

Chapitre4 : Les résidus de mycotoxines dans les aliments

1-Introduction

Du grec mycos (champignon) et du latin toxinum (poison), le terme mycotoxine désigne des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Plus de 2500 mycotoxines ont été répertoriées, mais seules une trentaine possèdent des propriétés toxiques réellement préoccupantes pour l'homme ou l'animal.

2-Définition

Les mycotoxines font parties des contaminants naturels de l'alimentation, par opposition aux molécules apportées intentionnellement ou accidentellement par l'homme telles que les additifs alimentaire et les résidus de produits phytosanitaires. On peut les trouver sur de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales mais aussi les fruits, ainsi que des aliments composés ou manufacturés issus de ces produits et destinés à l'alimentation. Elles peuvent également être retrouvées dans le lait, les œufs, les viandes ou les abats, si les animaux ont été exposés à une alimentation contaminée par des mycotoxines.

Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, difficilement dégradables par les organismes vivants et très stables à l'acidité et à la chaleur. Les mycotoxines sont particulièrement résistantes à la chaleur, ce qui les rend d'autant plus dangereuse pour le consommateur puisqu'on peut les retrouver dans les aliments après cuisson ou même stérilisation.

il y a six familles de mycotoxines qui, si elles sont présentes dans l'alimentation à des doses suffisantes, peuvent faire courir des risques aux consommateurs.

Ce sont :les aflatoxines,les ochratoxines,les fumonisines,les trichothécènes,la patuline et la zéaralénone

3-Production

Parmi les milliers d'espèces de moisissures qui peuvent être présentes sur ou dans les produits alimentaires, seulement 3 à 400 sont capables de produire des mycotoxines.La production des mycotoxines est influencée par la souche de moisissure, les conditions ambiantes et le substrat. Certaines souches produisent peu ou pas du tout de mycotoxines et d'autres en

fabriquent beaucoup. Une atmosphère humide et chaude favorise leur sécrétion. Les denrées élevées en glucides représentent un milieu plus propice à la production de mycotoxines que celles riches en protéines. Parmi les denrées alimentaires "à risque" on retiendra particulièrement les céréales et tous les produits dérivés.

Les différentes mycotoxines sont classées quant à leurs risques de cancérogénicité pour l'homme conformément aux procédures adoptées et aux pratiques en vigueur au CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) :

4-Classification

4-1-Les aflatoxines

Les aflatoxines (AF) sont des mycotoxines produites principalement par trois espèces d'*Aspergillus* : *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. *Aspergillus parasiticus* concerne principalement la culture d'arachide et *Aspergillus nomius* est prédominant sur le blé et le coton.

Les aflatoxines nécessitent un climat chaud et humide pour être produites. Ce problème concerne donc principalement les pays tropicaux et sub-tropicaux. Une vingtaine d'aflatoxines sont connues, les quatre principales sont les aflatoxines B1, B2, G1 et G2.

L'aflatoxine B1 donne un métabolite, l'aflatoxine M1 (dérivé hydroxylé de l'AFB1) excrété dans le lait lorsque les vaches laitières sont nourries avec aliments contaminés par l'aflatoxine B1.

L'AFB1 est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2.

Les aflatoxines sont : Carcinogènes, Hépatotoxiques, Immunotoxiques et Tératogènes.

L'AFB1 et le mélange des aflatoxines sont reconnus cancérigènes pour l'Homme (groupe 1 du CIRC), et l'AFM1 est reconnue comme cancérigène chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'Homme (groupe 2B du CIRC).

Les teneurs maximales admises varient, suivant la mycotoxine et l'aliment considéré.

La commission européenne a limité la teneur en aflatoxines totales (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) à 4 µg/kg, l'AFB1 seule à 2 µg/kg dans les noix, les fruits secs,

les céréales prêtes à la vente, et l'AFM1 à 0.05 µg/kg dans le lait. Pour les produits qui doivent subir un procédé industriel, la limite légale établie correspond à 8 µg/kg et à 15 µg/kg respectivement d'AFB1 et des aflatoxines totales.

Aux USA, les teneurs admissibles sont 5 fois plus grandes que celle établies en Europe.

Le métabolisme de l'AFB1 libère l'AFM1 dans le lait des mammifères. Leur pouvoir cancérigène puissant et leur présence dans l'alimentation pour bébés ont contribué à instaurer des limites très strictes (50 ng.L-1).

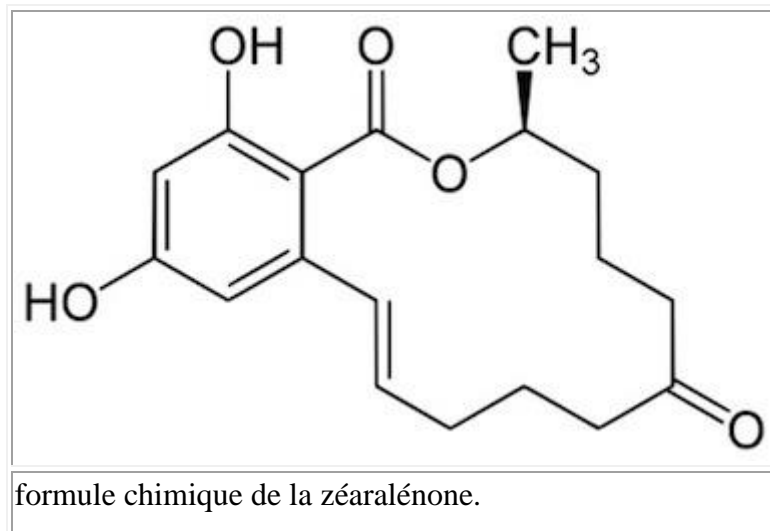
Denrées à haut risque de contamination : Maïs, cacahuète, noix du Brésil, pistache, coprah et graine de coton.

Denrées à risque : Figue, noix de Pécan, amandes, noix, épices.

Denrées à risque mineur : Soja, haricots, sorgho, blé, orge, millet, plantes légumineuses, manioc, riz et avoine.

4-2-La zéaralénone

La zéaralénone (ZEA) ou toxine F-2 est produite par certaines espèces du genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum* et *F. culmorum*. La production de ZEA est favorisée par de basses températures et une forte concentration en oxygène (*F. graminearum* ne peut pas produire de ZEA dans des conditions d'ensilage en anaérobiose). La zéaralénone est dite "mycotoxine œstrogène" du fait de sa structure et de ses effets.



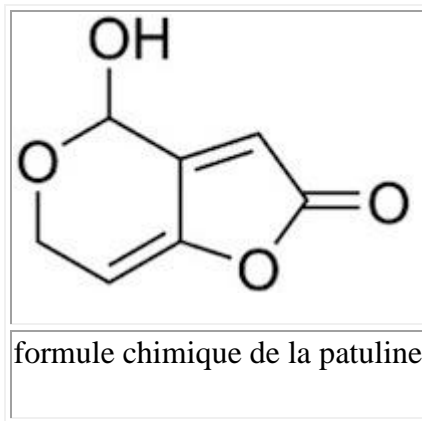
La zéaralénone est :

- Oestrogénique
- Classée groupe 3 par le CIRC.

Une dose journalière tolérable égale à 0,2 micro g/kg-pc /j a été fixé par la JECFA et le Comité scientifique de l'alimentation humaine. (kg-pc : kilogramme de poids corporel). Cette mycotoxine a été détectée comme contaminant naturel du maïs, de l'orge, du blé et du sorgho, mais aussi de l'avoine, du foin, du riz, de la noix et du tabac. Des résidus de ZEA peuvent être retrouvés dans des tissus ou organes d'animaux nourris avec des aliments contaminés. De même, des résidus de métabolites de la ZEA, surtout la zéaralénol et ses dérivés, peuvent être retrouvés dans le lait d'animaux nourris par des aliments contaminés.

4-3-La patuline

La patuline est produite par de nombreux champignons appartenant principalement aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Cette toxine est principalement trouvée sur pomme, après une contamination par *P. expansum*. Le développement de ce champignon, et donc la production de patuline, est favorisé lorsque la surface du fruit a été endommagée par un insecte ou des manipulations.



La patuline est :

- Neurotoxique
- Tératogène et embryotoxique
- Immunotoxique
- Classée dans le groupe 3 par le CIRC.

Une dose journalière tolérable égale à 0,4 µg/kg-pc /j a été fixé par la JECFA et le Comité scientifique de l'alimentation humaine. (kg-pc : kg de poids corporel)

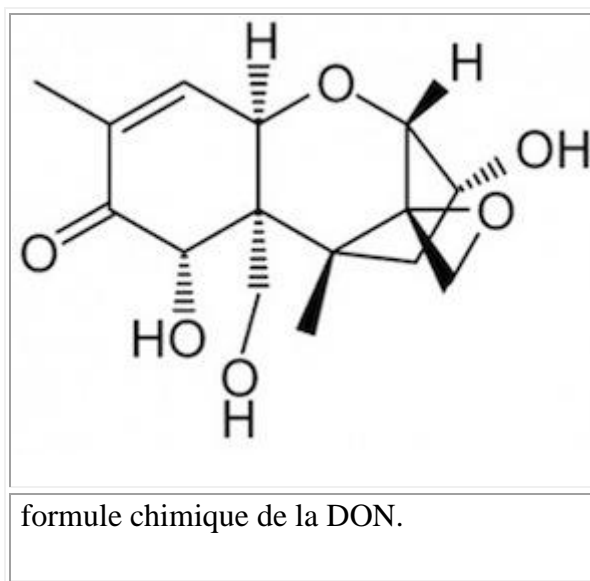
Les denrées à haut risque de contamination sont le jus de pomme, la compote de pomme et le cidre. La contamination du jus de pomme peut être spectaculaire. Dans un jus préparé à partir de pommes partiellement pourries, il a été retrouvé plus de 8 g/L. Il faut donc contrôler efficacement les lots utilisés pour la préparation de jus de pommes et de compote de pommes d'autant plus que cette mycotoxine est thermostable en condition acide. Cependant, la fermentation alcoolique détruit la patuline, c'est pourquoi les produits tels que le cidre et le poiré n'en contiennent pas. Très occasionnellement, de la patuline a été retrouvée de façon anecdotique sur d'autres denrées : bananes, ananas, raisins, pêches, abricots...

4-4-Les trichothécènes

Les trichothécènes regroupent plus de 160 mycotoxines, produites surtout par des *Fusarium* : *F. graminearum* et *F. culmorum*. Les trichothécènes les plus fréquentes sont : DON (désynivalénol), T-2, HT-2, DAS (diacétoxyscirpénol) et NIV (nivalénol). Le DON est la moins toxique, la plus toxique étant la T-2.

Le DON est la trichothécène la plus répandue, il se forme presque toujours sur les plants avant la récolte. Sa formation dépend étroitement des conditions climatiques, et va donc varier d'une région à l'autre, voire d'une année à l'autre.

La toxine T-2, produite sur les céréales dans de nombreuses parties du monde, est particulièrement associée à une période prolongée d'humidité pendant la moisson. Elle est probablement à l'origine de l'aleucie toxique alimentaire, maladie qui a touché des milliers de personnes en Sibérie pendant la Seconde guerre mondiale.



Les trichothécènes sont :

- Immunotoxiques
- Hématotoxiques
- Tératogènes
- Classées dans le groupe 3 par le CIRC.

Des doses journalières tolérables égales à :

- 1.10^{-6} g/kg-pc /j pour la DON et $0,06.10^{-6}$ g/kg-pc /j pour la T-2 et la HT-2 ont été fixé par la JECFA et le Comité scientifique de l'alimentation humaine.

L'effet le plus significatif de la toxine T-2 (ainsi que d'autres trichothécènes) est son effet immunosuppresseur. Quelques résultats expérimentaux permettent de penser que la toxine T-2

peut être cancérogène chez l'animal. Les syndromes émétiques et le refus de nourriture provoqués chez le bétail par la présence de DON dans les aliments ont conduit à donner à cette mycotoxine le nom de toxine émétique.

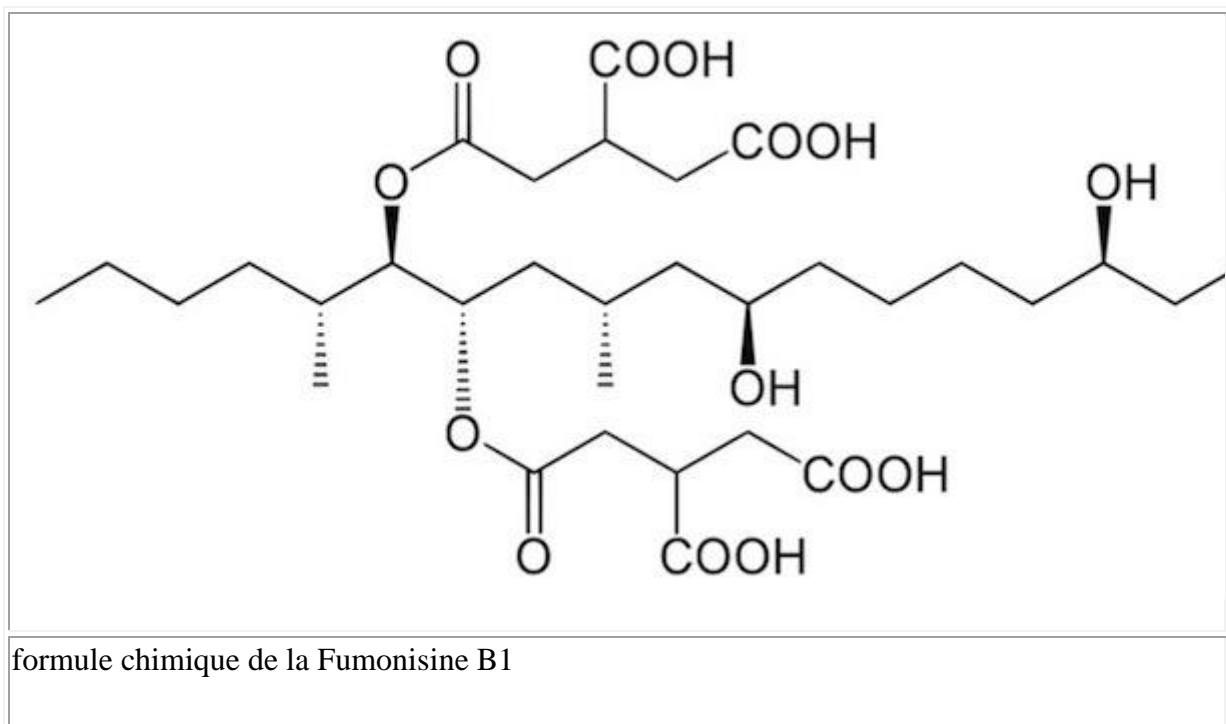
Les denrées à haut risque de contamination sont les céréales telles que le blé, le maïs, l'orge et l'avoine. On les retrouve également sur le riz, le seigle et le sorgho. Les trichothécènes sont thermostables, on peut donc les retrouver dans des produits dérivés comme le pain, la farine, les pâtes, ..., et même la bière.

4-5- Les fumonisines

Il s'agit d'un groupe d'une quinzaine de mycotoxines qui apparaissent fréquemment sur le maïs, souvent en même temps que d'autres types de mycotoxines. Elles n'ont été identifiées que tardivement, en 1988, bien que leurs effets, sur les chevaux notamment, soient connus depuis plus de 150 ans. La structure chimique et le caractère hydrosoluble des fumonisines les différencient nettement des autres mycotoxines. Ce qui explique que les Fumonisines ne pouvaient pas être prises en compte par les procédés d'extraction et les détecteurs habituels.

Les fumonisines sont produites principalement par *Fusarium verticillioides* et *F. proliferatum*, isolées sur maïs mais également sur d'autres substrats comme le sorgho et le millet. La contamination des céréales est le reflet d'une prolifération fongique sur les récoltes à une saison particulière, infection influencée par l'origine, l'humidité et les dommages dus aux insectes.

Les fumonisines les plus largement répandues sont la fumonisine B1 et B2 (FB1 et FB2).



Les fumonisines sont :

- Immunotoxiques
- Tératogènes et embryotoxiques
- Cancérogène (Groupe 2B d'après la classification CIRC)

A poids équivalent, les fumonisines sont bien moins toxiques que les aflatoxines par exemple, mais elles sont souvent présentes en quantité bien plus élevée. Une dose journalière tolérable égale à 2 micro g/kg-pc /j a été fixée par la JECFA et le Comité scientifique de l'alimentation humaine en 2001.
(kg-pc : kilogramme de poids corporel)

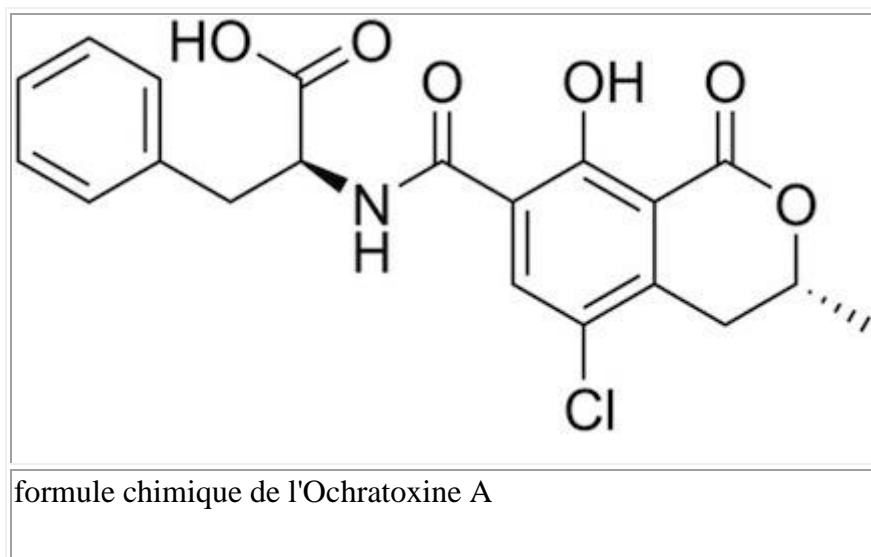
Les denrées à haut risque de contamination sont le maïs et ses produits dérivés: farine de maïs, polenta, semoule de maïs, corn flakes. Les autres denrées potentiellement contaminées sont le riz, les épices, le sorgho et la bière mais à des niveaux peu élevés.

4-6- Les ochratoxines

La principale ochratoxine est l'ochratoxine A (OTA), on la trouve dans certaines régions tempérées (Europe Occidentale, Canada, certaines zones d'Amérique du Sud) où elle est produite par le *Penicillium verrucosum*, moisissure qui se développe fréquemment au cours

du stockage des céréales. On la rencontre également dans les régions tropicales où elle est produite par une autre espèce de champignon, l'*Aspergillus ochraceus*. Ces deux espèces sont communes sur le maïs et dans les fourrages secs.

Le café vert peut également être contaminé par l'OTA, ce qui représente un danger potentiel de santé publique. Les principales espèces productrices d'OTA dans le café sont l'*A. ochraceus* et les souches apparentées (environ 80% des souches isolées produisent spontanément de l'OTA) ; dans le café l'OTA se développe surtout durant les opérations après récolte.



L'ochratoxine A (OTA) est :

- Néphrotoxique
- Immunotoxique et myélotoxique
- Neurotoxique
- Cancérogène (Groupe 2B dans la classification CIRC)

Cette toxine touche surtout les reins et peut provoquer des lésions aiguës et chroniques; elle a été rattachée à la néphropathie endémique balkanique, maladie rénale mortelle que l'on rencontre souvent, mais pas exclusivement, dans plusieurs vallées des Balkans.

Une dose hebdomadaire tolérable égale à 0,1 micro g/kg-pc /semaine a été fixé par la JECFA et le Comité scientifique de l'alimentation humaine en 2000 et 2001.

Les denrées à haut risque de contamination sont les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine, riz, ...), ainsi que le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs. Cette mycotoxine peut être présente dans les produits dérivés des céréales, comme la farine, le pain et les pâtes. On peut également en trouver sur le raisin. L'ochratoxine A est aussi retrouvée dans les abats et les viandes d'animaux nourris avec des aliments contaminés.

La présence d'OTA dans le café vert a été signalée depuis les années 70. Des études montrent que la torréfaction détruit de 30 à 90 pour cent et plus d'OTA dans le café vert, et que l'OTA résiduelle dans le café torréfié peut être facilement extraite dans une solution aqueuse.

5-Méthodes de recherche et de dosage des mycotoxines dans les aliments

5-1Principe

Le principe de la détermination des mycotoxines est basé sur leur extraction des aliments par des solvants organiques convenables et leur purification sur une colonne d'immuno-affinité.

Les colonnes d'immuno-affinité contiennent chacune un anticorps très spécifique pour chaque mycotoxine recherchée et la purification de la mycotoxine dépend de son affinité à l'anticorps en question. Il est important de noter que l'anticorps peut être dénaturé par une température élevée et des changements de pH.

Le tampon doit être toujours au dessus du gel et la colonne doit être conservée entre 2 et 8°C. L'élution de la toxine est effectuée par un éluant (solvant organique) dénaturant la liaison anticorps-antigène. L'identification et la quantification de la toxine dans

l'éluat se fait finalement par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) couplé à un fluorimètre.

l'analyse des mycotoxines dans les denrées alimentaires doit être ciblée par les investigateurs vu l'écologie des moisissures qui diffère d'une moisissure à une autre et la nature chimique propre de chaque aliment, ainsi selon ces recommandations nous avons procédé aux analyses suivantes :

- Détermination des aflatoxines dans le blé.
- Détermination de l'OTA dans les fruits secs et les olives noires de table.

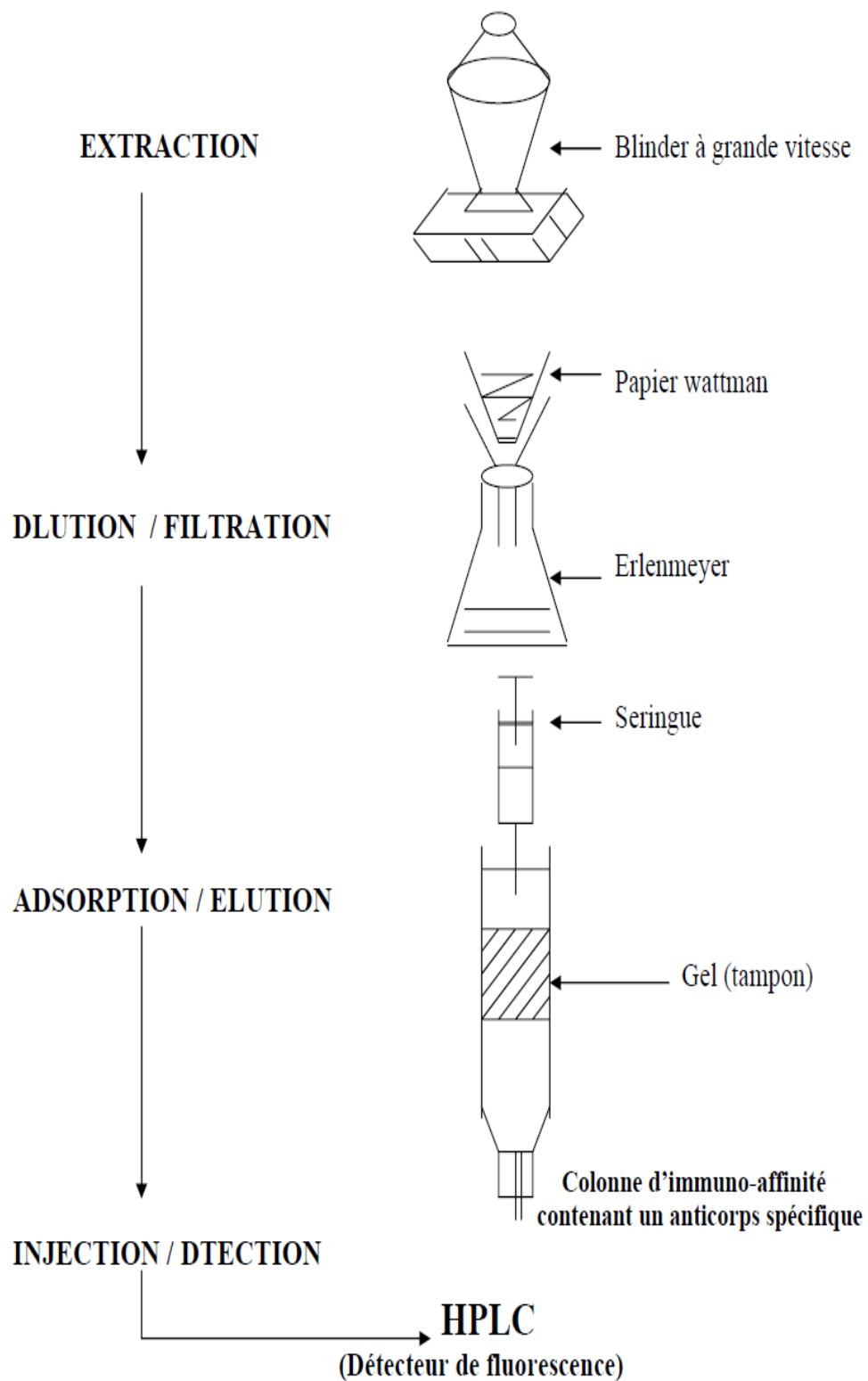


Schéma : les principales étapes utilisées pour l'analyse des mycotoxines par HPLC.

5-2- Analyse des aflatoxines dans le blé

Les échantillons ont été analysés en utilisant une méthode décrite par Roch *et al.* (1994). 50g d'échantillon ont été extraits par 250 ml du mélange acétone: eau (85:15 v/v) en utilisant un blinder à grande vitesse pendant 3 minutes.

Après filtration sur papier wattman n°4, 5 ml du filtrat sont dilués par 95 ml d'une solution de tampon phosphate (PBS, pH 7.3).

Une colonne d'immuno-affinité contenant un anticorps spécifique des aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2) est conditionnée par 10 ml du tampon PBS. 50 ml du filtrat dilué ont été appliqués à la colonne à un flux de 3 ml.min⁻¹, la colonne a été lavée par 20 ml d'eau bidistillée et l'air dans la colonne a été éliminé par une seringue jusqu'au sec.

Les aflatoxines ont été éluées par application en premier de 500 µl du méthanol. Ensuite, 1250 µl du méthanol ont été appliqués à la colonne et collectés par pression de l'air à travers la colonne. Après élution, l'éluât a été dilué avec 3250 µl d'eau bidistillée et mélangé au vortex. 100 µl de l'éluât dilué a été injecté à un HPLC.

La dérivation post-colonne a été effectuée avec la pyridine hydrobromide perbromide (PBPB) à 0.005 % dans l'eau bidistillée à un flux de 0.4 ml.min⁻¹.

La colonne C18 Phenomenex (250 x 4.6 mm, 5µm) a été utilisée. La phase mobile utilisée était le mélange acétonitrile-eau-méthanol (17:54:29, v/v/v) à un flux de 1 ml.min⁻¹. Le fluorimètre a été opéré à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 365 nm et 435 nm. Le temps de rétention de l'AFB1 a été 7,8 min.

5-3- Détermination de l'OTA dans les olives noires de table

5-3-1- Extraction

10 g d'un échantillon broyé ont été extraits par une solution contenant 50 ml de chloroforme et 10 ml d'acide chlorhydrique à 0,1M pendant 1h dans un shaker.

L'extrait a été filtré et le chloroforme évaporé avec un rotavapeur. La phase aqueuse a été dégraissée par le n-hexane qui va être éliminé par la suite.

La phase aqueuse I^{aire} a été alcalinisée avec 10 ml du carbonate de sodium (NaHCO₃, 0,1N) et extraite une 2^{ème} fois avec 50 ml de chloroforme pendant 20 min.

le chloroforme est ensuite éliminé et la phase aqueuse II^{aire} acidifiée avec l'HCl (0,1M) est extraite une 3^{ème} fois avec 50 ml de chloroforme pendant 20 min. Le chloroforme a été évaporé à sec à l'aide d'un rotavapeur. Le résidu sec obtenu est dissous dans 1 ml de la phase mobile.

5-3-2- Conditions chromatographiques

Le système HPLC consiste en une pompe, un autoinjecteur, un moniteur de fluorescence et un logiciel (PIC3®, ICS). La colonne Spherisorb ODS 1 (250 x 4.6mm x 10 µm) a été utilisée. La phase mobile dégazée et filtrée à travers un filtre Millipore (0.45µm) consiste en 48% d'acétonitrile et 52% d'acétate de sodium –acide acétique 4mM (19/1: v/v). Le débit a été fixé à 1 ml/min. Le détecteur de fluorescence a été manipulé à des longueurs d'excitation et d'émission respectivement de l'ordre de 330 nm et 470 nm.

5-3-3- Confirmation de l'OTA

0,5 ml de l'extrait final ont été évaporés au sec et additionnés de 0,4 ml d'un tampon Tris (0,04 M), NaCl (1M) ajusté à pH 7,5. A cette solution, on ajoute 100 µl de l'enzyme carboxypeptidase et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 3 heures. 50 µl de cette solution ont été analysés par HPLC sous les conditions chromatographiques citées en haut.