



**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Analyse fongique et détection des  
mycotoxines dans les produits à base de  
céréales au niveau de la région de Fès**

Préparé par :

**Hakima El Madani**

Encadré par :

**Pr. Lotfi Aarab**

**Soutenu Le 17 Juin 2014 devant le jury composé de:**

**Pr. Lotfi Aarab**

**Encadrant**

**Pr. Samir Ananou**

**Examineur**

**Pr. Naima Elghachtouli**

**Examineur**

**Pr. Samira Sefrioui**

**Examineur**

**Lieu du stage : Laboratoire des Molécules Bioactives FST Fès**

**Année Universitaire : 2013-2014**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Nom et prénom: EL Madani Hakima**

**Année Universitaire : 2013 - 2014**

**Titre: Analyse fongique et détection des mycotoxines dans les produits à base de céréales au niveau de la région de Fès.**

### Résumé

Les principaux objectifs de cette étude visent à évaluer dans un premier volet à évaluer la qualité hygiénique de quelques zones de production du pain au niveau de la ville de Fès. Pour cela un questionnaire a été préparé afin d'évaluer l'état de salubrité des unités de fabrication du pain. Dans un deuxième volet, nous avons collecté un ensemble d'échantillons de produits à base de céréales auprès de différentes zones (supermarchés, épiciers et boulangeries). L'étude de la qualité microbiologique de ces produits a été focalisée sur la recherche des levures et moisissures, qui représentent l'empreinte de la contamination fongique. Ensuite, nous avons étudié leur niveau de contamination par trois types de mycotoxines incluant les aflatoxines, le déoxynivalénol et la fumonisine. Finalement, nous avons étudié l'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de farines et de pains.

Les résultats de cette étude ont montré que la qualité hygiénique des zones de production du pain dépend essentiellement de la conformité du matériel utilisé au cours des étapes de production et aussi sur la conformité des locaux et des lieux. L'analyse fongique a montré que 24% les échantillons sont contaminés par les moisissures essentiellement par l'espèce *Aspergillus niger* et 9% des échantillons sont contaminés par les levures essentiellement par l'espèce *Debaryomyces sp.* Parmi l'ensemble des échantillons analysés 96,96 % présentent une très haute concentration des aflatoxines. Ce travail nous a permis également de mettre en évidence l'effet de la fermentation et de la digestion sur la réduction de la concentration des aflatoxines.

**Mots clés: Céréales, Qualité hygiénique, Aflatoxines, Déoxynivalénol, Fumonisine.**



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>AFs</i>	<i>Aflatoxines totales</i>
<i>CAM</i>	<i>Crédit Agricole du Maroc.</i>
<b>CCA</b>	Commission du <i>Codex Alimentarius</i> .
<i>CIC</i>	<i>Conseil International des Céréales.</i>
<i>DON</i>	<i>Déoxynivalénol</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
<i>FAO</i>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations.</i>
<b>GLCG</b>	Groupe de Liaison sur la Conservation des Grains.
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis Critical Control Point.
<i>MAPM</i>	<i>Ministère d'Agriculture et de Pêche Maritime.</i>
<i>Milieu PDA</i>	<i>Milieu Potato dextrose agar.</i>
<i>Mt</i>	<i>Millions de tonnes.</i>
<i>ONCIL</i>	<i>Office National Interprofessionnel des Céréales et Légumineuses.</i>
<i>UE</i>	<i>Union Européen.</i>
<i>URSS</i>	<i>Union des républiques socialistes soviétiques.</i>
<i>ONCIL</i>	<i>Office National Interprofessionnel des Céréales et Légumineuses</i>



## Table des matières

Introduction.....	9
Synthèse bibliographique.....	11
Industrie des céréales.....	11
I. Production et consommation.....	11
1. Mondiale.....	11
2. Nationale.....	12
2.1. Répartition géographique des zones de production.....	14
2.2. Les types de produits à base de céréales les plus consommés au Maroc.....	14
II. Qualité nutritionnelle des céréales.....	16
1. Qualité nutritive des céréales complètes.....	17
2. Propriétés protecteurs des céréales complètes.....	17
3. Les céréales complètes raffinées.....	17
III. Altération des céréales.....	18
1. Les moisissures et les mycotoxines.....	18
1.1. Les aflatoxines.....	21
1.2. Les ochratoxines.....	21
1.3. Les toxines de Fusarium.....	22
1.4. La patuline.....	22
IV. Normes établis.....	22
1. Nationaux.....	22
2. Internationaux.....	23
Matériel et méthodes.....	25
I. Enquête sur les conditions de vente et de commercialisation du pain.....	25
o Période d'étude.....	26
o Matériel.....	26
II. Analyse fongique des échantillons de produits céréaliers.....	26
1. Echantillonnage.....	26
2. Préparation de la suspension mère.....	26



3.	Isolement des levures et des moisissures (NM 08.0.123).....	26
3.1.	Identification et caractérisation des levures et moisissures isolées à partir des dérivés de céréales 27	
III.	Etude de la contamination par mycotoxines.....	30
1.	Principe générale.....	30
2.	Dosage des aflatoxines.....	30
2.1.	Préparation des extraits.....	31
2.2.	Dosage des aflatoxines .....	31
3.	Dosage de déoxynivalénol .....	31
3.1.	Préparation des extraits .....	31
3.2.	Dosage de déoxynivalénol.....	31
4.	Dosage de la fumonisine.....	32
4.1.	Principe du test.....	32
4.2.	Préparation des extraits .....	32
4.3.	Procédure du test.....	32
5.	Etude de l'effet de quelques traitements biologiques sur de la réduction de la concentration des aflatoxines.....	33
5.1.	Effet couplé de la fermentation et de température.....	33
5.2.	Effet de la digestion .....	33
	Résultats .....	34
I.	Enquête sur les conditions de vente et de commercialisation du pain.....	34
1.	Analyse du niveau de conformité .....	35
1.1.	Locaux.....	35
1.2.	Entretien et nettoyage .....	35
1.3.	Hygiène du personnel.....	36
1.4.	Entreposage de la matière première.....	37
2.	Qualification de la qualité de l'environnement de travail.....	38
II.	Analyse fongique .....	39
1.	Isolement de la flore fongique à partir des produits céréaliers issus des différents points de vente.....	39



---

2.	Caractérisation de la microflore isolée des produits à base de céréales .....	39
2.1.	Identification des moisissures .....	39
2.2.	Identification des levures .....	40
III.	Dosage des mycotoxines dans les échantillons .....	41
1.	Dosage des aflatoxines .....	41
2.	Dosage de déoxynivalénol .....	44
3.	Dosage des fumonisines .....	46
IV.	Effet de quelques traitements biologiques sur la réduction de la concentration des aflatoxines .....	48
1.	Effet couplé de la fermentation et de la température .....	48
2.	Effet de la digestion .....	49
	Discussion .....	50
	Conclusion et perspectives .....	53
	Références bibliographiques .....	55



## Liste des tableaux

Tableau 1: Donnés sur la situation des céréales dans le monde (FAO, 2014).....	11
Tableau 2: Comparaison de la valeur nutritionnelle de quelques produits céréaliers (Santé Canada, 2008) .....	16
Tableau 3: Effet toxique sur l'homme de quelques mycotoxines .....	20
Tableau 4: Limites maximales proposées par le projet de réglementations marocain d'alimentation humaine pour les limites de mycotoxines (Zinedine A. et al., 2007). .....	23
Tableau 5: Valeurs guides recommandées par le <i>Codex Alimentarius</i> pour les échanges mondiaux des denrées alimentaires destinées à l'homme.....	24
Tableau 6: Règlements européens en vigueur pour la limitation des teneurs en mycotoxines dans les produits céréaliers destinées à l'homme RÈGLEMENT (CE) N ° 1881/2006 19 décembre 2006. ....	24
Tableau 7: Analyse des aflatoxines totales dans les sous produits de céréales.....	43
Tableau 8: Analyse de déoxynivalénol dans les sous produits de céréales .....	45
Tableau 9: Analyse de fumonisines dans les sous produits de céréales.....	47



## Liste des figures

Figure 1: Conformité des locaux des zones de production du pain .....	35
Figure 2: Entretien et nettoyage des zones de production .....	36
Figure 3: Hygiène du personnel .....	37
Figure 4: Conformité des méthodes d'entreposage de la matière première.....	38
Figure 5: Analyse de conformité des programmes d'hygiènes.....	38
Figure 6: La flore fongique isolés à partir des produits de céréales collectés .....	39
Figure 7: Espèces de moisissures identifiées .....	40
Figure 8: Espèces de levures identifiées .....	41
Figure 9: Courbe d'étalonnage pour le dosage des aflatoxines totales .....	42
Figure 10: Gamme d'étalonnage de DON .....	44
Figure 11: Gamme d'étalonnage pour le dosage de fumonisine.....	46
Figure 12: Etude de l'effet de cuisson pour la réduction de la concentration d'aflatoxine .....	49
Figure 13: Etude de l'effet de la digestion sur trois échantillons différents de pains .....	50



## Introduction

Les céréales sont à la base de notre alimentation depuis l'émergence de l'agriculture. Chaque continent a eu sa céréale de prédilection : le riz en Extrême-Orient, le blé et l'orge de l'Inde à l'Atlantique, le seigle et l'avoine en Europe occidentale, le maïs en Amérique, le millet et le sorgho en Afrique. Depuis plus d'un siècle, la consommation des céréales est en baisse dans les pays industrialisés. Toutefois, elle demeure importante dans les régions moins favorisées, où les céréales sont la principale source de l'apport énergétique et assurent jusqu'à 90 % de l'apport en protéines, contre 25 % dans les pays industrialisés (FAO, 2014).

Environ 600 millions de tonnes de blé sont produites par an dans le monde. La plupart est transformé en farine de blé puis en divers aliments tels que le pain, les pâtes, les nouilles et les gâteaux.

Cependant, la plante des céréales pousse à des climats chauds et humides offrant aux champignons notamment aux moisissures toxigènes de très bonnes conditions de développement ceci s'ajoute à la richesse des graines des céréales en glucides reconnus comme principales sources d'énergie (Zinedine *et al.*, 2009).

Les moisissures responsables de l'altération des graines sont réparties en deux groupes écologiques, les moisissures du champ : *Alternaria* et *Fusarium* (Cruz *et al.*, 1988) et les moisissures de stockage : *Aspergillus* et *Penicillium* (Cahagnier *et al.*, 1996).

La sécrétion par les moisissures de métabolites toxiques dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (nature de la souche) ou bien extrinsèques (conditions de l'environnement).

Le Maroc se caractérise par un climat chaud et humide, ce qui favorise la croissance de ces moisissures toxigènes dans la matière première des aliments notamment celle des produits céréaliers. La haute contamination de la matière première et les conditions non contrôlées de traitement sont deux grands problèmes de sécurité alimentaire au Maroc. Un programme de gestion des risques tels que le système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) qui sert à identifier et à maîtriser les risques durant la production et la transformation, n'est pas encore appliqué au sein des unités de transformation des aliments. Selon la *Commission du Codex Alimentarius* (CCA), ce système si il est correctement mis en œuvre, devrait déboucher sur une réduction du niveau des mycotoxines dans de nombreuses céréales (CCA, 2003). En effet, les problèmes de mycotoxines



liés à l'alimentation n'ont pas encore été profondément étudiés pour acquérir les informations nécessaires (Zinedine et *al.*, 2009). Les questions de réglementation ne sont pas disponibles dans le domaine de l'exposition alimentaire et le commerce de détail.

Les produits céréaliers sont parmi les principales denrées alimentaires les plus contaminées par la flore fongique responsable de la production des substances hautement toxiques connues sous le terme de mycotoxines. Des études épidémiologiques ont révélé la dangerosité de ces mycotoxines sur la santé de l'Homme. Au Maroc, les premières recherches scientifiques faisant mention de la contamination des denrées alimentaires par des champignons toxigènes n'ont vu le jour qu'au milieu des années 70 où un nombre de produits incluant des céréales sont révélés susceptibles d'héberger des spores d'*Aspergillus* toxigènes. Nos assiettes ne sont pas donc à l'abri du danger causé par ces micro-organismes pathogènes. En plus, les unités industrielles marocaines et les unités d'importation œuvrent en l'absence de contrôle de routine par les autorités compétentes et de l'absence de standards de qualité et de sécurité sanitaire des aliments. Par conséquent, le manque de l'application de normes et de limites réglementaires fixant les teneurs maximales des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale dans notre pays rend la sécurité des consommateurs marocains dépendante en grande partie de la chaîne d'approvisionnement alimentaire et de la qualité hygiénique des zones de transformation des produits à base de céréales.

Les principaux objectifs de notre travail visent :

- Evaluation de la qualité hygiénique de quelques zones de production du pain au niveau de la région de Fès.
- Etude du degré de la contamination microbienne des échantillons collectés.
- Dosage des mycotoxines dans les échantillons à base de céréales en utilisant des trousse d'ELISA.
- Etude de quelques facteurs pouvant avoir un effet sur la réduction de la concentration des aflatoxines dans les produits analysés.



## Synthèse bibliographique Industrie des céréales

### I. Production et consommation

#### 1. Mondiale

Les céréales constituent de loin la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour la consommation humaine et pour l'alimentation du bétail.

Le secteur des céréales est d'une importance cruciale pour les disponibilités alimentaires mondiales.

Au niveau mondial, la consommation moyenne de céréales par habitant a augmenté légèrement, passant de 152.2 kg en 2012/13 à 152.9 kg en 2013/14 (FAO, 2014) (tableau 1).

**Tableau 1:** Données sur la situation des céréales dans le monde (FAO, 2014)

Année	2011-2012	2012-2013	2013-2014
<b>Production</b>			
Monde	2353.3	2306.8	2514.8
Pays en voie de développement	1352.0	1396.0	1437.6
Pays développés	1001.3	910.8	1077.2
<b>Commerce</b>			
Monde	319.4	309.3	325.3
Pays en développement	101.6	125.6	108.7
Pays développés	217.8	183.7	216.6
<b>Utilisation</b>			
Monde	2326.6	2324.7	2419.8
Pays en développement	1470.6	1489.2	1543.1
Pays développés	856.0	835.5	876.7
Consommation humaine de céréales par habitant (en Kg/habitant)	151.9	152.2	152.9

Selon un rapport du Conseil International des Céréales, les principaux pays exportateurs des céréales sont : Argentine, Australie, Canada, Etats-Unis, Kazakhstan, Russie, Ukraine, Union européenne (Conseil International des Céréales, 2014).

Les dernières estimations de FAO concernant la production céréalière mondiale de 2013 s'établissent à 2 515 millions de tonnes (y compris le riz usiné).

Concernant le blé, cette denrée alimentaire constitue la principale culture céréalière dans le monde et représente environ 31% de la consommation globale en céréales (Choueiri E. et al., 2003). Une proportion croissante de blé est utilisée pour l'alimentation animale dans les pays industrialisés (45



pour cent de son usage total dans l'Union Européen). L'utilisation de blé par habitant dans les pays en développement, essentiellement pour l'alimentation humaine, a continué d'augmenter, et la plupart de ces pays sont de plus en plus dépendants des importations.

Les principales régions consommatrices de blé dans le monde sont l'Asie (Asie de l'Est pour 140 Millions de tonnes (Mt) et du Sud pour 127 Mt) et l'Union Européenne (121 Mt). Suivent les pays de l'ex-URSS (Union des républiques socialistes soviétiques), le Moyen-Orient, l'Amérique du Nord et l'Afrique. Parmi ces grands ensembles, certains reposent en grande partie sur les importations pour assurer leur consommation. C'est le cas de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient, producteurs et consommateurs historiques de blé, essentiellement pour l'alimentation humaine.

En 2013/2014, le poste « alimentation humaine, semences, usages industriels » représenterait 94 % des utilisations intérieures en Afrique du Nord. Avec 46 Million de tonnes importées en 2013/2014, les pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient concentrent le tiers des échanges mondiaux (Agreste Conjoncture, 2014).

Selon dernier un rapport du ministère de l'agriculture et de l'agroalimentaire et de forêt de la France, en Afrique du Nord, le premier importateur est l'Égypte (10 Mt) suivi de l'Algérie (6,5 Mt) et, pour des quantités plus faibles, le Maroc, la Libye et la Tunisie. Leurs importations augmentent régulièrement, en relation avec une production déficitaire et parfois irrégulière, et une population en hausse, par ailleurs, en Afrique du Nord, 40 % des quantités de blé consommées seraient importées, ce pourcentage atteignant 57 % au Moyen-Orient (Agreste conjoncture, 2014).

Les principaux pays producteurs des céréales dans le monde sont la Chine continentale, l'Inde, les Etats Unis et la Fédération de Russie.

## 2. Nationale

L'Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), déclare en 2007 que l'apport énergétique alimentaire de principales céréales (blé, maïs et orge) constitue 60% de l'apport énergétique alimentaire des Marocains. Cette place avancée à l'échelle des gros consommateurs de céréales, mais peu enviable, est confirmée par la consommation annuelle au Maroc qui s'élève à 200 kg / habitant / an sachant que la consommation moyenne mondiale de céréales est de 152 kg/an/habitant (Office National Interprofessionnel des Céréales et Légumineuses



« ONICL », 2013). Elles fournissent environ 2/3 des besoins énergétiques et 70% des apports protéiques dans une ration alimentaire moyenne (FAO, 2003).

Selon la Direction de la Statistique, les céréales représentaient 19,5 % des dépenses alimentaires. En effet, la consommation des céréales sous forme de produits qui en sont dérivés directement (pain, farines, semoules) ou indirectement (produits laitiers, viandes) constitue une part importante des dépenses alimentaires des ménages (Direction de la statistique, 2001).

Les céréales représentent 20% des dépenses alimentaires. Dans l'alimentation animale, les céréales, la paille et le son couvrent 40% des besoins totaux en unités fourragères. Elles donnent lieu à 40% des occasions de travail offertes par le secteur de la production végétale. En outre, elles constituent en moyenne 30% du Produit Agricole Intérieur Brut et 45% du total des importations alimentaires. Ainsi, le commerce des céréales et de leurs dérivés conditionnent l'activité économique générale du pays (Émission de Billets de Trésorerie, 2003). Cette place de choix est révélée par l'importance des superficies qu'elles couvrent et qui atteignent 5,3 millions hectare. Cette superficie s'est accrue de 23% par rapport à ce qu'elle était pendant les années 70. Actuellement, les céréales occupent 70% des superficies cultivées par an. L'orge, le blé tendre, le blé dur et le maïs constituent le lot des céréales principales. Les céréales dites secondaires comprennent le riz, l'avoine, l'alpiste et le sorgho.

Le commerce des céréales et de leurs dérivés conditionnent l'activité économique générale du pays. Elles représentent la première spéculation au Maroc, en effet les conditions climatiques par leur caractère très aléatoire conditionnent énormément la production annuelle en céréales. On estime que 90 % des surfaces cultivées en céréales sont situées dans les régions à agriculture pluviale et la moitié de ces surfaces sont localisées dans les zones arides et semi-arides.

Le blé tendre représente près de 70% de la consommation des céréales des urbains et 66% de celle des ruraux. En milieu urbain, la consommation de blé dur est principalement issue de l'industrie alors qu'en milieu rural, les ménages consomment le blé dur produit localement. Les consommations humaines de l'orge et du maïs sont devenues marginales spécialement pour les urbains (Crédit Agricole du Maroc, 2012).

Selon le Ministère de l'Agriculture à l'horizon 2020 la demande totale des céréales pourrait atteindre 137,5 millions de quintaux. Les demandes en blé tendre et en blé dur constitueraient respectivement près de 33% et 23% de la consommation totale projetée (ONICL, 2013).



Dans le but d'améliorer la productivité céréalière nationale et réduire l'exposition à la volatilité du marché international, le « Plan Maroc Vert » adopté en 2008 a notamment pour objectif, dans la filière céréalière, de réduire les importations de 15 à 20% à l'horizon 2020 (Ministère d'Agriculture et de Pêche Maritime « MAPM », 2009). Cependant, les investissements prévus pour le développement d'une agriculture à haute valeur ajoutée (avec des produits majoritairement destinés à l'exportation) sont très largement supérieurs à ceux prévus pour les petites exploitations agricoles (MAPM, 2008b).

### *2.1. Répartition géographique des zones de production*

La superficie nationale couverte par les 4 principales céréales dépasse 5 millions d'hectares et la production varie, en relation avec les changements de conditions météorologiques, dans une grande fourchette allant de 17,5 à 103,6 millions de quintaux (en moyenne 30% de blé tendre, 26% de blé dur, 39% d'orge et 5% de maïs).

La production est plus élevée dans les greniers traditionnels, principalement Chaouia, l'Oriental, Abda-Doukkala (15% par région) et secondairement le Haouz, Taza-El Hoceima, le Gharb, Meknès et Tadla-Azilal (7 à 9% chacune), l'ensemble assurant plus de 84% de la production nationale. Dans les 8 autres régions, la production est très faible (1 à 5%) ou nulle (régions désertiques) incitant le Plan Maroc Vert à prôner la reconversion vers des activités plus adaptées (Institut National de Recherche Scientifique et Maroc Vert, 2012).

Vu l'importance stratégique de la filière, ce dernier a fait l'objet d'une politique gouvernementale attentive : le « Plan Maroc Vert » qui a fixé comme objectif l'augmentation rapide et focalisée de la productivité céréalière par:

- La refonte du tissu des acteurs autour d'agrégateurs productivistes capables d'intensifier l'investissement (intrants, stockage, logistique).
- La re-focalisation sur des périmètres représentant un cœur céréalier à haute productivité.
- L'accompagnement possible par un redéploiement graduel des mécanismes de ciblage des aides aux consommateurs et aux producteurs (ONICL, 2013).

### *2.2. Les types de produits à base de céréales les plus consommés au Maroc*

Au Maroc les produits céréaliers sont principalement issus de la farine du blé, et ils sont consommés sous des formes très diverses, variables avec les continents et les civilisations.



Le blé tendre est principalement destiné à la fabrication de pains (levés ou plats), de biscuits, de viennoiseries (croissants, brioches, pain de mie, pain brioché...), de pâtisseries et produits divers fabriqués par cuisson-extrusion (pains plats, produits apéritifs) et de pâtes alimentaires; le blé dur est destiné à celle des pâtes alimentaires, de couscous, de galettes et, plus rarement, de pain.

- **Pain**

Bien avant de prendre le sens actuel et occidental de "pâte pétrie, levée, et cuite au four", le pain existait et était consommé sous forme d'un aliment quelque peu différent, que nous ne qualifierions d'ailleurs plus aujourd'hui de pain.

Au Maroc, le pain est un produit de consommation de base pour les marocains. Selon des chiffres émanant de la fédération nationale de la boulangerie et pâtisserie au Maroc, on compte 105 millions de rondes et baguettes de pain acheté consommées par jour soit une moyenne de trois pour chaque habitant.

- **Semoule de blé**

La branche industrielle des fabricants de pâtes alimentaires et couscous au Maroc compte à ce jour (mars 2004) 16 unités opérationnelles qui totalisent une capacité de production annuelle de l'ordre de 170.000 tonnes dont la moitié est destinée à la production des pâtes alimentaires et l'autre moitié à la fabrication du couscous( Rapport de synthèse , 2004).

Les consommations moyennes des produits industriels sont de l'ordre de 1,55 kg/an /personne pour les pâtes alimentaires et de 1,60 kg/an /personne pour le couscous.

- **Biscuits**

Les biscuits existent sous une très grande variété de forme et décomposition: secs, sucrés, salés, fermentés, moelleux, fourrés... On connaît des centaines de produits différents. Leur fabrication industrielle a pris naissance en Angleterre au début du XXe siècle.

On distingue des produits à pâtes dures et semi-dures (biscuits sucrés : petit-beurre, sablés, biscuits secs ; biscuits salés pour apéritif ; crackers), des produits à pâtes molles (génévoises) et des produits à pâtes liquides (gaufrettes).

La consommation de biscuits au Maroc est autour de 2 kg /habitant/ an.

Le marché marocain de la biscuiterie est estimé à 58 000 tonnes par an. 28 entreprises : domination par sept opérateurs : *Gaumar*, *Henry's*, *Bimo*, *Excelo* et des marques étrangères notamment *Mars*. Le chiffre d'affaires global est de 664 millions de Dirhams, l'équivalent de 1,8 millions



depaquets vendus annuellement. Une croissance annuelle de l'ordre de 17 % à 20 %. Le secteur de la biscuiterie est segmenté en trois créneaux : les biscuits, les gaufrettes, et la pâtisserie industrielle.

## II. Qualité nutritionnelle des céréales

Les céréales et leur sous produits sont une source importante d'énergie, de glucides, de protéines et fibre, ainsi que toute une gamme de micronutriments tels que la vitamine E, une partie des vitamines du groupe B, le magnésium et le zinc (tableau 2).

**Tableau 2:** Comparaison de la valeur nutritionnelle de quelques produits céréaliers (Santé Canada, 2008)

	Energie	Proteines	Glucides	FAT (1)	Calcium	fer	Sodium	Potassium	Magnisium	Phosphore	Thiamine	Rhiflavine	Folates
	kcal	g	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	EFA (2)
Farine d'avoine	200	7	35	5.3	27	2.2	2	199	78	226	0.3	0.08	15
Farine de blé à grains entier	215	9	46	7.7	22	2.5	3	257	87	219	0.3	0.14	28
Farine de riz	305	8 5	67	2.0	8	0.3	0	63	29	82	0.1	0.02	3
Faine de seigle pâle	198	5	43	7.9	11	1.0	1	126	38	105	0.2	0.05	12
Semoule de maïs	267	6	57	5.4	4	0.8	2	118	29	61	0.1	0.04	35
Son d'avoine sec	122	9	33	5.2	29	2.7	2	281	117	365	0.6	0.11	26
Pain blanc commercial	93	3	18	0.8	53	1.3	238	35	8	35	0.2	0.12	60
Couscous	93	3	19	0.7	7	0.3	4	48	7	18	0.1	0.02	12

(1) FAT : Fibres Alimentaires Totales AFA ; (2) EFA : Equivalent de Folate Alimentaire



## 1. Qualité nutritive des céréales complètes

Les céréales complètes sont une source de nombreuses vitamines essentielles, des minéraux et de composés phytochimiques.

Les grains entiers de céréales sont :

- Une excellente source de glucides.
- Faible en gras saturés, mais est une source d'acides gras polyinsaturés, dont les omégas - 3 et l'acide linoléique.
- Sans cholestérol, riche en fibres solubles et insolubles, et d'amidon.
- Une source importante de protéines.
- une bonne source de vitamines du groupe B, y compris l'acide folique.
- Une bonne source de nombreux minéraux tels que le fer, le magnésium, le cuivre, le zinc et le phosphore.
- Une bonne source d'antioxydants et de composés phytochimiques.

## 2. Propriétés protecteurs des céréales complètes

Les céréales complètes contiennent de nombreux composés phytochimiques, ces derniers se trouvent dans les aliments végétaux. Ces composés phytochimiques comprennent :

- Lignanes : peut réduire le risque de maladie coronarienne.
- Acide phytique - réduit l'index glycémique (IG) des aliments, ce qui est important pour les personnes atteintes de diabète, et aide à protéger contre le développement de cellules cancéreuses dans le côlon.
- Saponines, phytostérols, squalène, oryzanol et tocotriénols reconnus pour leurs capacités de réduire le cholestérol sanguin.
- Composés phénoliques reconnus pour leurs effets antioxydants.

## 3. Les céréales complètes raffinées

Pour les grains de céréales raffinés, les couches de son et le germe sont généralement retirées, ne laissant que l'endosperme. Ce processus peut entraîner des pertes importantes de fibres, de vitamines, de minéraux, d'antioxydants et de composés phytochimiques des grains.

Certaines fibres, de vitamines et de minéraux peut être rajouté dans les produits céréaliers raffinés (pain blanc).



### III. Altération des céréales

En raison de leur large utilisation comme aliments de l'Homme et du bétail, l'étude microbiologique et la qualité hygiéniques des produits céréaliers restent importantes afin de préserver leur salubrité en termes de contamination microbienne et en termes de préservation de leur qualité organoleptique.

Les sources de contamination microbienne des céréales sont nombreuses, elles proviennent principalement de l'environnement dans lequel les grains sont cultivés, traités et transformés. Les micro-organismes qui contaminent les céréales peuvent provenir de l'air, la poussière, le sol, l'eau, les insectes, les rongeurs, les oiseaux, les animaux, les êtres humains, du stockage et de l'expédition des conteneurs et des équipements de manutention et de traitement (Bullerman B. et *al.*, 2011).

Cette contamination peut aboutir à une altération des céréales qui dépend de trois facteurs conditionnant l'ampleur de ces diverses altérations :

- **Le temps:** c'est le facteur prépondérant puisqu'il conditionne la durée des dégradations. Plus un grain humide attend avant d'être traité, plus il se dégrade, il convient donc d'agir le plus rapidement possible après la récolte pour mettre ce grain dans de bonnes conditions de stockage.
- **L'humidité du grain:** elle conditionne l'intensité des dégradations surtout si le grain est très humide. Lorsque l'humidité du grain est portée au niveau du « seuil de stabilisation » (il n'y a plus ni eau libre ni eau faiblement adsorbée), l'activité respiratoire est très faible, et le produit se comporte presque comme une matière inerte. Les moisissures ne peuvent se développer qu'avec une humidité relative de l'air interstitiel supérieure à 65-70 %.
- **La température du grain:** une augmentation de 5°C double l'intensité respiratoire. On a donc intérêt à abaisser la température de stockage par la ventilation. Les insectes ne se reproduisent plus au-dessous de 12°C et ils sont tués si le grain peut être maintenu durant deux mois et demi en dessous de 5°C.

#### 1. Les moisissures et les mycotoxines

La contamination des grains de céréales peut avoir lieu :



Au cours de la culture des céréales : certaines espèces de moisissures provenant du sol (*Fusarium*) ou de l'atmosphère se développent préférentiellement sur les plantes, en particulier lorsqu'elles y trouvent une porte d'entrée au niveau par exemple des grains en faveur d'une microblessure due à des actions mécaniques (brisures) ou engendrée par l'action d'insectes ou de petits animaux comme les rongeurs. La protection des cultures par utilisation de pesticides et de fongicides visent d'ailleurs entre autre à limiter ces microlésions considérées comme points d'entrée des contaminations par les micro-organismes.

Pendant le stockage : la flore dangereuse ou susceptible d'altérer la qualité des céréales est essentiellement constituée par des moisissures adaptées à des taux d'hydratation assez bas (15-16% de teneur en eau) et appelée communément flore de stockage.

Les principaux représentants de cette microflore de stockage sont essentiellement des espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, accompagnées par des espèces secondaires de Mucorales ou des genres *Byssoclamys*, *Scopulariopsis* et *Wallemia*. Ces moisissures de stockage sont les seules à pouvoir se développer sur des grains à 15 - 16% de teneur en eau (elles sont appelées, de ce fait, xérotolérantes). De plus, certaines d'entre elles peuvent synthétiser des molécules extrêmement toxiques pour l'homme et les animaux : les mycotoxines (FAO, 1996).

Dans des conditions favorables de la croissance fongique au niveau des céréales et de ses produits, le risque de la production des toxines devient non négligeables, ces substances sont généralement connues sous le nom de mycotoxines (tableau 2).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, présentes dans plusieurs produits de l'alimentation humaine et animale et qui provoquent de nombreuses maladies chez l'homme et l'animal (FAO, 2003). Toutefois, la sensibilité chez les animaux et chez l'homme varie avec les espèces, l'âge, la nutrition, la période d'exposition ainsi que d'autres facteurs (FAO, 2003).

Selon un rapport de FAO, les intoxications sont rares chez l'homme du fait de son alimentation diversifiée. Mais, dans le cas de stockage de tonnages très importants de céréales pendant de longues durées, des développements ponctuels sont à craindre (FAO, 1996). Les seuils de toxicité de



ces toxines chez l'homme ou chez animaux d'élevage étant très bas, le moindre développement, même localisé, est particulièrement important à détecter.

Plusieurs milliers de molécules toxiques ont été identifiées chez les champignons mais seule une vingtaine de familles posent des problèmes en nutrition humaine ou animale (Cahagnier B. et al., 1998) dont les plus reconnues pour leurs effets toxiques sont donnés dans le tableau 3.

Cinq genres de moisissures (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps*) sont les mieux reconnus comme aptes à produire des mycotoxines dans les aliments. Toutes les espèces d'un genre, et même toutes les souches d'une même espèce toxigène, ne sont pas productrices de mycotoxines ; inversement, une même espèce ou souche fongique peut être capable de produire plusieurs sortes de mycotoxines. La multicontamination des denrées est donc fréquente : elle peut être due à une multiproduction de mycotoxines par une même espèce (en général deux ou trois mycotoxines, parfois plus) ou bien à une monoproduction de plusieurs espèces de moisissures simultanément présentes sur la denrée alimentaire.

**Tableau 3:** Effet toxique sur l'homme de quelques mycotoxines

Moisissure responsable	Mycotoxines incriminées	Syndromes prédominants
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines	Hépatotoxiques
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxines	Néphrotoxiques
<i>Penicillium viridicatum</i>	Citrinine	
<i>Aspergillus clavatus</i>	Patuline	Neurotoxiques
<i>Penicillium expansum</i>		
<i>Fusarium divers</i>	Trichothécènes	Gastro-entérotoxiques
<i>Fusarium divers</i>	Trichothécènes	Hémorragies
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisine	Nécrose cervicale
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisine	Cancer de l'œsophage
<i>Fusarium graminearum</i>	Zéaralénone	Effet œstrogène



Les principales familles de mycotoxines suivies sur le plan de la sécurité sanitaire des aliments sont décrites ci-dessous :

### 1.1. Les aflatoxines

Les aflatoxines sont produites essentiellement par des *Aspergillus* sous des climats chauds et humides. L'*Aspergillus flavus* (d'où le nom d'aflatoxine de « A.-fla-toxine », sous-entendu toxine d'*Aspergillus flavus*) se développe particulièrement sur des graines d'oléagineux (arachides, maïs), des céréales (blé), des plantes aromatiques (épices ou aromates comme le piment, le paprika, le poivre, la noix de muscade, le cumin...). On distingue :

- L'aflatoxine B1 est de loin la plus toxique (cancérogène) et en règle générale la plus abondante, les autres aflatoxines co-sécrétées étant les aflatoxines B2, G1 et G2 [les lettres B et G renvoient à l'initiale (en anglais) de la couleur que prennent les taches de fluorescence lors de l'analyse de ces toxines par chromatographie sur couche mince : B pour bleu (blue) et G pour vert (green). Les aflatoxines sont essentiellement rencontrées sur des produits importés (arachides, maïs, raisins secs...), en provenance de pays aux climats tropicaux ou subtropicaux (Afrique, sud des États-Unis).
- Les aflatoxines M1 et M2 (cette dernière rarement observée) sont des dérivés hydroxylés des aflatoxines B1 et B2 que l'on retrouve typiquement dans le lait de la vache après métabolisation hépatique.

### 1.2. Les ochratoxines

Les ochratoxines peuvent être synthétisées par des *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, d'où le nom de la toxine) ou des *Penicillium* (*P. verrucosum*).

L'ochratoxine A contamine de nombreuses denrées alimentaires (céréales et produits dérivés). Il existe les formes dites B et C rarement recherchées car peu présentes dans les aliments.



### 1.3. Les toxines de *Fusarium*

Les *Fusariums* sont des moisissures extrêmement répandues dans le sol, se développent facilement sur les épis de céréales dans nos régions tempérées.

On distingue la vaste famille des trichothécènes (probablement près de 200 molécules) subdivisées en trichothécènes A (toxines T2, HT2...) et trichothécènes B (déoxynivalénol ou DON, nivalénol...).

#### a) La déoxynivalénol (DON)

La DON est produit par divers *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*) notamment sur le blé. Ces espèces de *Fusarium* sont aussi capables de produire la zéaralénone connue des éleveurs de porc comme molécule à effet oestrogénique perturbant la reproduction des élevages. La zéaralénone est essentiellement produite sur le maïs d'où cette mycotoxine tire son nom, « zéa » signifiant maïs.

#### b) Les fumonisines

Les fumonisines sont produites par différentes espèces de *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*...) sont au nombre d'une quinzaine mais la fumonisine B1 est de loin la plus répandue et la plus significative en terme de risque associé aux aliments. Elles ont été découvertes en 1988 à l'occasion de l'intoxication spectaculaire à évolution mortelle de chevaux contaminés par leur avoine.

### 1.4. La patuline

La patuline est une petite mycotoxine excrétée par diverses espèces de *Penicillium*, d'*Aspergillus* et de *Byssochyllum* : ces moisissures se développent sur les fruits (en particulier fruits à pépins) ou sur les betteraves.

## IV. Normes établis

Face à la gravité des mycotoxines, il est donc nécessaire de protéger la santé de l'homme et des animaux sensibles en limitant leur exposition aux mycotoxines.

### 1. Nationaux

Le Maroc ne possède pas des normes ou des limites réglementaires fixant les teneurs maximales des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale. Cependant, un projet de réglementation



de ces toxines a été préparé vers la fin des années 90 par le comité interministériel pour le contrôle alimentaire et la répression des fraudes (CIPCARF) mais il n'a pas encore été adopté (Zinedine A. et al., 2007). Ce projet prévoit la normalisation des contaminants minéraux et organiques dans les aliments et fixe les concentrations maximales admissibles des mycotoxines dans certaines denrées destinées à l'alimentation humaine et animales.

Même si d'après les documents de la FAO, ce projet est complet, mais certaines limites proposées restent élevées et nécessitent une révision, d'autres limites sont encore absentes et nécessitent d'être ajoutées avant l'adoption définitive de ce projet (tableau 4).

**Tableau 4:** Limites maximales proposées par le projet de réglementations marocain d'alimentation humaine pour les limites de mycotoxines (Zinedine A. et al., 2007).

Mycotoxine	Limite en µg/kg	Aliment concerné
AFB1	10	Tous les aliments
	5	Les huiles végétales, les céréales, la farine de blé
Aflatoxines totales	-	-
Fumonisines	-	-
ZEA	200	Céréales, huiles végétales
DON	-	-

- : Absence de donnés

## 2. Internationaux

Le *Codex Alimentarius* est une instance émanant de la FAO qui élabore des valeurs guides pour le contrôle à l'import-export des denrées alimentaires au regard du risque de mycotoxines (tableau 4). Il propose également des codes de bonnes pratiques agricoles pour tenter de prévenir ou d'essayer



de maîtriser la contamination des récoltes (au champ et au cours du stockage) par les mycotoxines (tableau 5).

**Tableau 5:** Valeurs guides recommandées par le *Codex Alimentarius* pour les échanges mondiaux des denrées alimentaires destinées à l'homme

Mycotoxines	Denrées	Teneurs maximales admissibles ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Aflatoxine B1	Alimentation infantile	1
Aflatoxine M1	Lait	0,5
Ochratoxine A	Céréales	5
Patuline	Pommes	50

En Europe, depuis l'ouverture du marché européen, la Commission européenne tente d'harmoniser les règlements existant dans les différents États membres. Toute disposition réglementaire concernant la sécurité sanitaire des aliments doit être transposée au niveau de chaque État membre. Un certain nombre de règlements (paraissant dans le Journal officiel des Communautés européennes) ont donc été récemment établis, notamment pour les aflatoxines, les ochratoxines et la patuline (tableau 6).

**Tableau 6:** Règlements européens en vigueur pour la limitation des teneurs en mycotoxines dans les produits céréaliers destinées à l'homme RÈGLEMENT (CE) N ° 1881/2006 19 décembre 2006.

Mycotoxine	Denrées	Teneurs maximales admissibles ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Aflatoxines totales (B1, B2, G1, G2)	Toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés	4
Déoxynivalénol	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales [y compris la farine de maïs, le maïs moulu et le gruau de maïs, son en tant que produit final mis sur le marché pour la consommation humaine]	750



	Pâtes (sèches)	750
	Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500
Fumonisines	Farine de maïs, maïs moulu, gruau de maïs, germe de maïs et huile de maïs raffinée	1000
	Aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe, à l'exception des aliments figurant aux points	400
	Préparations à base de maïs et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200

## Matériel et méthodes

### I. Enquête sur les conditions de vente et de commercialisation du pain

Au niveau des zones de production des pains notamment les boulangeries, la première cause de contamination du produit finis résulte généralement des mauvaises conditions de stockage de la matière première, ainsi qu'à différentes actes de productions avant sa distribution, ceci se répercute négativement sur ces produits finis et bien évidemment sur la santé du consommateur, il est donc indispensable de surveiller tous les éléments qui peuvent être responsable de la contamination du pain.



La présente étude a été conduite dans une optique technique et macro-économique, ceci permet une lecture spécifique sur les conditions de vente et de commercialisation du pain au niveau de la ville de FES. Pour se faire, l'enquête a été réalisée par le biais d'un questionnaire.

### ○ Période d'étude

Cette étude a été réalisée pendant une période qui s'est étendu entre Janvier 2014 et Avril 2014.

### ○ Matériel

Un questionnaire a été établi par Excel 2007 et utilisé dans cette enquête (voir annexes).

## II. Analyse fongique des échantillons de produits céréaliers

### 1. Echantillonnage

Trente-trois (33) échantillons de produits à base de céréales dont les pains (n=21), farines (n=5), biscuits (n=5) et semoules deblé (n=2) ont été collectés pendant une période de quatre mois. Les échantillons de sous produits céréaliers ont été prélevés auprès de différents points de vente : grande surface, boulangerie, épiciers en fonction des marques de ces produits que ce soit marques locales ou importées et sont répartis sur différents quartiers et dans le but d'avoir une hétérogénéité des prélèvements.

Les échantillons ont été prélevés dans des sacs stériles et acheminés au laboratoire « Molécules Bioactives de la Faculté des Sciences et Techniques - Fès » où ils ont été maintenus à une température de 4°C jusqu'à leur analyse.

Les analyses microbiologiques ont été focalisées sur la recherche des levures et moisissures, qui représentent l'empreinte de la contamination fongique (Larpent J. et *al.*, 1997).

### 2. Préparation de la suspension mère

La suspension mère a été préparée en dispersant vingt grammes de chaque échantillon de sous produits de céréales dans 180 ml de la solution Tween 80 (0,05%) (Tabuc C. et *al.*, 2007).

### 3. Isolement des levures et des moisissures (NM 08.0.123)

L'isolement des levures et des moisissures a été faite par étalement d'un volume de 0,1 ml de la suspension mère dans une boîte de pétri contenant le milieu gélosé approprié pour chaque germe.



- Isolement des moisissures : utilisation du milieu gélosé dextrosée à la pomme de terre ou milieu PDA (voir annexes) auquel s'ajouté le chloramphénicol (25µg/ml) afin d'inhiber toute croissance bactérienne. L'incubation des boîtes ensemencées est effectuée à 30°C pendant 3 à 7 jours.
- Isolement des levures : utilisation du milieu YPG ou le Sabouraud (voir annexes), auquel est ajouté le chloramphénicol (25µg/ml) afin d'inhiber toute croissance bactérienne. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 à 72 heures.

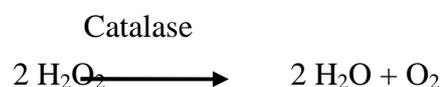
### 3.1. Identification et caractérisation des levures et moisissures isolées à partir des dérivés de céréales

Une fois isolées, les levures et les moisissures sont purifiées par repiquages successifs sur un milieu d'isolement convenable. Ensuite, les souches de moisissures sont stockées sur gélose inclinée (2% de l'extrait de malt et 2% d'agar) à 4°C. Celles des levures sont conservées dans le glycérol (50%) dans température de - 20°C ou sur gélose inclinée de YPG (voir annexe).

#### 3.1.1. Identification des moisissures

Après ensemencement des moisissures sur le milieu PDA et leur incubation à 25°C pendant une semaine. L'identification du genre des moisissures a été réalisée ainsi selon la clé d'identification d'André Breton par étude:

- Macroscopique : Morphologie, vitesse de croissance, couleur et texture du thalle.
- Microscopique : Etudier l'organe de fructification des moisissures isolés par une étude de la forme du mycélium, du sporange aussi bien les caractéristiques morphologiques des spores.
- Caractères physiologiques : utilisation des tests enzymatiques :
  - Test catalase des moisissures



Ce test consiste à déposer une goutte d'une solution de l'eau oxygénée sur une lame et on y dissocie la souche à tester dans la goutte par une anse. Un dégagement gazeux aura lieu dans le cas d'une moisissure catalase positif.



### 3.1.2. Identification des levures

L'identification des levures a été basée sur l'analyse des caractères morphologiques, et sur l'étude de certains critères physiologiques. Cette détermination systématique est réalisée conformément aux clés Kreger-Van Rij (Kreger-Van Rij *et al.*, 1984).

#### a) Etude du mycélium

L'observation microscopique du mycélium a été réalisée après 10 jours d'incubation à 25°C. La forme du mycélium est une caractéristique importante pour la détermination systématique des souches.

#### b) Etude de la sporulation

Le mode de reproduction sexuée est l'un des principaux critères dans la classification systématique des levures.

- Levures ascosporegènes, rattachées aux ascomycètes dont la reproduction est assurée par des ascospores qui sont des endospores.
- Levures ballistosporogènes, apparentées aux basidiomycètes dont la reproduction est assurée par des basidiospores qui sont des exospores.
- Levures imparfaits, rattachées aux deutéromycètes dont aucun mode de reproduction sexuée n'est défini. Ce groupe a deux affinités d'ascomycètes et de basidiomycètes.

La forme des spores est évaluée par la culture des souches sur un milieu spécifique notamment le milieu Mac Calary d'Adams (voir annexe). L'incubation se fait à 25°C pendant un mois. Les trois formes de sporulation sont mises en évidence à l'aide des observations microscopiques après coloration des spores avec le vert de malachite.

#### c) Etude des caractères physiologiques

##### o Test de réduction du tétrazolium

Ce test a été réalisé par étalement d'un inoculum concentré sur des boîtes contenant le milieu de Sabouraud additionné de 0,1 g/l du 2, 3,5-tryphenyl-tétrazolium, produit incolore avant l'ensemencement. Une réaction positive indiquant une réaction du tétrazolium se traduit par une teinte rose puis rouge plus ou moins intense selon les espèces. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48h (Chakiri M. *et al.*, 2008 et Kreger-van Rij *et al.*, 1984).

Sur ce milieu la couleur des colonies varie suivant l'espèce de *Candida* :



- Blanc crème : *Candida albicans*.
- Blanc mat : *Candida krusei*.
- Rose : *Candida stellatoidea*.
- Rouge : *Candida parakrusei*.
- Rouge violet : *Candida tropicalis*.

#### ○ **Formation de pellicule**

Le bouillon du milieu YPG est réparti à raison de 5ml par tube de 18mm de diamètre puis stérilisé à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min. Ensuite, ce milieu est ensemencé par 10µl d'une préculture fraîche des différentes souches testées, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 48h. La réaction positive est représentée par la formation d'un voile à la surface du bouillon, ou d'un anneau sur la paroi du tube ou bien par la formation des deux (Chakri M. et *al.*, 2007).

#### ○ **Croissance des levures en fonction de la variation des températures**

Les souches de levures sont inoculées dans le milieu de culture Sabouraud ou YPG puis incubés afin de caractériser leurs capacité de développement selon différents températures 25°C ; 30°C ; 37°C et de 44°C pendant 24h.

#### ○ **Test catalase des levures**

Ce test consiste à déposer une goutte d'une solution de l'eau oxygéné sur une lame et on y dissocie la colonie des levures à tester dans la goutte par une anse. Ensuite si un dégagement gazeux a lieu cela traduisant la présence de l'enzyme catalase chez les levure testé.

#### ○ **Test amylase des levures**

La levure capable d'utiliser l'amidon va sécréter des amylases, qui hydrolysent l'amidon :



A partir des cultures fraîches de levures à tester ; on ensemence de chaque culture de levure sur des boites contenant le milieu YPG additionné de l'amidon. Après 48 heures d'incubation à 30°C, on fait la révélation de l'activité amylase.



La révélation se fait par le mélange de:

- Iodure de potassium.....3g.
- Iode.....0,3g.
- Eau distillée.....100ml.

Le lavage a été fait par l'eau distillé stérile.

### III. Etude de la contamination par mycotoxines

Les échantillons de sous produits de céréales collectés ont également été analysés pour trois types de mycotoxines différentes (aflatoxines, déoxynivalénol, fumonisine) en utilisant le test d'ELISA par compétition.

#### 1. Principe générale

Le principe de la détermination des mycotoxines est basé sur leur extraction à partir des différents échantillons de sous produits de céréales par un solvant approprié et leur dosage en utilisant la technique immunoenzymatique.

Le dosage des mycotoxines dans les différents échantillons de sous produits de céréales collectés a été réalisé par deux types de tests ELISA:

- Test ELISA indirect par compétition : pour le dosage des aflatoxines et déoxynivalénol.
- Test ELISA direct par compétition : pour le dosage de la fumonisine.

#### 2. Dosage des aflatoxines

Il s'agit d'une réaction antigène-anticorps, où les anticorps de captures dirigées contre un type de mycotoxine sont fixés sur les puits de la plaque de microtitration. Par l'addition de l'extrait de l'échantillon à analyser et une quantité déterminé d'un type de mycotoxine conjugué à la peroxydase (AFT-PX) donné par le kit, les deux molécules (mycotoxine suspectée présente dans l'échantillon et la mycotoxine marquée donné par le kit) entrent en compétition pour un même anticorps anti-aflatoxine. Le complexe anticorps antigène est révélé par l'addition d'un substrat chromogène qui est le 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) où une coloration bleue s'apparait, une solution d'arrêt est alors ajouté après une incubation de la plaque d'ELISA à 30° pendant 20 à 30 minutes. La mesure de l'absorbance est réalisée par spectrophotomètre à 450nm utilisant un lecteur



de plaques à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland). La concentration d'aflatoxine dans l'échantillon est inversement proportionnelle à l'absorbance.

Pour le dosage des aflatoxines dans les échantillons de sous produits de céréales, un kit de test d'ELISA a été utilisé (RIDASCREEN® Aflatoxin Total, Germany).

L'extraction et le dosage des trois types de mycotoxines (aflatoxines, déoxynivalénol et fumonisine) ont été réalisés selon les instructions du fabricant.

### *2.1. Préparation des extraits*

Deux grammes (2g) de l'échantillon de sous produits céréaliers ont été solubilisés dans 10 ml de méthanol 70 % et homogénéisée pendant 10min. L'extrait obtenu est filtré à travers du papier Wattman. Cent microlitres du filtrat obtenu est dilué dans 600µl du tampon donnée par le kit.

### *2.2. Dosage des aflatoxines*

Cinquante microlitres d'anticorps dilué au 1/2 dans du tampon BBS sont répartis dans chaque puits de la plaque d'ELISA. Cette dernière est ensuite incubée une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 50µl du filtrat de l'échantillon dilué au 1/7ème et 50µl du conjugué sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. Une incubation est faite une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 100µl du substrat / chromogène (TMB) est additionné. Ensuite la plaque est incubée pendant trente minutes à 30°C. Cent microlitres de la solution d'arrêt de la réaction est ajouté. La mesure de l'absorbance est réalisée par un spectrophotomètre à 450nm (Labsystems Multiskan MS, Finland).

## **3. Dosage de déoxynivalénol**

Pour le dosage de déoxynivalénol, un kit test est utilisé (RIDASCREEN® FAST DON). Les instructions du fabricant ont été suivies pour la préparation des extraits et le dosage de déoxynivalénol.

### *3.1. Préparation des extraits*

Cinq grammes (5g) de l'échantillon de sous produits de céréales ont été solubilisés dans 25 ml de l'eau distillée et homogénéisés pendant trois minutes. L'extrait obtenu est filtré à travers du papier Wattman.

### *3.2. Dosage de déoxynivalénol*

Cinquante microlitres d'anticorps dilué au 1/2 dans du tampon BBS sont répartis dans chaque puits de la plaque d'ELISA. Cette dernière est ensuite incubée une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 50µl du filtrat de l'échantillon dilué au 1/7ème et 50µl du conjugué sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. Une incubation est faite



une heure à 30°C. Après trois lavage par le tampon BBS, 100µl du substrat /chromogène (TMB). Ensuite la plaque est incubée pendant trente minutes à 30°C. Cent microlitres de la solution d'arrêt de la réaction est ajouté. La mesure de l'absorbance est réalisée par un spectrophotomètre à 450 nm (Labsystems Multiskan MS, Finland).

#### 4. Dosage de la fumonisine

Pour le dosage de la fumonisine dans les échantillons de sous produits de céréales collectés, un kit de dosage de la fumonisine a été utilisé (Agra Qant ®, Romer Lab, Ferland).

Les étapes de la préparation des extraits et du dosage sont données par le fabricant.

##### 4.1.Principe du test

Le dosage de la fumonisine se fait par la technique d'ELISA direct par compétition.

La fumonisine est extraite à partir des échantillons de produits céréaliers en utilisant le méthanol 70%. Les extraits dilués mélangés avec un conjugué de la fumonisine marqué à peroxydase et déposés dans des puits de microtitration revêtue d'anticorps. La molécule de Fumonisine contenu dans les échantillons et les standards de contrôle entrent en compétition avec la fumonisine conjugué pour les mêmes sites de liaison d'anticorps. Après une étape de lavage, un substrat d'enzyme (TMB) est ajouté et une couleur bleue s'est développée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de fumonisine dans l'échantillon ou dans le standard. Une solution d'arrêt est ajoutée. L'absorbance mesurée est mesuré par un spectrophotomètre à 450 nm.

##### 4.2.Préparation des extraits

Vingt grammes de l'échantillon de sous produits de céréales ont été ajoutés à 100 ml de la solution d'extraction (méthanol 70%), le produit obtenu est par la suite mélangé pendant 3 minutes. L'extrait est par la suite filtré par un papier Wattman puis dilué au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée.

##### 4.3.Procédure du test

Soixante-dix microlitres du conjugué de la fumonisine donné par le fabricant et 35µl de l'échantillon de sous produits de céréales dilué ou de standard sont répartis dans chaque puits de la plaque d'ELISA. Cette dernière est ensuite incubée une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 100µl du substrat / chromogène (TMB) est ajouté. 100µl de la solution d'arrêt de la réaction est ajouté après une incubation une heure à 30°C. La mesure de l'absorbance à 450nm a été réalisée par un spectrophotomètre.



## 5. Etude de l'effet de quelques traitements biologiques sur de la réduction de la concentration des aflatoxines

### 5.1. Effet couplé de la fermentation et de température

La méthode de fermentation que nous avons adoptée est celle effectuée dans le milieu rurale et urbain au Maroc avec de légères modifications à savoir les proportions en inoculum selon le protocole introduit par Faid et *al.* (1994). Trois échantillons de farine ont été utilisé dans cette essais (F002, F003 et F004) et qui sont analysés au préalable par la méthode d'ELISA pour la recherche des traces d'aflatoxines.

Les pâtesde farines utilisées dans l'essai sont préparées en mélangeant dix grammes de farine auquel est ajouté 0,2 grammes de levure et 6ml de l'eau distillé chauffée à 40°C. La pâte est bien pétrie puis cuite.

### 5.2. Effet de la digestion

Pour étudier l'effet de la digestion sur la réduction de la concentration des aflatoxines, trois échantillons différents de pains (P005, P014 et P02) ont été choisis aléatoirement, pour les quelles un protocole d'étude cet effet a été suivit.

- Mode opératoire

Dix grammes de l'échantillon de pain ont été ajouté à 20 mg de la pepsine et 100ml du PBS à pH=3 et. Le mélange a été centrifugé dix minutes à 3000 tr/min après son incubation deux heures à 37°C. Un volume de 3,5 ml du surnagent a été ajouté à 6,5 ml du méthanol pur et 100  $\mu$ l de la solution obtenu a été mélangé avec 600  $\mu$ l du tampon de dosage des aflatoxines totales. 50  $\mu$ l du mélange a été utilisé pour le dosage des aflatoxines par la méthode d'ELISA par compétition.



Photo 1 : Quartiers visités au cours de la période d'enquête

## 1. Analyse du niveau de conformité

L'analyse du niveau de conformité de boulangeries visitées, a été limitée sur les réponses des responsables des services aux questions posées.

### 1.1. Locaux

Afin d'éviter la contamination croisée et l'atteinte à la sécurité des produits commercialisés, le contrôle de la conformité des locaux et des installations des boulangeries restent des étapes importantes afin de diminuer les risques d'anomalies.

L'observation de la conformité des locaux au niveau des zones de production du pain, montre que le pourcentage de conformité des locaux sanitaire reste satisfaisante qui est de l'ordre de 60%, par ailleurs la non conformité des locaux d'entreposage et de préparation d'aliment qui est de l'ordre 23,52% (Figure 2).

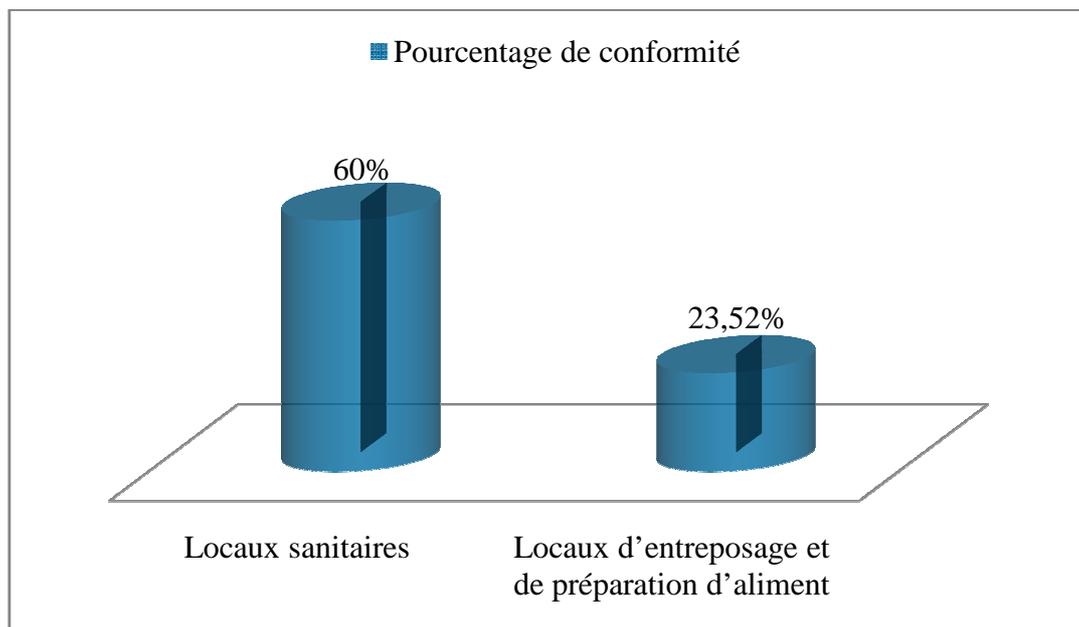


Figure 1: Conformité des locaux des zones de production du pain

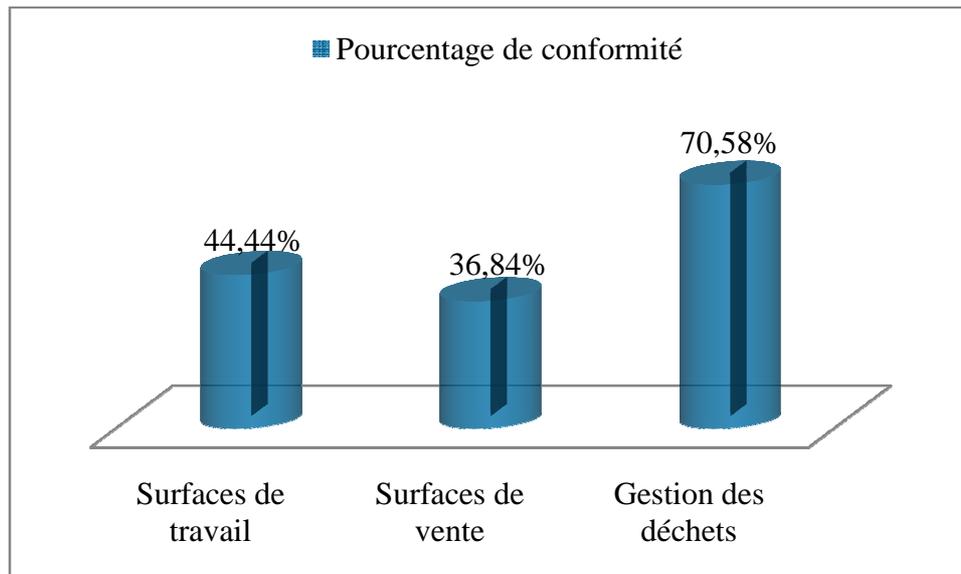
### 1.2. Entretien et nettoyage

Les espaces de la zone de production destinés aux aliments doivent être propres et bien entretenus.



Dans une boulangerie, il est donc important de faire une distinction claire entre les espaces privés d'une part et les espaces réservés à la fabrication et à la vente d'autre part. Un entretien efficace doit garantir le bon état de l'infrastructure.

Au niveau des boulangeries visitées, la conformité des surfaces de travail et de vente reste médiocre (44,44% et 36,84% respectivement), par ailleurs l'entretien des déchets de ces zone est satisfaisant (70,58%) (Figure 3).

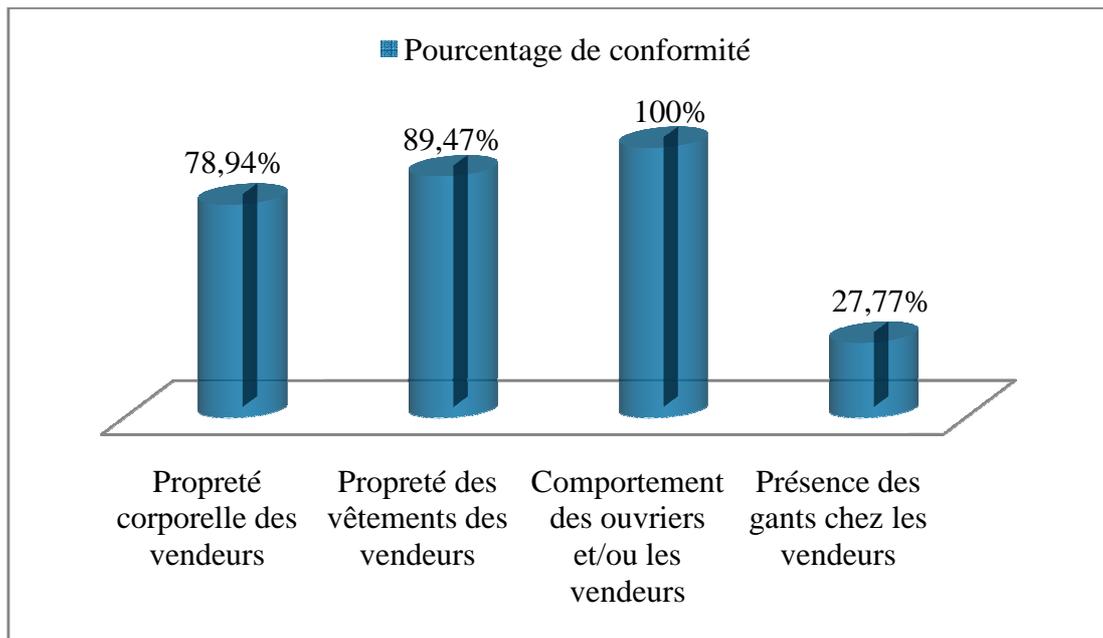


**Figure 2:**Entretien et nettoyage des zones de production

### 1.3.Hygiène du personnel

Afin de pouvoir fabriquer des produits boulangers sains et sans risques, il faut qu'il y ait non seulement une production sécurisée mais également une hygiène suffisante. En plus d'une bonne hygiène des locaux, des matériaux et des appareils, l'hygiène personnelle revêt également toute son importance. En effet, on peut amener des micro-organismes ou provoquer une contamination physique avec des mains sales, des vêtements de travail souillés...etc.

L'hygiène du personnel au niveau des boulangeries visitées est satisfaisante ainsi que leurs comportement (le fait de se moucher, toucher de la saleté ou de fumer) au cours de la manipulation de l'aliment est à 100% conforme, aussi que la propreté corporelle et celle des vêtements est appréciable (78,94% et 89,47% respectivement) (Figure 3).



**Figure 3:**Hygiène du personnel

#### *1.4.Entreposage de la matière première*

L'entreposage des aliments devraient être conçu et construit de manière à protéger efficacement les aliments contre la contamination pendant le stockage et de réduire au minimum la détérioration des produits alimentaires par le réglage de la température et de l'humidité.

L'application de techniques de stockage adaptées permet de faciliter le contrôle concernant une éventuelle présence de nuisibles.

Généralement, la méthode d'entreposage de la matière première dans les zones de production du pain a été satisfaisante, puisqu'on trouve que 83,33% de ces boulangeries séparent les différents types de matière première, ainsi le contrôle de l'humidité et de la température dans les zones de stockages de la matière première est appliqué (100% et 60% respectivement) (figure 5).

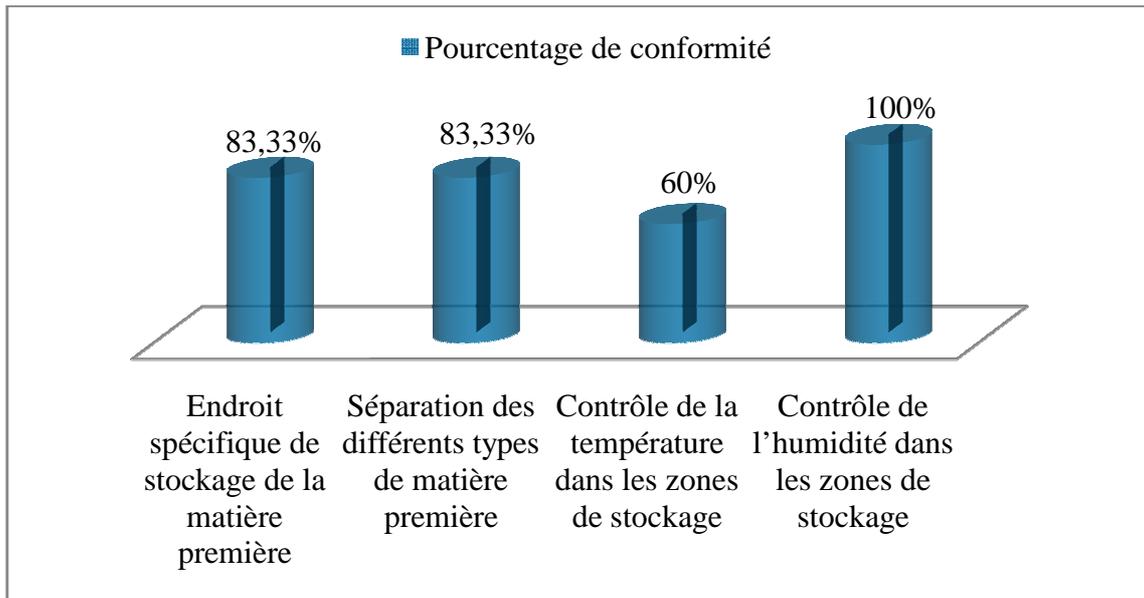


Figure 4: Conformité des méthodes d'entreposage de la matière première

## 2. Qualification de la qualité de l'environnement de travail

L'enquête menée pour l'état des lieux montre que le pourcentage de conformité pour les cinq programmes d'hygiène est de 89,47 % pour les mains d'œuvre, 83,33 % pour la matière première, 78,47 % pour la méthode, 41,2 % pour le milieu et 23,52 % pour le matériel (figure 5).

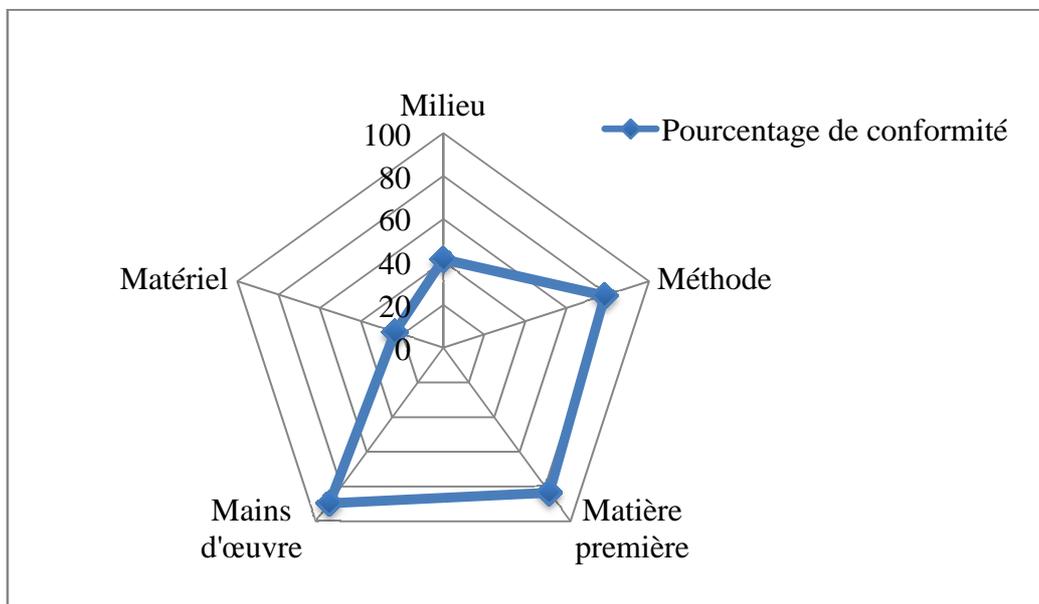


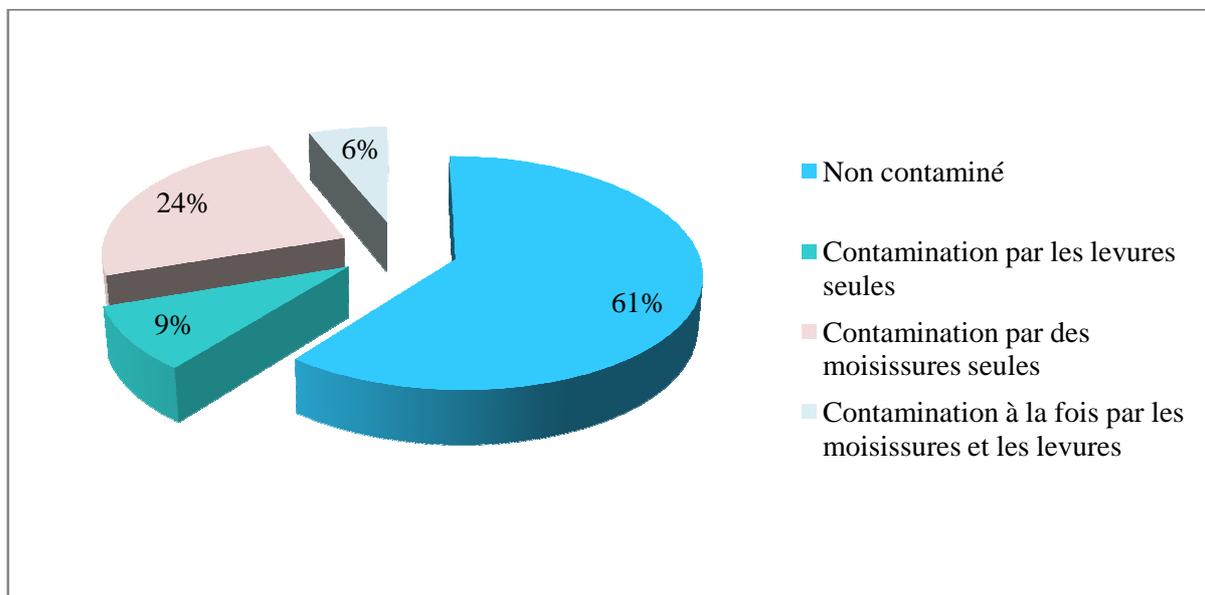
Figure 5: Analyse de conformité des programmes d'hygiène

## II. Analyse fongique

### 1. Isolement de la flore fongique à partir des produits céréaliers issus des différents points de vente

Sur 33 échantillons analysés 61% sont révélés non contaminés par la flore fongique, 24% sont contaminés par des moisissures, 9% sont contaminés par des levures et 6% sont contaminés à la fois par des moisissures et des levures.

Les résultats de l'analyse de la flore fongique des sous produits de céréales sont présentés dans la figure 6.

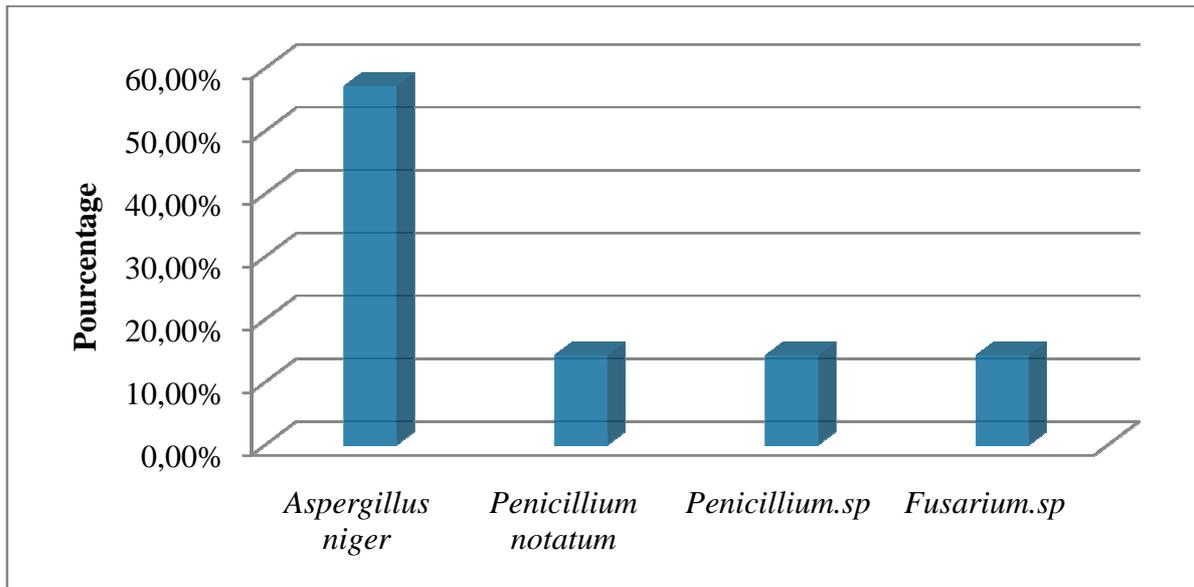


**Figure 6:** La flore fongique isolée à partir des produits de céréales collectés

### 2. Caractérisation de la microflore isolée des produits à base de céréales

#### 2.1. Identification des moisissures

Les résultats de l'identification des souches de moisissures sont indiqués dans la figure 7. Cette identification a permis de dévoiler que l'espèce *Aspergillus niger* domine avec 57,14 %. En deuxième lieu, se positionnent les espèces *Penicillium notatum* et *Penicillium.sp* et *Fusarium.sp* qui représentent un pourcentage de 14,29% pour chaque espèce (figure 7).



**Figure 7:** Espèces de moisissures identifiées

Parmi les souches identifiées principalement (de droite à gauche) : *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* et *Fusarium sp*.

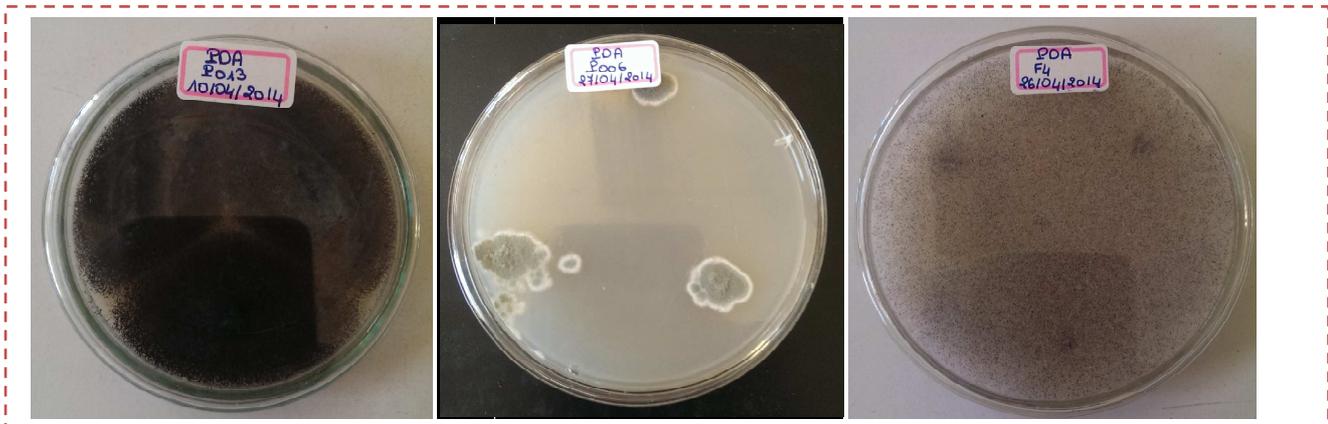


Photo 2 : Quelques espèces de moisissures isolées à partir des produits de céréales

## 2.2. Identification des levures

Les résultats de l'identification des souches de levures sont indiqués dans la figure 7. Cette identification a permis de dévoiler que l'espèce *Debaryomyces sp* domine avec 60 %. En deuxième lieu, se positionnent les espèces *Geotrichum candidum* (photo 3), et *Candida sp* qui représentent un pourcentage de 20% pour chaque espèce (figure 8).

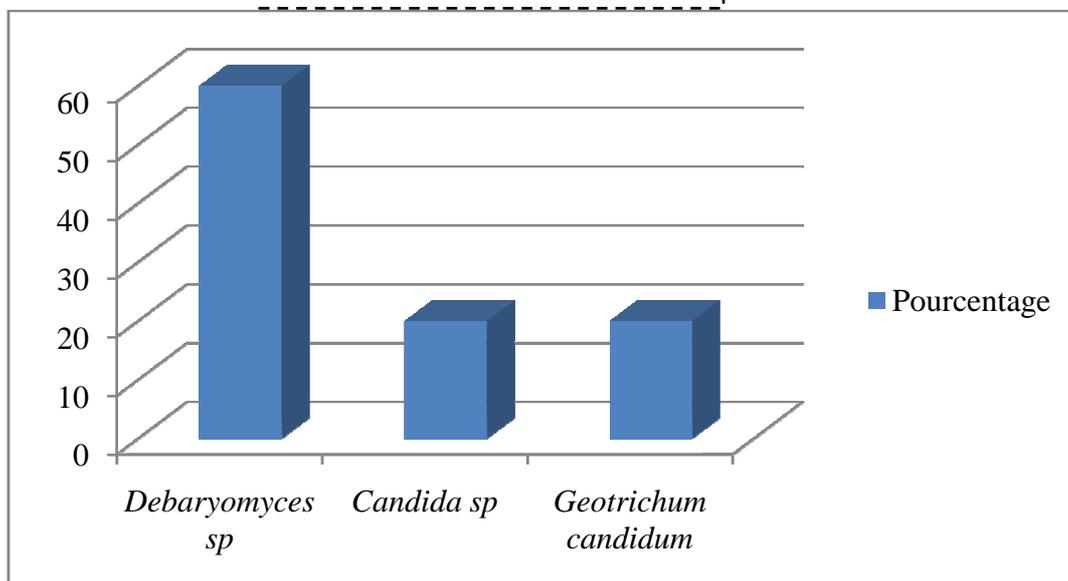
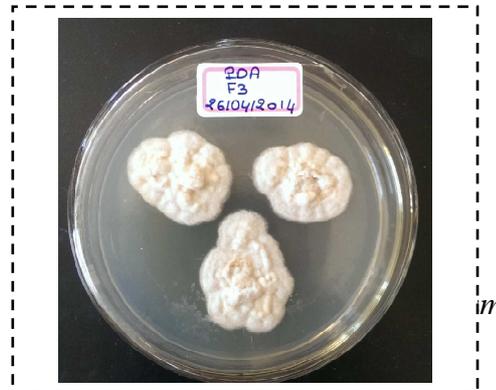


Figure 8: Espèces de levures identifiées

### III. Dosage des mycotoxines dans les échantillons

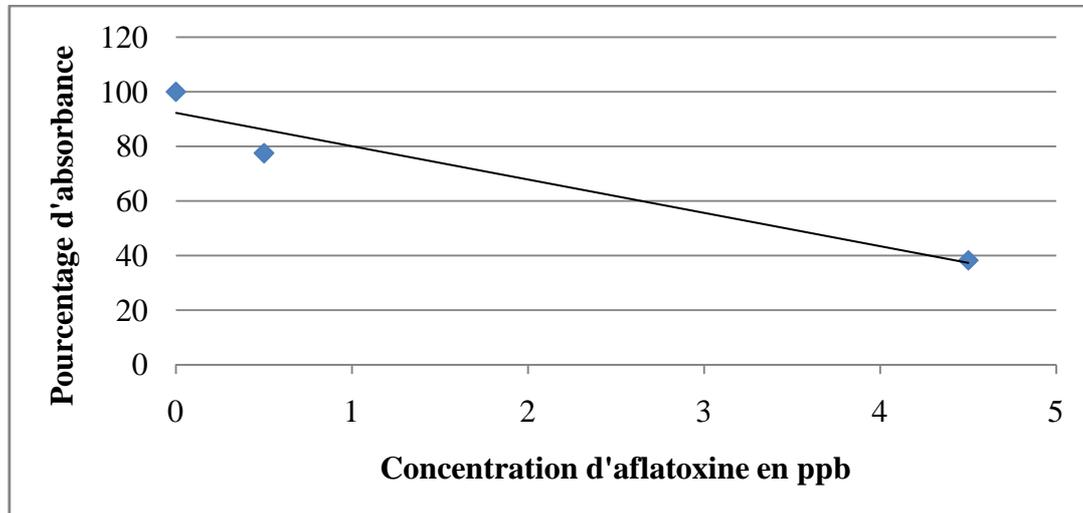
#### 1. Dosage des aflatoxines

Les échantillons de sous produits de céréales ont été analysés par la méthode ELISA par compétition. Pour le dosage des aflatoxines dans ces échantillons, un kit de test RIDASCREEN® (« R -Biopharm AG », Allemagne) a été utilisé pour l'analyse. La quantification de ces molécules a nécessité l'élaboration d'une courbe d'étalonnage en faisant appel à des standards des aflatoxines



contenant différentes concentrations ( figure 9) . La densité optique a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques d'ELISA à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland).

**Remarque :** 1ppb= 1µg/Kg



**Figure 9:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des aflatoxines totales

Selon le dernier rapport de la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006) portant sur la fixation de teneurs maximales des mycotoxines dans les céréales, la limite maximale d'aflatoxine dans les produits céréaliers transformés est fixée à 4ppb.

Les résultats obtenus ont montré que 96,96% d'échantillons analysés par la technique ELISA par compétition contiennent des taux d'aflatoxines supérieur à cette norme, ce qui nous permet de déduire qu'un certain nombre de conditions environnementales notamment de la température et de l'humidité au cours de la culture ou du stockage ont favorisé le développement des moisissures toxigènes responsables de la sécrétion de cette molécule toxique (tableau 7).



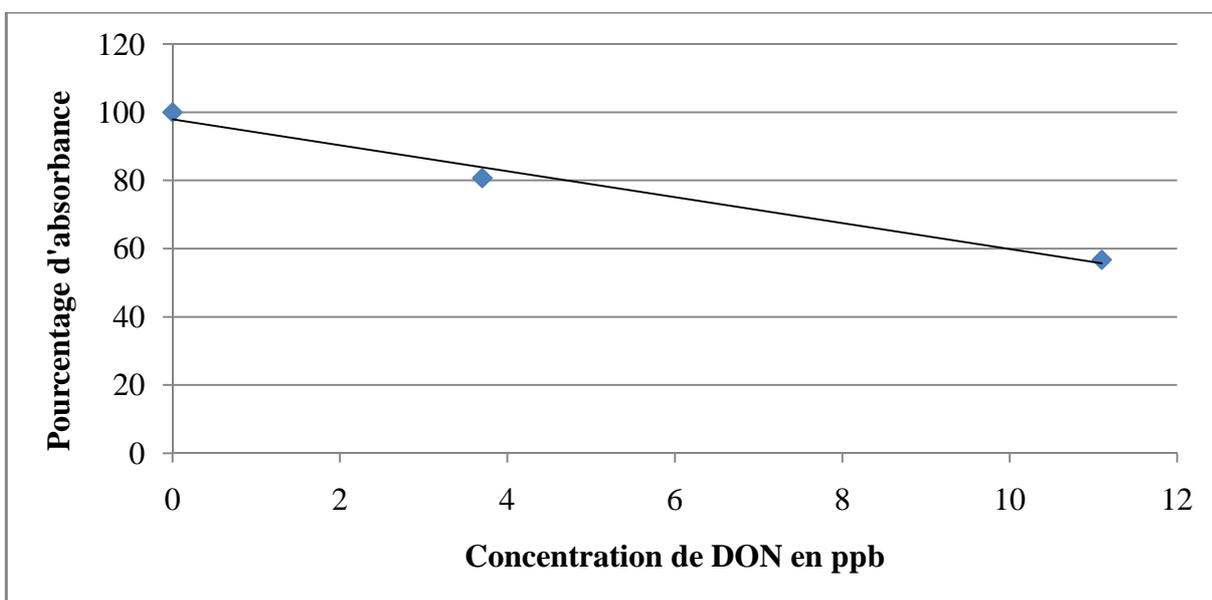
**Tableau 7:** Analyse des aflatoxines dans les sous produits de céréales

Echantillon	Concentration d'aflatoxine en ppb	Conformité de l'échantillon
<b>Pain</b>		
P001	88,02	Non conforme
P002	103,35	Non conforme
P003	72,69	Non conforme
P004	48,16	Non conforme
P005	140,14	Non conforme
P006	56,33	Non conforme
P007	86,99	Non conforme
P008	83,93	Non conforme
P009	72,69	Non conforme
P010	61,44	Non conforme
P011	43,04	Non conforme
P012	64,51	Non conforme
P013	62,46	Non conforme
P014	104,37	Non conforme
P015	48,16	Non conforme
P016	61,44	Non conforme
P017	86,99	Non conforme
P018	73,71	Non conforme
P019	111,52	Non conforme
P020	117,66	Non conforme
P021	137,08	Non conforme
<b>Farine</b>		
F001	152,41	Non conforme
F002	154,45	Non conforme
F003	104,37	Non conforme
F004	138,1	Non conforme
F005	0	Conforme
<b>Biscuits</b>		
B001	121,01	Non conforme
B002	115,9	Non conforme
B003	113,86	Non conforme
B004	126,12	Non conforme
<b>Semoule de blé</b>		
S001	119,1	Non conforme
S002	106,7	Non conforme
<b>Produit à base de maïs</b>		
M001	122,03	Non conforme



## 2. Dosage de déoxynivalénol

Les échantillons ont été analysés par la méthode ELISA par compétition. Pour le dosage de déoxynivalénol dans ces échantillons. Un kit de test RIDASCREEN® (R –Biopharm FAST DON, Allemagne) a été utilisé pour l'analyse. La quantification des molécules de déoxynivalénol a nécessité l'élaboration d'une courbe d'étalonnage en faisant appel à des standards de déoxynivalénol contenant différentes concentrations ( figure 10) . La densité optique a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques d'ELISA à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland).



**Figure 10:** Gamme d'étalonnage de DON

Selon le dernier rapport de la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006) portant sur la fixation de teneurs maximales des mycotoxines dans les céréales, la limite maximale de déoxynivalénol dans céréales destinées à la consommation humaine directe y compris les farines de céréales est fixé à 750 ppb.

Pour les pains, les biscuits, le taux maximal de déoxynivalénol doit être inférieur à 500ppb.

Les résultats obtenus ont montré que 42,42% (14 échantillons positifs parmi 33 échantillons) présentent une concentration de déoxynivalénol comprise entre 3ppb et 101 ppb.

En effet, 100 % de ces échantillons positifs présentent un taux de déoxynivalénol inférieur à la norme européenne (tableau 8).



**Tableau 8:** Analyse de déoxynivalénol dans les sous produits de céréales

Echantillon	Concentration de déoxynivalénol en ppb	Conformité
<b>Pains</b>		
P001	63,64	Conforme
P002	59,98	Conforme
P003	0	Conforme
P004	0	Conforme
P005	0	Conforme
P006	0	Conforme
P007	0	Conforme
P008	0	Conforme
P009	0	Conforme
P010	0	Conforme
P011	0	Conforme
P012	17,88	Conforme
P013	3,81	Conforme
P014	0	Conforme
P015	0	Conforme
P016	0	Conforme
P017	22,1	Conforme
P018	0	Conforme
P019	0	Conforme
P020	0	Conforme
P021	5,68	Conforme
<b>Farines</b>		
F001	0	Conforme
F002	0	Conforme
F003	0	Conforme
F004	0	Conforme
F005	101,46	Conforme
<b>Biscuits</b>		
B001	52,12	Conforme
B002	47,9	Conforme
B003	54,46	Conforme
B004	52,6	Conforme



Semoules de blé		
S001	43,67	Conforme
S002	59,62	Conforme
Produit à base de maïs		
M001	8,97	Conforme

### 3. Dosage des fumonisines

Les échantillons ont été analysés par la méthode ELISA par compétition. Pour le dosage des fumonisines dans ces échantillons, un kit de test AgraQuant® ((Romer Laboratory Inc., Singapore), a été utilisé pour l'analyse. La quantification de ces molécules nécessite l'élaboration d'une courbe d'étalonnage en faisant appel à des standards de la fumonisine contenant différentes concentrations (figure 11). La densité optique a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques d'ELISA à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland).

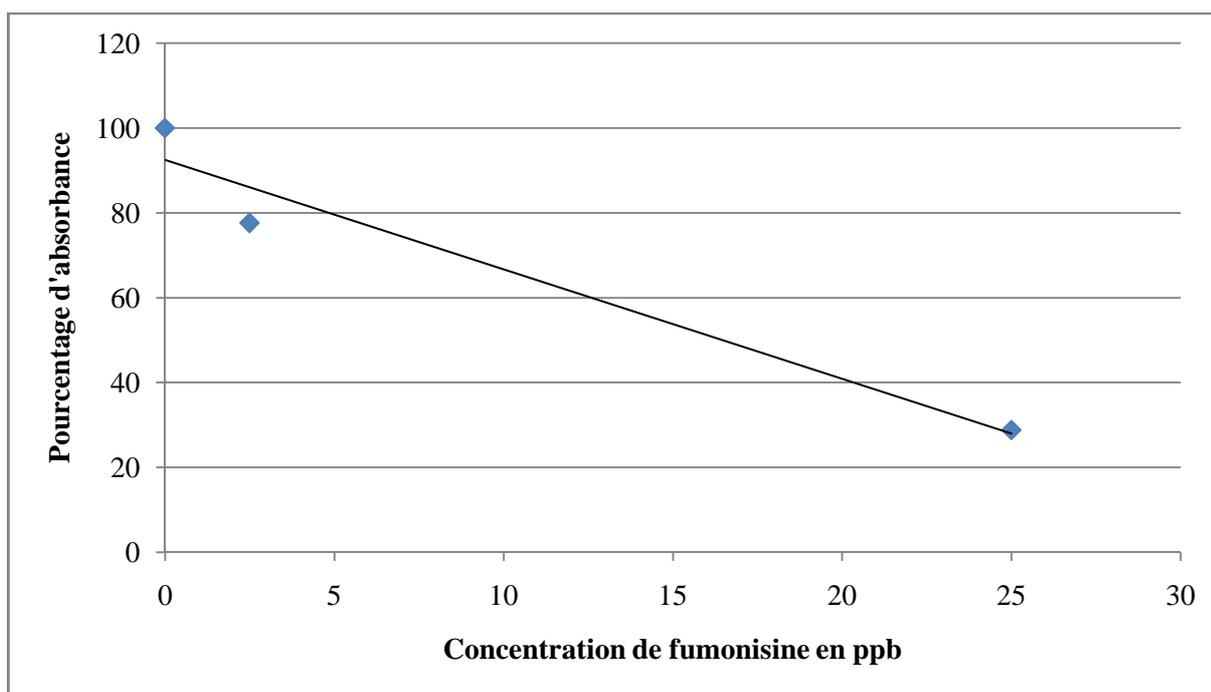


Figure 11: Gamme d'étalonnage pour le dosage de fumonisine

Selon le dernier rapport de la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N° 1881/2006) portant sur la fixation des teneurs maximales des mycotoxines dans les céréales, la limite maximale de fumonisine les farines de céréales est fixée à 1000 ppb.



Les résultats obtenus ont montré que 72,72% des échantillons analysés sont contaminés par la fumonisine dans un intervalle compris entre 4,9 ppb et 489,01 ppb, toutefois, 100 % de ces échantillons contaminés présentent un taux de fumonisine est inférieur à la norme européenne fixé par la commission européenne (tableau 9).

**Tableau 9:** Analyse de fumonisines dans les sous produits de céréales

Echantillon	Concentration de fumonisines en ppb	Conformité
<b>Pains</b>		
P001	21,97	Conforme
P002	0	Conforme
P003	60,6	Conforme
P004	51,7	Conforme
P005	87,34	Conforme
P006	0	Conforme
P007	0	Conforme
P008	0	Conforme
P009	0	Conforme
P010	0	Conforme
P011	0	Conforme
P012	50,2	Conforme
P013	82,88	Conforme
P014	48,72	Conforme
P015	0	Conforme
P016	88,08	Conforme
P017	4,9	Conforme
P018	105,17	Conforme
P019	109,63	Conforme
P020	120,77	Conforme
P021	133,4	Conforme
<b>Farines</b>		
F001	57,63	Conforme
F002	91,8	Conforme
F003	37,57	Conforme
F004	107,4	Conforme
F005	489,01	Conforme
<b>Biscuits</b>		



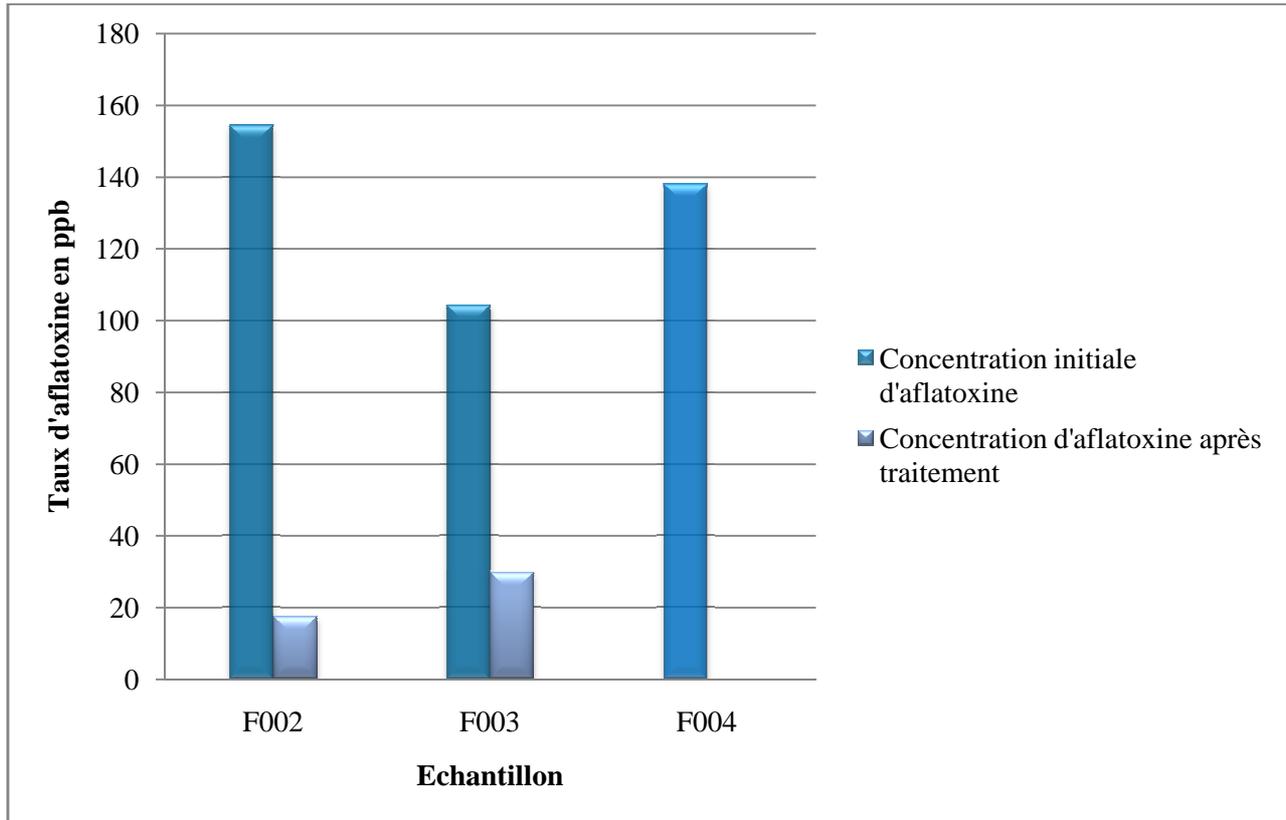
B001	27,1	Conforme
B002	192,94	Conforme
B003	116,81	Conforme
B004	44,91	Conforme
<b>Semoules de blé</b>		
S001	40,68	Conforme
S002	0	Conforme
<b>Produit à base de maïs</b>		
M001	23,76	Conforme

## IV. Effet de quelques traitements biologiques sur la réduction de la concentration des aflatoxines

### 1. Effet couplé de la fermentation et de la température

Trois échantillons de farines ont été choisis pour étudier l'effet couplé de la fermentation et de température incluant à la fois les échantillons F002, F003 et F004. Ces trois échantillons de farine que nous avons utilisée dans cet essai sont analysés au préalable par la méthode d'ELISA par compétition pour la recherche des traces d'aflatoxines.

Dans l'échantillon F002, la concentration d'aflatoxine avant le traitement a été de l'ordre de 154,45 ppb, après la cuisson cette concentration a été réduite pour atteindre 17,5 ppb, soit une réduction de 88,6%. Le même effet de ce traitement a été remarqué pour les autres échantillons, puisqu'on remarque pour l'échantillon F003, la concentration d'aflatoxine a passé de 104,37 ppb à 29,8 ppb, soit une réduction de 71,3% ; pour l'échantillon F004, la concentration d'aflatoxine a passé de 138,1 ppb à 0 ppb soit une réduction de 100% (figure 12).



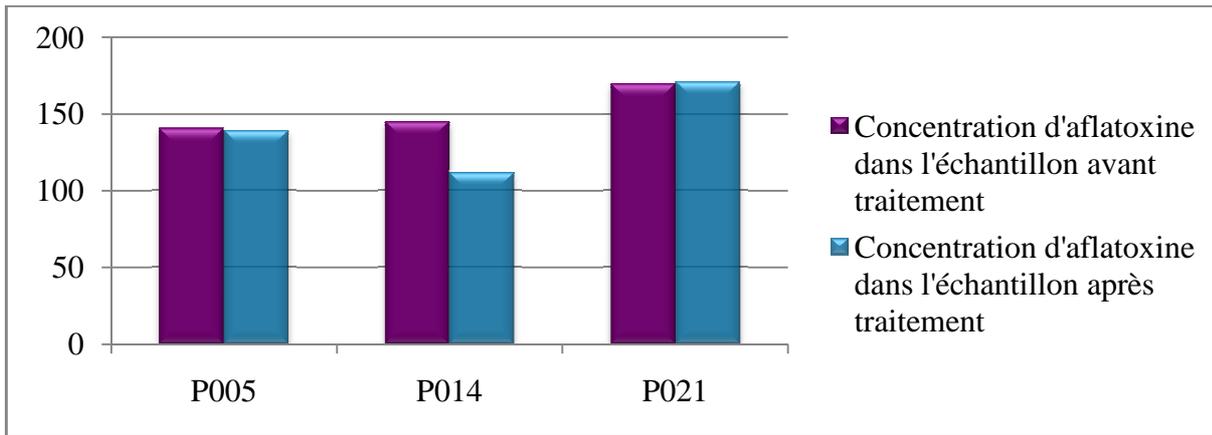
**Figure 12:** Etude de l'effet de cuisson pour la réduction de la concentration d'aflatoxine

## 2. Effet de la digestion

Trois échantillons du pain, ont été choisis pour étudier l'effet de la digestion sur la réduction de la concentration d'aflatoxine : P005, P014 et P021.

Une très faible réduction d'aflatoxines dans les échantillons a été observée après traitement, puisqu'on remarque que pour l'échantillon P005 la réduction est de l'ordre de 1.02% passant de 140.72 ppb à 139.28 ppb après traitement.

Concernant l'échantillon P014, la réduction a été de l'ordre de 22,94% passant de 145,06 ppb à 111,78 ppb, et pour l'échantillon P021 la concentration d'aflatoxine a resté stable sans aucun effet de la digestion (figure 7).



**Figure 13:** Etude de l'effet de la digestion sur trois échantillons différents de pains

## Discussion

La présente étude a pour objectif d'évaluer dans un premier temps la qualité hygiénique de quelques zones de production des pains au niveau de la région de Fès, pour ce faire nous avons préparé un questionnaire afin de mettre en évidence l'hygiène des magasins visités.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de conformité à la fois pour les mains d'œuvre (89,47%), pour la matière première (83,33%) et les méthodes (78,47 %) est satisfaisante, toutefois la fréquence de conformité pour les milieux (41,2 %) et pour le matériel (23,52%) est moyennement ou parfois non satisfaisante. Ces résultats pourraient nous faire penser que la contamination des échantillons par les germes microbiens notamment par la flore fongique peut provenir de plusieurs conditions non hygiéniques surtout par la contamination croisée, et par l'état d'hygiène du lieu de production provenant essentiellement de l'environnement du milieu de production et du matériel souillé.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué le niveau de contamination fongique de nos échantillons collectés et nous avons identifié les espèces de champignons isolés. Les résultats de cette analyse révèle un niveau de contamination des échantillons par l'espèce *Aspergillus niger*



étaient très répandues (57,14%), et que le taux d'incidence des espèces *Fusarium spp.* *Penicillium sp* et *Penicillium notatum* était relativement faible (14,29%). En effet, la contamination des produits céréaliers par la flore des moisissures inclut principalement trois principaux champignons d'altération appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, (Oliveira P.M. et al., 2013). Une étude réalisée par Joshaghani montre que les espèces de moisissures les plus communément isolés à partir des échantillons de blé étaient *Aspergillus niger* (21,4%), suivie par l'espèce de *Fusarium spp* (17,8%) suivie par *Penicillium spp* (8,9%) (H.Joshaghani et al., 2013). En Iran, une étude de E. Čonková en 2006 montre que la contamination fongique des échantillons de blé collectés à partir de deux provinces différentes montre toujours la dominance de trois espèces de moisissures notamment *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* et *Penicillium spp* (E. Čonková et al., 2006). Une étude Algérienne de Riba révèle la haute fréquence de contamination des échantillons de blé par les espèces de *Fusarium*, *Penicillium*, et surtout *Aspergillus* (appartenant à la section Flaviens et Nigri) (A Riba et al. 2008). La haute fréquence et l'abondance des espèces d'*Aspergillus spp* pourrait être due à une défaillance dans la production alimentaire et/ou dans les méthodes de conservation de la matière première.

L'analyse des produits de céréales pour leur niveau de contamination par les levures a révélé la dominance de l'espèce *Debaryomyces sp* (60%), suivie par les espèces *Candida sp* et l'espèce *Geotrichum candidum* (20% pour chacun). En effet selon Joshaghani (2013), les principales levures qui peuvent être présent dans les graines de céréales et dans ses sous produits sont celle appartenant aux espèces *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* et *Trichosporon* (Joshaghani H. et al, 2013).

La présence des espèces fongique notamment les espèces appartenant au genre d'*Aspergillus*, *Penicelium* et *Fusarium* dans les échantillons analysés, qui sont reconnus comme principales agents sécréteurs des mycotoxines dans les denrées alimentaires principalement les sous produits de céréales, suggère la présence probable de ces molécules toxique dans nos échantillons. Pour cela un dosage de trois types de mycotoxines (aflatoxines totales, déoxynivalénol et fumonisine) par la méthode d'ELISA par compétition a été réalisé. Notre étude montre que plus de 96% des échantillons présentent une très haute concentration des aflatoxines totales ( supérieur à 43 ppb) qui reste largement supérieur à la norme ( 4 ppb) fixé par la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006). Ce résultat est comparable à l'étude menée par Iqbal et al en 2014 où 41% des échantillons de céréales du petit déjeuner analysés sont contaminés



par les aflatoxines totales (AF<sub>S</sub>) dont 8% de ces échantillons présentent un taux d'AF<sub>S</sub> supérieur à la norme fixée par l'Union Européen en 2006 (Iqbal et *al.* 2014). Une autre étude réalisée par Soleimany (2011) où 50% des échantillons de céréales analysés sont contaminés par les AFs (F. Soleimany et *al.*, 2011).

Les résultats du dosage de déoxynivalénol ont montré que 42,42% présentent une concentration de déoxynivalénol comprise entre 3 ppb et 101 ppb dont 100 % des échantillons positifs présentent un taux de déoxynivalénol inférieur à la norme européenne, ces résultats sont très proches de celui rapportés par Yanshen en Chine où 52,5% des échantillons de céréales commerciales analysés présentent une concentration de DON comprise entre 7 ppb et 534 ppb qui reste au dessous des limites maximum fixés par UE (Yanshen L. et *al.*, 2011, European Commission, 2006). Une autre étude réalisée au Maroc par Ennouari montre sur 81 échantillons de céréales montrent que Les résultats des analyses ont montré que 9 échantillons parmi 81 échantillons au total (11,1%) ont été contaminés par le DON dont les niveaux de DON dans les échantillons positifs ont varié entre 65 et 1310 ppb (Ennouari A. et *al.*, 2012).

Les résultats de dosage de fumonisine dans les échantillons, ont révélés que 72,72% des échantillons analysés sont contaminés par la fumonisine dans un intervalle compris entre 4,9 ppb et 489,01 ppb, toutefois, 100 % de ces échantillons contaminés présentent un taux de fumonisine inférieur à la norme européenne fixé par la commission européenne (Règlement (CE) N° 1881/2006). En effet, des rapports précédents de la Bulgarie et d'autres pays européens décrivent l'occurrence de *Fusarium moniliforme* dans des échantillons de céréales infectées en Bulgarie, ce qui suggère un potentiel de la présence des fumonisines dans les grains de céréales (Radostina M. et *al.*, 2013).

Trois échantillons de farine (F002, F003 et F004) ont été choisis pour l'étude de l'effet de cuisson (incluant effet de la température et de la fermentation des levures), pour lesquels le dosage au préalable des aflatoxines a été réalisé. En effet, la plupart des mycotoxines sont relativement stables à la chaleur (température comprise entre 80 et 121°C), donc il n'y a pas de destruction se produit dans des conditions normales de cuisson (Milicevic et *al.*, 2010). La stabilité des mycotoxines lors de la transformation des aliments a été examinée dans l'étude de Bullerman & Bianchini (2007). Toutefois, la réduction de la concentration des aflatoxines par la voie fermentaire peut expliquer la diminution de la concentration des aflatoxines dans les produits testés. Une étude de Mokoena indiquant l'effet marquant de la fermentation des bactéries lactiques sur la réduction de façon



significative la concentrations des deux mycotoxines (fumonisin B1 and zearalenone) dans le maïs. Cependant, une telle réduction ne peut pas modifier de manière significative les effets toxiques possibles de ces toxines (Mokoena MP, 2005). L'étude de l'effet de la digestion, n'a révélé aucun effet sur la réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de pains, cependant, aucune étude n'a montré une relation entre cet effet et la réduction de la concentration des mycotoxines dans les aliments.

## Conclusion et perspectives

Les principaux objectifs de cette étude étaient à la fois d'évaluer la qualité hygiénique de quelques zones de production au niveau de la ville de Fès. Pour cela un questionnaire a été préparé afin de mettre en évidence le niveau de conformité de ces zones et pour avoir une idée sur la salubrité du pain.

Dans un deuxième temps, nous avons collectés des échantillons auprès de différents points de vente afin d'évaluer la flore fongique des sous produits de céréales. Au même temps, nous avons évalué le niveau de contamination par les mycotoxines. Et finalement, nous avons effectué une étude de quelques paramètres physico-chimiques pouvant avoir un effet sur la réduction de la concentration des aflatoxines.

L'ensemble de cette étude nous a permis de tirer les constatations suivantes :

- La qualité hygiénique de boulangeries visitées au niveau de la région de Fès, dépend de la conformité des cinq programmes d'hygiène, où nous avons constaté la non-conformité des milieux et du matériel utilisé, qui peut être à l'origine d'une contamination des produits finis.



- Une très haute contamination de la plupart des échantillons de sous produits de céréales par les aflatoxines totales, avec des concentrations très élevés qui dépassent les limites fixés par la réglementation européenne.
- Une contamination de ces échantillons, par le déoxynivalénol pour certains échantillons, avec des concentrations au dessous des normes fixés par la réglementation européenne.
- Une contamination de ces échantillons, par les fumonisines, où leurs concentrations restent au dessous des normes fixés par la réglementation européenne.
- L'étude de l'effet de couplé de la digestion et de la fermentation a révélé un grand pouvoir de réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de farine. Toutefois, l'effet de la digestion n'a pas révélé un grand pouvoir de réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de pains.

En perspectives il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments à analyser (produits à base de maïs, produits destinés aux enfants et aux bébés...) et de rechercher d'autres toxines (Zéaralénone, Ochratoxines). Il est également intéressant d'étudier séparément l'effet de la fermentation par les levures sur la réduction de la concentration des mycotoxines dans les produits alimentaire fermentés. Il est également intéressant d'étudier le degré d'exposition de la population marocaine aux mycotoxines en analysant ces toxines dans les produits biologiques en particulier dans le sérum.



## Références bibliographiques

- Better Health Channel (2013). Cereals and wholegrain foods. Disponible au site [http://www.betterhealth.vic.gov.au/bhcv2/bhcvpdf.nsf/ByPDF/Cereals\\_and\\_wholegrain\\_foods/\\$File/Cereals\\_and\\_wholegrain\\_foods.pdf](http://www.betterhealth.vic.gov.au/bhcv2/bhcvpdf.nsf/ByPDF/Cereals_and_wholegrain_foods/$File/Cereals_and_wholegrain_foods.pdf) consulté le
- Bullerman B. et Bianchini A., (2011). The Microbiology of Cereals and Cereal Products. University of Nebraska-Lincoln. Department of Food Science and Technology.
- Cahagnier B., Dragaci S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage -meessen L., Multon J.L., Richard-Molard D., Roquebert M.F, (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. Lavoisier Tec&Doc. France.
- Cahagnier B., Fleurat-Lessard F. (1996). Bonnes conditions du grain à l'entreposage et moyens de maîtrise des altérations en cours de stockage. In : Guide des bonnes pratiques du Groupe de Liaison sur la Conservation des Grains (GLCG): Stockage à plat des céréales pour une durée indéterminée: Bonnes conditions du grain à l'entreposage. GLCG (ed.) La Rochelle, pp. 7-14.
- Chakri M., El Haidani A, El Mzibri M, Haggoud A, Iraqui HM, Houari A, and KS Ibnsouda (2007). Yeast strains from the endogenous microfloras of the olive flies *Bactrocera oleae* larvae which could degrade the olive oil mill wastewaters polyphenols. *Annals of Microbiology* 57(2): 143-148.
- Choueiri E., (2003). La céréaliculture. Projet "Assistance au Recensement Agricole" FAO.
- Commission des communautés européennes (2006). RÈGLEMENT (CE) N° 1881/2006 DE LA COMMISSION du 19 décembre 2006 Portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Disponible en ligne sur le lien <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:32006R1881>. Consulté le



- Commission du Codex Alimentarius (CCA) (2003). Code d'usages en matière de prévention et réduction de la contamination des céréales par les mycotoxines, y compris les appendices sur l'ochratoxine a, la zéaralénone, les fumonisines et les trichothécènes.
- Čonková A., Laciaková A., Styriak I., Czerwiecki L., Wilczyńska G. (2006). Fungal contamination and the levels of mycotoxins (DON and OTA) in cereal samples from Poland and East Slovakia. *Czech J. Food Sci.*, 24: 33-40.
- Conseil International des Céréales (2014). Rapport du marché des céréales. GMR 443.
- Crédit Agricole du Maroc (2011). Chiffres clés de la filière Céréales et Légumineuses.
- Cruz J.F., Troude F., Griffon D., Hébert J.P (1988). Conservation des grains en régions chaudes- deuxième trimestre «Techniques rurales en Afrique». *Vol 545 p.*
- Direction de la Statistique (2001). Enquête nationale sur les niveaux de vie des ménages 1998-99. MPEP (Ministère de la prévision économique et du plan), Rabat, Maroc.
- Division du commercial international et des marchés de la FAO dans le cadre du Système mondial d'information et d'alerte rapide sur l'alimentation et l'agriculture (SMIAR) (2014) Perspectives de récolte et situation alimentaire.
- Dragacci S., Grosso F., Frémy J.M. (2005). Unité Toxines, polluants organiques et pesticides du Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments de l'AFSSA : Analyse et détection des mycotoxines.
- EGMOND V., (1993) .Rationale for regulatory programmes for mycotoxins in human foods and animal feeds. *Food Additives and Contaminants.*
- Émission de Billets de Trésorerie Dossier d'Information COPRAGRI S.A. (2003).
- Ennouari A., Sanchis V., Mar\_in S., Rahouti M., Zinedine A. (2013). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. *Food Control*, 32(1), 115e118.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512005944>.
- Faid M, Boraam F, Zyani I et Larpent JP (1994) Characterization of sourdough bread ferments made in the laboratory by traditional methods. *Z Lebensm Unters Forsch.* 198: 287-291.
- FAO (1996). Bonnes conditions du grain à l'entreposage. Disponible sur le lien <http://www.fao.org/wairdocs/x5160f/X5160f01.htm>.
- FAO (2003). Manuel sur l'application du Système de l'analyse des risques- points critiques pour leur maîtrise (HACCP) pour la prévention et de contrôle des mycotoxines.



- Gallo G., Lo Bianco M., Bognanni R., Saimbene G. (2008). Mycotoxins in durum wheat grain: hygienic-health quality of sicilian production. *J Food Sci.*;73(4):T42-7.
- Ghali R., Hmaissia-khlifa K., Ghorbel H., Maaroufi K., Hedili A. (2007). Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control* 19 .p921–924.  
[http://www.fnm.org.ma/pdf/Exposé%20filière%20céréalière%20\(Plan%20Maroc%20Vert\)%2024%20juin%2009.pdf](http://www.fnm.org.ma/pdf/Exposé%20filière%20céréalière%20(Plan%20Maroc%20Vert)%2024%20juin%2009.pdf).
- Iqbal SZ., Rabbani T., Asi MR., Jinap S. (2014). Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. *Food Chemistry* 157 (2014) 257–262.
- Joshaghani H., Namjoo M., Rostami M., Kohsar F., Niknejad F., (2013). Mycoflora of Fungal Contamination in Wheat Storage (Silos) in Golestan Province Noth of Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(4):e6334.
- Kreger Van Rij NJW (1984) *The Yeasts, a Taxonomie Study*. 3rd edition. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- LARPENT J., Christèle A., Bal-Fontaine M., Bennari S., Barbalat C., (1997). *Microbiologie Alimentaires : Techniques de laboratoire*.
- MahnineaN., Meca G., Elabidi A., Fekhaoui M., Saoiabi A., Font G., J. Mañes ,Zinedine A. (2011). Further data on the levels of emerging Fusarium mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in breakfast and infant cereals from Morocco. *Food Chemistry* 124 .p 481–485.
- Manova R., Mladenova R. (2008). Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. *Food Control* 20 .p 362–365.
- MAPM. (2008b). *Plan Maroc vert: Premières perspectives sur la stratégie agricole*. Ministère de l’Agriculture et de la Pêche Maritime, Royaume du Maroc. (Disponible à : [http://www.amabmaroc.org/amabfiles/plan\\_maroc\\_vert/plan\\_maroc\\_vert.ppt](http://www.amabmaroc.org/amabfiles/plan_maroc_vert/plan_maroc_vert.ppt)).
- MAPM. (2009). *Plan Maroc Vert – Stratégie de développement intégré de l’Agriculture au Maroc – Filière céréalière*. Ministère de l’Agriculture et de la Pêche Maritime, Royaume du Maroc.
- Ministère de l’Agriculture, de l’Agroalimentaire et de la Forêt- République française. *Agreste Synthèses (2014) .Céréales .Article n° 2014/229*.
- NM 08.0.123. *Microbiologie des aliments—Dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25 °C. Méthode de routine*. p. 6.



- Office National Interprofessionnel des Céréales et Légumineuses. (2013). Bulletin d'information marché des céréales.
- Pacin A., Ciancio Bovier E., Cano G., Taglieri D., Hernandez Pezzani C. (2009). Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. p492–495.
- Pacina A., Ciancio Bovier E., Cano G., Taglieri D., Hernandez Pezzani C. (2009). Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. 492–495.
- Québec Amérique International. 2014. Dictionnaire visuelle ikonet.com.
- Radostina M., Rositsa M. (2008). Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. Food Control 20 (2009) 362–365.
- Rapport de synthèse (2004): étude d'analyse du potentiel de la branche industrielle des pâtes alimentaires et couscous au Maroc.
- Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. Int J Food Microbiol. 2008;122(1-2):85-92.
- Soleimany F., Jinap S., Faridah A., Khatib A. (2011). A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. Food Control 25 (2012) 647e653.
- Tabuc C, Marin D, Guerre P, Sesan T, Bailly J (2007). Aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone contamination of cereals in South-East Romania.
- Taheri N., Semnani S., Roshandel G., Namjoo M., Keshavarzian H., Chogan AG., Ghasemi Kebria F. Joshaghani H. (2012). Aflatoxin Contamination in Wheat Flour Samples from Golestan Province, Northeast of Iran. Iranian J Publ Health, Vol. 41, No.9, p.42-47.
- Villa P., Markaki P. (2008). Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment. Food Control 20 .p 455–461.
- Yanshen L., Zhanhui W., Sarah DS., Weimin S., Cun L., Suxia Z., Xingyuan C., Jianzhong S. (2011). Determination of deoxynivalenol in cereals by immunoaffinity clean-up and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Methods 56 (2012) 192–197.



ZineddineA., Mañes J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. 334–344.

ZineddineA., IdrissiL. (2007).Présence et réglementation des mycotoxines dans les aliments au Maroc: Situation actuelle et perspectives.



## **IV. Evaluation des conditions de vente et de commercialisation du pain**

Au niveau des zones de production du pain notamment les boulangeries, la première cause de contamination du produit fini résulte généralement des mauvaises conditions de stockage de la matière première, ainsi qu'à différentes actes de productions avant sa distribution, ceci se répercute négativement sur ces produits finis et bien évidemment sur la santé du consommateur, il est donc indispensable de surveiller tous les éléments qui peuvent être responsables de la contamination du pain.

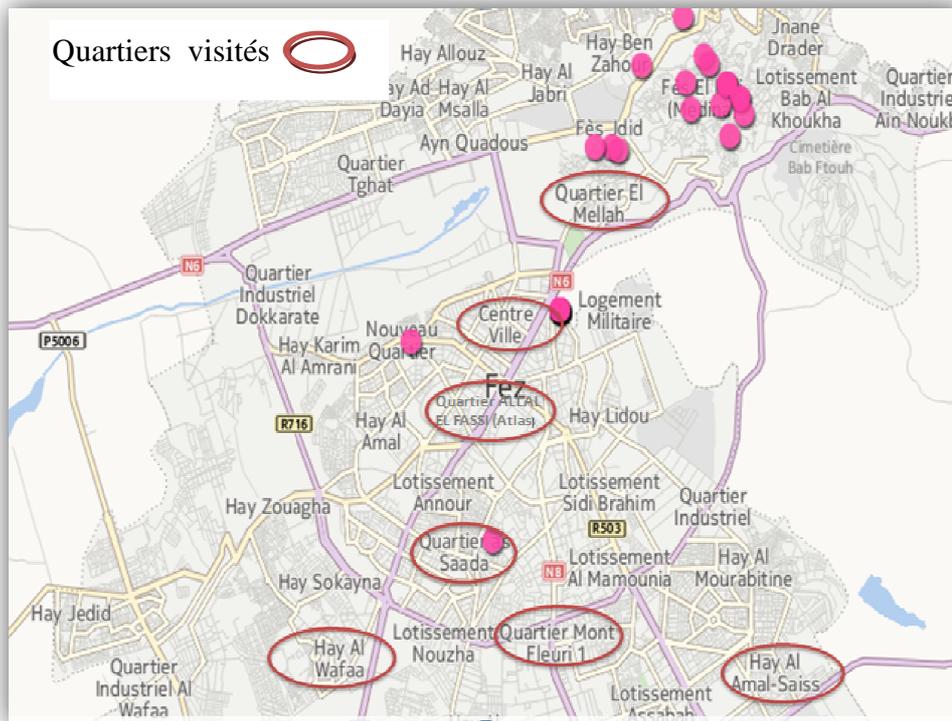
La présente étude a été conduite a pour objectif d'évaluer les conditions de vente et de commercialisation du pain au niveau de la ville de FES. Pour se faire, l'enquête a été réalisée par le biais d'un questionnaire.

### **○ Période d'étude**

Cette étude a été réalisée pendant une période qui s'est étendue entre Janvier 2014 et Avril 2014.

### **○ Lieu de l'étude**

Dix-neuf points de vente du pain appartenant à sept quartiers (quartier El Mellah, Centre ville, quartier Allal El Fassi, quartier Saada, Hay Al Waffa Narjis, Hay Al Amal Saiss et quartier Mont Fleuri) (photo 1) au niveau de la ville de Fès, ont été l'objet d'une enquête d'étude de la qualité hygiénique, pour cela un questionnaire a été établi pour évaluer le pourcentage de conformité (voir annexe 1).



- **Photo 1** : Quartiers visités au cours de la période d'enquête

- **Matériel**

Un questionnaire a été établi par Excel 2007 et utilisé dans cette enquête (voir annexe 1).

## V. Analyse fongique des échantillons de produits céréaliers

### 4. Echantillonnage

Trente-trois (33) échantillons de produits à base de céréales dont les pains (n=21), farines (n=5), biscuits (n=5) et semoules de blé (n=2) ont été collectés pendant une période de quatre mois. Les échantillons de sous produits céréaliers ont été prélevés auprès de différents points de vente : grande surface (n=2), boulangerie (n=21), épiciers (n=10) en fonction des marques de ces produits que ce soit marques locales ou importées et sont répartis sur différents quartiers dans le but d'avoir une hétérogénéité des prélèvements.

Les échantillons ont été prélevés dans des sacs stériles et acheminés au laboratoire « Molécules Bioactives de la Faculté des Sciences et Techniques - Fès » où ils sont maintenus à une température de 4°C jusqu'à leur analyse.



Les analyses microbiologiques ont été focalisées sur la recherche des levures et moisissures, qui représentent l’empreinte de la contamination fongique (Larpent et *al.*, 1997).

## 5. Préparation de la suspension mère

La suspension mère a été préparée en dispersant vingt grammes de l’échantillon de sous produits de céréales dans 180 ml de la solution Tween 80 (0,05%) (Tabuc et *al.*, 2007).

## 6. Isolement des levures et des moisissures (NM 08.0.123)

L’isolement des levures et des moisissures a été faite par étalement d’un volume de 0,1 ml de la suspension mère dans une boîte de pétri contenant le milieu gélosé approprié pour chaque germe.

- Isolement des moisissures : utilisation du milieu gélosé dextrosée à la pomme de terre ou milieu PDA (voir annexes) auquel s’ajouté le chloramphénicol (25 µg/ml) afin d’inhiber toute croissance bactérienne. L’incubation des boîtes ensemencées est effectuée à 30°C pendant 3 à 7 jours.
- Isolement des levures : utilisation du milieu YPG (voir annexe 2), auquel est ajouté le chloramphénicol (25µg/ml) afin d’inhiber toute croissance bactérienne. L’incubation est réalisée à 30°C pendant 48 à 72 heures.

### 6.1. *Identification et caractérisation des levures et moisissures isolées à partir des dérivés de céréales*

Une fois isolées, les levures et les moisissures sont purifiées par repiquages successifs sur un milieu d’isolement convenable. Ensuite, les souches de moisissures sont stockées sur gélose inclinée (2% de l’extrait de malt et 2% d’agar) à 4°C. Celles des levures sont conservées dans le glycérol (50 %) à - 20°C ou sur gélose inclinée de YPG (voir annexe).

#### 6.1.1. *Identification des moisissures*

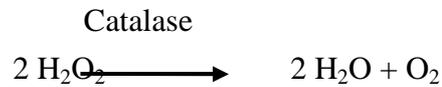
Après ensemencement des moisissures sur le milieu PDA et leur incubation à 25°C pendant une semaine, l’identification du genre des moisissures a été réalisée ainsi selon la clé d’André Breton par étude:

- Macroscopique : Morphologie, vitesse de croissance, couleur et texture du thalle.
- Microscopique : Etudier l’organe de fructification des moisissures isolés par une étude de la forme du mycélium, du sporange aussi bien les caractéristiques morphologiques des spores.



- Caractères physiologiques : utilisation des tests enzymatiques :

- Test catalase des moisissures



Ce test consiste à déposer une goutte d'une solution de l'eau oxygénée sur une lame et on y dissocie la souche à tester dans la goutte par une anse. Un dégagement gazeux aura lieu dans le cas d'une moisissure catalase positif.

#### 6.1.2. Identification des levures

L'identification des levures a été basée sur l'analyse des caractères morphologiques, et sur l'étude de certains critères physiologiques. Cette détermination systématique est réalisée conformément aux clés Kreger-Van Rij (Kreger-Van Rij *et al.*, 1984).

#### d) Etude du mycélium

L'observation microscopique du mycélium a été réalisée après 10 jours d'incubation à 25°C. La forme du mycélium est une caractéristique importante pour la détermination systématique des souches.

#### e) Etude de la sporulation

Le mode de reproduction sexuée est l'un des principaux critères dans la classification systématique des levures.

- Levures ascosporegènes, rattachées aux ascomycètes dont la reproduction est assurée par des ascospores qui sont des endospores.
- Levures ballistosporogènes, apparentées aux basidiomycètes dont la reproduction est assurée par des basidiospores qui sont des exospores.
- Levures imparfaits, rattachées aux deutéromycètes dont aucun mode de reproduction sexuée n'est défini. Ce groupe a deux affinités d'ascomycètes et de basidiomycètes.

La forme des spores est évaluée par la culture des souches sur un milieu spécifique notamment le milieu Mac Calary d'Adams (voir annexe). L'incubation se fait à 25°C pendant un mois. Les trois formes de sporulation sont mises en évidence à l'aide des observations microscopiques après coloration des spores avec le vert de malachite.



f) Etude des caractères physiologiques

○ **Test de réduction du tétrazolium**

Ce test a été réalisé par étalement d'un inoculum concentré sur des boîtes contenant le milieu de Sabouraud additionné de 0,1 g/l du 2, 3,5-tryphenyl-tétrazolium, produit incolore avant l'ensemencement. Une réaction positive indiquant une réaction du tétrazolium se traduit par une teinte rose puis rouge plus ou moins intense selon les espèces. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48h (Chakiri M. et *al.*, 2008 et Kreger-van Rij et *al.*, 1984).

Sur ce milieu la couleur des colonies varie suivant l'espèce de *Candida* :

- Blanc crème : *Candida albicans*.
- Blanc mat : *Candida krusei*.
- Rose : *Candida stellatoidea*.
- Rouge : *Candida parakrusei*.
- Rouge violet : *Candida tropicalis*.

○ **Formation de pellicule**

Le bouillon du milieu YPG est réparti à raison de 5ml par tube de 18mm de diamètre puis stérilisé à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min. Ensuite, ce milieu est ensemencé par 10µl d'une préculture fraîche des différentes souches testées, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 48h. La réaction positive est représentée par la formation d'un voile à la surface du bouillon, ou d'un anneau sur la paroi du tube ou bien par la formation des deux (Chakri M. et *al.*, 2007).

○ **Croissance des levures en fonction de la variation des températures**

Les souches de levures sont inoculées dans le milieu de culture Sabouraud ou YPG puis incubés afin de caractériser leurs capacité de développement selon différents températures 25°C ; 30°C ; 37°C et de 44°C pendant 24h.

○ **Test catalase des levures**

Ce test consiste à déposer une goutte d'une solution de l'eau oxygénée sur une lame et on y dissocie la colonie des levures à tester dans la goutte par une anse. Un dégagement gazeux aura lieu traduisant la présence de l'enzyme catalase chez la levure testée.



○ **Test amylase des levures**

La levure capable d'utiliser l'amidon va sécréter des amylases, qui hydrolysent l'amidon :



A partir des cultures fraîches de levures à tester ; on ensemence de chaque culture de levure sur des boîtes contenant le milieu YPG additionné de l'amidon. Après 48 heures d'incubation à 30°C, on fait la révélation de l'activité amylase.

La révélation se fait par le mélange de:

- Iodure de potassium.....3g.
- Iode.....0,3g.
- Eau distillée.....100ml.

Le lavage a été fait par l'eau distillée stérile.

## **VI. Etude de la contamination par mycotoxines**

Les échantillons de sous produits de céréales collectés ont également été analysés pour trois types de mycotoxines différentes (aflatoxines, déoxynivalénol, fumonisine) en utilisant le test d'ELISA par compétition.

### **6. Principe générale**

Le principe de la détermination des aflatoxines est basé sur leur extraction à partir des différents échantillons de sous produits de céréales par un solvant approprié et leur dosage en utilisant la technique immunoenzymatique.

Le dosage des mycotoxines dans les différents échantillons de sous produits de céréales collectés a été réalisé par deux types de tests ELISA:

- Test ELISA indirect par compétition : pour le dosage des aflatoxines et déoxynivalénol.
- Test ELISA direct par compétition : pour le dosage de la fumonisine.

### **7. Dosage des aflatoxines**

Il s'agit d'une réaction antigène-anticorps, où les anticorps de capture dirigés contre un type de mycotoxine sont fixés sur les puits de la plaque de microtitration. Par l'addition à la fois de l'extrait de l'échantillon à analyser et une quantité déterminé d'un type de mycotoxine conjugué à la



peroxydase (AFT-PX), les deux molécules (mycotoxine suspectée présente dans l'échantillon et la mycotoxine marquée donné par le kit) entrent en compétition pour un même anticorps anti-aflatoxine. Le complexe anticorps antigène est révélé par l'addition d'un substrat chromogène qui est le 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) où une coloration bleue s'apparait, une solution d'arrêt est alors ajouté après une incubation de la plaque d'ELISA à 30° pendant 20 à 30 minutes. La mesure de l'absorbance est réalisée par spectrophotomètre à 450 nm utilisant un lecteur de plaques à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland). La concentration d'aflatoxine dans l'échantillon est inversement proportionnelle à l'absorbance.

Pour le dosage des aflatoxines dans les échantillons de sous produits de céréales, un kit de test d'ELISA a été utilisé (RIDASCREEN® Aflatoxin Total, Germany).

La sensibilité du kit est de 1,75 µg/kg.

L'extraction et le dosage des trois types de mycotoxines (aflatoxines, déoxynivalénol et fumonisine) ont été réalisés selon les instructions du fabricant.

### *7.1. Préparation des extraits*

Deux grammes (2g) de l'échantillon de sous produits céréaliers ont été solubilisés dans 10 ml de méthanol 70 % et homogénéisée pendant 10 min. L'extrait obtenu est filtré à travers du papier Wattman. Cent microlitres du filtrat obtenu est dilué dans 600 µl du tampon donnée par le kit.

### *7.2. Dosage des aflatoxines*

Cinquante microlitres (50 µl) d'anticorps dilué au 1/2 dans le tampon BBS sont répartis dans chaque puits de la plaque d'ELISA. Cette dernière est ensuite incubée une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 50 µl du filtrat de l'échantillon dilué au 1/7eme et 50 µl du conjugué sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. Une incubation est réalisée par la suite une heure à 30°C. Après trois lavage par le tampon BBS, 100 µl du substrat / chromogène (TMB) est additionné. La plaque ensuite est incubée pendant trente minutes à 30°C. Cent microlitres (100 µl) de la solution d'arrêt de la réaction est ajouté. La mesure de l'absorbance est réalisée par un spectrophotomètre à 450 nm (Labsystems Multiskan MS, Finland).

## **8. Dosage de déoxynivalénol**

Pour le dosage de déoxynivalénol, un kit test est utilisé (REDASCREEN® FAST DON) dont sa sensibilité est inférieur à 0,2 mg/kg. Les instructions du fabricant ont été suivies pour la préparation des extraits et le dosage de déoxynivalénol.

### *8.1. Préparation des extraits*



Cinq grammes (5g) de l'échantillon de sous produits de céréales ont été solubilisés dans 25 ml de l'eau distillé et homogénéisés pendant trois minutes. L'extrait obtenu est filtré à travers du papier Wattman.

### 8.2. Dosage de déoxynivalénol

Cinquante microlitres d'anticorps dilué au  $\frac{1}{2}$  dans le tampon BBS sont répartis dans chaque puits de la plaque d'ELISA. Cette dernière est ensuite incubée une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 50  $\mu$ l du filtrat de l'échantillon dilué au 1/7ème et 50  $\mu$ l du conjugué sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. Une incubation est faite par la suite une heure à 30°C. Après trois lavage par le tampon BBS, 100  $\mu$ l du substrat /chromogène (TMB). Ensuite la plaque est incubée pendant trente minutes à 30°C. Cent microlitres de la solution d'arrêt de la réaction est ajouté. La mesure de l'absorbance est réalisée par un spectrophotomètre à 450 nm (Labsystems Multiskan MS, Finland).

## 9. Dosage de la fumonisine

Pour le dosage de la fumonisine dans les échantillons de sous produits de céréales collectés, un kit de dosage de la fumonisine a été utilisé (Agra Qant<sup>®</sup>, Romer Lab, Ferland) dont sa sensibilité est inférieur à 0,2 mg/kg.

Les étapes de la préparation des extraits et du dosage sont données par le fabricant.

### 9.1. Principe du test

Le dosage de la fumonisine se fait par la technique d'ELISA direct par compétition.

La fumonisine est extraite à partir des échantillons de produits céréaliers en utilisant le méthanol 70%. Les extraits dilués mélangés avec le conjugué de la fumonisine marqué à peroxydase et déposées dans des puits de microtitration revêtue d'anticorps. La molécule de fumonisine contenu dans les échantillons ou dans les standards de contrôle entrent en compétition avec la fumonisine conjugué pour les mêmes sites de liaison d'anticorps. Après une étape de lavage, un substrat d'enzyme (TMB) est ajouté et une couleur bleue s'est développée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de fumonisine dans l'échantillon ou dans le standard. Une solution d'arrêt est ajoutée. L'absorbance est mesuré par un spectrophotomètre à 450 nm.

### 9.2. Préparation des extraits

Vingt grammes de l'échantillon de sous produits de céréales ont été ajouté à 100 ml de la solution d'extraction (méthanol 70%), le produit obtenu est par la suite mélangé pendant 3 minutes. L'extrait est par la suite filtré par un papier Wattman puis dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  avec de l'eau distillée.



### 9.3. Procédure du test

Soixante-dix microlitres du conjugué de la fumonisine donné par le fabricant et 35  $\mu$ l de l'échantillon de sous produits de céréales dilué ou de standard sont répartis dans chaque puits de la plaque d'ELISA. Cette dernière est ensuite incubée une heure à 30°C. Après trois lavages par le tampon BBS, 100  $\mu$ l du substrat / chromogène (TMB) est ajouté. Par la suite 100  $\mu$ l de la solution d'arrêt de la réaction est ajoutée après une incubation une heure à 30°C. La mesure de l'absorbance à 450 nm a été réalisée par un spectrophotomètre.

## 10. Etude de l'effet de quelques traitements biologiques sur de la réduction de la concentration des aflatoxines

### 10.1. Effet couplé de la fermentation et de la cuisson

La méthode de fermentation que nous avons adoptée est celle effectuée dans le milieu rurale et urbain au Maroc avec de légères modifications à savoir les proportions en inoculum selon le protocole introduit par Faid et *al.* (1994). Trois échantillons de farine ont été utilisés dans cette essai (F002, F003 et F004) et qui sont analysés au préalable par la méthode d'ELISA pour la recherche des traces d'aflatoxines.

Les pâtes de farines utilisées dans l'essai sont préparées en mélangeant dix grammes de farine auquel est ajouté 0,2 grammes de levure et 6ml de l'eau distillée chauffée à 40°C. La pâte est bien pétrie puis cuite.

### 10.2. Effet de la digestion

Pour étudier l'effet de la digestion sur la réduction de la concentration des aflatoxines, trois échantillons différents de pains (P005, P014 et P021) ont été choisis pour les quelles un protocole d'étude cet effet a été suivi.

- Mode opératoire

Dix grammes de l'échantillon de pain ont été ajoutés à 20 mg de la pepsine et 100ml du PBS à pH=3 et. Le mélange a été centrifugé dix minutes à 3000 tr/min après une incubation deux heures à 37°C. Un volume de 3,5 ml du surnageant a été ajouté à 6,5 ml du méthanol pur et 100  $\mu$ l de la solution obtenue a été mélangé avec 600  $\mu$ l du tampon de dosage des aflatoxines totales. 50  $\mu$ l du mélange a été utilisé pour le dosage des aflatoxines par la méthode d'ELISA par compétition.



## V. Enquête sur les conditions de vente et de commercialisation du pain

### 3. Analyse du niveau de conformité

L'analyse du niveau de conformité de boulangeries visitées, a été limitée sur les réponses des responsables des services aux questions posées.

#### 3.1. Locaux

Afin d'éviter la contamination croisée et l'atteinte à la sécurité des produits commercialisés, le contrôle de la conformité des locaux et des installations des boulangeries restent des étapes importantes afin de diminuer les risques d'anomalies.

L'observation de la conformité des locaux au niveau des zones de production du pain, montre que le pourcentage de conformité des locaux sanitaire reste conforme qui est de l'ordre de 60%, par ailleurs la non conformité des locaux d'entreposage et de préparation d'aliment qui est de l'ordre 23,52% (Figure 1).

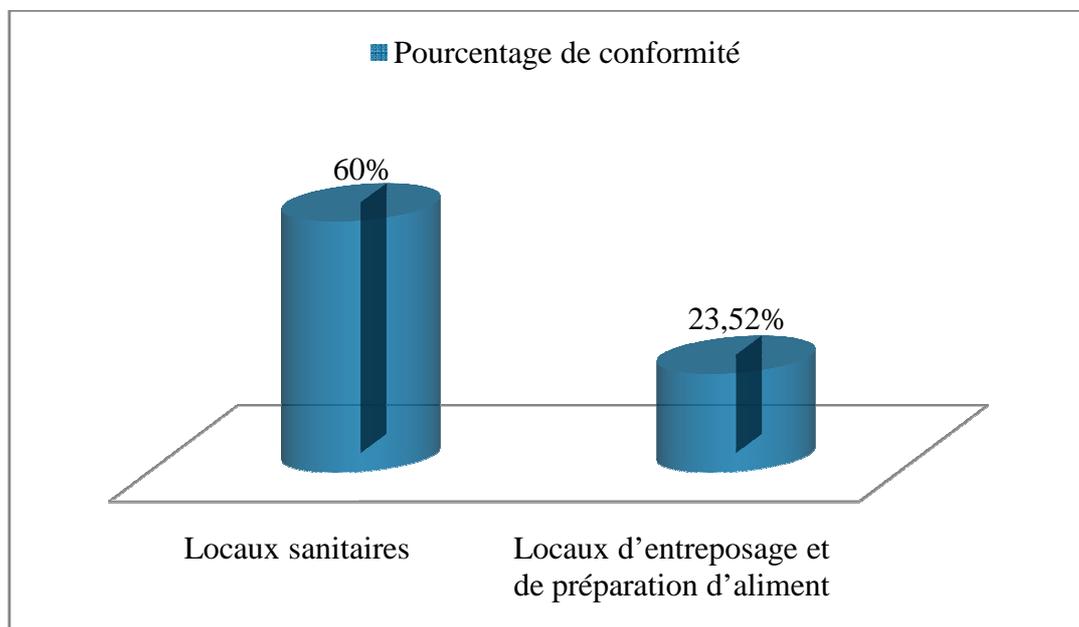


Figure 14: Conformité des locaux des zones de production du pain

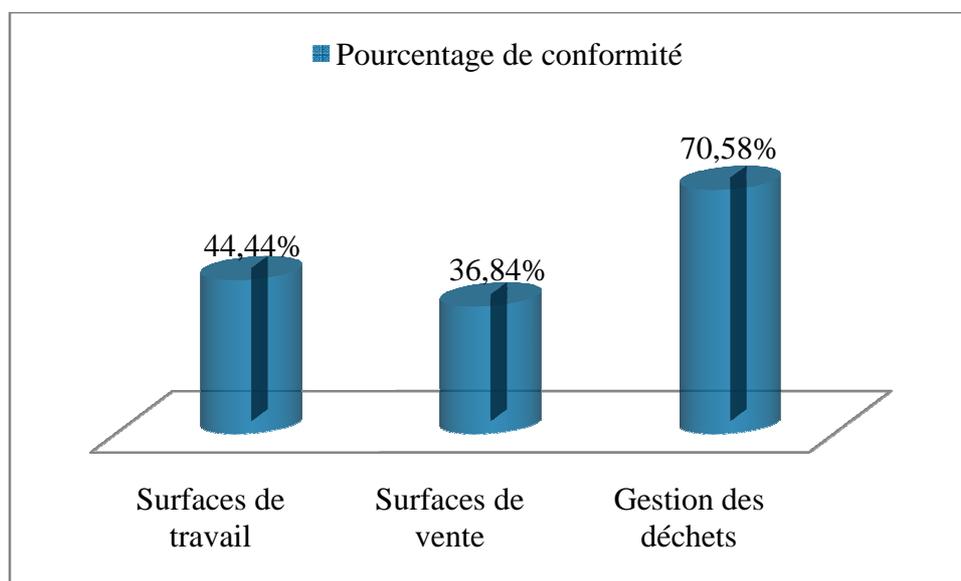


### 3.2. Entretien et nettoyage

Les espaces de la zone de production destinés aux aliments doivent être propres et bien entretenus.

Dans une boulangerie, il est donc important de faire une distinction claire entre les espaces privés à la fabrication d'une part et les espaces réservés à la vente d'autre part. Un entretien efficace doit garantir le bon état de l'infrastructure.

Au niveau des boulangeries visitées, la conformité des surfaces de travail et de vente reste médiocre (44,44% et 36,84% respectivement), par ailleurs l'entretien des déchets de ces zones est conforme (70,58%) (Figure 2).



**Figure 15:** Entretien et nettoyage des zones de production

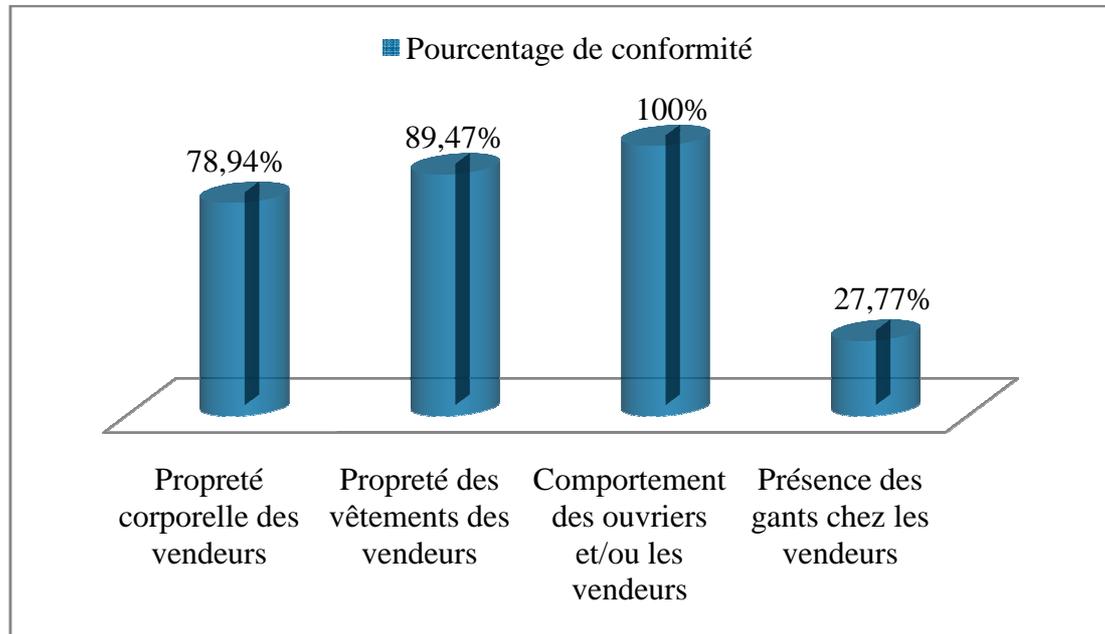
### 3.3. Hygiène du personnel

Afin de pouvoir fabriquer des produits boulangers sains et sans risques, il faut qu'il y ait non seulement une production sécurisée mais également une hygiène suffisante. En plus d'une bonne hygiène des locaux, du matériel et des appareils, l'hygiène personnelle revêt également toute son importance. En effet, on peut amener des micro-organismes ou provoquer une contamination physique avec des mains sales, des vêtements de travail souillés...etc.

L'hygiène du personnel au niveau des boulangeries visitées est satisfaisante ainsi que leurs comportement (le fait de se moucher, toucher de la saleté ou de fumer) au cours de la manipulation



de l'aliment est à 100% conforme, aussi que la propreté corporelle et celle des vêtements est appréciable (78,94% et 89,47% respectivement) (Figure 3).



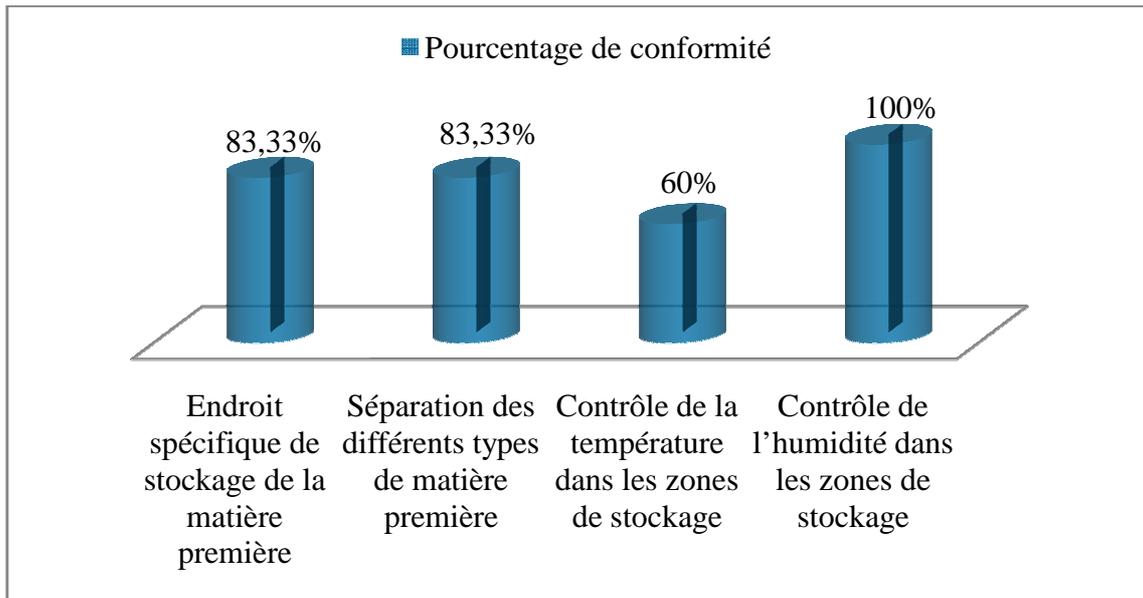
**Figure 16:** Hygiène du personnel

### 3.4. Entreposage de la matière première

L'entreposage des aliments devraient être conçu et construit de manière à protéger efficacement les aliments contre la contamination pendant le stockage et de réduire au minimum la détérioration des produits alimentaires par le réglage de la température et de l'humidité.

L'application de techniques de stockage adaptées permet de faciliter le contrôle concernant une éventuelle présence de nuisibles.

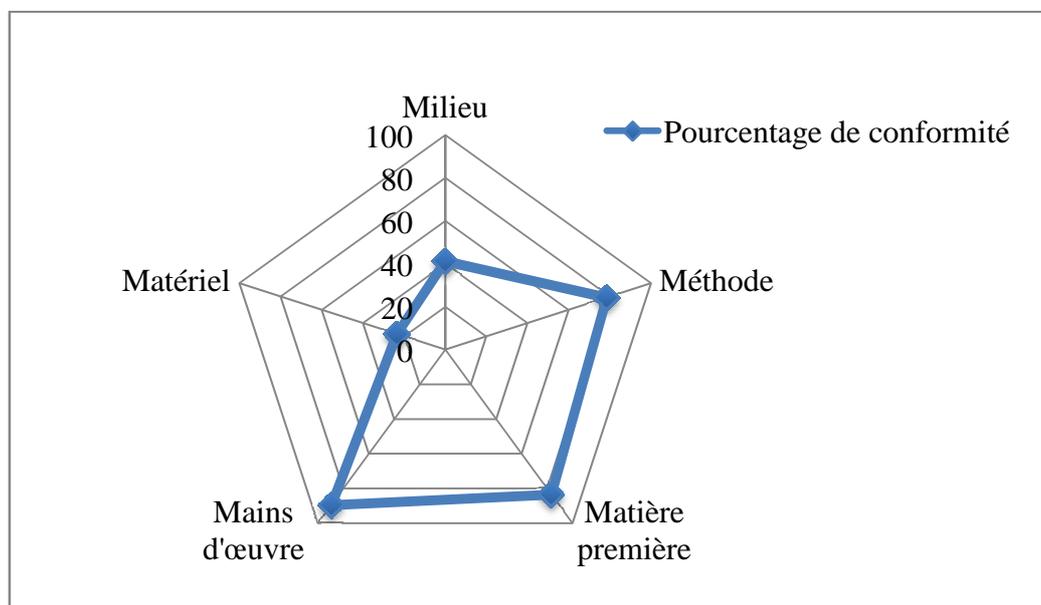
Généralement, la méthode d'entreposage de la matière première dans les zones de production du pain visités a été satisfaisante, puisqu'on trouve que 83,33% de ces boulangeries séparent les différents types de matière première, ainsi le contrôle de l'humidité et de la température dans les zones de stockage de la matière première est appliqué (100% et 60% respectivement) (figure 4).



**Figure 17:** Conformité des méthodes d'entreposage de la matière première

#### 4. Qualification de la qualité de l'environnement de travail

L'enquête menée pour l'état des lieux montre que le pourcentage de conformité pour les cinq programmes d'hygiène est de 89,47 % pour la main d'œuvre, 83,33 % pour la matière première, 78,47 % pour la méthode, 41,2 % pour le les milieux et 23,52% pour le matériel (figure 5).



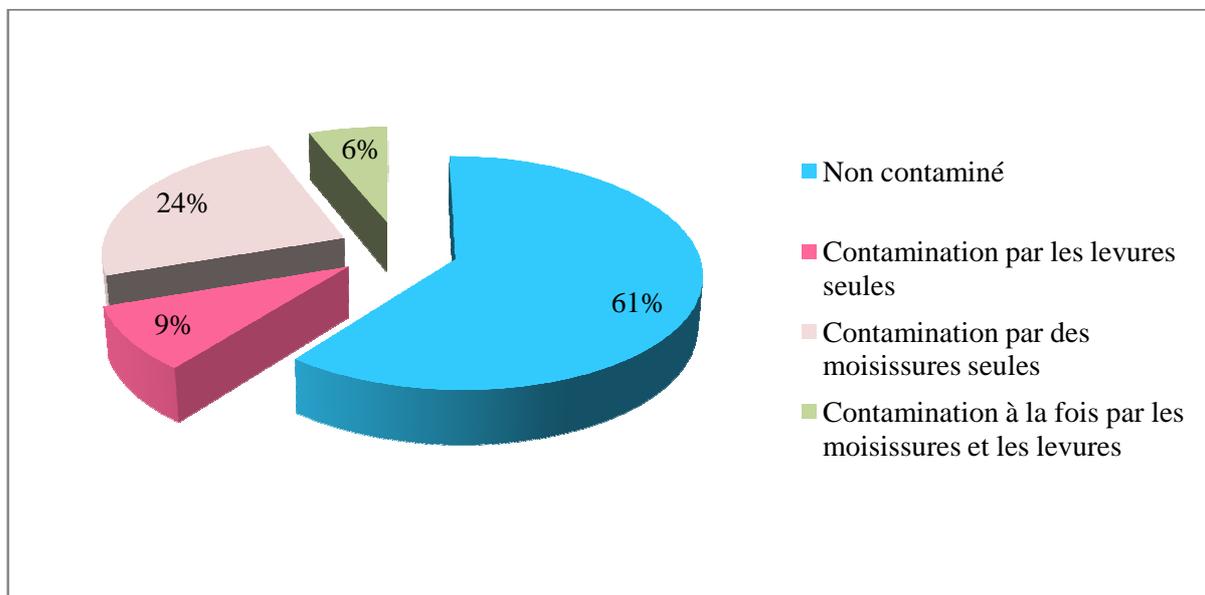
**Figure 18:** Analyse de conformité des programmes d'hygiène

## VI. Analyse fongique

### 3. Isolement de la flore fongique à partir des produits céréaliers issus des différents points de vente

Sur 33 échantillons analysés, 61% sont révélés non contaminés par la flore fongique, 24% sont contaminés par des moisissures, 9% sont contaminés par des levures et 6% sont contaminés à la fois par des moisissures et des levures.

Les résultats de l'analyse de la flore fongique des sous produits de céréales sont présentés dans la figure 6.



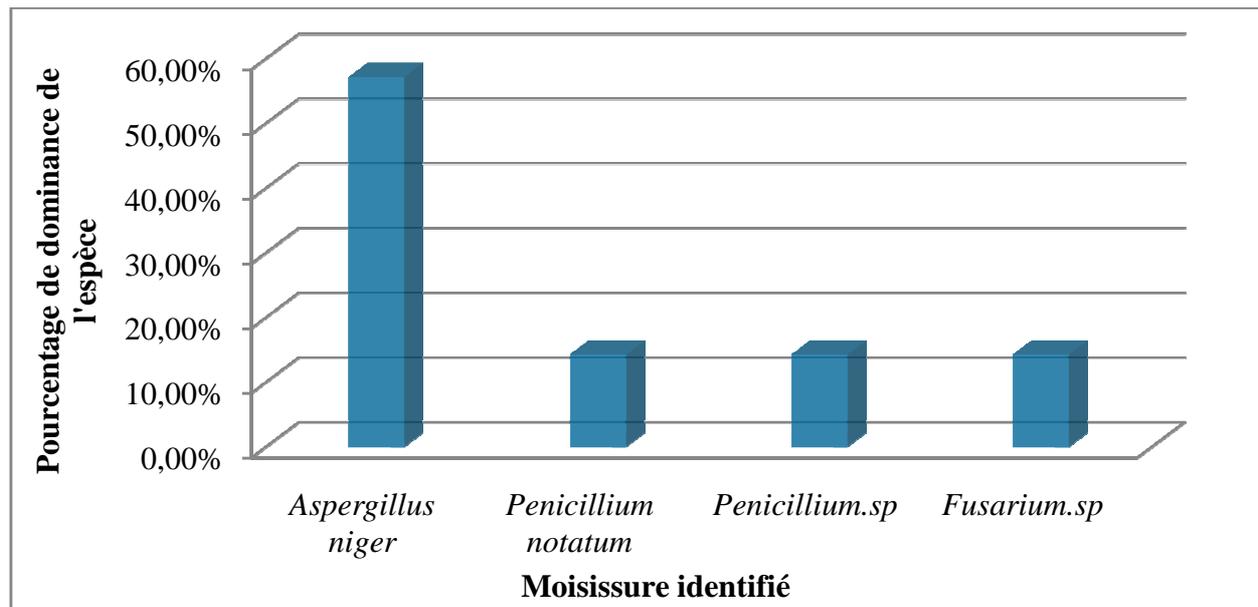
**Figure 19:** La flore fongique isolée à partir des produits de céréales collectés

### 4. Caractérisation de la microflore isolée des produits à base de céréales

#### 4.1. Identification des moisissures

Les résultats de l'identification des souches de moisissures sont indiqués dans la figure 7. Cette identification a permis de dévoiler que l'espèce *Aspergillus niger* domine avec 57,14 %.

En deuxième lieu, se positionnent les espèces *Penicillium notatum* et *Penicillium.sp* et *Fusarium.sp* qui représentent un pourcentage de 14,29% pour chaque espèce (figure 7).



**Figure 20:** Espèces de moisissures identifiées

Parmi les souches identifiées principalement (de droite à gauche) : *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* et *Fusarium sp*.



Photo 2 : Quelques espèces de moisissures isolées à partir des produits de céréales

#### 4.2. Identification des levures

Les résultats de l'identification des souches de levures sont indiqués dans la figure 7. Cette identification a permis de dévoiler que l'espèce *Debaryomyces sp* domine avec 60 %. En deuxième lieu, se positionnent les espèces *Geotrichum candidum* (photo 3), et *Candida sp* qui représentent un pourcentage de 20% pour chaque espèce (figure 8).

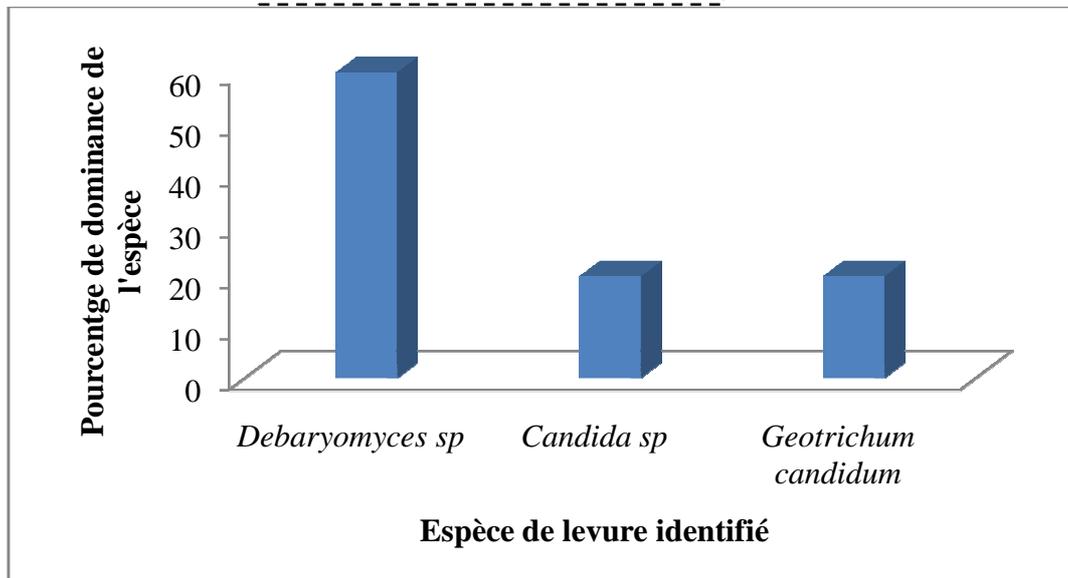
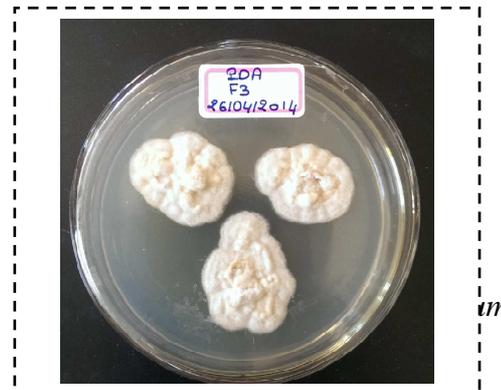


Figure 21: Espèces de levures identifiées

## VII. Dosage des mycotoxines dans les échantillons

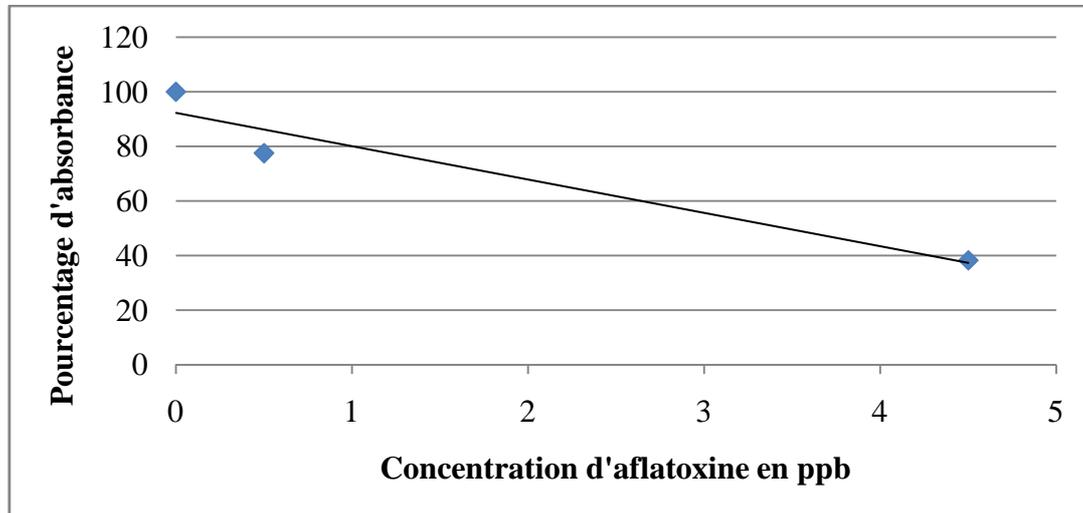
### 1. Dosage des aflatoxines

Les échantillons de sous produits de céréales ont été analysés par la méthode ELISA par compétition. Pour le dosage des aflatoxines dans ces échantillons, un kit de test RIDASCREEN® (« R -Biopharm AG », Allemagne) a été utilisé pour l'analyse. La quantification de ces molécules a nécessité l'élaboration d'une courbe d'étalonnage en faisant appel à des standards des aflatoxines



contenant différentes concentrations ( figure 9) . La densité optique a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques d'ELISA à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland).

**Remarque :** 1ppb= 1µg/Kg



**Figure 22:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des aflatoxines totales

Selon le dernier rapport de la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006) portant sur la fixation de teneurs maximales des mycotoxines dans les céréales, la limite maximale des aflatoxines dans les produits céréaliers transformés est fixée à 4 ppb.

Les résultats obtenus ont montré que 96,96% d'échantillons analysés (32 échantillons parmi 33 échantillons) par la technique ELISA par compétition contiennent des taux d'aflatoxines supérieur à cette norme ( 4 ppb) , ce qui nous permet de déduire qu'un certains nombre de conditions environnementales notamment de la température et de l'humidité au cours de la culture ou du stockage ont favorisé le développement des moisissures toxigènes responsables de la sécrétion de cette molécule toxique (tableau 7).



**Tableau 10:** Analyse des aflatoxines dans les sous produits de céréales

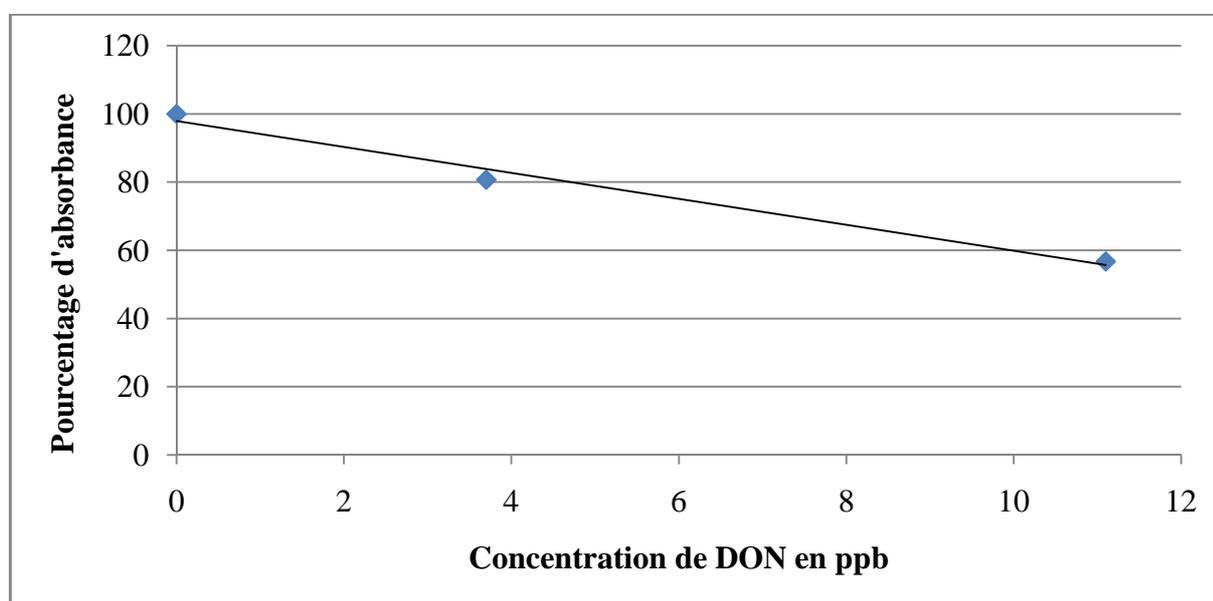
Echantillon	Concentration d'aflatoxine en ppb	Conformité de l'échantillon
<b>Pain</b>		
P001	88,02	Non conforme
P002	103,35	Non conforme
P003	72,69	Non conforme
P004	48,16	Non conforme
P005	140,14	Non conforme
P006	56,33	Non conforme
P007	86,99	Non conforme
P008	83,93	Non conforme
P009	72,69	Non conforme
P010	61,44	Non conforme
P011	43,04	Non conforme
P012	64,51	Non conforme
P013	62,46	Non conforme
P014	104,37	Non conforme
P015	48,16	Non conforme
P016	61,44	Non conforme
P017	86,99	Non conforme
P018	73,71	Non conforme
P019	111,52	Non conforme
P020	117,66	Non conforme
P021	137,08	Non conforme
<b>Farine</b>		
F001	152,41	Non conforme
F002	154,45	Non conforme
F003	104,37	Non conforme
F004	138,1	Non conforme
F005	0	Conforme
<b>Biscuits</b>		
B001	121,01	Non conforme
B002	115,9	Non conforme
B003	113,86	Non conforme
B004	126,12	Non conforme
<b>Semoule de blé</b>		
S001	119,1	Non conforme
S002	106,7	Non conforme
<b>Produit à base de maïs</b>		



M001	122,03	Non conforme
------	--------	--------------

## 2. Dosage de déoxynivalénole

Les échantillons ont été analysés par la méthode ELISA par compétition. Pour le dosage de déoxynivalénole dans ces échantillons. Un kit de test RIDASCREEN® (R –Biopharm FAST DON, Allemagne) a été utilisé pour l'analyse. La quantification des molécules de déoxynivalénole a nécessité l'élaboration d'une courbe d'étalonnage en faisant appel à des standards de déoxynivalénole contenant différentes concentrations ( figure 10) . La densité optique a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques d'ELISA à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland).



**Figure 23:** Gamme d'étalonnage de DON

Selon le dernier rapport de la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006) portant sur la fixation de teneurs maximales des mycotoxines dans les céréales, la limite maximale de déoxynivalénole dans céréales destinées à la consommation humaine directe y compris les farines de céréales est fixé à 750 ppb.

Pour les pains, les biscuits, le taux maximal de déoxynivalénole doit être inférieur à 500 ppb.

Les résultats obtenus ont montré que 42,42% (14 échantillons positifs parmi 33 échantillons) présentent une concentration de déoxynivalénole comprise entre 3ppb et 101 ppb.



En effet, 100 % de ces échantillons présentent un taux de déoxynivalénol inférieur à la norme européenne (tableau 8).

**Tableau 11:** Analyse de déoxynivalénol dans les sous produits de céréales

Echantillon	Concentration de déoxynivalénol en ppb	Conformité
<b>Pains</b>		
P001	63,64	Conforme
P002	59,98	Conforme
P003	0	Conforme
P004	0	Conforme
P005	0	Conforme
P006	0	Conforme
P007	0	Conforme
P008	0	Conforme
P009	0	Conforme
P010	0	Conforme
P011	0	Conforme
P012	17,88	Conforme
P013	3,81	Conforme
P014	0	Conforme
P015	0	Conforme
P016	0	Conforme
P017	22,1	Conforme
P018	0	Conforme
P019	0	Conforme
P020	0	Conforme
P021	5,68	Conforme
<b>Farines</b>		
F001	0	Conforme
F002	0	Conforme
F003	0	Conforme
F004	0	Conforme
F005	101,46	Conforme
<b>Biscuits</b>		



B001	52,12	Conforme
B002	47,9	Conforme
B003	54,46	Conforme
B004	52,6	Conforme
<b>Semoules de blé</b>		
S001	43,67	Conforme
S002	59,62	Conforme
<b>Produit à base de maïs</b>		
M001	8,97	Conforme

### 3. Dosage des fumonisines

Les échantillons ont été analysés par la méthode ELISA par compétition. Pour le dosage des fumonisines dans ces échantillons, un kit de test AgraQuant® ((Romer Laboratory Inc.,Singapore), a été utilisé pour l'analyse. La quantification de ces molécules a nécessité l'élaboration d'une courbe d'étalonnage en faisant appel à des standards de la fumonisine contenant différentes concentrations (figure 11). La densité optique a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques d'ELISA à 96 puits (Labsystems Multiskan MS, Finland).

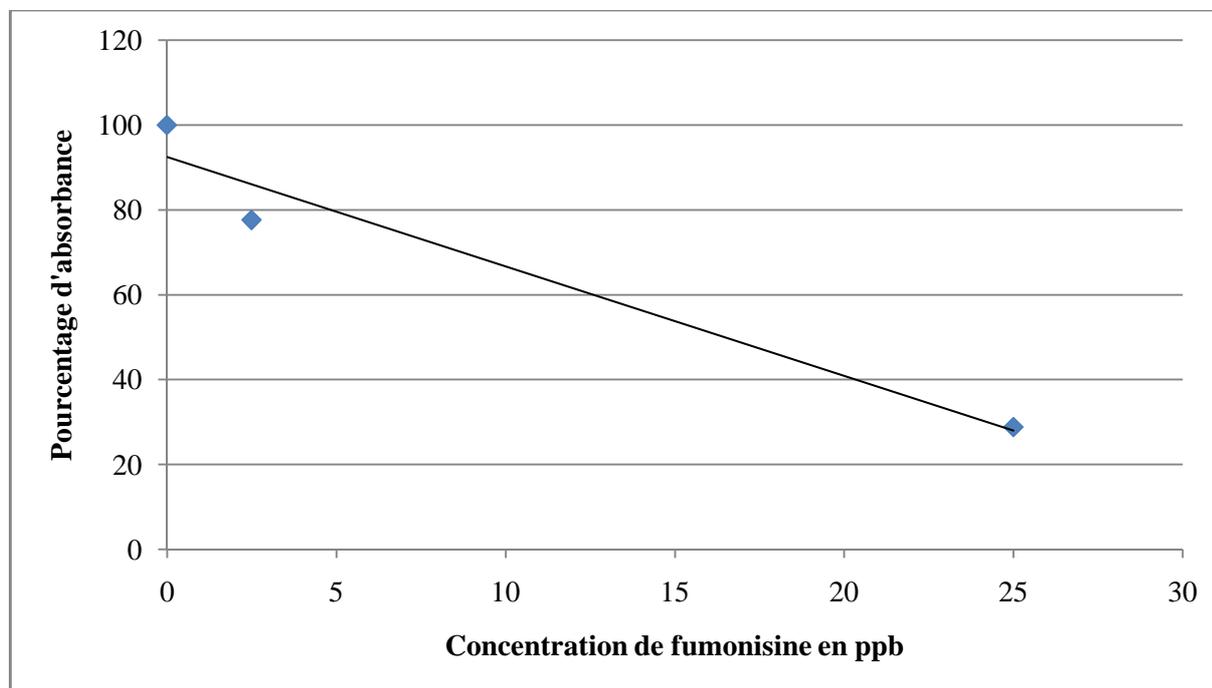


Figure 24: Gamme d'étalonnage pour le dosage de fumonisine



Selon le dernier rapport de la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006) portant sur la fixation des teneurs maximales des mycotoxines dans les céréales, la limite maximale de fumonisine dans les farines de céréales est fixés à 1000 ppb.

Les résultats obtenus ont montré que 72,72% des échantillons analysés sont contaminés par la fumonisine dans un intervalle compris entre 4,9 ppb et 489,01 ppb, toutefois, 100 % de ces échantillons contaminés présentent un taux de fumonisine est inférieur à la norme européenne fixée par la commission européenne (tableau 9).

**Tableau 12:** Analyse de fumonisines dans les sous produits de céréales

Echantillon	Concentration de fumonisines en ppb	Conformité
<b>Pains</b>		
P001	21,97	Conforme
P002	0	Conforme
P003	60,6	Conforme
P004	51,7	Conforme
P005	87,34	Conforme
P006	0	Conforme
P007	0	Conforme
P008	0	Conforme
P009	0	Conforme
P010	0	Conforme
P011	0	Conforme
P012	50,2	Conforme
P013	82,88	Conforme
P014	48,72	Conforme
P015	0	Conforme
P016	88,08	Conforme
P017	4,9	Conforme
P018	105,17	Conforme
P019	109,63	Conforme
P020	120,77	Conforme
P021	133,4	Conforme
<b>Farines</b>		
F001	57,63	Conforme



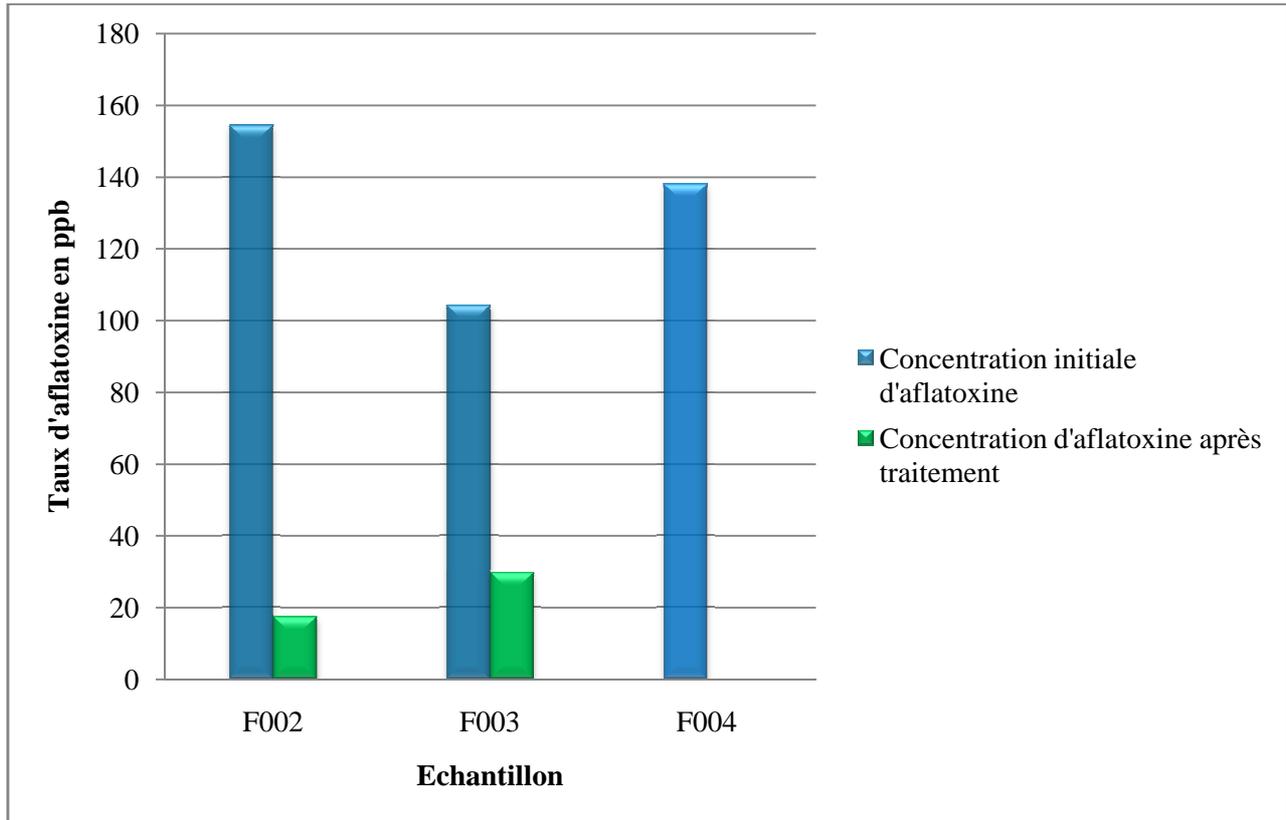
F002	91,8	Conforme
F003	37,57	Conforme
F004	107,4	Conforme
F005	489,01	Conforme
<b>Biscuits</b>		
B001	27,1	Conforme
B002	192,94	Conforme
B003	116,81	Conforme
B004	44,91	Conforme
<b>Semoules de blé</b>		
S001	40,68	Conforme
S002	0	Conforme
<b>Produit à base de maïs</b>		
M001	23,76	Conforme

## VIII. Effet de quelques traitements biologiques sur la réduction de la concentration des aflatoxines

### 1. Effet couplé de la fermentation et de la température

Trois échantillons de farines ont été choisis pour étudier l'effet couplé de la fermentation et de température incluant à la fois les échantillons F002, F003 et F004. Ces trois échantillons de farine que nous avons utilisée dans cet essai sont analysés au préalable par la méthode d'ELISA par compétition pour la recherche des traces d'aflatoxines.

Dans l'échantillon F002, la concentration d'aflatoxines avant le traitement a été de l'ordre de 154,45 ppb, après le traitement cette concentration a été réduite pour atteindre 17,5 ppb, soit une réduction de 88,6%. Le même effet de ce traitement a été remarqué pour les autres échantillons, puisqu'on remarque pour l'échantillon F003, la concentration d'aflatoxines a passé de 104,37 ppb à 29,8 ppb, soit une réduction de 71,3% ; pour l'échantillon F004, la concentration d'aflatoxines a passé de 138,1 ppb à 0 ppb soit une réduction de 100% (figure 12).



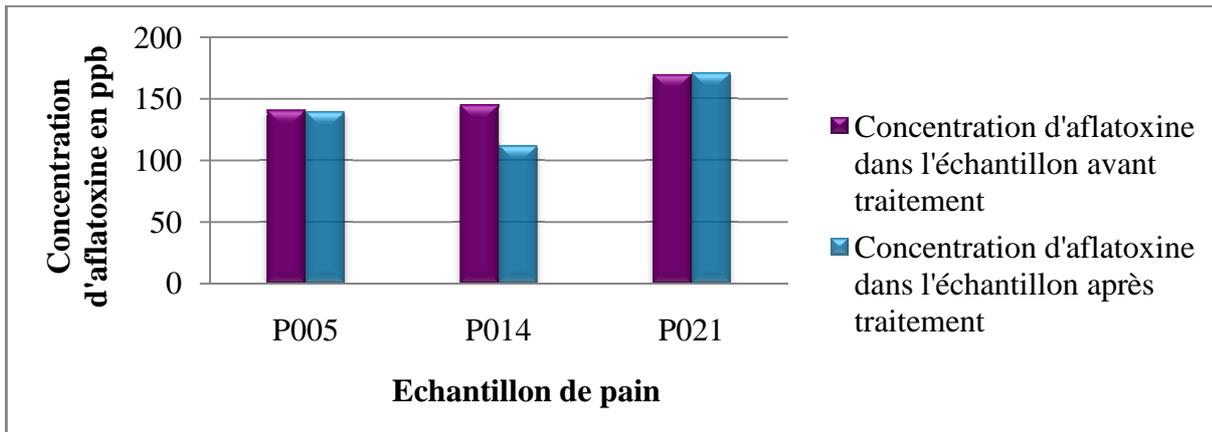
**Figure 25:** Etude de l'effet couplé de la température et la fermentationsur la réduction de la concentration d'aflatoxine

## 2. Effet de la digestion

Trois échantillons du pain, ont été choisis pour étudier l'effet de la digestion sur la réduction de la concentration d'aflatoxines : P005, P014 et P021.

Une très faible réduction d'aflatoxines dans les échantillons a été observée après traitement, puisqu'on remarque que pour l'échantillon P005 la réduction est de l'ordre de 1.02% passant de 140.72 ppb à 139.28 ppb après traitement.

Concernant l'échantillon P014, la réduction a été de l'ordre de 22,94% passant de 145,06 ppb à 111,78 ppb, et pour l'échantillon P021 la concentration d'aflatoxine a resté stable sans aucun effet de la digestion (figure 13).



**Figure 26:** Etude de l'effet de la digestion sur trois échantillons différents de pains



La présente étude a pour objectif d'évaluer dans un premier temps la qualité hygiénique de quelques zones de production des pains au niveau de la région de Fès, pour ce faire nous avons préparé un questionnaire afin de mettre en évidence l'hygiène des magasins visités.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de conformité à la fois pour les mains d'œuvre (89,47%), pour la matière première (83,33%) et les méthodes (78,47 %) est satisfaisant, toutefois la fréquence de conformité pour les milieux (41,2 %) et pour le matériel (23,52%) est non satisfaisante. Ces résultats pourraient nous faire penser que la contamination des échantillons par les germes microbiens notamment par la flore fongique peut provenir de plusieurs conditions non hygiéniques essentiellement par la contamination croisée, et par l'état d'hygiène du lieu de production provenant essentiellement de l'environnement du milieu de production et du matériel souillé.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué le niveau de contamination fongique de nos échantillons collectés et nous avons identifié les espèces de champignons isolés. Les résultats de cette analyse révèle un niveau de contamination des échantillons par l'espèce *Aspergillus niger* étaient très répandues (57,14%), et que le taux d'incidence des espèces *Fusarium spp.* *Penicillium sp* et *Penicillium notatum* était relativement faible (14,29%). En effet, la contamination des produits céréaliers par la flore des moisissures inclus principalement trois principaux champignons d'altération appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, (Oliveira et al., 2013). Une étude réalisée par Joshaghani montre que les espèces de moisissures les plus communément isolés à partir des échantillons de blé étaient *Aspergillus niger* (21,4%), suivie par l'espèce de *Fusarium spp* (17,8%) suivie par *Penicillium spp* (8,9%) (Joshaghani et al., 2013). En Iran, une étude de Čonková en 2006 montre que la contamination fongique des échantillons de blé collectés à partir de deux provinces différentes montre toujours la dominance de trois espèces de moisissures notamment *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* et *Penicillium spp* (Čonková et al., 2006). Une étude Algérienne de Riba révèle la haute fréquence de contamination des échantillons de blé par les espèces de *Fusarium*, *Penicillium*, et surtout *Aspergillus* (appartenant à la section Flaviens et Nigri) (Riba et al. 2008). La haute fréquence et l'abondance des espèces d'*Aspergillus spp* pourrait être due à une défaillance dans la production alimentaire et/ou dans les méthodes de conservation de la matière première.

L'analyse des produits de céréales pour leur niveau de contamination par les levures a révélé la dominance de l'espèce *Debaryomyces sp* (60%), suivie par les espèces *Candida sp* et l'espèce



*Geotrichum candidum* (20% pour chacun). En effet selon Joshaghani (2013), les principales levures qui peuvent être présent dans les graines de céréales et dans ses sous produits sont celle appartenant aux espèces *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* et *Trichosporon* (Joshaghani et al, 2013).

La présence des espèces fongique notamment les espèces appartenant au genre d'*Aspergillus*, *Penicelium* et *Fusarium* dans les échantillons analysés, qui sont reconnus comme principales agents sécréteurs des mycotoxines dans les denrées alimentaires principalement les sous-produits de céréales, suggère la présence probable de ces molécules toxique dans nos échantillons. Pour cela un dosage de trois types de mycotoxines (aflatoxines, déoxynivalénol et fumonisine) par la méthode d'ELISA par compétition a été réalisé. Notre étude montre que plus de 96% des échantillons présentent une très haute concentration des aflatoxines totales ( supérieur à 43 ppb) qui reste largement supérieur à la norme ( 4 ppb) fixé par la commission européenne publié le 19 décembre 2006 (Règlement (CE) N ° 1881/2006). Ce résultat est comparable à l'étude menée par Iqbal et al en 2014 où 41% des échantillons de céréales du petit déjeuner analysés sont contaminés par les aflatoxines totales (AF<sub>S</sub>) dont 8% de ces échantillons présentent un taux d'AF<sub>S</sub> supérieur à la norme fixée par l'Union Européen en 2006 (Iqbal et al. 2014). Une autre étude réalisée par Soleimany (2011) où 50% des échantillons de céréales analysés sont contaminés par les AFs (Soleimany et al., 2011).

Les résultats du dosage de déoxynivalénol ont montré que 42,42% présentent une concentration de déoxynivalénol comprise entre 3 ppb et 101 ppb dont 100 % des échantillons positifs présentent un taux de déoxynivalénol inférieur à la norme européenne, ces résultats sont très proches de celui rapportés par Yanshen en Chine où 52,5% des échantillons de céréales commerciales analysés présentent une concentration de DON comprise entre 7 ppb et 534 ppb qui reste au dessous des limites maximum fixés par UE (Yanshen et al, 2011, European Commission, 2006). Une autre étude réalisée au Maroc par Ennouari montre que 9 échantillons parmi 81 échantillons au total (11,1%) sont contaminés par le DON dont les niveaux de contamination vari entre 65 et 1310 ppb (Ennouari et al, 2012).

Les résultats de dosage de fumonisine dans les échantillons, ont révélés que 72,72% des échantillons analysés sont contaminés par la fumonisine dans un intervalle compris entre 4,9 ppb et 489,01 ppb, toutefois, 100 % de ces d'échantillons contaminés présentent un taux de fumonisine inférieur à la norme européenne fixée par la commission européenne



(Règlement (CE) N ° 1881/2006). En effet, des rapports précédents de la Bulgarie et d'autres pays européens décrivent l'occurrence de *Fusarium moniliforme* dans des échantillons de céréales infectées en Bulgarie, ce qui suggère un potentiel de la présence des fumonisines dans les grains de céréales (Radostina et al., 2013).

Trois échantillons de farine (F002, F003 et F004) ont été choisis pour l'étude de l'effet de cuisson (incluant effet de la température et de la fermentation des levures), pour lesquels le dosage au préalable des aflatoxines a été réalisé. En effet, la plupart des mycotoxines sont relativement stables à la chaleur (température comprise entre 80 et 121°C), donc il n'y a pas de destruction se produit dans des conditions normales de cuisson (Milicevic et al., 2010). La stabilité des mycotoxines lors de la transformation des aliments a été examinée dans l'étude de Bullerman et Bianchini (2007). Toutefois, la réduction de la concentration des aflatoxines par la voie fermentaire peut expliquer la diminution de la concentration des aflatoxines dans les produits testés. Une étude de Mokoena indiquant l'effet marquant de la fermentation des bactéries lactiques sur la réduction de façon significative la concentration des deux mycotoxines (fumonisin B1 and zearalenone) dans le maïs. Cependant, une telle réduction ne peut pas modifier de manière significative les effets toxiques possibles de ces toxines (Mokoena, 2005). L'étude de l'effet de la digestion, n'a révélé aucun effet sur la réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de pains, cependant, aucune étude n'a montré de relation entre cet effet et la réduction de la concentration des mycotoxines dans les aliments.



## Conclusion et perspectives

Les principaux objectifs de cette étude étaient à la fois d'évaluer la qualité hygiénique de quelques zones de production au niveau de la ville de Fès. Pour cela un questionnaire a été préparé afin de mettre en évidence le niveau de conformité de ces zones et pour avoir une idée sur la salubrité du pain.

Dans un deuxième temps, nous avons collectés des échantillons auprès de différents points de vente afin d'évaluer la flore fongique des sous produits de céréales. Au même temps, nous avons évalué le niveau de contamination par les mycotoxines. Et finalement, nous avons effectué une étude de quelques paramètres physico-chimiques pouvant avoir un effet sur la réduction de la concentration des aflatoxines.

L'ensemble de cette étude nous a permis de tirer les constatations suivantes :

- La qualité hygiénique de boulangeries visitées au niveau de la région de Fès, dépend de la conformité des cinq programmes d'hygiène, où nous avons constaté la non-conformité des milieux et du matériel utilisé, qui peut être à l'origine d'une contamination des produits finis.
- Une dominance de contamination des échantillons de sous produits de céréales par les espèces *Aspergillus niger* et de *Debaryomyces sp.*
- Une très haute contamination de la plupart des échantillons de sous produits de céréales par les aflatoxines totales, avec des concentrations très élevés qui dépassent les limites fixés par la réglementation européenne.
- Une contamination de ces échantillons, par le déoxynivalénol pour certains échantillons, avec des concentrations au dessous des normes fixés par la réglementation européenne.
- Une contamination de ces échantillons, par les fumonisines, où leurs concentrations restent au dessous des normes fixés par la réglementation européenne.
- L'étude de l'effet de couplé de la cuisson et de la fermentation a révélé un grand pouvoir de réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de farine. Toutefois, l'effet de la digestion n'a pas révélé de grand pouvoir de réduction de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de pains.



En perspectives il serait intéressant d'élargir la gamme des aliments à analyser (produits à base de maïs, produits destinés aux enfants et aux bébés...) et de rechercher d'autres toxines (Zéaralénone, Ochratoxines). Il est également intéressant d'étudier séparément l'effet de la fermentation par les levures sur la réduction de la concentration des mycotoxines dans les produits alimentaire fermentés. Il est également intéressant d'étudier le degré d'exposition de la population marocaine aux mycotoxines en analysant ces toxines dans les produits biologiques en particulier dans le sérum.