transferts

LES MYCOTOXINES

Etat des connaissances, réglementation

Sabine GALINDO, 6 mars 2008

UMR QualiSud

CIRAD SupAgro Montpellier UM1 Université Montpellier 1 UM2

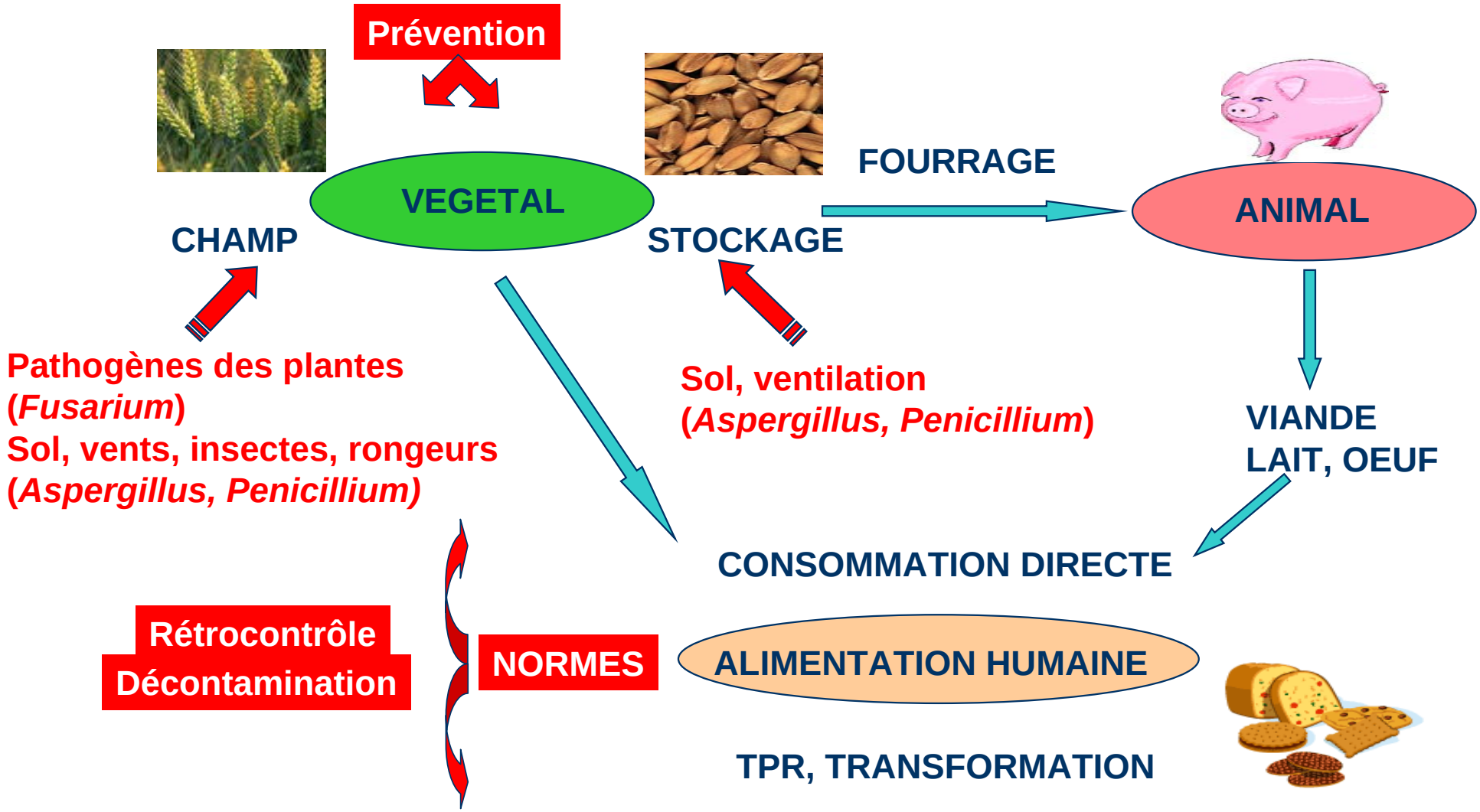
Définition-Propriétés

- Métabolite secondaire des moisissures (stress, compétition)
- Faible PM < 500
- Pouvoir toxique réel pour le consommateur (l'homme ou l'animal)
  - ~ 300 mycotoxines recensées
  - ~ 30 aux caractéristiques toxiques préoccupantes
- Grande diversité structurale
  - *Polyacétates* : aflatoxines, citrinine, ochratoxines, patuline, zéaralénone, fumonisines
  - *Terpènes* : trichothécènes (sesqui), trémorgènes
  - *Peptides* : ergotamine (alcaloïdes), tryptoquivaline,..
  - *Pipérazines* : sporidesmine, gliotoxine, roquefortine,..

Mycotoxines et moisissures

- Même toxine ← ≠ espèces fongiques
- Une souche fongique → plusieurs mycotoxines
- Présence de moisissures ~~→~~ présence de mycotoxines
- Toxine peut persister ← ~~moisissure~~

Contamination



Paramètres de croissance et de toxinogénèse

Conditions → **Température Humidité O_2 Durée**

Nature du substrat → **pH aw**

Microflore → **Compétition Interaction**

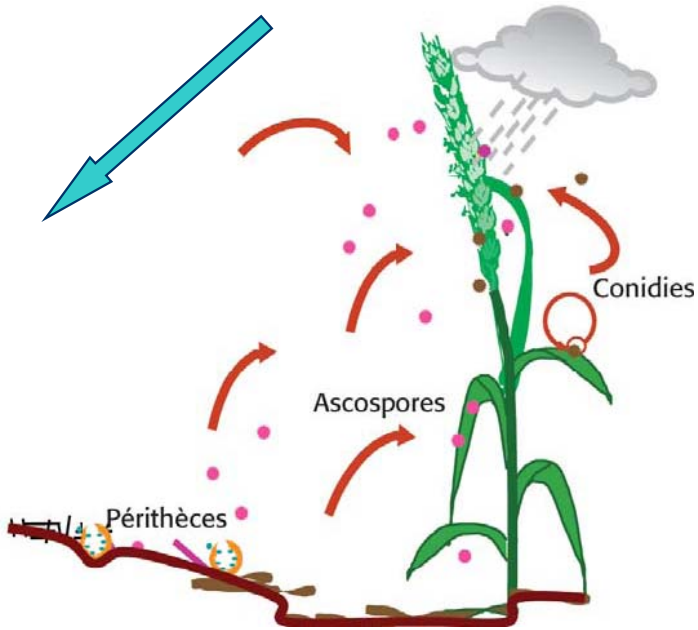
Facteurs externes → **Dommages mécaniques Insectes et rongeurs Vent (Dispersion spores)**

- T > 15 °C
- a_w > 0,9
- H > 17 %
- 0_2

CROISSANCE FONGIQUE

PRODUCTION DE TOXINES

Stockage en milieu chaud, humide et aéré



Denrées contaminées

Denrées	Moisissures	Toxines
Maïs, riz, cacahuètes, graines de coton, de potiron, haricots, tissus d'animaux (jambon, saucisses), abats (rognon), produits laitiers	*Aspergillus*	Aflatoxines Stérigmatocystine Ochratoxine A
Fruits, blé et dérivés, riz, noix, fromage	*Penicillium*	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, Ochratoxine A
Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine, noix	*Fusarium*	Trichothécènes (Déoxynivalénol DON, NIV, Toxine T-2, Diacétoxyscirpénol DAS), Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine
Fruits (pomme et tomate), légumes	*Alternaria*	Alternariol Acide tenuazonique
Blé et dérivés, seigle	*Claviceps*	Alcaloïdes de l'ergot

Effets produits expérimentalement chez l'animal

Effets	Mycotoxines
Hépatoxique	Aflatoxines
Néphrotoxique	Ochratoxine A, Citrinine
Neurotoxique	Citréoviridine, Ergot de seigle
Cardiotoxique	Citréoviridine, Acide pénicillique
Diabétogène	Acide terrique
Immunotoxique	Aflatoxines, Ochratoxine A, Trichothécènes
Trémorigène	Trichothécènes
Oestrogéniques	Zéaralénone
Tératogène	Aflatoxine B1, Ochratoxine A
Cancérogène	Aflatoxine B1, Ochratoxine A, Stérigmatocystine

DSE $\xrightarrow{/100}$ DJA $\xrightarrow{HA}$ DJT ng/j/Kgpc

Méthodes d'analyse et de dosage

Broyage/Tamisage

95 % Extraction LS/LL

80 % Purification/concentration IAC/SPE

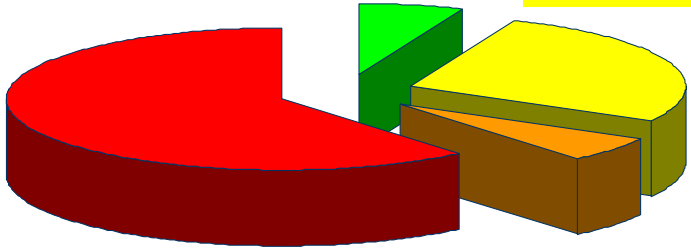
80 % Dérivation

Chromatographie

Réglementation : en fonction poids des lots
poids et nombre d'échantillons élémentaires
OTA céréales> 1500 T : 500 T ; 10 Kg ; 100 (100g)

Echantillonnage 6 %

Traitement des données 27 %



Traitement de l'échantillon 61 %

Analyse 6 %

Réglementation :
répétabilité et reproductibilité RDS faibles et RDT élevés
OTA 1-10 ppb : RDS_r<40% ; RDS_R<60 % ; RDT = 70-110 %

Comparatif de méthodes d'analyse et de dosage

Screening

Référence

	Sensibilité	Spécificité	Avantage	Inconvénient
ELISA	±	±	Simple et rapide	Peu sensible
FLUO	±	±	Simple et rapide	Dérivation, coût
CCM	+	+	Simple +sieurs mycotox	Peu sensible
GC-MS (DON)	++	+++	Spécifique +sieurs mycotox	Dérivation
HPLC-UV (PAT, DON, ZEA)	++	++	Sans dérivation	Purification IAC : 10 € 1 mycotox
HPLC-FLUO (OTA, AFB1, FB1)	++++	++	Sensible	Purification IAC : 10 € Dérivation
HPLC-MS-MS	++++	++++	Sensible, spécifique sans dérivation +sieurs mycotox	Coût : 200 K€

Nouvelles technologies

- Spectroscopie infra-rouge (NIR, MIR)
- Electrophorèse capillaire
- Polarisation de fluorescence
- Polymères à empreinte moléculaire MPIs
- Biocapteurs à résonance plasmonique de surface (SPR)
- Biocapteurs à fibre optique
- Capteurs immunologiques matriciels
- Bandelettes fluorescentes

Prévention et décontamination

- Prévention :
  - Triage
  - Contrôle séchage et stockage
  - Traitements pré-récolte (fongicide, agent biologique, compétition, SDN)

- Traitements de décontamination :
  - Physiques (thermiques, irradiations (UV, γ, MO))
  - Chimiques (ammoniaque, bisulfites, chlore, hypochlorite Na, H_2O_2)
  - Biologiques (bioconversion : *Mucor*, *A. niger* ; adsorption levures)

Aflatoxicoses

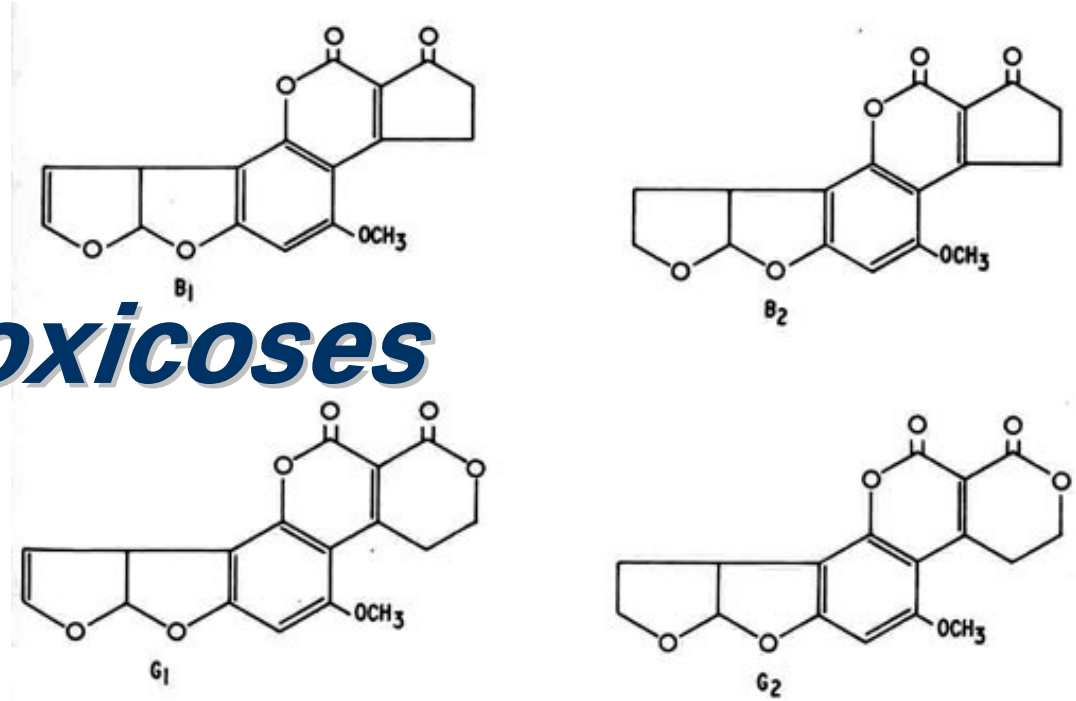


Fig. 1 Structures of aflatoxins B_1, B_2, G_1, and G_2.

Aflatoxicoses

- Espèces responsables :
  Aspergillus flavus, *A. parasiticus*, *Penicillium verrucosum*

- Arachides, céréales

- Infection au champ et surtout au stockage

- AFB1 :
  - Hépatotoxique : cirrhose, hépatite, cancérogène pour l'homme (Classe 1)
  - Immunotoxique, neutotoxique et tératogène
  - Pas de DSE ; DL50 = 10 mg/Kg
- AFM1 :
  - Métabolite hydroxylé, éliminé par le lait
  - Toxicité voisine, classe 2B

Réglementation européenne alimentation humaine

Règlement CE 466/2001

Produits	Mycotoxines	Normes (µg/Kg)
Arachides, fruits à coques	AFB1	2
Fruits secs, Céréales et dérivés	B1, B2, G1, G2	4
Arachides soumises à traitement de triage ou autres méthodes physiques	AFB1	8
	B1, B2, G1, G2	15
Fruits à coques et fruits séchés soumis à traitement de triage ou autres méthodes physiques	AFB1	5
	B1, B2, G1, G2	10
Epices (Piment, poivre, gingembre, safran, noix de muscade)	AFB1	5
	B1, B2, G1, G2	10
Lait	AFM1	0,05

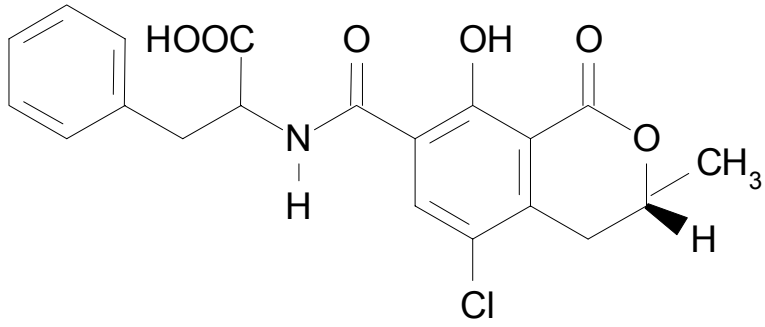
Réglementation européenne alimentation humaine

Règlement CE 683/2004

Produits	Mycotoxines	Normes (µg/Kg)
Aliments diététiques à des fins médicales spécifiques de nourrisson	AFB1	0,1
	AFM1	0,025
Préparations pour nourrisson	AFB1	0,1
	AFM1	0,025

Mode prélèvement d'échantillons et méthode d'analyse de référence : directive 98/53/CE

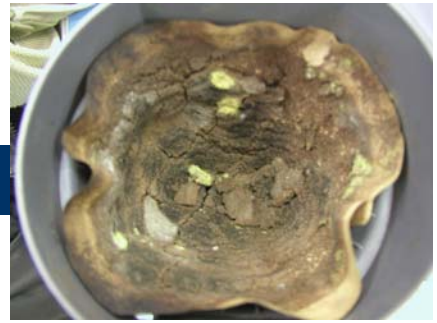
Ochratoxicose



Ochratoxine A

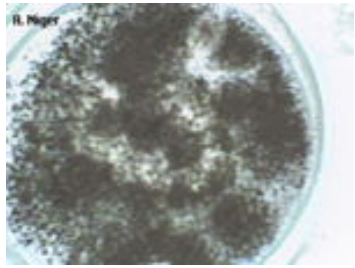
Néphrotoxique (BEN),
cancérogène possible (2B)
Immunotoxique, neurotoxique, génotoxique, tératogène
DJT = 5 ng/j/Kg pc ; DL50 = 50 mg/Kg

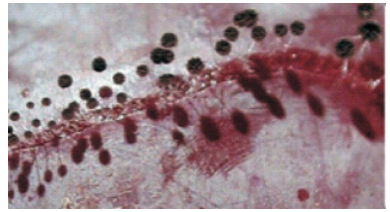
Moisissures productrices



- **Genre *Aspergillus***
  - Principal producteur sous climat chaud (28 °C) et humide (Tropical et Méditerranéen)
  - *A. ochraceus (café)*

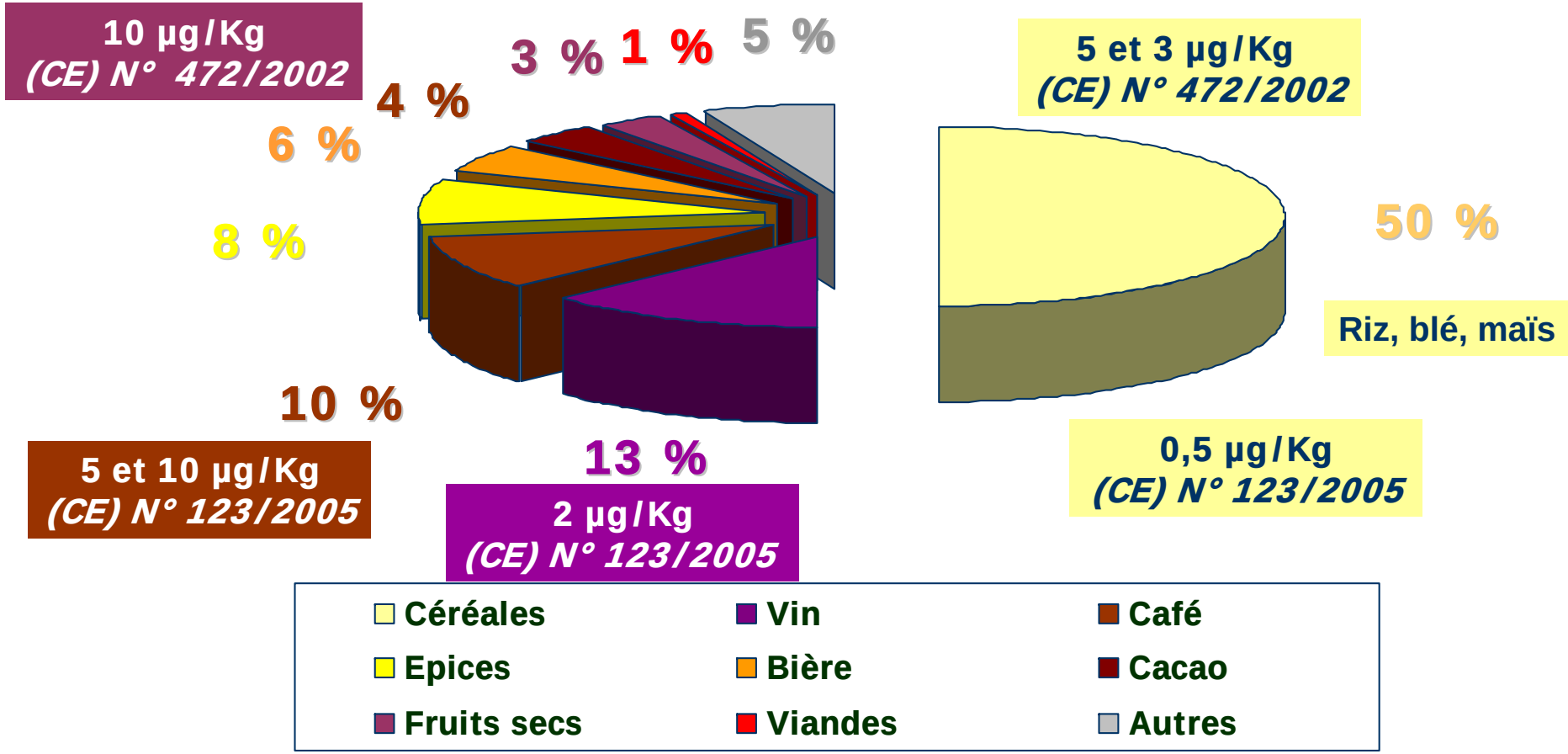
  - *A. niger, A.carbonarius (raisin)*





- **Genre *Penicillium***
  - Principal producteur sous climats tempérés et froids (< 20 °C)
  - *P.verrucosum, P. viridicatum (céréales)*

Contribution des principales denrées impliquées dans la consommation totale moyenne d'Ochratoxine A en Europe



Mode prélèvement d'échantillons et méthode d'analyse de référence : directive 2002/26/CE

L'ochratoxine A dans le pain

- Développement et production au stockage
- L'ochratoxine A se concentre dans les sons
- La farine blanche est moins contaminée que la farine complète
- Panification : ↘ faible OTA
- Consommation modérée 100 g/j
- Adulte de 70 kg = 4 ng/j/Kgpc pour pain complet proche DJT (5 ng/j/Kgpc)

Normes : 3 µg / Kg

L'ochratoxine A dans le vin

- Vin rouge plus contaminé
- Pourtour méditerranéen : jusqu'à 10 µg/L
- Véraison, entrée maritime, vers de la grappe
- Vinification, action préventive viticole
- Consommation modérée = 0,3L / jour
- Adulte de 70 kg = 8,6 ng /j/Kgpc > DJT
- Danger : plusieurs litres de vin par jour

Normes : 2 µg / L

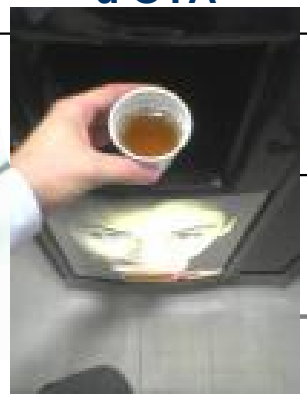
L'ochratoxine A dans le café

- Cerises contaminées au champ
- Traitement post-récolte :
  - Voie sèche favorable développement et toxinogenèse
  - Séchage
  - Stockage
- L'ochratoxine est thermostable
  40 à 90 % de réduction par torréfaction
- En moyenne : 5 tasses / jour = 50 g /jour
- Adulte de 70 kg = 3,5 ng /j/Kg pc < DJT (5ng/j/Kg)
- Importance de la méthode d'extraction de la boisson

Normes : 5 µg / kg

Café boisson

Type café	OTA	Café torréfié broyé	Café « Filtre »	Café « Piston »	Café « Expresso »
Café 1	OTA µg.kg^{-1}	24,7 ± 0,1	30,1 ± 0,1	30,1 ± 1,7	18,4 ± 0,7
	%récupération d'OTA	100	122	122	75
		13,4 ± 0,2	9,3 ± 0,1	12,7 ± 0.9	6,8 ± 0,4
		100	69	95	51



Café instantané 2x+ contaminé : concentration par mode de préparation, ajout frauduleux de coques

Estimation prise journalière (teneur moyenne)

	Céréales[1]	Pain[1]	Vin[1]	Bière[2]	café[2]	porc[3]	volaille[3]
OTA (µg/Kg)	0,59	0,59	0,27	0,07	0,76	0,11	0,03
Aliment (g/j)	40,3	111,5	288	233,8	20,4	80	11
OTA absorbée (ng/j)	23,8	68,1	77,8	16,4	15,5	8,8	0,3
Prise journalière (ng/j/Kg poids corporel)(60Kg)	0,39	1,14	1,29	0,22	0,2	0,1	<0,001

Consommation normale, modérée
1 France, 2 Allemagne, 3 Danemark

Total = 3,34 ng/j.Kg

Estimation prise journalière (norme)

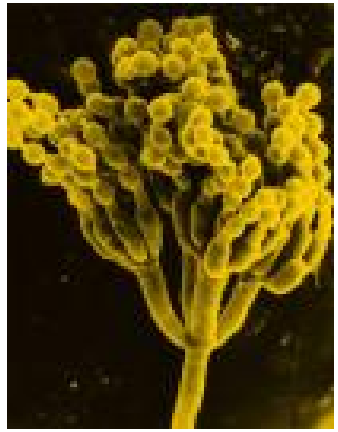
	Céréales	Pain	Vin	Bière	café	porc	volaille
OTA (µg/Kg)	5	3	2	0,2	5	-	-
Aliment (g/j)	40,3	111,5	288	233,8	20,4	80	11
OTA absorbée (ng/j)	201,5	223	576	46,8	102	8,8	0,3
Prise journalière (ng/j/Kg poids corporel)(60Kg)	3,35	3,71	9,6	0,78	1,7	0,1	<0,001

Total = 19,24 ng/j.Kg

Penicilliotoxicoses

La Patuline

- Divers genres de moisissures productrices :
  - *P. expansum*, *P. patulum*, *P. claviforme*
  - *A. clavatus*, *A. gigantus*, *A. terreus*
  - *Paecilomyces variotii*
  - *Byssochlamys nivea*, *B. fulva*



- Denrées contaminées : fruits (pomme)

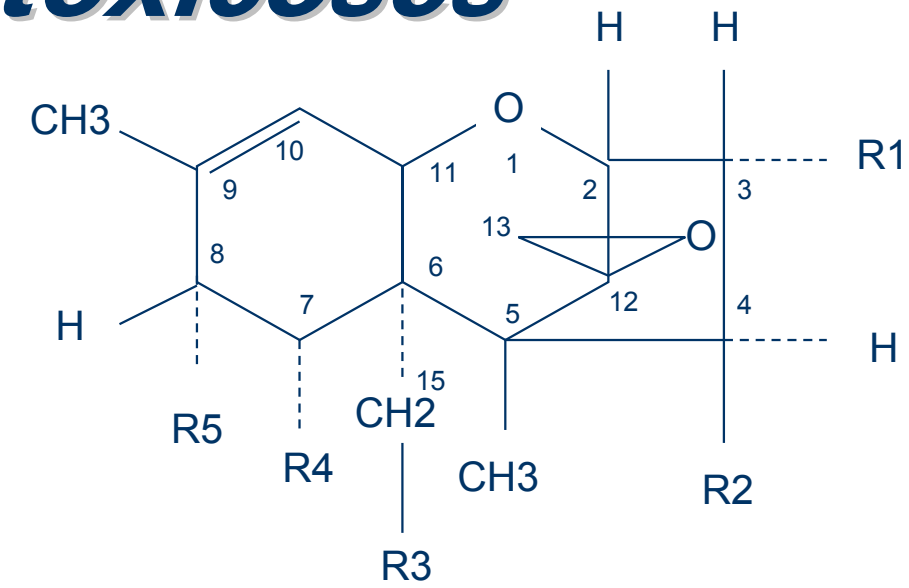
- Toxicité endocrinienne, immunotoxique, génotoxique, non classé cancérogène (3)

Réglementation européenne alimentation humaine

Produits	Règlement CE	Normes (µg/Kg)
Jus de fruit en particulier de pomme, nectar fruits mélangés	1425/2003	50
Cidre et autres boissons fermentées à base de pomme	1425/2003	50
Compotes de pomme	1425/2003	25
Préparation pour nourrisson à base de pomme (jus de fruit, petits pots)	1425/2003	10

Mode prélèvement d'échantillons et méthode d'analyse de référence : directive 2003/78/CE

Fusariotoxicoses



Fusariotoxines polyacétates

Zéaralénone (ZEA)

- Plusieurs *fusarium* sur des céréales surtout maïs
- Effet oestrogénique (traitement troubles ménopause envisagé)
- DL 50 inconnue car pas d'effets toxiques aigus

Fumonisines

- Récemment découverts (1988)
- *Fusarium moniliforme, F.graminearum* sur maïs
- Expérimentation en cours DL 50 non encore connue
- B1 : oedèmes pulmonaires porc, cancers hépatiques rat (2B)

Fusariotoxines sesquiterpènes

Nivalénol (NIV) et fusarénones

- *Fusarium nivale* sur Graminées
- Très toxiques DL50 = 50 et 5 ppm
- Altération des cellules du tissu hématopoïétique des os, de la rate et des ganglions lymphatiques

Trichothécènes

- *F. tricinctum* (millet, orge et blé), *F. graminearum*, *Trichothecium roseum* (maïs)
- + dangereuses : Diacétoxyscirpénol (DAS) et Toxine T-2 (DL50 = 7 ppm)
  Gastro-entérite, vomissement, somnolence, mort, ATA, agent du bioterrorisme
- + fréquente : déoxynivalénol (DON ou vomitoxine)(DL50 : 50 ppm)

Réglementation européenne alimentation humaine

Mycotoxine	Produits	Règlement CE	Normes (µg/Kg)
DON	Céréales brutes	856/2005	1250
	Blé dur et avoine bruts	856/2005	1750
	Maïs brut	1126/2007	1750
	Céréales destinées conso humaine, farines de céréales, son et germe	1126/2007	750
	Pâtes sèches	856/2005	750
	Pain, pâtisserie, biscuits, céréales petit déj.	856/2005	500
	Préparation à base céréales et aliments pour bébé	856/2005	200

Mode prélèvement d'échantillons et méthode d'analyse de référence : directive 2005/38/CE

Réglementation européenne alimentation humaine

Mycotoxine	Produits	Règlement CE	Normes (µg/Kg)
ZEA	Céréales brutes	856/2005	100
	Maïs brut	1126/2007	350
	Farine de céréale (excepté maïs)	856/2005	75
	Farine de maïs	1126/2007	75
	Huile de maïs raffiné	1126/2007	400
	Pain, pâtisseries biscuits, céréales collation et petit dèj. (sauf maïs)	856/2005	50
	céréales collation et petit dèj. maïs	1126/2007	100

Mode prélèvement d'échantillons et méthode d'analyse de référence : directive 2005/38/CE

Réglementation européenne alimentation humaine

Mycotoxine	Produits	Règlement CE	Normes (µg/Kg)
Fumonisines	Maïs brut	1126/2007	4000
	Maïs destinés conso humaine, farines de céréales, son et germe	1126/2007	1000
	Céréales collation et petit dèj. maïs	1126/2007	800
	Préparation à base de maïs et aliments pour bébé	1126/2007	200
	Fraction de mouture particules >500 µm non destinées conso humaine	1126/2007	1400
	Fraction de mouture particules ≤500 µm non destinées conso humaine	1126/2007	2000

Mode prélèvement d'échantillons et méthode d'analyse de référence : directive 2005/38/CE

Bilan

Couple Toxine/Denrées

Mycotoxines	Denrées
AFB1	arachides, pistaches, maïs, noix, figues, raisins secs, céréales, épices
AFM1	lait, produits laitiers
OTA : + denrées	céréales (orge, avoine, seigle, blé) et dérivés (bière, biscuiterie), café, cacao, raisins, vins, abats de porc ou de volaille (rognon,charcuterie, saucisses, boudin)
Patuline	pommes et jus de pomme, fruits à pépins, betteraves (pulpes)
DON	céréales (blé), farine et produits dérivés (pain), pâtes alimentaires
ZEA	maïs
Fumonisines	maïs, blé, avoine
T-2 et HT-2	céréales

Céréales : + mycotoxines