1	Diagramme représentant le processus de fabrication des produits au sein de la société	7
2	Structure chimique des aflatoxines.	11
3	Structure chimique de l'ochratoxine.	11
4	Structure chimique de la zéaralénone.	12
5	Structure chimique de la déoxynivalénol.	12
6	Structure chimique de la fumonisine.	12
7	Structure chimique de la T-2 toxine.	13
8	Variation de la concentration de l'aflatoxine dans le Maïs en fonction de tonnage.	22
9	Variation de la concentration de la fumonisine dans le Maïs en fonction de tonnage.	23

INTRODUCTION

L'alimentation animale joue un rôle déterminant dans l'industrie alimentaire mondiale et permet de produire, partout dans le monde des denrées alimentaires d'origine animale d'une manière économiquement viable. Ces aliments peuvent être fabriqués soit par des entreprises industrielles, soit par simple mélange sur le lieu de production. Ces aliments sont constitués principalement par les céréales (Maïs, orge, blé ... etc) et graines oléagineuses (soja, tournesol... etc) qui sont riches en fibres et autres nutriments utilisés pour nourrir et couvrir les besoins nutritionnels des animaux. **(FAO)**

Malheureusement, les céréales sont menacées par plusieurs agents de détérioration tels que les moisissures. Les moisissures altèrent la qualité des aliments pour animaux en dégradant des substances et en formant des métabolites toxiques « **Mycotoxines** » qui nuisent aux performances et à la santé des animaux.

La recherche systématique des mycotoxines a commencé vers 1960 avec la découverte de « l'Aflatoxine » après la mort de 100000 dindes en Angleterre intoxiqués par de tourteau d'Arachides contaminé par cette mycotoxines. Depuis lors, de nombreux mycotoxines ont été découvertes tels que l'ochratoxine, la toxine T2, la zearatoxine etc. **(Revue suisse Agric. 38 (6): 329-334, 2006)**

La détermination des mycotoxines dans les céréales a pour objectif de pouvoir faire une estimation des teneurs finales en mycotoxines présentes dans l'aliment composé pour ensuite si nécessaire modifier le taux d'incorporation des céréales et dérivés dans la formulation afin d'arriver à des teneurs en toxines acceptables dans le produit fini (en fonction de l'animal ciblé). Donc les mycotoxines sont régulièrement recherchés afin de garantir la qualité des aliments pour animaux. . **(Revue suisse Agric. 38 (6): 329-334, 2006)**

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail effectué au sein de **la société Alf Al Maghrib** est d'étudier le taux des mycotoxines à la réception et au cours du stockage dans 2 types de céréales « Maïs, et blé » et un produit fini à base de Maïs.

Cette étude comprend 3 parties :

- ❖ **Partie 1** : une synthèse bibliographique, qui rassemble des données sur les mycotoxines.
- ❖ **Partie 2** : une description du processus d'échantillonnage, l'extraction et dosage des mycotoxines par la méthode **ELISA**.
- ❖ **Partie 3** : consacrée à la présentation des résultats et à leur interprétation.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A-Présentation de la société Alf al Maghrib :



1. Historique :

La société **ALF EL Maghrib**, est l'une des principales entreprises agricoles à Fès, qui se spécialise dans la fabrication et la commercialisation des aliments de bétails et volailles.

C'est une société anonyme créée en 1974 par le groupe Chawni à SIDI BRAHIM à Fès avant de se déplacer au nouveau site, situé au lotissement ENNAMAË au quartier industriel BEN SOUDA, elle appartient au groupe Holding Zalar qui regroupe des autres sociétés : Moulin Zalagh ; Couvnord et Tramanor.

La société se décompose en 3 grandes unités :

- La production : pour la fabrication d'aliments composés équilibrés, présentés sous forme de farine, miettes ou granulés et adaptés pour chaque type d'animal.
- Laboratoire : pour les analyses physicochimiques et microbiologiques.
- Le prémix : pour la fabrication d'un pré mélange appelé prémix (ce sont des Concentrés d'oligoéléments, de vitamines et de minéraux. Ils sont associés en faible pourcentage aux différentes matières premières pour constituer l'aliment complet à destination du bétail).

Tableau 1 : fiche technique de la société.

Raison sociale	Société el Alf
Forme juridique	Société anonyme (S.A)
Directeur de l'entreprise	Mr Ali Berbich
Date de création	1974
Capital	50.000.000 dh
Tél	0535728895
Siège social	Lotissement ENNAMAÉ, Quartier Industriel Ben souda, Fès
Superficie	6000 m ² dont 2500 m ² couverts
Activités	Fabrication des aliments composés pour Bétails et Volailles
Capacité de production	500 tonnes / jour
Certifications	ISO 9001/ OHSAS 18001 / ISO 22000

2. Activités de la société :

La société Alf al Maghreb a pour activité :

- La fabrication d'un pré-mélange d'acides aminés, d'oligoéléments et vitamines ce qu'on appelle « prémix » incorporé à un pourcentage compris entre 0.5 et 1% lors de la fabrication d'aliments composés.
- La fabrication d'aliments composés équilibrés au plan nutritionnel et étudiés pour chaque type d'animal tel que Farine , Miette(calibration de produit) ou Granulés.

3. Les produits de la société :

L'alimentation animale fait appel à deux principaux de matières premières : les céréales et les sous-produits industriels.

❖ **Matières premières (MP) :**

La totalité des céréales et surtout le Maïs proviennent de l'étranger, 90% d'Amérique et 10% d'Argentine, elles arrivent à la société par transport en vrac.

Pour les matières premières on distingue :

- Les céréales (le maïs le plus utilisé, l'orge, le blé ...)

- Les tourteaux (Les tourteaux sont les sous-produits solides obtenus après extraction de l'huile des graines des oléagineux. Sous-produits de la trituration, industrie de fabrication de l'huile, ils représentent généralement de 50 à 75 % de la masse des graines).

Les tourteaux sont utilisés en alimentation animale. Ils constituent la 2e classe d'aliments la plus importante après les céréales.

- Les sous-produits : mélasse, sons de blé ...
- Les huiles et graisses, les complexes de minéraux, les vitamines, les additifs etc sont utilisés en pourcentages minimes.

Tableau 2 : exemples de matières premières de la société

Matières premières	Spécification
Céréales	Maïs, orge, blé
Sous céréales	Son-DDGS Golden- Pulpe de caroube(PC) – coque de soja (CS)-grignon d'olives (GO)-Pulpe de betterave(PB)...
Tourteaux	Tourteaux de soja 48 TS48 Tourteaux de tournesol TT 30%,36%... Tourteaux de colza TC farine de poisson FP 55%, 65%
Additifs	Macroéléments :-solide (phosphate mono et bicalcique, carbonate de calcium) -liquide (huile de soja, choline, mélasse)
Prémélanges	Oligoéléments : vitamines, acides aminés...

❖ **Produits finis (pf) :**

Les produits finis (PF) de la société Alf al Maghreb sont sous forme de :

- farines.
- granulés.

Ces produits sont fabriqués de telle façon à fournir aux animaux les besoins nutritionnels selon l'espèce, l'âge etc.

Tableau 3 : exemples de quelques produits finis et leur présentation

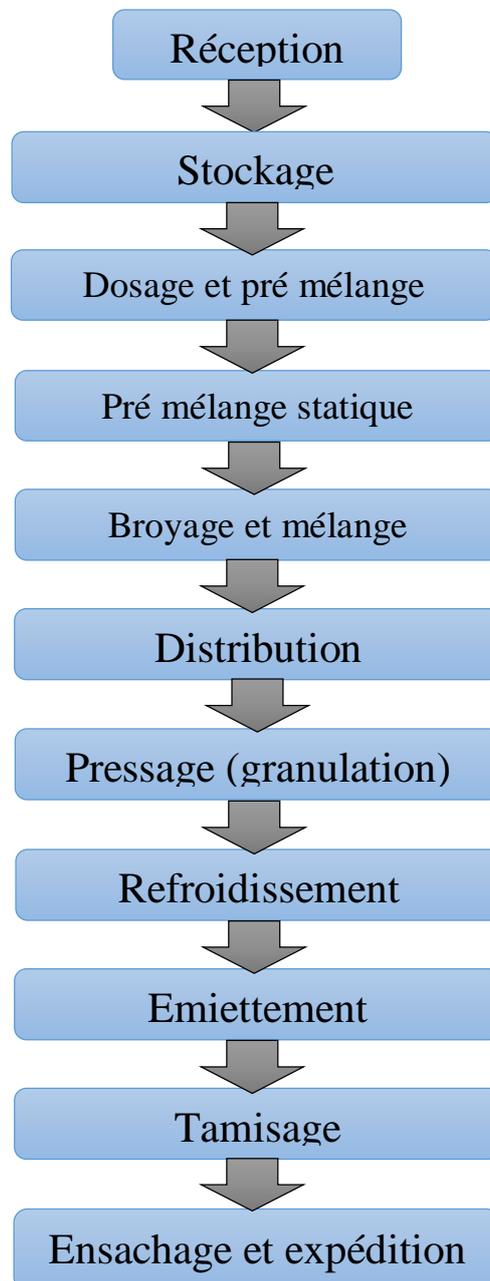
Famille de PF	Présentation du PF	Caractéristiques d'aliment
Poulet de chair		
Pré démarrage	Farine homogène	Aliment complet
Démarrage	Farine homogène ou miette	Aliment complet
Croissance	Miette ou granulé	Aliment complet
Finition	Granulé	Aliment complet
Entretien	Granulé	Aliment complet
Bovin		
Bovin démarrage	Granulé	Aliment complémentaire
Vaches laitières	Granulé	Aliment complémentaire
Bovin à l'entretien	Granulé	Aliment complémentaire
Bovin d'engraissement	Granulé	Aliment complémentaire
Ovin		
Ovin démarrage	Granulé	Aliment complémentaire
Ovin d'embouche	Granulé	Aliment complémentaire
Brebis	Granulé	Aliment complémentaire
Ovin à l'entretien	Granulé	Aliment complémentaire
Lapin		
Lapines et lapereaux	Granulé	Aliment complet équilibré
Lapin engraissement	Granulé	Aliment complet équilibré

4. Processus de fabrication :

Le processus de fabrication des aliments composés peut se décomposer en plusieurs étapes principales : la réception des matières premières, la fabrication et l'expédition. Ces étapes sont précédées d'une étape de recherche et de formulation pour déterminer les besoins alimentaires des animaux et les caractéristiques des matières premières sont rigoureusement étudiés dans les laboratoires et les centres de recherche afin d'assembler les ingrédients dans des proportions adaptées.

Donc ici on va citer les différentes étapes de fabrication dans le diagramme ci-dessous :

Figure 1 : diagramme représentant le processus de fabrication des produits au sein de la société.



5. Présentation du laboratoire contrôle de qualité

Mon stage a été effectué au sein du laboratoire de contrôle de qualité interne de la société Alf Al Maghreb.

Ce laboratoire est un service de contrôle de qualité des produits fabriqués par la société ainsi que le contrôle d'hygiène des équipements, d'environnement et de personnel.

Le laboratoire est composé de deux unités :

- Unité bactériologique
- Unité physico-chimique

❖ L'unité bactériologique :

L'unité bactériologique est composée de 5 salles :

- Salle d'autopsie : dans laquelle on effectue l'autopsie des poussins et le prélèvement du sang et des organes qui sont ensuite traités dans la salle de bactériologie.
- Salle de bactériologie : dans laquelle se font les différents types d'analyses bactériologiques telles que l'analyse des germes pathogènes (**Salmonelles, Clostridium...**) et d'autres analyses selon la demande et le plan de contrôle des couvoirs.
- Salle de sérologie destinée à la détection des mycotoxines par la méthode d'**ELISA**.
- Salle de préparation des milieux de cultures et stockage des produits.
- Salle d'autoclavage et stérilisation du matériel et milieux de cultures.

❖ l'unité physico-chimique :

L'unité physico-chimique est composée de deux salles :

- Salle de broyage des échantillons.
- Salle des analyses physico-chimiques (humidité, ph, dosage des protéines...).

B. Les mycotoxines dans les céréales :

1. Définition :

Les mycotoxines sont des substances chimiques toxiques produites par des champignons spécifiques qui infectent les récoltes. Différentes espèces de champignons produisent des mycotoxines de toxicité très variée pour les humains et les animaux. Ainsi, il existe des limites légales liées à certaines mycotoxines dans les céréales destinées à la consommation humaine et des valeurs limites indiquées par l'Union européenne pour les céréales destinées à l'alimentation animale. Les mycotoxines sont un groupe de toxines d'origine naturelle produites par des moisissures ou des champignons dans le grain, que ce soit sur le terrain ou pendant le stockage. Généralement déclenchées par des phénomènes météorologiques extrêmes, ces toxines peuvent nuire à la santé humaine et causer des pertes économiques concernant le bétail.

2. Conditions de toxogénèse :

La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxogénèse. De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, le plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée.

➤ Activité en eau (Aw) :

L'activité hydrique nécessaire à la toxogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique. Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une Aw de 0,80 ; par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque l'Aw est $\geq 0,85$ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005). De même, *Fusarium graminearum* peut se développer dans des substrats dont l'activité hydrique est de l'ordre de 0,93. La production de déoxynivalénol, elle, est importante pour des Aw de 0,995 (Ramirez *et al.*, 2006).

➤ pH :

Comme pour l'Aw, la gamme de pH permettant la toxogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. En 1997 Keller a caractérisé l'effet du pH sur la croissance de *Fusarium proliferatum* et, en parallèle, sur la production de fumonisine B1.

➤ Présence d'oxygène :

Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique. Une concentration en oxygène inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO₂ empêchent l'élaboration de mycotoxines. (Cairns-Fuller *et al.*,2005; Keller *et al.*, 1997).

➤ Température :

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance, mais, le plus souvent, légèrement inférieure. C'est notamment le cas pour l'élaboration des aflatoxines (*Aspergillus flavus*), de l'ochratoxine A (*A. ochraceus*). La température optimale pour la croissance de *Fusarium graminearum* est de 25°C, mais la synthèse de la zéaralénone peut avoir lieu à 15°C. La température peut aussi influencer la proportion de toxines produites par une souche susceptible de synthétiser plusieurs molécules. Par exemple, *Fusarium graminearum* peut produire préférentiellement de la zéaralénone à 25°C, alors que c'est le déoxynivalénol qui sera majoritairement produit à 28°C (Pfohl-Leskowicz, 2001).

3. Les types des mycotoxines qui affectent les céréales :

Il existe plusieurs mycotoxines qui affectent les céréales soit dans les champs on l'appel **mycotoxines du champ**, soit durant le stockage et on l'appel **mycotoxines du stockage**.

❖ Les mycotoxines du stockage :

✚ Les Aflatoxines :

Ce sont des métabolites des champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*.

Il existe 4 principaux types d'Aflatoxines : B1, B2, G1 et G2 qui est nommés suivant leurs propriétés fluorescentes propres. L'Aflatoxine B1 est la plus fréquemment rencontrée de ce groupe et la plus toxique. Les Aflatoxines sont retrouvées principalement dans les céréales, le maïs, l'arachide, les graines de coton et les noix.

Les Aflatoxines peuvent provoquées une pathologie du foie chez les animaux et causer une diminution de la production (lait, œufs, poids des animaux, etc.). L'Aflatoxine B1 est un puissant cancérigène pour l'homme, et peut contribuer au cancer de foie.

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

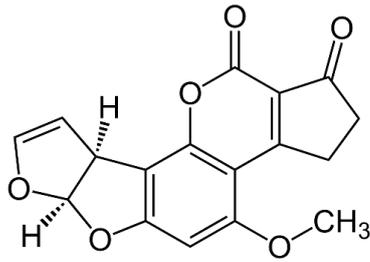


Figure 2 : structure chimique des aflatoxines

✚ L'ochratoxine (OTA): produite principalement par les champignons *Aspergillus ochraceous* et *Penicillium verrucosum*, peut être retrouvée dans un grand nombre de produits tels que les raisins, l'orge, les produits du soja, le café etc, Bien que les niveaux d'ochratoxine puissent être relativement bas, ils ne sont pas toujours rapidement éliminés par l'organisme et leurs niveaux peuvent s'accumuler dans le sang et d'autres tissus chez l'homme ou les animaux ayant consommé les aliments contaminés.

L'Ochratoxine est avant tout une toxine pour le rein mais si sa concentration est suffisamment élevée des dommages peuvent se révéler au niveau du foie aussi.

L'Ochratoxine est cancérigène chez le rat et souris, et est suspectée être l'agent causal chez l'homme de la Néphropathie endémique des Balkans, qui affecte les reins. Les tumeurs sont toujours associées à cette pathologie.

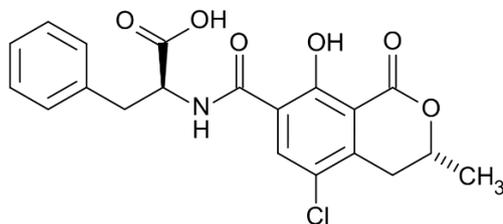


Figure 3 : structure chimique de l'ochratoxine

❖ Mycotoxines du champ :

✚ La zéaralénone(ZON) : est produite par les champignons *Aspergillus graminearum*. Le grain infecté par cet organisme aura toujours une couleur rosée en raison d'un pigment qui est probablement et simultanément produit avec la Zéaralénone. Dans la plupart des cas, la Zéaralénone est retrouvée dans le maïs, elle est aussi retrouvée dans d'autres cultures principales telles que le blé, l'orge le sorgho et le seigle à travers le monde. Les principaux effets de Zéaralénone sont oestrogéniques et implique surtout le système urogénal. Les porcins sont les animaux les plus généralement touchés, quoique les bovins, les volailles et les rongeurs de laboratoire le soient également.

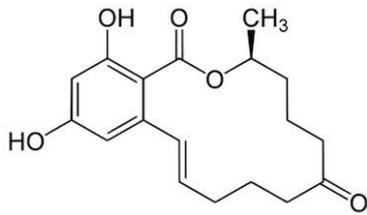


Figure 4 : structure chimique de la zéaralénone :

- ✚ La **déoxynivaléol (DON)** : sont produits par différents contaminants fongiques du genre *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. roseum*, ...) qui contaminent les grains de blé, d'orge, d'avoine ou de maïs et même du riz lors de la floraison. Des niveaux élevés de contamination en DON ont été rapportés pendant les années pluvieuses⁴.

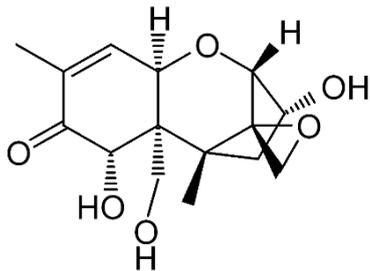


Figure 5 : structure chimique de la déoxynivaléol

- ✚ Les **fumonisines** : récemment découverts, sont un groupe des métabolites toxiques structurellement proches et produits par plusieurs espèces de champignons. Le plus important est leur production par le *Fusarium moniliforme*, qui est un contaminant du Maïs dans de nombreuses parties du monde. L'ingestion de fumonisine au travers d'aliments pour animaux contaminés et de nourriture pour la consommation humaine a été liée à la fois à des effets toxiques et cancérogènes. Les trois plus importants fumonisines sont les FB1, FB2 et FB1. FB1 en particulier a été relié au Leukoencephalomalacia équin et au syndrome d'œdème pulmonaire porcine ainsi qu'à la néphrotoxicité et cancers hépatiques chez les rats. Alors que la dose minimale conduisant à ces problèmes est encore en cours de détermination.

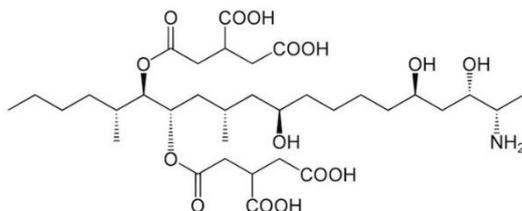


Figure 6 : structure chimique de la fumonisine

- ✚ La T-2 toxine : est produite par des champignons du genre *Fusarium*, et le plus important producteur est *Fusarium sporotrichioides*. Cette mycotoxine survient dans les céréales comme le blé, le maïs, l'avoine, l'orge, le riz, les haricots et les fèves de soja, ainsi que dans certains produits à base de céréales. La T-2 toxine inhibe la synthèse des protéines et affecte les cellules se divisant activement, tels que celles qui bordent le tractus gastro-intestinal, de la peau, les cellules érythroïdes et lymphoïdes. Les effets de la T-2 toxine pour les animaux comprennent une perte de poids ou une mauvaise prise de poids, diarrhées hémorragique, la nécrose cutanée ou des lésions du bec, des hémorragies et une baisse de la production (œufs, lait etc).

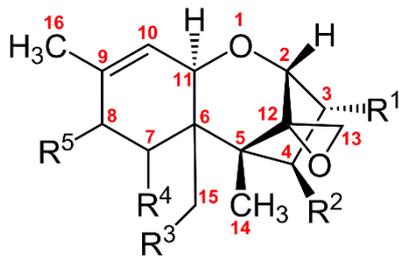


Figure 7 : structure chimique de la T-2 toxine

PARTIE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Processus d'échantillonnage :

1. objet :

Cette procédure a pour objet de décrire la démarche à suivre pour prélever des échantillons unitaires en vrac ou en sac afin d'obtenir un échantillon représentatif.

2. Domaine d'application :

Cette procédure est appliquée pour :

- ❖ Les matières premières à la réception destinées à la fabrication d'aliments composés tels que « maïs, tourteaux de soja, sous-produits de céréales, minéraux et additifs, ... etc ».
- ❖ Les produits finis fabriqués par la société Alf Al Maghrib et qui sont destinés à l'alimentation des bétails et volailles.
- ❖ Les matières premières utilisées dans la fabrication du prémélanges « Prémix ».

3. Equipement d'échantillonnage :

Les équipements utilisés pour ce processus sont divisés selon la nature de la matière à prélever :

- ✚ Sonde à sac pour l'échantillonnage des matières premières en sac.
- ✚ Pelle à main pour l'échantillonnage des produits finis en vrac.
- ✚ Préleveur d'échantillons des matières premières en vrac.

4. Types d'échantillonnage et exécution :

- ❖ Echantillonnage des matières premières en vrac :

Les étapes de l'échantillonnage des matières premières en vrac sont les suivantes :

Premièrement, programmation des boitiers en commande du préleveur soit en mode automatique ou en mode manuel selon le tonnage du camion, ensuite récupération d'un échantillon représentatif et le mélanger, puis prélèvement 500 g de cet échantillon et verser la quantité restante dans le véhicule. Finalement, identification le sac d'échantillon par les informations suivantes : date de réception, N° de projet et N° de silo.

Selon la fréquence d'analyse mentionnée dans le **plan de contrôle des matières premières**, le technicien du laboratoire assure le prélèvement d'un échantillon représentatif des matières premières et renseigne le registre d'Echantillothèque, les échantillons prélevés sont gardés dans l'Echantillothèque du laboratoire pendant une période de trois mois.

❖ Echantillonnage des matières premières en sac :

Les prises d'échantillons s'effectuent par sondage au hasard dans des différentes parties de sacs retenus selon les étapes suivantes :

Premièrement identifier le sac en plastique par le N° d'immatriculation du camion, la date de réception par l'agent de réception avant de commencer le sondage des sacs puis veiller à ce que tous les sacs d'un lot soient accessibles au sondage.

✚ Pour que l'échantillon soit représentatif, les sacs dans lesquels sont faits les prélèvements doivent être bien réparties dans le lot complet.

✚ Si les sacs sont empilés, une pression considérable pourrait être exercée sur les sacs placés au bas de la pile. Avant de prélever un échantillon, frapper les sacs au bas de la pile avec le gros bout de la sonde pour réduire cette pression et empêcher le sac d'éclater.

Finalement, après le prélèvement, remplacer les fibres pour fermer l'ouverture.

Selon la fréquence d'analyse mentionnée dans le plan de contrôle MP, le technicien Labo assure le prélèvement d'un échantillon représentatif des matières premières et renseigne le registre d'Echantillothèque, les échantillons prélevés sont gardés dans l'Echantillothèque Labo pendant une période de trois mois.

❖ Echantillonnage des produits finis à l'ensachage :

Les prélèvements des produits finis s'effectuent par le magasinier selon les étapes suivantes :

Premièrement prélever un échantillon par référence /shift/ jour pour le labo, et un échantillon par client/ jour qui est conservé après dans l'Echantillothèque pendant une période de trois mois, puis mettre les échantillons dans des sacs en plastique identifiée par la référence du produits finis et la date de fabrication.

Selon la fréquence d'analyse du plan contrôle des produits finis, le technicien du laboratoire assure le prélèvement d'un échantillon représentatif des produits finis et renseigne le registre d'Echantillothèque. Les échantillons prélevés sont gardés dans l'Echantillothèque Labo pendant une période de trois mois.

❖ Echantillonnage des matières premières de l'unité Prémix :

Les prélèvements des matières premières rentrant dans la fabrication du prémix s'effectuent par le responsable prémix selon les étapes suivantes :

Premièrement prélever à l'aide d'une pelle à main d'un échantillon de 100 g pour chaque lot des matières premières suivantes : (Anticoccidiens, Facteurs de croissance, Prémélanges vitaminés, Prémélanges minérales, Additifs, Levures ... etc). Ensuite mettre les échantillons dans un sac en plastique, puis identifier le sac par une étiquette pré-imprimée via le logiciel **NUTRICIEL**, cette dernière contient les informations suivantes : « Code matière, N° Lot, Date de péremption, Date de Réception ». Finalement Garder les échantillons pendant une période de trois mois, afin d'assurer la traçabilité du produit semi fini.

B. Matériels utilisés

1. Solvants d'extraction :

Méthanol à 70%.

Eau distillée.

2. Échantillons analysés :

Deux échantillons de Maïs du même fournisseur :

- Le premier échantillon réceptionné en janvier 2019.
- le deuxième échantillon réceptionné en mars 2019.

Deux échantillons du blé du même fournisseur :

- Le premier réceptionné en Mars 2019.
- Le deuxième réceptionné en Avril 2019.

Deux échantillons d'un produit fini à base de Maïs :

- Le premier fabriqué en janvier 2019.
- Le deuxième fabriqué en Mai 2019.

Ces échantillons ont été extraits par la solution de méthanol 70 % puis analysés par la méthode Elisa pour détecter le taux des mycotoxines.

C. La détection des Mycotoxines par la Méthode ELISA :

1. Principe :

La technique ELISA (**Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay**) est une technique **immuno-enzymatique** de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

❖ **Avantages de la technique:**

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé.
- La validité des trousseaux est d'environ 1 an.

❖ **inconvénients de la technique :**

- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.

2. Mode opératoire :

❖ **Préparation de l'échantillon / Extraction :**

Un échantillon représentatif est soigneusement broyé et mélangé, avant de procéder à l'extraction proprement dite.

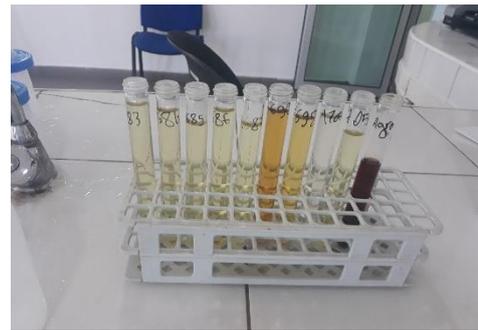
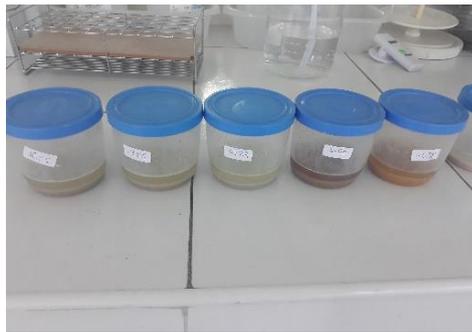
- Pour l'extraction On distingue deux méthodes :

- **L'extraction par le méthanol :**

Ajouter de 100 ml de solution d'extraction méthanol/ eau (70 /30 v/v) puis mélanger et fermer le flacon. L'extraction par le méthanol se fait pour la détection de l'Aflatoxine, l'Ochratoxine, la Fumonisine la Zearalenone et la T-2 Toxine.

- **L'extraction par l'eau distillée :**

Ajouter de 100 ml d'eau distillée ou désionisée puis mélanger et fermer le flacon. L'extraction par l'eau distillée ou désionisée se fait pour la détection de la Déoxynivalénol.



Photographie I : Extraction des échantillons à analyser

Après l'étape d'extraction on passe à l'étape d'analyse :

❖ **Protocole :**

Placer le nombre approprié de micropuits de dilution à bord sur le support prévu. Un puits de dilution sera nécessaire pour chaque standard (cf. . 0, 1.0, 2.0, 10.0 et 20.0 ppb) et pour chaque échantillon, placer un nombre égal de micropuits recouverts d'anticorps sur le support prévu, distribuer 200 μL de conjugué dans chaque micropuits de dilution, ajouter 100 μL de chaque standard ou échantillon dans les micropuits de dilution correspondant et contenant les 200 μL de conjugué, mélanger par 3 va et vient et en douceur le contenu des micropuits de dilution, puis transférer doucement et immédiatement 100 μL de chaque micropuit de dilution vers les micropuits correspondant contenant les anticorps, puis incuber pendant 15 min.

Après 15 min d'incubation, vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement contre du papier absorbant (3 fois) pour retirer tout le liquide des puits. Ensuite remplir les puits avec 250 μL d'eau distillée, puis vider les puits de nouveau selon le même protocole, répéter l'opération (5 fois). Puis ajouter 100 μL de substrat dans chaque micropuit et incuber 5 min à température ambiante (20 à 25°C) à l'abri de la lumière.

Enfin, ajouter 100 μL de solution stop dans micropuit et mesurer la D.O à 450nm.

Partie 3 **PARTIE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

La détection des mycotoxines par le test ELISA dans les échantillons a montré les résultats suivants :

I. Résultats d'analyse des échantillons du Maïs.

✚ à la réception :

Le tableau suivant présente le taux des mycotoxines à la réception dans les échantillons de Maïs.

Tableau 4 : résultats d'analyse du premier échantillon de Maïs.

Type des mycotoxines		Ochratoxine / Conformité	Zéaralénone / Conformité	Aflatoxines / Conformité	Don / Conformité	Fumonisine / conformité	T-2/ conformité
mycotoxines en ppb	1 ^{er} échantillon	<1.9 Conf	141 Conf	<1 Conf	900 Conf	2840 Conf	<10 Conf
	2 ^{ème} échantillon	<1.9 Conf	152 Conf	<1 Conf	630 Conf	1590 Conf	<10 Conf
Max Toléré		250 ppb	2000ppb	20 ppb	8000ppb	60000 ppb	200 ppb

C : conforme

Ppb : particule par billion

D'après le tableau ci-dessus on observe que :

- Pour le premier échantillon : on a obtenu une concentration <1.9 ppb d'ochratoxine, 141 ppb de zéaralénone, <1 ppb d'Aflatoxines, 900 ppb de déoxynivalénol, 2840 ppb de fumonisine et <10 ppb de la T-2 toxine.
- Pour le deuxième échantillon : on a obtenu une concentration <1.9 ppb d'ochratoxine, 152 ppb de zéaralénone, <1 ppb d'Aflatoxines, 630 ppb de déoxynivalénol, 1590 ppb de fumonisine et <10 ppb de la T-2 toxine.

On déduit alors après la comparaison des résultats obtenus avec la norme des taux tolérés des mycotoxines dans les céréales que les deux échantillons de Maïs sont conformes.

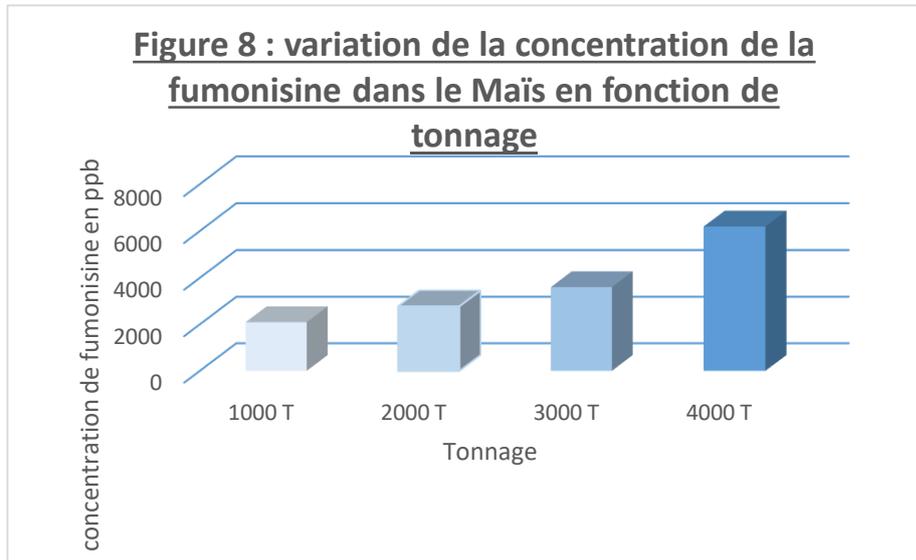
On peut expliquer ces résultats par les raisons suivantes :

- Une bonne gestion de la matière première pendant la récolte est cela par l'utilisation des fongicides qui luttent contre le développement des moisissures et par conséquence la production des mycotoxines.
- Le respect des conditions d'hygiène durant le transport

La recherche de la fumonisine est faite juste pour le Maïs et produits dérivés, car c'est un contaminant courants de cette dernière et dans une moindre mesure du blé et d'autres céréales. (JECFA en 2016). Cette étude a montré que la fréquence d'occurrence et les concentrations

moyennes de FB1 (fumonisines B1) étaient plus importantes dans les produits du maïs et à base de maïs que dans d'autres produits céréaliers.

✚ Au cours du tonnage (stockage en continue) :



✚ La figure ci-dessus présente la concentration en fumonisine dans le Maïs pendant le processus de tonnage (stockage en continue).

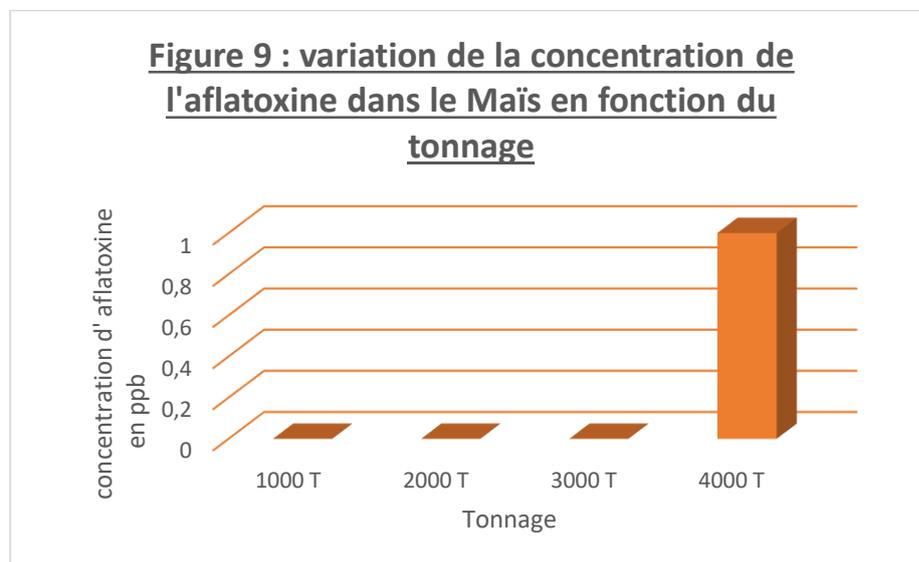
D'après la figure ci-dessus on observe que les premier 1000 T contenant 2090 ppb des fumonisines, les 1000 T ajoutés contenant une concentration de 2770 ppb par contre les troisièmes 1000 T contenant 3600 ppb et finalement les derniers 1000 T ajoutés contenant 6190 ppb en fumonisines.

On peut dire que cela est dû aux raisons suivantes :

- la matière première ajoutée à chaque fois est plus chargée en fumonisines.
- Un certain nombre de conditions environnementales notamment de la température et d'humidité au cours du stockage ont favorisé le développement des moisissures toxigènes responsable de la sécrétion de cette molécule toxique (fumonisine).

Mais malgré l'augmentation du taux de la fumonisine les résultats obtenue sont conformes et ne dépasse pas les normes (60000 ppb).

- La figure ci-dessous présente le changement de la concentration en aflatoxine dans le Maïs durant le processus du tonnage.



D'après la figure si dessus on distingue que le taux d'Aflatoxine est plus élevé dans 4000T avec une concentration de 1 ppb contre une concentration <1 dans 1000T, 2000T et 3000T.

Cette augmentation est due peut être à la matière première ajoutée qui est plus chargée en Aflatoxines.

Les résultats restent toujours conformes malgré cette variation de taux d'Aflatoxine, car la concentration ne dépasse pas les normes (annexe 1).

Après un mois du stockage :

Le tableau suivant présente la concentration des mycotoxines recherchés (mycotoxines de stockage) dans les deux échantillons de Maïs analysés après un mois de stockage.

Tableau 6 : résultats d'analyse du Maïs après un mois de stockage.

Type de mycotoxine	Aflatoxines	Ochratoxine	Déoxynivalénol
mycotoxines en ppb	<1 Conf	<1.9 Conf	450 Conf
Max toléré	20 ppb	250 ppb	8000 ppb

Conf : Conforme.

Ppb : particule par billion / ng /mg de produit

- Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que cet échantillon contient une concentration <1 ppb en aflatoxines, <1.9 ppb en ochratoxine et 450 ppb en déoxynivalénol.
- D'après ces résultats on peut déduire la conformité de l'échantillon et on peut supposer que cela est dû aux bonnes conditions du stockage (humidité et activité de l'eau).

II. Résultats d'analyse des échantillons du blé :

✚ À la réception :

Le tableau suivant présente le taux des mycotoxines dans deux échantillons du blé analysé par la méthode Elisa.

Tableau 7 : résultats d'analyse des deux échantillons du blé.

Type des mycotoxines		Ochratoxine (OTA)	zéaralénone	Aflatoxines	Don	T-2 toxine
mycotoxines en ppb	1 ^{er} échantillon	<1.9 Conf	<20 Conf	1 Conf	<200 Conf	14 Conf
	2 ^{ème} échantillons	<1.9 Conf	32 Conf	<1 Conf	<200 Conf	20 Conf
Max toléré		250 ppb	2000 ppb	20 ppb	8000 ppb	200 ppb

Conf : conforme

Ppb : particule par billion / ng/g de la matière

D'après le tableau ci-dessus on observe que :

- le premier échantillon : contient une concentration <1,9 ppb en ochratoxine, <20 ppb de zéaralénone, 1 ppb d'aflatoxines, <200 ppb en déoxynivalénol et 14 ppb de T-2 toxine.
- le deuxième échantillon : contient une concentration <1,9 ppb en ochratoxine, 32 ppb de zéaralénone, <1 ppb d'aflatoxines, <200 ppb en déoxynivalénol et 20 ppb de T-2 toxine.

Les résultats montrent que les échantillons sont non contaminés par les mycotoxines car ils contiennent des concentrations inférieures au maximum toléré.

On peut déduire ces résultats aux raisons suivantes :

- ✚ La matière première est non contaminée à l'origine.
- ✚ Les conditions du transport sont bien respectées.

III. Résultats d'analyse du produit fini :

Le tableau suivant représente les résultats d'analyse de 3 essais effectués sur un produit fini fabriqué de Maïs à 51% de la composition final destiné à l'alimentation de poulets de chair :

Tableau 8 : résultats d'analyse d'un produit fini à base de Maïs.

Type de mycotoxine recherché	Aflatoxines		
N° d'essai	1	2	3
mycotoxines en ppb	1 Conf	1 Conf	1 Conf
Max toléré	20 ppb		

Conf : conforme

Ppb : particule par billion / ng/g de la matière

D'après le tableau ci-dessus on observe les résultats des trois essais :

Les trois essais montrent que l'échantillon contient une concentration en aflatoxines de 1 ppb ce qui est inférieur au maximum toléré, donc l'échantillon est conforme.

- ✓ la conformité du produit est due à la qualité de la matière première (Maïs) et aux bonnes conditions du stockage.

CONCLUSION :

Dans le cadre du projet de fin d'études, réalisé au laboratoire interne de la société **Alf Al Maghrib**, nous avons travaillé sur la détection des mycotoxines par le test dans des matières premières (maïs et blé) et un produit fini fabriqué à base du maïs destiné à l'alimentation animale, afin de garantir la qualité de cette dernière. Les résultats d'analyses ont montrés que 100 % des échantillons sont conformes avec des concentrations en mycotoxines inférieurs aux taux maximaux tolérés.

La surveillance de la présence et de la prévalence des mycotoxines est généralement effectuée au moment de la réception du grain, pendant le stockage et avant l'expédition. Un programme de dépistage rigoureux au point de réception peut aider le responsable à déterminer s'il accepte la matière, la refuse ou l'achemine vers une voie de production en fonction des niveaux de mycotoxines (incorporation selon l'espèce animal).

Finalement la sécurité alimentaire est une responsabilité partagée entre gouvernements, industriels de l'aliment de bétail / volaille, agro-industries et consommateurs.

RÉFÉRENCE :

BIBLIOGRAPHIQUE :

- ✚ Cairns-Fuller V., Aldred D., Magan N., (2005) Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1215-1221
- ✚ Cristina Tabuc : Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines.
- ✚ Filali samouh khawla (2017 / 2018) : identification des espèces de moisissures toxigènes.
- ✚ Méthode de traitement de la matière première à la réception (société).
- ✚ Mode opératoire du test Elisa (société).
- ✚ Norme de la qualité fongique des matières premières (société).
- ✚ Procédure d'échantillonnage (société).
- ✚ Pfohl-Leszkowicz A., (2001), Définition et origines des mycotoxines in *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14.
- ✚ Ramirez M., Chulze S., Magan N., (2006), Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain, *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 291-296

WEBOGRAPHIQUE :

- ✚ mas.stephanie.free.fr/curiosite_et_decouverte/les_mycotoxines.
- ✚ who.int/foodsafety/FSDigest_Fumonisins_FR.
- ✚ foodsafety.neogen.com/fr/mycotoxins.

ANNEXE

Arrêté N° 1490 : le max toléré des mycotoxines dans les céréales

Type des Mycotoxine / Type de céréale	ochratoxine	aflatoxines	fumonisines	zéaralénone	Déoxynivalénoïl	T-2 toxine
Maïs	250 ppb	20 ppb	60000 ppb	2000 ppb	8000 ppb	200 ppb
Blé	250ppb	20 ppb	-----	2000 ppb	8000 ppb	200 ppb

Merci

