

1.1. Historique

L'intoxication par les mycotoxicoses dues à l'ingestion d'aliments contaminés par certaines moisissures peuvent être gravissimes : les épidémies liées à l'ingestion d'ergot du champignons *Claviceps Purpurea* sont décrites depuis le moyen Âge sous le nom de mal des ardents, ou doigt de Saint-Antoine ; en 1944, une épidémie d'ergotisme tua encore près de 400 personnes en France [14].

Selon Mannon & Johnson (1985), environ 25% des denrées alimentaires sont contaminées par des mycotoxines, métabolites secondaires des diverses moisissures. La mycoflore est estimée entre 200 000 et 300 000 espèces.

Les mycotoxines sont principalement produites par cinq genres de moisissures : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*.

Sur 110 000 espèces de moisissures connues appartenant à ces cinq genres, seules une certaine sont potentiellement productrices de toxines :

- *Penicillium viridicatum* : ochratoxines
- *P.citrinum* : citrinine
- *P.patulum* : patulimes
- *Fusarium* : zéaralénone, trichothécènes, fumonisines
- *Claviceps* (*Cl. Purpurea* : ergotamine).

En 1997, une enquête menée par synthèse Eleveage montrait que 70% des échantillons contrôlés étaient contaminés par des trichothécènes du groupe B (27% présentaient des taux élevés). 6% des échantillons étaient fortement contaminés par la Zéaralénone.

Les mycotoxines sont donc un problème majeur. D'une année à l'autre, la contamination peut varier. Par exemple, en 1996, l'Autriche affichait un taux de contamination par Zéaralénone de 74% alors qu'il était plus que de 6% en 1997 [19].

Qu'est ce que les mycotoxines ?

Le terme mycotoxine vient du mot grec «mycose» qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison. Les mycotoxines sont des toxines de faible poids moléculaire, élaborées par les champignons (toxines fongiques) au cours de leur métabolisme secondaire. Elles se développent sur certains substrats, dans des conditions de température, d'humidité et de pH bien spécifiques, et peuvent provoquer par ingestion des maladies dites " mycotoxicoses" [14].

1.2. Les facteurs d'apparition des mycotoxines

1.2.2-les facteurs intrinsèques:

Le taux initial de la pollution par une espèce toxigène est l'important car il reflète le risque d'imprégnation toxinique c'est-à-dire que plus le taux sera élevé plus le risque sera important (Poyer. 2004).

Si le grain ne s'écoule pas naturellement lors de la vidange d'une cellule, c'est le signe d'une prise en masse totale ou partielle occasionnée par un développement de moisissures.

Enfin pour éviter toute contamination il faut que la propreté de la récolte, du matériel de manutention et de stockage soit quasi irréprochable (Pierrick et al., 2003).

1.2.3-les facteurs extrinsèques:

2.3.1-Les facteurs physiques, physico-chimiques et chimiques:

- a) La disponibilité en eau
- b) La température
- c) Le pH
- d) La composition gazeuse
- e) La nature du substrat

2.3.2. Les facteurs biologiques:

La dissémination des ces mycotoxines dépend des facteurs physico-chimique cité précédemment mais également de leur potentiel infectieux (intensité de sporulation et longévité des spores). Elle peut s'effectuer soit dans l'air soit dans l'eau.

Si nous associons d'autres espèces fongiques aux souches toxigènes alors généralement nous pouvons constater un effet dépressif sur la production de la toxine. Cela est dû à une compétition pour le substrat et au fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Poyer, 2004).

1.3. Méthodes de détection:

Plusieurs techniques sont performantes pour la détection des principales mycotoxines : la chromatographie sur couche mince, la chromatographie liquide haute pression (HPLC), les techniques immuno-enzymatiques [14].

3.1. Méthodes des d'échantillonnage

Les mycotoxines peuvent engendrer des effets néfastes au niveau de la santé des humains ou des animaux. Il est donc important de connaître les niveaux de mycotoxines dans les matières premières. Ainsi, pour déterminer la contamination ou non d'un lot, il est important de connaître la

dose qu'il contient. Pour ce faire, les échantillons doivent être testés au laboratoire. Ainsi, différentes opérations, sont nécessaires pour arriver au résultat. Ces opérations ne sont pas si évidentes car le résultat diffère souvent d'un laboratoire à un autre selon le type de mycotoxines. Rappelons cependant que, tout résultat ne s'interprète qu'avec des informations sur l'état de l'échantillon analysé [19].

3.2. Méthodes d'analyse et de quantification

On distingue deux catégories de méthodes de dosage : tests immuno-enzymatiques et les techniques de séparation chromatographiques [19].

3.2.1. Analyse par tests immuno-enzymatique: Méthode ELISA (Test rapide) :

-Principe :

Le test immuno-enzymatique par compétition est basé sur la réaction immunologique entre un antigène et un anticorps. Il permet de doser les mycotoxines dans les grains. Voici les différentes étapes indispensables pour une quantification par la méthode ELISA (enzyme Linked immunoadsorbent Assay):

- Séparation de l'échantillon : broyage et homogénéisation

- Extraction de la molécule par un solvant approprié (souvent du méthanol).

- Ensuite, on ajoute un réactif se fixant sur les anticorps restants libres de la membrane. Après une étape de lavage permettant d'éliminer les molécules non fixées, on ajoute un dernier réactif : le substrat. En présence du conjugué, il est transformé en produit coloré.

La coloration signifie que la toxine recherchée dans l'échantillon est non détectée et inversement : l'absence de coloration signifie la détection [19].

-Limites :

- Un test ELISA ne dose qu'une mycotoxine à la fois donc ne permet pas d'évaluer une multicontamination.

- Toutes les mycotoxines ne peuvent pas être détectées par un test ELISA.

- La méthode ELISA utilise des enzymes fragiles qui demandent des conditions de conservation rigoureuses, en particulier la température.

- La limite de détection est variable selon la toxine recherchée : elle est de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les tests les plus sensibles. On utilise l'exemple ppb.

- Risque non négligeable d'avoir des résultats faux-positifs en test ELISA : il faut donc renforcer l'analyse par méthodes analytiques comme les méthodes séparatives chromatographiques [19].

3.2.2. Techniques de séparation chromatographique en HPLC ou GC : Test officiel

Les méthodes utilisées pour la détermination des mycotoxines sont basées sur des techniques de séparation chromatographiques en HPLC ou GC souvent après une étape de dérivation [7].

Principe :

Le chromatographe permet de séparer les différents constituants de l'échantillon analysé. L'étude chromatographique s'effectue en plusieurs étapes :

- Broyage et homogénéisation de l'échantillon.
- Extraction des mycotoxines du substrat par un solvant organique approprié à la molécule.
- Purification et concentration de la solution par SPE (solide phase extraction) ou par sélection de la toxine grâce à une colonne d'immunoaffinité dont la principale caractéristique est de contenir l'anticorps spécifique de la mycotoxine.
- Séparation des molécules recherchées par chromatographie liquide ou gazeuse.

Limites :

Les coûts sont plus élevés car l'appareillage de haute technicité représente un investissement très coûteux. De plus, les manipulations demandent une maintenance qualifiée. La durée des analyses et le volume important de solvant nécessaire sont autant de facteurs contraignants qui entraînent un délai de une à deux semaines pour l'analyse de l'échantillon [19].