



## Toxicologie analytique

### TD 4:

## Toxicologie Alimentaire

### 1- Les mycotoxines

# La toxicologie alimentaire

- ❑ Les études de toxicologie sont indispensables pour l'évaluation du risque alimentaire, réalisée par des agences publiques, ou par l'industrie agroalimentaire.
- ❑ Ces évaluations doivent permettre de déterminer la probabilité pour que le consommateur ne coure aucun danger en absorbant tel ou tel aliment, c'est ce qu'on appelle **le risque sanitaire**.
- ❑ Il faut identifier le danger potentiel, puis le caractériser. C'est une démarche difficile, longue et complexe.

# Les mycotoxines

- ❑ les mycotoxines de « mycos » : champignon sont des molécules de faible masse moléculaire issues du métabolisme secondaire des moisissures.
- ❑ Ces molécules sont élaborées par certaines espèces de moisissures colonisant des plantes (céréales, fruits, légumes) ou des aliments.
- ❑ D'après leur nature chimique, les mycotoxines sont très stables, en particulier thermostables, et difficiles à éliminer.

□ Compte tenu des effets toxiques qu'elles induisent, notamment toxicité chronique de type cancérogénicité, les mycotoxines introduites dans des chaînes alimentaires aboutissant à l'homme peuvent exposer celui-ci à un certain nombre de problèmes de santé.

□ De ce fait, de nombreuses techniques d'analyse ont été développées pour détecter et quantifier les mycotoxines.

# Les différents types de mycotoxines

## 1- Aflatoxines : produits oléagineux et produits laitiers

Les *Aspergillus* infestent de préférence les plantes oléagineuses (arachides, maïs...) en pays chauds : certaines souches toxigènes sont capables de produire l'ensemble des quatre aflatoxines (B1, B2, G1, G2).

Les fruits secs (noix, amandes...) et les fruits séchés (figues) sont de bons substrats pour les *Aspergillus* et la contamination de ces produits par les aflatoxines est fréquente.

Les principaux produits dérivés (farine, pâtes d'arachide ou de cacao) peuvent renfermer des teneurs élevées (jusqu'au mg/kg) en aflatoxines si les matières premières ne sont pas contrôlées.

## **2- Ochratoxine A : produits végétaux et produits charcutiers d'origine porcine ou avicole**

➤ L'ochratoxine A est sécrétée par des moisissures du genre *Aspergillus* ou *Penicillium*.

➤ Les *Penicillium* sont particulièrement présents dans nos régions aux climats tempérés et humides et peuvent donc infester des cultures céréalières (orge, blé, avoine,...) ou légumineuses sur pied ou lors de leur stockage.

➤ L'ochratoxine A entre dans la chaîne alimentaire de l'homme soit par consommation directe de produits contaminés céréaliers ou dérivés soit par consommation de produits carnés provenant de porcs ou de volailles nourris avec des grains contaminés, soit encore par consommation de café, de raisin ou de vin. On peut en effet retrouver de l'ochratoxine A dans des produits d'origine animale comme le lait.

## Les différents types de mycotoxines

### 3- Fumonisines et produits d'origine végétale

Le genre *Fusarium* est très répandu dans la nature et de nombreuses souches des espèces sont toxigènes. Les mycotoxines produites sont la zéaralénone, les fumonisines, la DON (déoxynivalénol) et d'autres trichothécènes. Les grains de céréales ou de maïs renferment souvent diverses toxines de *Fusarium* (contamination multiple). La DON est produite à des taux parfois très importants (jusqu'à plusieurs centaines de mg/kg de denrée) en particulier sur le blé.

## Les différents types de mycotoxines

### 4- Patuline et fruits à pépins

- ❖ Des fruits à pépins comme les pommes, les poires, les raisins ou bien les fraises sont des substrats de choix pour certaines moisissures comme le *Penicillium expansum* capables de produire de la patuline.
- ❖ Celle-ci est facilement transférée tout au long de la fabrication de produits dérivés tels que les jus de pomme ou de poire, le cidre... ou dans des préparations type compotes.
- ❖ Mais la contamination par la patuline peut aussi trouver son origine dans une altération des produits transformés eux-mêmes.

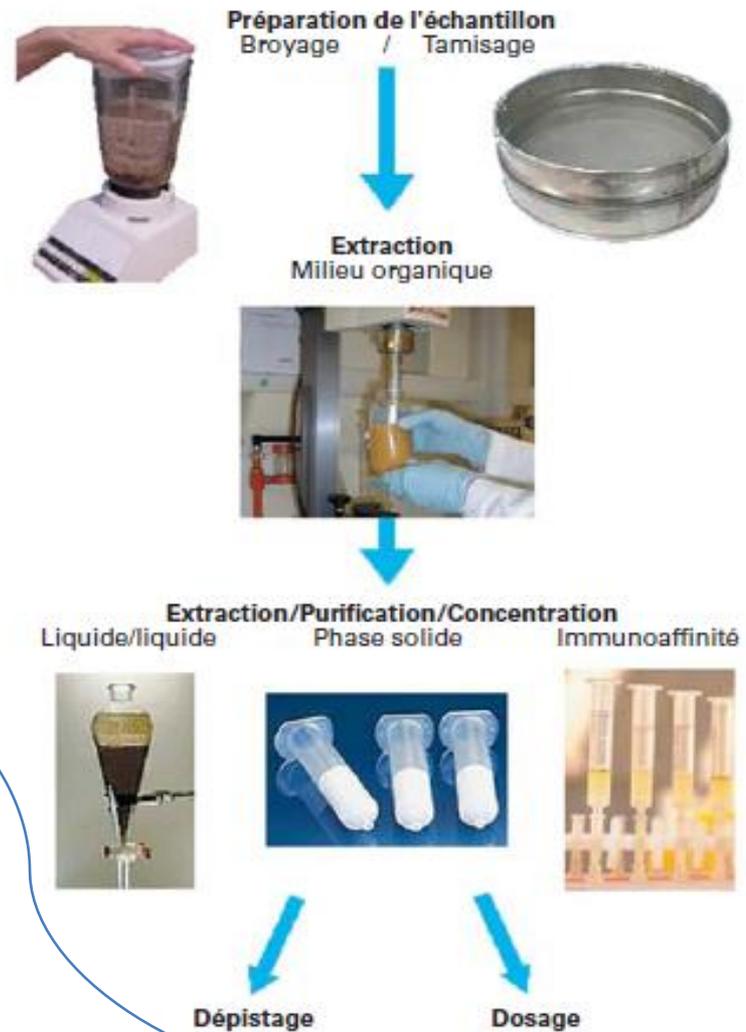
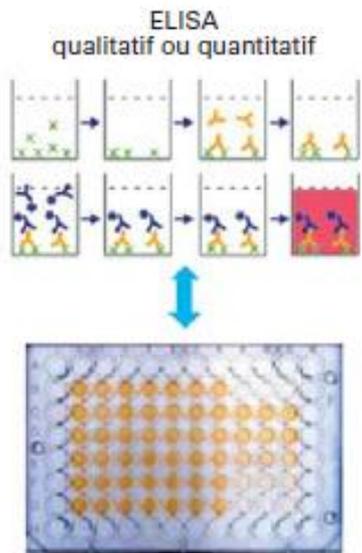
# Principes analytiques de détection et/ou de dosage des mycotoxines

- Pour l'analyse des mycotoxines habituellement présentes à l'état de traces dans les aliments (c'est-à-dire en quantité inférieure au ppb, soit inférieure au  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).
- Il existe toute une panoplie de méthodes fondées essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules puis de leur détection par spectrophotométrie ou par fluorimétrie.
- Les méthodes physico- chimiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie gazeuse (CPG) ou la chromatographie liquide haute performance (CLHP) permettent la quantification des mycotoxines.

**Note : 1 ppb (part per billion, partie par milliard) =  $10^{-9}$ .**

•D'autres méthodes de développement plus récent utilisent le principe de **l'immunoanalyse**. Ainsi, les techniques **immunochimiques de type ELISA** autorisent suivant leur configuration soit une détection de type présence ou absence (résultat qualitatif), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine.

•**Les techniques immunochimiques** sont souvent qualifiées de rapides car de nombreux échantillons peuvent être analysés à la fois en 3 à 4 heures.



**Principes d'analyse des mycotoxines**

## Préparation des échantillons. Extraction et purification

- ❖ Les **mycotoxines** se recherchent dans de nombreux aliments, ce qui en terme d'analyse correspond à une multitude de matrices complexes.
- ❖ Les protocoles destinés à l'analyse **des mycotoxines** renferment systématiquement des étapes préliminaires de préparation des échantillons (broyage, centrifugation, extraction en milieu organique, partition liquide-liquide).
- ❖ Souvent longues et manuelles, ces étapes doivent être optimisées pour chaque type de matrice.
- ❖ L'analyse **des mycotoxines** étant une analyse de traces, il est de plus en plus recommandé de procéder à une étape de purification puis de concentration de l'extrait.

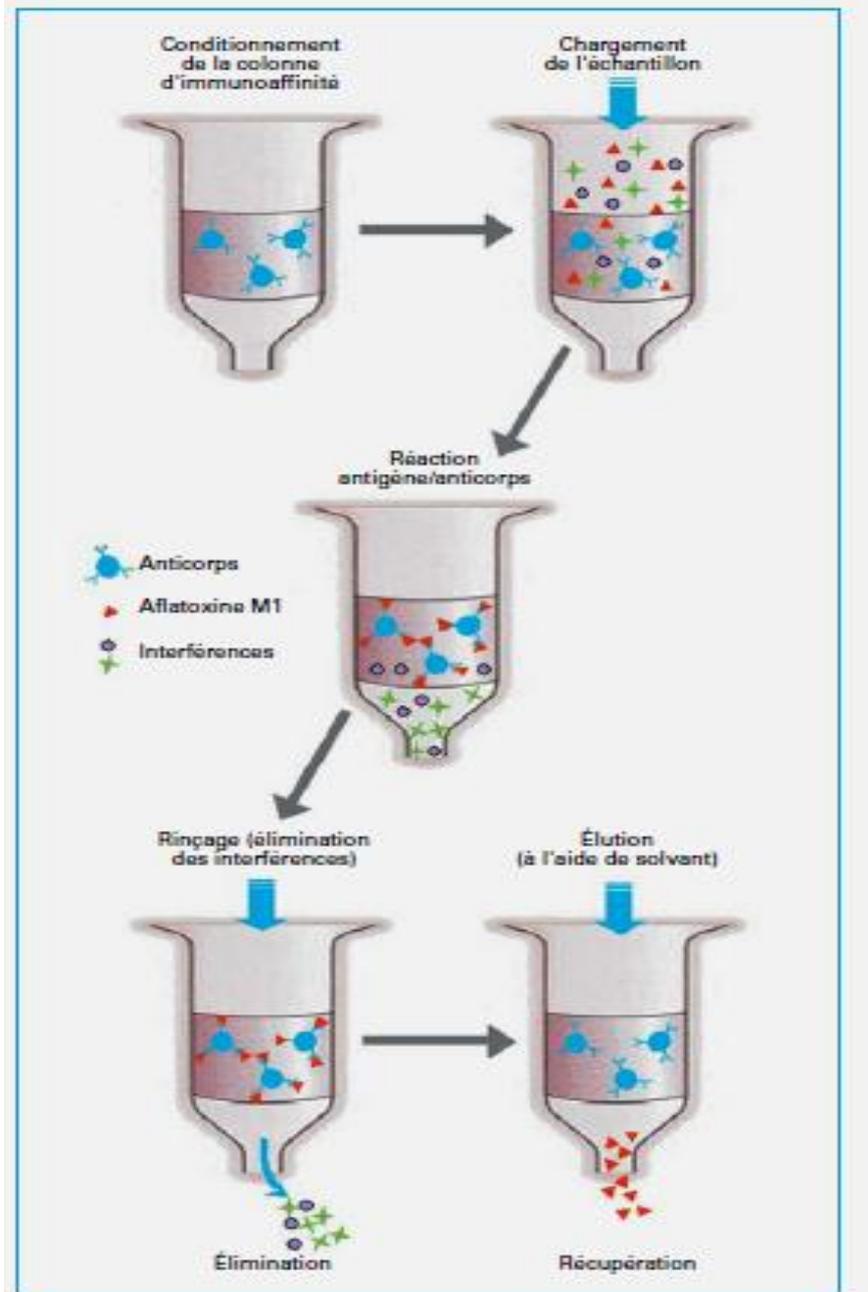
Cette technique, initialement développée pour l'extraction et la purification de toxines contenues dans les fluides biologiques (sérum, urine, lait) a été adaptée à la purification des mycotoxines contenues dans des matrices solides (grains, noix...).

## **Principe de la chromatographie d'immunoaffinité**

- Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de l'anticorps comme réactif d'affinité.
- L'anticorps antimycotoxine est tout d'abord immobilisé sur un support qui a souvent l'apparence d'un gel remplissant une microcolonne, conditionné à l'aide d'un tampon.
- La chromatographie par immunoaffinité se réalise en plusieurs étapes comme le montre la figure.

**La mycotoxine est recueillie et sa quantité est estimée par différents moyens physico-chimiques simples (microcolonne de visualisation) ou complexes par CCM ou par CLHP.**

# Extraction et purification d'un échantillon par chromatographie d'immunoaffinité



## **Applications de la chromatographie d'immunoaffinité**

- Chromatographie d'immunoaffinité et dépistage : la chromatographie par immunoaffinité peut être combinée à la chromatographie sur microcolonne pour être utilisée comme test de dépistage des aflatoxines dans les céréales.

- Chromatographie d'immunoaffinité et dosage : la chromatographie par immunoaffinité peut être combinée à la CCM ou la CLHP pour le dosage des mycotoxines. Dans ce cas, l'éluat final obtenu par chromatographie par immunoaffinité est concentré puis injecté dans le système de séparation CLHP, suivi généralement d'une détection par fluorescence. Grâce à cette association, des teneurs inférieures à 0,1 ppb, voire moins, peuvent être facilement détectées.

## Méthodes chromatographiques.

- L'analyse proprement dite des mycotoxines s'effectue essentiellement par techniques chromatographiques telles que:

1. la chromatographie sur couche mince (CCM),
2. la chromatographie liquide haute performance (CLHP),
3. la chromatographie gazeuse (GC) couplée ou non à la spectrométrie de masse (GC-MS),
4. la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

## 1- La CCM

- La CCM a été la première technique employée. Bien que le seuil de détection qui peut être obtenu par ce type de technique est moins intéressant que par CLHP,
- Ce type de technique permet une détection qualitative ou semi-qualitative. Elle reste très utilisée dans les pays en voie de développement car, d'une part elle est peu coûteuse, facile à mettre en place, ne requérant pas d'appareillage sophistiqué, et, d'autre part, elle est suffisante pour rechercher des teneurs élevées de mycotoxines auxquelles sont confrontés ces pays.

## 2- HPLC

La technique CLHP est la plus utilisée depuis une vingtaine d'années. Dès lors que les étalons sont disponibles, c'est la méthode de choix pour l'analyse des mycotoxines.

Les méthodes par CLHP sont quantitatives et grâce à leur couplage à la détection par fluorescence, elles peuvent atteindre des limites de détection aussi basses que la dizaine de ppt ou ng/kg. Combinées à une étape préalable de purification par chromatographie d'immunoaffinité, ces techniques ont pu être validées au niveau international et ce principe d'analyse est actuellement retenu dans la plupart des méthodes officielles et font l'objet de normes françaises.

### **3- La chromatographie gazeuse**

✓ La chromatographie gazeuse est réservée à l'étude des mycotoxines qui peuvent être volatilisées. Elle convient plutôt à la classe des trichothécènes mais elles sont difficiles à calibrer et à valider.

✓ Pour ces mycotoxines, on préfère actuellement la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS-MS).

## La LC-MS-MS

- La LC-MS est de plus en plus utilisée pour effectuer des confirmations et identifications de mycotoxines par identification des ions-fils et comparaison à des banques de données spectrales.
- Cette technique est très coûteuse par l'achat de l'appareil, sa maintenance et la nécessité d'un personnel hautement spécialisé.