

Recherche de mycotoxines dans des denrées alimentaires distribuées au Maroc

Abdelrhafour TANTAOUI-ELARAKI¹✧, Lamyae BENABDELLAH¹,
Mohamed MAJDI², Moulay Rachid ELALAOU² & Abdellatif DAHMANI²

(Reçu le 02/05/1994 ; Accepté le 27/06/1994)

البحث عن بعض السموم الفطرية في مواد غذائية موزعة بالمغرب

في إطار مسح شامل للسوق الغذائية المغربية قصد تحديد مدى تلوث المواد بالسموم الفطرية تتضمن هذه الدراسة التي غطت الفترة 1991-1992 تحليل 336 عينة موزعة كالتالي : 286 من الحبوب و النخالة ، 44 من الزبيب و 6 من الفستق. تم البحث عن الأفلاتوكسينات في جميع العينات، بينما شملت الدراسة التتقيب على الأوكراطوكسين أ و الزيارالينون كذلك في 219 عينة من الحبوب و النخالة و قد تبين أن عينة واحدة من ضمن 50 من الذرى كانت ملوثة بحوالي 18 ug من الأفلاتوكسين ب 1 في الكيلوغرام، و كذلك عينة واحدة من ضمن 6 من الفستق بما قدره 820 ug من مجموع الأفلاتوكسينات ب 1 ، ج 1 ، ب 2 و ج 2، كما أن عينات من ضمن 75 من الشعير كانت تحتوي على كميات ضئيلة من الأوكراطوكسين أ (1,13 إلى 2,83 ug في الكيلوغرام). هذه النتائج تبين مدى سلامة انحبوب، و خصوصا القمح ، و كذلك الزبيب ، من التلوث بالميكروكوكسينات التي شملت هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية : السموم الفطرية - الحبوب - الفستق - الزبيب - المغرب.

Recherche de mycotoxines dans des denrées alimentaires distribuées au Maroc

Dans le cadre d'une campagne de contrôle de la contamination des denrées alimentaires distribuées au Maroc, 336 échantillons ont été analysés durant la période 1991-92. Ces échantillons se répartissaient en 286 de céréales et son, 44 de raisins secs et 6 d'arachides. L'aflatoxine a été recherchée dans tous les échantillons, alors que 219 d'entre eux, tous de céréales et son, étaient également analysés pour la recherche de l'ochratoxine A et de la zéaralénone. Un échantillon de maïs sur 50 analysés s'est révélé contaminé par l'aflatoxine B₁ (18 µg/kg), et un sur 6 d'arachides était fortement pollué (820 µg/kg d'aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂). D'autre part, 3 échantillons d'orge sur 75 contenaient de faibles teneurs en ochratoxine A (1,13 à 2,83 µg/kg). Ces résultats montrent l'innocuité des céréales distribuées au Maroc, notamment le blé, ainsi que des raisins secs, en ce qui concerne la contamination par les mycotoxines recherchées.

Mots clés : Mycotoxines - Céréales - Arachides - Raisins secs - Maroc

Mycotoxins survey in foodstuffs distributed in Morocco

As a part of a broad survey on the contamination of food commodities distributed in Morocco, 336 samples were analysed within 1991-92. These included 286 cereal grains and barn, 44 raisin, and 6 peanut samples. Aflatoxins were looked for in all of the samples, while 219 samples of cereal grains and barn were also investigated for ochratoxin A and zearalenone. One corn sample out of 50 was contaminated with aflatoxin B₁ (18 µg/kg), and one of peanuts out of 6 contained 820 µg/kg of total aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. Also 3 samples of barley out 75 of analysed turned out to be contaminated with small amounts of ochratoxin A (1.13 - 2.83 µg/kg). These results show the innocuity of cereal grains in Morocco, especially wheat, regarding the contamination with the mycotoxins covered by this study.

Key words : Mycotoxins - Cereal grains - Peanuts - Raisins - Morocco

¹ Département de Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P.6202- Instituts, 10 101 Rabat (Maroc)

² Division de la Répression des Fraudes, DPVCTRF, 25, Avenue des Alaouites, Rabat Maroc

✧ Auteur correspondant

INTRODUCTION

La contamination fongique des denrées alimentaires peut causer la dépréciation de leur valeur nutritionnelle ainsi que la détérioration de leurs qualités organoleptiques. S'il s'agit de souches toxigènes de moisissures et si les conditions environnantes sont favorables, il peut y avoir également synthèse et accumulation de mycotoxines.

Les mycotoxines sont un ensemble varié de substances, définies comme étant des métabolites fongiques non antigéniques capables de provoquer des syndrômes spécifiques chez l'homme et/ou les animaux (Jarvis, 1971).

Un certain nombre de travaux scientifiques font mention de la contamination des denrées alimentaires marocaines par des champignons toxigènes. Le premier remonte à 1977 (Tantaoui-Elaraki, 1977) où un grand nombre de produits incluant des céréales, des légumineuses et des épices se sont révélés susceptibles d'héberger des spores d'*Aspergillus* toxigènes. Plus tard, une série de travaux sur les olives a montré leur contamination assez fréquente avec *Aspergillus flavus* et *A. ochraceus* producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines, respectivement (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983b; Gourama *et al.*, 1985), de même qu'avec une multitude d'autres espèces fongiques (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1990) qui se sont avérées, pour une large majorité, capables de produire des métabolites toxiques mis en évidence à l'aide de tests biologiques (Samane *et al.*, 1991). Parallèlement, d'autres investigations mettaient à jour la toxigenèse des deux moisissures les plus fréquentes sur fruits d'agrumes, *Penicillium italicum* et *P. digitatum* (Faid & Tantaoui-Elaraki, 1989; Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1992; Lemrani *et al.*, 1992).

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

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

Malheureusement, on dispose de très peu de données à ce sujet pour notre pays. Pourtant, on signale dès 1945 une intoxication de porcs par une alimentation moisie (Ninard & Hinterman, cités par Lafont 1970) et, beaucoup plus récemment, des dizaines d'équidés ont été emportés dans le Gharb par la stachybotryotoxicose, due aux mycotoxines produites sur la paille par *Stachybotrys atra* (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994). Les seules données relatives à la recherche de mycotoxines dans les aliments à notre connaissance se résument en la contamination d'un échantillon de farine de blé par l'ochratoxine A sur 70 analysés (Le Tutour *et al.*, 1983a), de 3 échantillons d'huile d'olive vierge par l'ochratoxine A sur 60 analysés (Le Tutour *et al.*, 1983b), et de 12 échantillons d'olives noires "façon Grèce" par l'aflatoxine B₁ et de 5 par l'ochratoxine A, sur 103 analysés (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983b).

Devant cette situation, la Direction de la Protection des Végétaux, des Contrôles Techniques et de la Répression des Fraudes (DPVCTRF) d'une part, et l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAV) d'autre part, ont lancé une série d'analyses visant à estimer l'état de la contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines au Maroc.

L'objet de cet article est de présenter les résultats de la campagne 1991-92, qui concernait en particulier la recherche des aflatoxines dans les céréales. Cependant, des échantillons de raisins secs et d'arachides y ont été ajoutés d'une part, et deux autres mycotoxines, l'ochratoxine A et la zéaralénone ont été également recherchées dans la plupart des échantillons de céréales, d'autre part.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Échantillonnage

Les prélèvements étaient effectués au hasard dans les différentes régions du pays par les agents de la Division de la Répression des Fraudes (DPVCTRF), sur des lots de produits proposés à la vente au public. Le tableau 1 donne la répartition des produits analysés.

2. Extraction et purification des extraits

• Céréales et dérivés

L'analyse portait sur 50 g de produit. Les échantillons de grains de blé, d'orge et de maïs étaient broyés, ceux de son étaient extraits directement.

Tableau 1. Nature et effectif des échantillons analysés

Nature	Effectif
Céréales et dérivés	286
* Blé	107
* Orge	75
* Son de blé	54
* Maïs	50
Raisins secs	44
Arachides	6
Total	336

La procédure, empruntée à Le Tutour *et al.* (1983a), permettait l'extraction simultanée des aflatoxines, de l'ochratoxine A et de la zéaralénone. Elle comportait:

- une extraction par un mélange méthanol-eau (8/2; v/v);
- une purification de l'extrait par une solution de défécation (150 g de sulfate de zinc et 50 g d'acide phosphotungstique pour 1 l d'eau distillée) et une filtration;
- une extraction à l'aide de chloroforme et une concentration à un volume de 0,5 ml.

• Arachides

La technique utilisée était celle préconisée par Boutibonnes *et al.* (1969). 20 g d'échantillon étaient broyés et délipidés deux fois avec 100 ml d'hexane. Une 3ème délipidation était effectuée à l'éther éthylique. Le produit dégraissé était séché à l'étuve (50°C/10 min) ou à l'air ambiant pendant 24 h. L'extraction chloroformique était réalisée par un mélange eau-chloroforme. Après agitation et filtration, l'extrait était concentré à 0,5ml.

• Raisins secs

30 g de produit étaient mélangés à 40 ml de chloroforme. Après agitation et filtration, l'extrait était concentré à 0,5 ml

3. Détection, confirmation et dosage de l'aflatoxine

Pour mettre en évidence la présence des aflatoxines on a utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) recouvertes de gel de silice

G60 de 0,25 mm d'épaisseur. De chaque extrait un volume de 5 µl était chromatographié parallèlement à un volume égal d'une solution chloroformique d'aflatoxine B₁ pure. La plaque était développée dans le système de solvants chloroforme-acétone (90/10; v/v) puis observée sous le rayonnement UV ($\lambda = 365$ nm). L'aflatoxine B₁ était confirmée par ajout, sur une tache de 5 µl de l'extrait suspect, de 1 µl d'acide trifluoroacétique (TFA) à 99% pur (Janssen Chimica). L'aflatoxine B₁ en présence du TFA se transforme en aflatoxine B_{2a} ayant un R_f 4 fois moindre que celui du standard d'aflatoxine B₁.

La détermination semi-quantitative de l'aflatoxine B₁ était réalisée en déposant sur une plaque de CCM des volumes décroissants de l'extrait contaminé (10 µl ; 8 µl ; ... ; 0,5 µl).

Après élution du chromatogramme et observation sous rayonnement UV, on notait le volume du dépôt avant extinction de la fluorescence de l'aflatoxine B₁ et on déduisait la quantité approximative de l'aflatoxine connaissant la quantité minimale détectable (1,5 ng dans notre cas) et le volume de l'extrait.

4. Détection, confirmation et dosage de l'ochratoxine A et de la zéaralénone

Cette analyse a porté sur 219 échantillons de céréales. Les extraits obtenus pour la recherche de l'aflatoxine B₁ étaient utilisés également pour la recherche de l'ochratoxine A et de la zéaralénone.

Sur 2 plaques de CCM, on déposait 5 µl de chaque extrait. Les 2 plaques étaient développées dans le système d'élution toluène-acétate d'éthyl-acide formique (6/3/1; v/v/v). L'une d'elles était observée sous rayonnement UV pour la détection de l'ochratoxine A dont la confirmation consiste en l'exposition du chromatogramme à la vapeur de NH₃. Dans ce cas, la fluorescence bleu-vert devient bleu brillant (Le Tutour *et al.*, 1983a). L'autre plaque était visualisée à l'œil nu après pulvérisation de la benzidine diazotée; la zéaralénone éventuellement présente émet une fluorescence rouge brique (Le Tutour *et al.*, 1983a).

Pour la quantification de l'ochratoxine A, on a utilisé la méthode du dosage semi-quantitatif de l'aflatoxine B₁ avec une limite détectable de 0,85 ng. La zéaralénone n'ayant pas été détectée, aucune quantification n'était nécessaire.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Seule la recherche des aflatoxines était prévue par la convention DPVCTRF-IAV Hassan II. Cependant, étant donnée la contamination possible des céréales par la zéaralénone (Bennett & Shotwell, 1979) et l'ochratoxine A (Shotwell *et al.*, 1971), on a étendu l'analyse à ces deux mycotoxines pour 219 échantillons de ces produits.

Les résultats rassemblés aux tableaux 2 et 3 montrent d'abord la très faible fréquence de contamination des denrées étudiées. Seulement 2 échantillons sur 286 analysés contenaient des quantités détectables d'aflatoxines (Tableau 2). Egalement seuls 3 échantillons sur 219 étaient contaminés par l'ochratoxine A, alors qu'aucun ne présentait une teneur décelable en zéaralénone (Tableau 3).

Tableau 2. Fréquence de contamination des produits analysés par les aflatoxines

Nature des produits	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons contaminés
Blé	107	0
Orge	75	0
Maïs	50	1
Son de blé	54	0
Raisins secs	44	0
Arachides	6	1
Total	286	2

Tableau 3. Fréquence de contamination de 219 échantillons de céréales par l'ochratoxine A et la zéaralénone

Nature des produits	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons contaminés	
		Ochratoxine A	Zéaralénone
Blé	87	0	0
Orge	75	3	0
Maïs	43	0	0
Son de blé	14	0	0
Total	219	3	0

Ces résultats sont particulièrement rassurants pour le blé, denrée de base de l'alimentation du pays, où aucune contamination n'était décelée. L'absence des 3 mycotoxines recherchées dans le son de blé, bien que l'ochratoxine A et la zéaralénone n'ont été recherchées que dans 14

échantillons, vient confirmer cette impression que le blé est peu susceptible à la contamination par les mycotoxines, notamment dans nos conditions souvent chaudes et sèches, même si on a signalé dans un travail antérieur la contamination d'un échantillon de farine de blé par l'ochratoxine A (Le Tutour *et al.*, 1983a).

En revanche, et malgré la fréquence relativement faible de leur contamination, le maïs et l'orge attirent l'attention.

Alors que sur 43 échantillons de maïs, on n'a pu détecter ni de l'ochratoxine A, ni de la zéaralénone, un échantillon sur 50 contenait de l'aflatoxine B₁ à raison de 18 µg/kg. Le maïs est réputé très susceptible à la contamination par les mycotoxines, notamment les aflatoxines (Bullerman, 1979 ; Jemmali, 1980 ; Anderson, 1983), la zéaralénone (Harwing & Munro, 1975 ; Jemmali, 1980 ; Mirocha & Christensen, 1982) et les fumonisines (Thiel *et al.*, 1992).

La faible fréquence de contamination constatée au Maroc peut s'expliquer par le climat sec qui sévit au moment de la récolte pour les productions nationales, et au cours du stockage pour les lots importés comme pour ceux produits localement.

Aucun des échantillons d'orge analysés ne révélait la présence d'aflatoxines ou de zéaralénone. En revanche, sur les 75 étudiés, 3 contenaient des traces d'ochratoxine A allant de 1,13 à 2,83 µg/kg. Cette fréquence, proche de 4%, mérite d'être soulignée, d'autant plus que cette mycotoxine a souvent été signalée dans cette céréale (Bullerman, 1979 ; Jemmali, 1980 ; Mirocha & Christensen, 1982).

Le maïs et l'orge sont destinés aussi bien à l'alimentation de l'homme qu'à celle des animaux, et même des taux de contamination aussi faibles laissent craindre des intoxications chroniques si le consommateur y est soumis sur une longue période de temps. Rappelons que les aflatoxines sont essentiellement des toxines hépatocancérogènes alors que l'ochratoxine A est plutôt une néphrotoxine (Bullerman, 1979).

Les 44 échantillons de raisins secs étudiés ne contenaient pas de quantités détectables d'aflatoxines. L'analyse des raisins secs a été incluse dans ce programme suite à une forte suspicion dont faisaient l'objet, de la part de producteurs nationaux, les lots importés. Si elle

n'est pas impossible, la contamination de fruits sucrés séchés tels que les raisins secs, figues sèches et pruneaux par les aflatoxines reste rare (Bullerman, 1979), notamment du fait de leur activité de l'eau trop basse pour permettre la croissance et la toxigenèse des moisissures. Pour la figue sèche, on a montré que c'est seulement au cours du processus de séchage que le produit passe par des valeurs d'activité de l'eau propices à la contamination (Le Bars, communication personnelle). Bien entendu, si cette contamination survient, les toxines accumulées persistent jusqu'à la consommation, même si l'activité de l'eau baisse au-dessous du minimum requis pour la toxigenèse.

Seulement 6 échantillons d'arachides étaient couverts par cette recherche. Un d'entre eux s'est révélé fortement contaminé. Il contenait 820 µg/kg d'aflatoxines totales, réparties comme suit: 250 d'aflatoxine B₁, 160 d'aflatoxine B₂, 250 d'aflatoxine G₁ et 160 d'aflatoxine G₂.

L'arachide est connue comme le substrat de prédilection des *Aspergillus* du groupe *flavus* producteurs d'aflatoxines (Moreau, 1977). Si ce produit est destiné à l'alimentation humaine, il représente manifestement une menace directe pour le consommateur. S'il est destiné à la trituration pour la production d'huile, c'est dans les tourteaux que se concentrent les aflatoxines (Lafont & Lafont, 1970). Les tourteaux étant utilisés dans l'alimentation des animaux, la conséquence prévisible de cette contamination est le passage dans les produits d'origine animale, notamment le lait, de quantités non négligeables de ces toxines (Applebaum *et al.*, 1982).

CONCLUSION

Bien que la fréquence et les taux de contamination des aliments analysés soient faibles, les résultats notés devraient susciter davantage de vigilance et encourager la poursuite de ce travail, d'autant plus que le prélèvement des échantillons était fait au hasard, sans sélection aucune des lots à contrôler en fonction d'une quelconque suspicion.

Si les raisins secs ne semblent pas devoir poser de problème, les arachides, elles, devraient retenir plus l'attention puisque sur seulement 6 échantillons, un était contaminé, et très fortement.

D'autre part, les céréales analysées se sont révélées peu touchées, notamment le blé. Néanmoins, même

si les grains entiers sont relativement peu susceptibles à l'invasion par les moisissures et la synthèse des mycotoxines, il n'en est pas forcément de même des produits dérivés tels que les farines, les semoules et les pâtes alimentaires.

Cette première campagne devrait donc être poursuivie pour contribuer davantage à combler les vastes lacunes qui persistent dans ce domaine.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Anderson R.A. (1983) Detoxification of aflatoxin contaminated corn in Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Eds Urban L. Diener, Richard L. Asquith & J.W. Dickens. *Proc. Symp. held in Atlanta, Ga., Jan. 26-27, 1982, South. Coop. Ser. Bull.* 279 : 87-90
- Applebaum R.S., Brackett R.E., Wiseman D.W. & Marth E.H. (1982) Aflatoxin, toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk Products. *A. Review. J. of Food Prot.* 45 : 752 777
- Bennett G.A. & Shotwell O.L. (1979) Zearalenone in cereal grains. *J.A.O.C.S.* 56 : 812-819
- Boutibonnes P., Jacquet J. & Teherani A. (1969) Chromatographie rapide en couche mince des flavotoxines dans les aliments. *Bull. Acad. Vét.* 42 : 825-833
- Bullerman L.B. (1979) Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health. *J. Food Prot.* 42 : 65-86
- Faid M. & Tantaoui-Elaraki A. (1989) Production of toxic metabolites by *Penicillium italicum* and *P. digitatum* isolated from citrus fruits. *J. Food Prot.* 52(3) : 194-197
- Gourama H., Tantaoui-Elaraki A. & Fares M. (1985) Toxinogenèse et activité lipolytique de souches d'*Aspergillus flavus* et d'*A. ochraceus* isolées des olives. *Actes Inst. Agron. Vét. (Maroc)* 5 (1&2): 51-57
- Harwing J. & Monro I.C. (1975). Mycotoxins of possible importance in diseases of Canadian farm animals. *Can. Vet. J.* 16: 125
- Jarvis B. (1971). Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bact.* 34 : 199-213
- Jemmali M. (1980). Méthodes d'analyses des mycotoxines dans les produits alimentaires. *Oléagineux* 35 : 357-364
- Lafont P. (1970) Mycotoxines et alimentation. *Cah. Nut. Diét.* 5 : 41

- Lafont P. & Lafont J. (1970) Contamination de produits céréaliers et d'aliments du bétail par l'aflatoxine. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **8** : 403-408
- Lemrani M., Tantaoui-Elaraki A. & Samih M. (1992) Toxicity of *Penicillium digitatum* (Pers ex Fr.) Sacch. and *P.italicum* Wehmer culture filtrates to the chick embryo. *Microbiol. Alim. Nutr.* **10** : 407-414
- Le tutour B., Tantaoui-Elaraki A. & Bullerman A. (1983a) Recherche de l'aflatoxine B₁, de l'ochratoxine A et de la zéaralénone dans les farines de blé. *Actes Inst. Agron. Vét. (Maroc)* **3** : 65-69
- Le tutour B., Tantaoui-Elaraki A. & Ihlal L. (1983b) Simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in olive oil. *J.A.O.C.S.* **60** : 835-837
- Mirocha C.J. & Christensen C.M. (1982) Mycotoxins in Storage of cereal grains and their products, C.M. Christensen, Ed. Third Ed. American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, Minnesota. USA. pp.241-271
- Samane S., Tantaoui-Elaraki A. & Essadaoui M. (1991) Mycoflora of Moroccan "Greek style" black olives. II Toxigenesis. *Microbiol. Alim. Nutr.* **9** : 335-352
- Shotwell O.L., Hesseltene C.W., Vandegrift E.E. & Goulden M.L. (1971) Survey of corn from different regions for aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Cereal Science Today* **16**(9) : 266-273
- Tantaoui-Elaraki A. (1977) Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* du Maroc. *Hommes Terre et Eaux* **6** (24) : 79-86
- Tantaoui-Elaraki A., Lemrani M. & Taousse R. (1992) Inhibition of the garden cress seed germination by *Penicillium italicum* Wehmer and *P. digitatum* (Pers Ex Fr.) Sacch. culture filtrates. *Lebenswiss. u. Technol.* **25** : 353-356
- Tantaoui-Elaraki A., Letutour B., Bousid M. & Keddani M.J. (1983) Contamination des olives noires "façon Grèce" par les spores d'*Aspergillus* toxigènes et leurs toxines. *Ind. Alim. Agric.* **100** : 997-1000
- Tantaoui-Elaraki A., Mekouar S.L., El Hamidi M. & Senhaji M. (1994) Toxinogenic strains of *Stachybotrys atra* associated with poisonous straw in Morocco. *Vet. Hum. Toxicol.* **32** : 93-96
- Tantaoui-Elaraki A., Samane S. & Roquebert M.F. (1990) Mycoflora of Moroccan "Green Style" black olives. I-Inventory. *Microbiol. Alim. Nutr.* **8** : 257-264
- Thiel P.G., Marasas N.F.O., Shephard G.S. & Sydenham E.W. (1992) Exposure of Humans and animals to fumonisins, carcinogenic metabolites of *Fusarium moniliforme*. Abstract. *VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Mexico-city Mexico. November 6-13, 1992*