



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2015

---

FACULTE DE PHARMACIE

## THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 3 septembre 2015, sur un sujet dédié à :

### **Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Sophie HEIT

née le 16 février 1989 à Nancy (54)

### **Membres du Jury**

Président :	M. Raphaël DUVAL,	Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy
Directeur :	M. Emmanuel RONDAGS,	Maître de Conférences, ENSAIA
Juges :	M. Jean-Yves JOUZEAU,	Professeur - Praticien Hospitalier, Faculté de Pharmacie Nancy
	M. Dominique DECOLIN,	Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie de Nancy
	M. Patrick CHAIMBAULT,	Professeur, Université de Metz
	M. Xavier FRAMBOISIER,	Ingénieur de Recherche, ENSAIA

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2014-2015**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Béatrice FAIVRE

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Conseil de la Pédagogie**

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Président, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Président, Raphaël DUVAL

**Responsable de la filière Officine**

**Responsables de la filière Industrie**

**Responsable de la filière Hôpital**

**Responsable Pharma Plus ENSIC**

**Responsable Pharma Plus ENSAIA**

**Responsable de la Communication**

**Responsable de la Cellule de Formation Continue  
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément  
des maîtres de stage**

**Responsables des échanges internationaux**

**Responsable ERASMUS**

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

Christine PERDIAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

<b>ENSEIGNANTS</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

**ENSEIGNANTS (suite)**

Section Discipline d'enseignement

	CNU*	
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

#### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

#### **\*Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX  
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# Remerciements

---

**A mon Président et Directeur de thèse, Monsieur le Professeur Raphaël Duval,**

Pour m'avoir fait l'honneur de co-diriger et de présider le jury de cette thèse. Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour votre enseignement et votre disponibilité. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect. Je vous prie d'accepter mes sincères remerciements.

**A mon Directeur de thèse, Monsieur le Docteur Emmanuel Rondags,**

Pour l'honneur que vous me faites de diriger cette thèse. Pour m'avoir inspiré ce sujet de thèse, pour votre disponibilité, vos conseils avisés et vos encouragements tout au long de ce travail. Grâce à vous, j'ai également eu l'honneur de rencontrer Monsieur Kozo Shimazu, Directeur Général de Kratos Analytical, a Shimadzu Group Company, et de lui présenter mes travaux. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements ainsi que mon profond respect.

**A mes juges,**

**Monsieur le Professeur Jean-Yves Jouzeau,**

Pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury de cette thèse. Je vous prie de recevoir le témoignage de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Dominique Decolin,**

Pour l'honneur que vous me faites d'être membre du jury de cette thèse. Veuillez accepter mes sincères remerciements et l'expression de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Patrick Chaimbault,**

Pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger. J'en suis très touchée et honorée. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect.

**Monsieur Xavier Framboisier,**

Je te remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre de mon jury de thèse. Un grand merci pour tous tes précieux conseils au cours de ce travail, ta disponibilité, ainsi que ta bonne humeur.

Je remercie également Julien Billard, d'avoir partagé toutes tes connaissances sur le MALDI, et Cédric Paris, pour ton aide au cours des analyses LC-MS et tes précieux conseils. Sans oublier toute l'équipe LRGP-BioProMo de l'ENSAIA, je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir permis de réaliser les essais décrits dans ce mémoire. Pour votre accueil, vos conseils et votre aide, je vous remercie sincèrement.

**A ma famille,**

**A mes parents**, vous m'avez permis de réaliser ces études dans les meilleures conditions qui soient. Vous m'avez toujours soutenue et supportée, avec mon stress et mes angoisses, surtout lorsque je vous annonçais que je souhaitais partir un an en Pologne. Mais, vous avez également partagé mes joies et tous ces bons moments qui resteront à jamais... Je vous dédie cette thèse.

**A mes deux sœurs et mon frère**, merci à vous 3 d'être vous, de votre soutien et vos encouragements tout au long de ces années. Des 4 coins de la France, vous avez toujours été là et je vous en remercie du fond du cœur.

**A mes Mamies**, d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir poussée à toujours donner le meilleur de moi-même.

*Avec tout mon amour.*

**A mes amis, de fac ou plus lointain,**

Marie, Emmeline, Edwige, Inès, Amandine, Kazu, toujours fidèles. Aux souvenirs de ces très bonnes années avec vous et qu'il y en ait encore beaucoup d'autres.

Aux "Rennaises" que j'ai rencontrées en Pologne, nous avons toujours pu compter les unes sur les autres au cours de cette année inoubliable, pleine de souvenirs, de voyages et d'anecdotes.

**A vous tous** qui avez fait un bout de chemin plus ou moins long avec moi.

# Sommaire

---

<b>Sommaire .....</b>	<b>1</b>
<b>Table des figures.....</b>	<b>5</b>
<b>Table des tableaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des annexes .....</b>	<b>8</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>9</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>10</b>
<b>Partie 1 : Etude bibliographique.....</b>	<b>12</b>
1 Le genre <i>Fusarium</i> .....	12
1.1 Identification des <i>Fusarium</i> .....	12
1.1.1 Caractéristiques morphologiques .....	12
1.1.2 Classification et taxonomie .....	14
1.2 Localisation – Habitat - Distribution .....	18
1.3 Pathogénicité des <i>Fusarium</i> .....	18
1.3.1 Pathogénicité pour les végétaux .....	18
1.3.2 Impact chez l'homme et l'animal .....	20
1.3.3 Effets indirects .....	21
1.4 Conclusion .....	22
2 Mycotoxines .....	22
2.1 Introduction.....	22
2.2 Conditions de production – Conditions environnementales .....	23
2.2.1 Facteurs abiotiques .....	23
2.2.2 Facteurs biotiques .....	24
2.3 Voies d'absorption chez l'homme et l'animal .....	24
2.4 Facteurs de risque pour l'homme.....	25
2.5 Les fusariotoxines .....	25
2.5.1 Trichothécènes.....	26
2.5.1.1 Structure .....	26
2.5.1.2 Propriétés physico-chimiques .....	27
2.5.1.3 Biosynthèse .....	27
2.5.1.4 Métabolisme.....	28
2.5.1.5 Mode d'action biologique .....	29
2.5.1.6 Toxicologie .....	29
2.5.1.7 Devenir dans les produits transformés .....	32
2.5.1.8 Utilisation.....	32
2.5.2 Zéaralénone .....	33
2.5.2.1 Structure .....	33
2.5.2.2 Propriétés physico-chimiques .....	33
2.5.2.3 Biosynthèse .....	34
2.5.2.4 Métabolisme.....	35
2.5.2.5 Mode d'action biologique .....	35
2.5.2.6 Toxicologie .....	36

2.5.2.7	Devenir dans les produits transformés .....	37
2.5.3	Fumonisines .....	38
2.5.3.1	Structure .....	38
2.5.3.2	Propriétés physico-chimiques .....	39
2.5.3.3	Biosynthèse .....	39
2.5.3.4	Métabolisme .....	40
2.5.3.5	Mode d'action biologique .....	41
2.5.3.6	Toxicologie .....	41
2.5.3.7	Devenir dans les produits transformés .....	43
2.5.4	Autres mycotoxines .....	44
3	Conclusion .....	45
<b>Partie 2 : Techniques analytiques .....</b>		<b>46</b>
1	Introduction .....	46
2	L'importance de l'échantillonnage .....	46
3	Identification des moisissures .....	48
3.1	Techniques de microbiologie directes .....	48
3.2	Méthode de biologie moléculaire .....	48
3.3	Spectrométrie de masse et MALDI-TOF .....	50
3.3.1	Principes généraux de la spectrométrie de masse .....	50
3.3.2	Principe détaillé du MALDI .....	51
3.3.3	Analyseur associé au MALDI pour l'identification de moisissures .....	52
3.3.3.1	Le TOF .....	53
3.4	Conclusion .....	54
4	Identification et quantification des mycotoxines .....	54
4.1	Techniques de référence .....	55
4.1.1	Méthodes physico-chimiques .....	56
4.1.1.1	Chromatographie liquide haute performance - Principe .....	56
4.1.1.2	Chromatographie en phase gazeuse - Principe .....	58
4.1.1.3	Types d'analyseurs CLHP et CPG .....	58
4.1.2	Techniques rapides – La méthode ELISA .....	59
4.1.2.1	Principe .....	59
4.1.2.2	Kits de dosage .....	60
4.2	MALDI .....	60
4.2.1	Le TOF réflectron .....	60
4.2.2	Autres analyseurs .....	61
4.3	Méthode génétique .....	61
5	Bilan .....	61
<b>Partie 3 : Matériels et Méthodes .....</b>		<b>63</b>
1	Matériels et Méthodes .....	63
1.1	Matériels .....	63
1.1.1	Souches .....	63
1.1.2	Milieux de culture .....	64
1.1.3	Réactifs .....	64
1.1.4	Standards .....	64

1.1.5	Matériels de préparation des échantillons et des cultures.....	64
1.1.6	Matériels d'analyse.....	64
1.2	Méthodes.....	65
1.2.1	Préparation du matériel.....	65
1.2.2	Mise en culture des souches .....	65
1.2.3	Préparation des échantillons .....	65
1.2.4	Préparation du mélange d'extraction .....	65
1.2.5	Dépôts sur plaque MALDI-TOF .....	65
1.2.6	Analyse MALDI-TOF .....	66
1.2.7	Utilisation de Saramis® .....	66
1.2.8	Analyse LC-MS.....	67
<b>Partie 4 : Résultats – Discussion .....</b>		<b>68</b>
1	Mise au point de la méthode .....	68
1.1	Optimisation des conditions d'analyse .....	68
1.1.1	Etude du couple matrice - fluence .....	68
1.1.1.1	Choix de la matrice et de la fluence .....	68
1.1.1.2	Résultats.....	69
1.1.1.3	Conclusion .....	72
1.1.2	Modalités de l'extraction .....	72
1.1.2.1	Durée d'extraction.....	73
1.1.2.2	Conditions de stockage .....	74
1.2	Influence du type de culture et de la nature du milieu .....	74
1.2.1	Interférences du milieu de culture et influence du temps de culture .....	74
1.2.1.1	Influence du milieu .....	74
1.2.1.2	Résultats.....	75
1.2.1.3	Conclusion .....	76
1.2.2	Nature du milieu : liquide vs gélifié .....	76
1.2.2.1	Mise en œuvre.....	77
1.2.2.2	Résultats.....	77
1.2.2.3	Conclusion .....	78
1.2.3	Traitement des échantillons .....	78
1.2.3.1	Digestion enzymatique.....	79
1.2.3.2	Traitement par vortex.....	80
1.2.3.3	Traitement par un broyeur à billes .....	81
1.2.3.4	Traitement par sonication.....	82
1.2.3.5	Conclusion de l'essai .....	83
1.3	Conclusions générales et perspectives sur la mise au point de méthode .....	83
2	Faisabilité de l'identification fongique .....	84
2.1	Identification de souches pures .....	84
2.1.1	Mise en œuvre de l'étude.....	85
2.1.2	Résultats.....	85
2.1.3	Conclusion.....	86
2.2	Elargissement à l'identification dans des co-cultures .....	87
2.2.1	Mélanges.....	87

2.2.2	Résultats.....	88
2.2.2.1	Première partie : mélange avant extraction.....	88
2.2.2.2	Deuxième partie : mélange en culture.....	90
2.2.3	Conclusion.....	92
2.3	Discussions .....	93
2.4	Perspectives immédiates .....	93
3	Identification de mycotoxines et du potentiel toxigène .....	94
3.1	Mise au point de la méthode .....	94
3.1.1	T2 pure.....	94
3.1.1.1	Analyse MALDI-TOF .....	94
3.1.1.2	Vérification par méthodes de référence .....	96
3.1.2	Détection T2 en culture .....	99
3.1.3	Conclusion.....	100
	<b>Conclusions générales - Perspectives.....</b>	<b>102</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>104</b>
	<b>Webographie.....</b>	<b>111</b>
	<b>Glossaire .....</b>	<b>112</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>114</b>

# Table des figures

Figure 1 : Caractères morphologiques primaires de deux espèces de <i>Fusarium</i> .....	13
Figure 2 : Morphologie de colonies d'espèces de <i>Fusarium</i> sur milieu Potato Dextrose Agar. La boîte du haut de chaque paire correspond au mycélium aérien, celle du bas à la vue de dessous (Summerell et al., 2003). .....	14
Figure 3 : Principaux systèmes taxonomiques du genre <i>Fusarium</i> .....	16
Figure 4 : Protocole d'identification établi par Leslie et Summerell pour l'identification des espèces du genre <i>Fusarium</i> (Leslie and Summerell, 2006).....	17
Figure 5 : Symptômes de la fusariose sur céréales : épis d'orge avec des grains fusariés.....	20
Figure 6 : Interactions entre la patate douce et les moisissures (Moss, 1996) .....	21
Figure 7 : Structure générale des trichothécènes (Desjardins, 2006) .....	26
Figure 8 : Structure de 3 trichothécènes : T2, HT2 (Groupe A) et DON (Groupe B).....	27
Figure 9 : Voie de biosynthèse de la toxine T2 chez <i>F. sporotrichioides</i> .....	28
Figure 10 : Structure chimique de la zéaralénone (ANSES, 2009).....	33
Figure 11 : Proposition de voie de biosynthèse de la zéaralénone (Kim et al., 2005) .....	34
Figure 12 : Structure chimique des métabolites de la zéaralénone (Magan and Olsen, 2004) .....	35
Figure 13 : Structure de la fumonisine FB1 (Bennett and Klich, 2003) .....	38
Figure 14 : Proposition de voie de biosynthèse des fumonisines par <i>F. verticillioides</i> (Desjardins, 2006) .....	40
Figure 15 : Teneur en DON d'une parcelle de 10 ha contaminée par <i>Fusarium</i> .....	46
Figure 16 : L'accumulation des erreurs d'échantillonnage (selon Grosjean et al., 2002).....	47
Figure 17 : Identification microbiologique des moisissures .....	48
Figure 18 : Principe général de la PCR pour l'identification et la quantification de <i>Fusarium</i> (source : IFBM).....	49
Figure 19 : Eléments constitutifs d'un spectromètre de masse (Bouchoux and Sablier, 2005).....	51
Figure 20 : Principe de la désorption laser douce (Tanaka, 2003) .....	52
Figure 21 : Principe de l'analyseur de temps de vol après désorption ionisation .....	53
Figure 22 : Principes d'analyse des mycotoxines (Dragacci and Frémy, 2005) .....	55
Figure 23 : Disposition des dépôts sur la plaque MALDI-TOF .....	66
Figure 24 : Cristallisation des différentes matrices .....	69
Figure 25 : Profils de <i>F. graminearum</i> avec du CHCA - Faibles masses .....	70
Figure 26 : Profils de <i>F. graminearum</i> avec du CHCA - Hautes masses.....	70
Figure 27 : Profil de <i>F. graminearum</i> avec du SA - Faibles masses.....	70
Figure 28 : Profil de <i>F. graminearum</i> avec du SA - Hautes masses .....	70
Figure 29 : Profil de <i>F. graminearum</i> avec du DHB - faibles masses .....	71
Figure 30 : Profil de <i>F. graminearum</i> avec du DHB - hautes masses.....	71
Figure 31 : Profils de <i>F. graminearum</i> pour les trois matrices – faibles masses .....	71
Figure 32 : Profils de <i>F. graminearum</i> pour les trois matrices – hautes masses.....	71
Figure 33 : Profils pour <i>F. poae</i> après différents temps d'extraction.....	73
Figure 34 : Comparaison de profils de <i>F. graminearum</i> en milieu YM et BHI - faibles masses .....	75

Figure 35 : Comparaison de profils de <i>F. graminearum</i> en milieu YM et BHI - hautes masses	75
Figure 36 : Profils cinétiques de <i>F. graminearum</i> - faibles masses - milieu YM	76
Figure 37 : Profils cinétiques de <i>F. graminearum</i> - hautes masses - milieu YM	76
Figure 38 : Comparaison des profils liquide/gélose de <i>F. graminearum</i> - faibles masses	77
Figure 39 : Comparaison des profils liquide/gélose de <i>F. graminearum</i> - hautes masses	78
Figure 40 : Profils de <i>F. graminearum</i> après digestion enzymatique - faibles masses	79
Figure 41 : Observation des profils de <i>F. graminearum</i> sur la zone spectrale 660-850 Da	79
Figure 42 : Profils de <i>F. graminearum</i> après différents traitements de digestion enzymatique - hautes masses	80
Figure 43 : Profils de <i>F. graminearum</i> après traitement au vortex - faibles masses	81
Figure 44 : Profils de <i>F. graminearum</i> après traitement au vortex - hautes masses	81
Figure 45 : Profils de <i>F. graminearum</i> après traitement au broyeur à billes - faibles masses	82
Figure 46 : Profils de <i>F. graminearum</i> après traitement au broyeur à billes - hautes masses	82
Figure 47 : Profils de <i>F. graminearum</i> après sonication - faibles masses	83
Figure 48 : Profils de <i>F. graminearum</i> après sonication - hautes masses	83
Figure 49 : Comparaison des profils de <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. langsethiae</i> et <i>F. graminearum</i> - faibles masses	85
Figure 50 : Comparaison des profils de <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. langsethiae</i> et <i>F. graminearum</i> - hautes masses	86
Figure 51 : Comparaison des différents mélanges de souches aux souches seules Faibles masses	88
Figure 52 : Comparaison des différents mélanges de souches aux souches seules Hautes masses	89
Figure 53 : Focalisation sur la zone 5000-12000 Da	90
Figure 54 : Exemple de 3 bi-mélanges liquides après 4 jours de culture	90
Figure 55 : Comparaison des profils obtenus pour le mélange <i>F. langsethiae</i> - <i>F. poae</i> Hautes masses	91
Figure 56 : Comparaison des profils obtenus pour le mélange <i>F. langsethiae</i> - <i>F. sporotrichioides</i> - Faibles masses	91
Figure 57 : Comparaison des profils obtenus pour le mélange <i>F. poae</i> - <i>F. sporotrichioides</i> - Faibles masses	92
Figure 58 : Épi d'orge contaminé par <i>F. langsethiae</i>	93
Figure 59 : Profils de la mycotoxine T2 diluée dans l'eau de la concentration pure à $10^{-4}$	95
Figure 60 : Profils de la toxine T2 diluée dans le milieu YM de la concentration pure à $10^{-4}$	95
Figure 61 : Comparaison des résultats de dilution de T2 dans l'eau distillée obtenus par LC-MS	96
Figure 62 : Corrélation entre la concentration en toxine T2 diluée dans l'eau et l'aire du pic détecté en LC-MS	97
Figure 63 : Profils de dilution de la toxine T2 dans le milieu YM par LC-MS	98
Figure 64 : Profil du milieu YM seul par LC-MS	99
Figure 65 : Comparaison des profils de trois souches et observation de la production en mycotoxine T2	100

# Table des tableaux

---

Tableau I : Classification des formes anamorphe et téléomorphe .....	14
Tableau II : Comparaison des systèmes taxonomiques de Snyder et Hansen, Wollenweber et Reinking et Leslie et Summerell (Leslie and Summerell, 2006). ....	15
Tableau III : Inventaire mycologique réalisé entre 2002 et 2011 sur des témoins non traités pour des tests de fusariose par Arvalis-Institut du végétal .....	24
Tableau IV : Toxines sécrétées selon différentes espèces.....	26
Tableau V : Classification des trichothécènes (Li et al., 2011; Parent-Massin et al., 2013)....	27
Tableau VI : Moisissures et bactéries de l'environnement capables de détoxifier la toxine T2 .....	29
Tableau VII : Quelques doses toxicologiques associées aux toxines T2 et HT2 (Ripert, 2013) .....	30
Tableau VIII : Quelques doses toxicologiques établies pour la zéaralénone (Ripert, 2013) ...	36
Tableau IX : Exemples de symptomatologie suivant l'espèce animale touchée (selon Ripert, 2013).....	37
Tableau X : Structures chimiques des fumonisines du groupe B (Desjardins, 2006).....	39
Tableau XI : Exemples de doses toxicologiques établies pour les fumonisines .....	41
Tableau XII : Réglementation de l'UE concernant les fumonisines (en µg/kg) .....	44
Tableau XIII : Matrices utilisées selon le type de molécules analysées (Howard, 2007).....	52
Tableau XIV : Comparaison des caractéristiques des deux types de CLHP .....	57
Tableau XV : Quelques types de détecteurs/d'analyseurs associés aux CLHP et CPG .....	59
Tableau XVI : Comparaison générale des analyseurs couplés au MALDI (Lewis et al, 2000) .....	61
Tableau XVII : Avantages et inconvénients des différentes techniques analytiques.....	62
Tableau XVIII : Espèces de <i>Fusarium</i> utilisées au cours des essais.....	63
Tableau XIX : Propriétés des matrices utilisées.....	69

# Table des annexes

---

Annexe 1 : Classification des agents par l’IARC en fonction de leur potentiel cancérigène (IARC, 2006).....	115
Annexe 2 : Composition solution Tof mix – calibration standard .....	116
Annexe 3 : Poster présenté à The World Mycotoxin Forum - Vienna.....	117

# Abréviations

---

ACN :	Acétonitrile
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATA :	Aleucie Toxique Alimentaire
CID :	Dissociation Induite par Collision (Collision-Induced Dissociation)
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
DAS :	Diacétoxyscirpénol
DON :	Déoxynivalénol
ENSAIA :	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
FAO :	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FHB:	Fusariose de l'épi ( <i>Fusarium</i> Head Blight)
IARC :	Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer (International Agency for Research on Cancer)
IFBM :	Institut Français de la Brasserie et de la Malterie
JECFA :	Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
LC-MS :	Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
LD50 :	Dose létale 50 (Lethal dose 50)
LOAEL :	Dose la plus faible entraînant l'observation d'effets indésirables (Lowest Observed Adverse Effect Level)
MALDI:	Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases
MS :	Spéctrométrie de masse (Mass Spectrometry)
NIV :	Nivalénol
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PMTDI :	Dose provisoire journalière acceptable (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake)
ppb	Partie par Billions
ppm :	Partie par millions
SPE	Extraction en Phase Solide (Solid Phase Extraction)
TFA :	Acide trifluoroacétique (TriFluoroacetic Acid)
TOF :	Temps de vol (Time Of Flight)
UE :	Union Européenne
USA :	Etats-Unis d'Amérique (United States of America)
WHO :	World Health Organization
YM :	Yeast and Malt extracts medium

# Introduction générale

---

Le genre *Fusarium* est associé à de nombreuses phytopathologies et est aussi responsable de la production de mycotoxines pouvant contaminer l'alimentation humaine et animale. Les conséquences sanitaires peuvent être dramatiques si la prise en charge est tardive ou en fonction des doses mises en cause. L'importance de l'identification des *Fusarium* intervient dès la culture au champ ou lors du stockage, mais cela entraîne le prélèvement d'échantillons complexes avec la possibilité d'une co-infection par plusieurs souches (*Fusarium* et autres) et la présence de matrices complexes. Des distinctions sont nécessaires entre les espèces elles-mêmes, en fonction de la pathogénicité, mais aussi des mycotoxines qu'elles sont susceptibles de produire et qui pourraient se retrouver dans l'alimentation. En effet, les mycotoxines nécessitent aujourd'hui une attention particulière en raison des problèmes qu'elles peuvent engendrer. Nombreuses sont celles qui résistent aux différents procédés de transformation, comme, par exemple, dans le domaine de la brasserie. Comme indiquent leurs noms, elles sont toxiques aussi bien pour les végétaux, que pour les animaux et les humains. Elles sont aussi un risque pour la santé publique par leur accumulation dans les denrées alimentaires.

Les *Fusarium* sont retrouvés, de plus en plus fréquemment, dans les cultures, notamment céréalières, du fait d'une conjonction de changements climatiques et d'utilisation déraisonnée de produits phytosanitaires. Les conséquences économiques et sanitaires sont aujourd'hui non négligeables, d'autant plus qu'ils sont, aujourd'hui, considérés comme des pathogènes émergents au niveau hospitalier et associés à un taux de mortalité élevé. Par ailleurs, leur potentiel à produire des métabolites secondaires toxiques, ou mycotoxines, incite à leur porter une attention particulière. Qui plus est, il existe bien souvent un fort décalage entre la présence de *Fusarium* et celle de mycotoxines. Cet état de fait nécessite, pour une évaluation correcte du risque tant mycologique que toxicologique, d'avoir recours, à la fois, à des techniques analytiques mycologiques et physico-chimiques lourdes à mettre en œuvre, ainsi qu'à du personnel qualifié.

Dans ce contexte, une technique analytique générique, le MALDI-TOF, paraît susceptible d'apporter rapidement des informations pertinentes permettant de gérer efficacement les crises associées aux *Fusarium*. En effet, le MALDI-TOF est déjà largement utilisé pour l'identification bactérienne, tandis que sa capacité à analyser et identifier les biomolécules, et donc potentiellement les mycotoxines, fait partie de sa raison d'être. Ce travail propose, en conséquence, d'évaluer la faisabilité de cette technique analytique pour l'identification rapide de moisissures du genre *Fusarium* et la détection des mycotoxines associées. Pour ce faire, une étude bibliographique permettra, dans un premier temps, de faire un état de l'art sur les impacts sanitaire et économique des moisissures, en général, et du genre *Fusarium*, en particulier. Les techniques existantes d'identification des moisissures et d'analyse des mycotoxines seront ensuite traitées, afin de mettre en exergue la niche analytique qui pourrait être dévolue au MALDI-TOF, et définir une stratégie expérimentale. Un chapitre dédié aux matériels et méthodes mis en œuvre sera ensuite développé avant de décrire, dans un chapitre résultats, les données majeures obtenues suivant trois axes expérimentaux que sont : la mise

au point de la pratique de la technique analytique, l'étude de faisabilité de l'identification d'espèces du genre *Fusarium* et l'étude de la détection de mycotoxines associées. Ces résultats seront ensuite synthétisés afin d'en tirer des conclusions pertinentes et, surtout, des perspectives à court et moyen terme.

# Partie 1 : Etude bibliographique

---

## 1 Le genre *Fusarium*

Les *Fusarium* sont des champignons filamenteux dont le genre « Deutéromycète » a été décrit pour la première fois en 1809 par Link, directeur du Jardin Botanique de Berlin, sous le nom de *Fusisporium*. Ce genre regroupe de nombreuses espèces. Leur nom, *Fusarium*, fait référence à leurs spores en forme de fuseau (lat. *Fusus*), également décrites comme ayant une forme de canoë ou de banane. Dès 1821, Fries, botaniste suédois, décrit le genre *Gibberella*, correspondant à la forme sexuée (téléomorphe) de la majorité des espèces de *Fusarium* (Brown and Proctor, 2013; Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

### 1.1 Identification des *Fusarium*

La taxonomie du genre *Fusarium* est depuis longtemps soumise à controverse avec de nombreuses classifications au cours du temps. En effet, la détermination des espèces a d'abord été effectuée sur leurs caractères morphologiques, avec des observations macro- et microscopiques, puis la classification a été revue en raison des avancées faites grâce à la biologie moléculaire, à la biochimie et l'utilisation de la génétique. Par ailleurs, la mise au point de nouvelles techniques de détection a entraîné des réarrangements dans la classification, mais également la découverte de nouvelles espèces.

En fonction des schémas d'identification suivis, de 9 à plus de 1000 espèces de *Fusarium* sont décrites. Depuis les années 1980, le nombre d'espèces reconnues augmente graduellement, avec aujourd'hui plus de 80 espèces décrites et classées.

#### 1.1.1 Caractéristiques morphologiques

Les caractères primaires ont été les premiers utilisés pour décrire et classer le genre *Fusarium*. Ils correspondent aux aspects macroscopiques des champignons, tels que la forme et la taille des conidies. Les conidies sont les spores assurant la reproduction asexuée des champignons.

Les *Fusarium* sont caractérisés par trois types de spores (Figure 1 ; Jeunot, 2005; Leslie and Summerell, 2006; Nelson et al., 1994) :

- les macroconidies, fusiformes et cloisonnées. Leur présence est la caractéristique majeure qui permet de distinguer le genre *Fusarium* des autres genres. Les différentes formes des macroconidies, leur taille ainsi que les extrémités apicales et basales (arrondies, crochetées, effilées, crantées) sont des éléments centraux pour l'identification des espèces de *Fusarium*. Ils peuvent permettre de différencier des espèces proches.
- les microconidies, petites, septées ou non (0 ou 1 septum, parfois 2 septa pour certaines espèces). Leurs formes sont diverses : fusiformes, ovoïdes, en forme de poire (piriforme) ou de rein. Elles ne sont pas produites par toutes les espèces de *Fusarium*. Leur distinction s'exerce sur les micronidies elles-mêmes, les cellules conidiogènes

sur lesquelles elles sont formées (monophialides ou polyphialides) ainsi que leur arrangement (seule, en chaîne, en bouquet).

- les chlamydospores. Elles ne sont pas présentes chez toutes les espèces. Elles sont formées seules, doublées, en bouquet ou en chaîne. Elles sont terminales ou intercalaires et différenciées par le mycélium ou par les conidies.

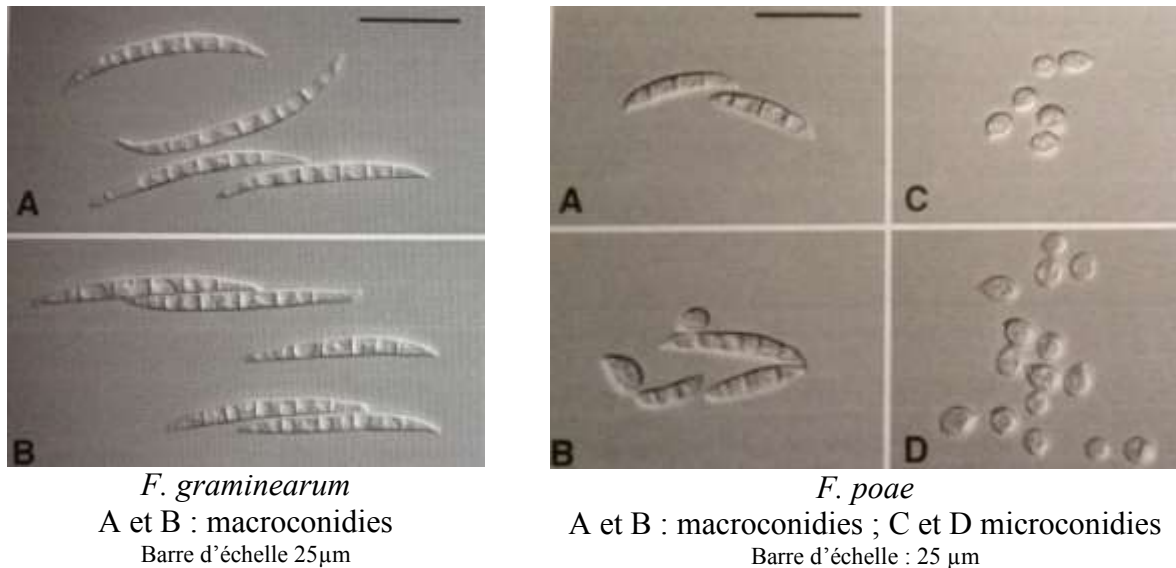


Figure 1 : Caractères morphologiques primaires de deux espèces de *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006)

Par ailleurs, des caractères secondaires ont été décrits et pouvant permettre de discriminer des espèces entre elles. Le caractère le plus notable est la pigmentation. Lors de leur croissance sur boîte de Pétri, les espèces du genre *Fusarium* forment des colonies cotonneuses, de couleur variable (blanc, rouge, pourpre...) selon les espèces (Figure 2). La vitesse de croissance ou les métabolites secondaires sont d'autres caractères secondaires pouvant être pris en considération.

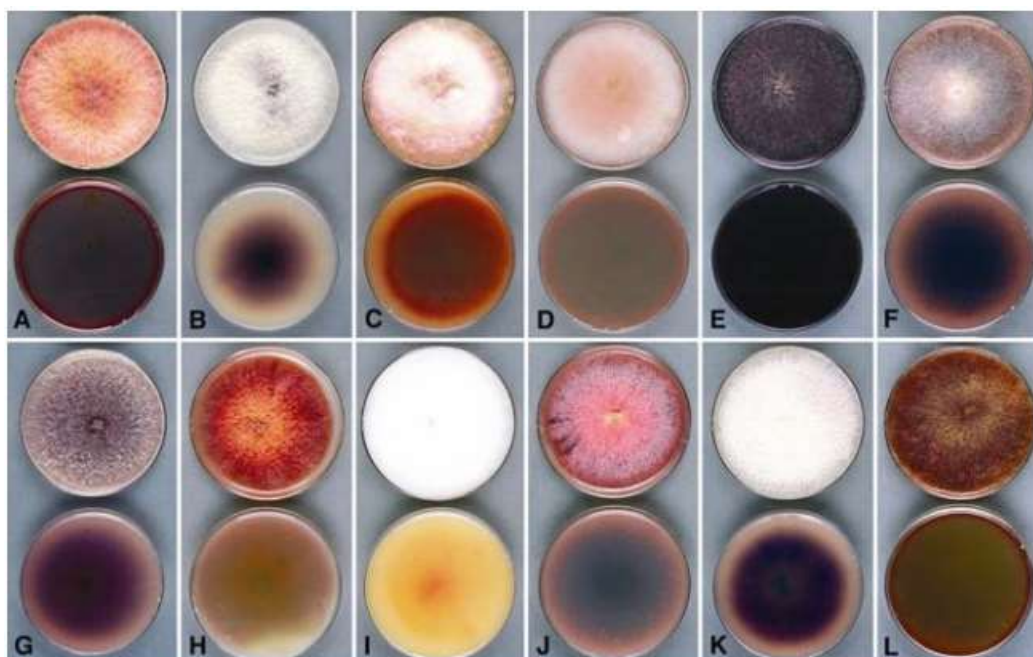


Figure 2 : Morphologie de colonies d'espèces de *Fusarium* sur milieu Potato Dextrose Agar. La boîte du haut de chaque paire correspond au mycélium aérien, celle du bas à la vue de dessous (Summerell et al., 2003).

A, *F. poae*. B, *F. oxysporum*. C, *F. acuminatum*. D, *F. nelsonii*. E, *F. subglutinans*. F, *F. nygamai*. G, *F. pseudonygamai*. H, *F. lateritium*. I, *F. thapsinum*. J, *F. decemcellulare*. K, *F. verticillioides*. L, *F. culmorum*.

### 1.1.2 Classification et taxonomie

Les *Fusarium* sont classifiés de deux façons selon leur forme sexuée ou non (Leslie and Summerell, 2006) :

- Anamorphe lorsque la forme asexuée est connue, appelée aussi forme imparfaite : *Fusarium*
- Téléomorphe lorsque la forme sexuée est connue, appelée également forme parfaite : *Gibberella* ou *Nectria*

Par exemple, *Fusarium graminearum* sous la forme asexuée est retrouvé sous le nom *Gibberella zeae* sous la forme sexuée. Il est à noter que les formes séxuées (téléomorphes) ne sont pas connues pour toutes les espèces comme par exemple *F. oxysporum*.

Selon le Code International de la Nomenclature Botanique, et notamment l'article 59.1, le nom correct à utiliser est le nom de la forme téléomorphe. Cependant, l'utilisation du nom de la forme anamorphe est tolérée sous certaines conditions. Ainsi, pour les espèces de ce genre, le nom « *Fusarium* », soit le nom de la forme anamorphe, est communément utilisé pour faciliter la compréhension (Leslie and Summerell, 2006). Par contre, la classification des deux formes parfaites et imparfaites diffère (Tableau I).

Tableau I : Classification des formes anamorphe et téléomorphe (Carlile et al., 2001; Jeunot, 2005)

Anamorphe → <i>Fusarium</i>	Téléomorphe → <i>Gibberella</i> ou <i>Nectria</i>
Fungi > Deutéromycètes > ordre des Hyphomycètes > famille des <i>Tuberculariaceae</i>	Fungi > Ascomycètes > Sordariomycètes > Hypocreomycetidae > Hypocréales > <i>Nectriaceae</i>

La classification reste variable et changeante. Par exemple, la forme *Fusarium* est souvent classée dans la famille des *Nectriaceae*. Ceci s'explique également par les nombreuses modifications dans la taxonomie.

L'espèce type du genre *Fusarium* est *Fusarium roseum*, décrit par Link en 1809. Puis, Link a effectué sa classification en fonction des espèces responsables des maladies végétales. Ainsi, le principe reposait sur l'énoncé suivant « Une espèce isolée à partir d'une plante individuelle est une espèce fongique individuelle spécifique de l'hôte ». Plus de 1000 espèces ont été alors décrites jusqu'à une revue de la taxonomie par Wollenweber et Reinking dans les années 1930 et la publication de leur ouvrage *Die Fusarien*. Ils reformulent le concept d'espèces et de genres et définissent des recommandations pour l'identification. En effet, celle-ci est indépendante de la plante-hôte dont l'espèce fongique provient, mais se base sur les caractères mycologiques. Ainsi, ces auteurs divisent le genre *Fusarium* en 16 sections, 65 espèces, 77 variétés subspécifiques (55 variétés et 22 formes) (Tableau II). Chaque section est définie par les caractères morphologiques comme la forme des macroconidies ou la pigmentation de la souche (Brown and Proctor, 2013; Leslie and Summerell, 2006; Nelson et al., 1994; O'Donnell, 1996).

Tableau II : Comparaison des systèmes taxonomiques de Snyder et Hansen, Wollenweber et Reinking et Leslie et Summerell (Leslie and Summerell, 2006).

<b>Espèces selon Snyder and Hansen</b>	<b>Sections selon Wollenweber et Reinking</b>	<b>Espèces selon Leslie et Summerell</b>
<i>F. episphaeria</i>	<i>Eupionnotes</i> <i>Macroconia</i>	<i>F. merismoides</i> , <i>F. dimerum</i>
<i>F. lateritium</i> <i>F. moniliforme</i>	<i>Lateritium</i> <i>Liseola</i>	<i>F. lateritium</i> <i>F. verticillioides</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. anthropilum</i> , <i>F. circinatum</i> et d'autres espèces complexes d'espèces <i>Gibberella fujikuroi</i>
<i>F. nivale</i>	<i>Arachnites</i>	N'est plus considéré comme appartenant au genre <i>Fusarium</i> ( <i>Microdochium</i> )
<i>F. oxysporum</i> <i>F. rigidiuscula</i> <i>F. roseum</i>	<i>Elegans</i> <i>Spicarioides</i> <i>Discolor</i> <i>Gibbosum</i> <i>Roseum</i> <i>Arthrosporiella</i>	<i>F. oxysporum</i> <i>F. decemcellulaire</i> <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. pseudograminearum</i> , <i>F. compactum</i> , <i>F. armeniacum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. longipes</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. torulosum</i> , <i>F. heterosporum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. polyphialidicum</i>
<i>F. solani</i>	<i>Martiella</i> <i>Ventricosum</i>	<i>F. solani</i>
<i>F. tricinctum</i>	<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. chlamydosporum</i>

Depuis, de nombreuses variations dans la taxonomie ont été présentées à partir de celle décrite par Wollenweber et Reiking (Figure 3).

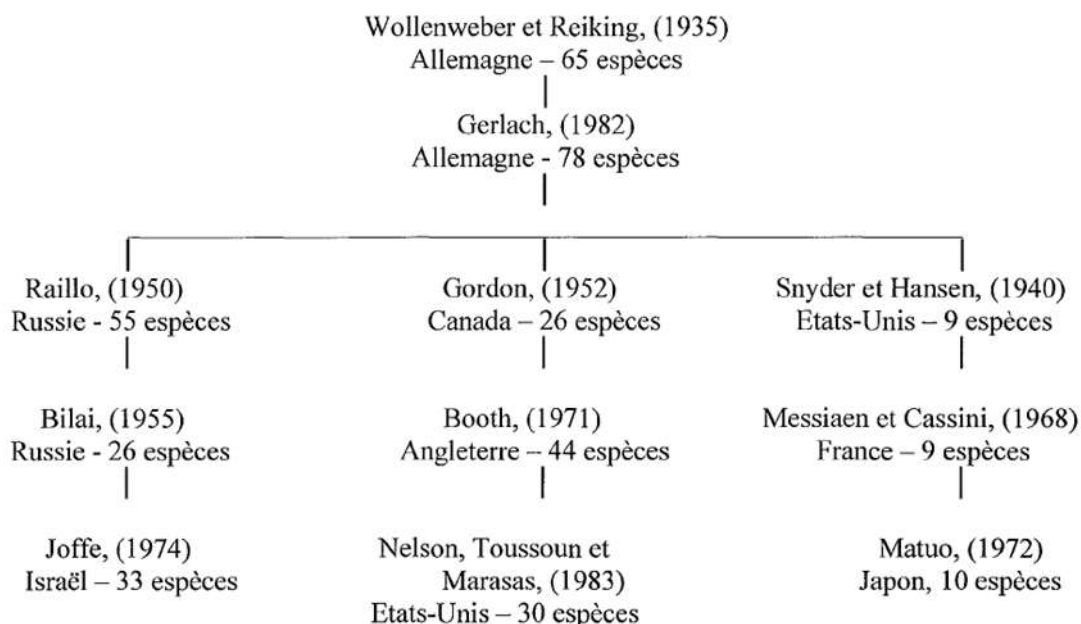


Figure 3 : Principaux systèmes taxonomiques du genre *Fusarium* (Jeunot, 2005; Leslie and Summerell, 2006; Nelson, 1991)

Aujourd'hui, 80 espèces du genre *Fusarium* sont dénombrées, mais les reclassifications sont encore régulières, même encore ces dernières années. En voici quelques exemples :

- *F. langsethiae* a été défini en 2004 après avoir été confondu avec *F. poae*.
- *F. sibiricum* n'a été classé comme tel qu'en 2008. Cette souche avait tout d'abord été assimilée à *F. poae* et *F. langsethiae* en raison de sa morphologie proche.
- *F. moniliforme* a été renommé *F. verticillioides* (Sacc) Nirenberg au cours du 8<sup>th</sup> International *Fusarium* Workshop (UK) en 1998.

Ainsi, en dépit des besoins opérationnels réels et importants, la classification phylogénétique reste encore balbutiante.

Leslie et Summerell, dans leur ouvrage publié en 2006, ont établi un protocole pour identifier les espèces de *Fusarium* dans l'objectif d'une standardisation (Leslie and Summerell, 2006 ; Figure 4).

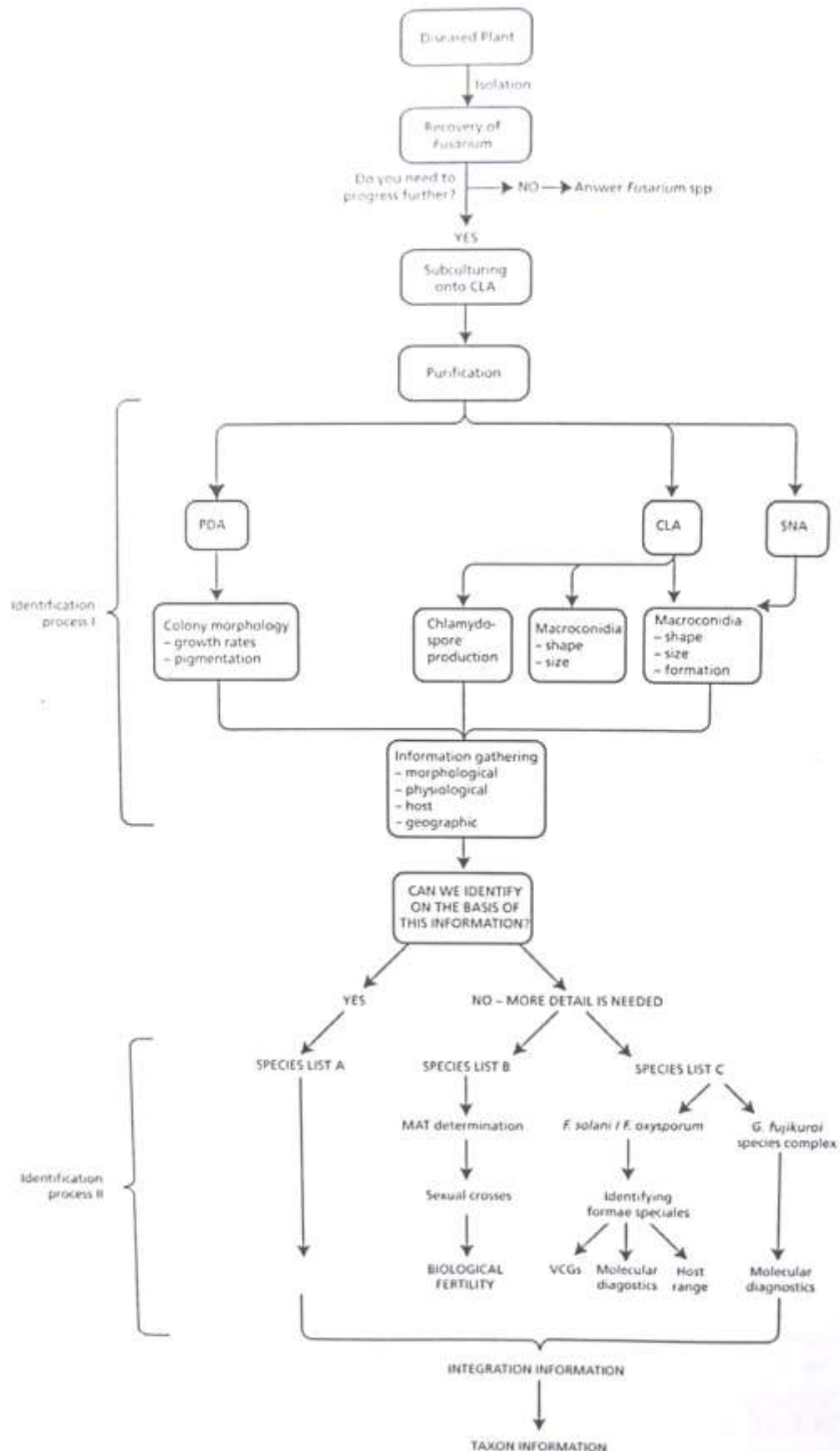


Figure 4 : Protocole d'identification établi par Leslie et Summerell pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006)

## 1.2 Localisation – Habitat - Distribution

Les moisissures de ce genre sont très répandues et elles peuvent être observées sur presque l'ensemble de la surface du globe. Chaque espèce nécessite des conditions environnementales optimales pour sa croissance et sa reproduction. Par exemple, les exigences de croissance des *Fusarium* sont la température, l'alternance jour/nuit ou encore l'activité en eau ( $a_w = 0,88-0,91$ ). Cependant, les *Fusarium* peuvent être retrouvés aussi bien dans des zones tempérées que dans des régions froides, tropicales ou subtropicales (Smith and Moss, 1985). Ces moisissures peuvent être isolées dans la plupart des sols, des racines et dans les eaux, comme, par exemple, dans les réseaux d'adduction urbains. C'est ainsi que des études ont montré la présence d'espèces de *Fusarium* dans les circuits d'eau de certains CHU comme à Dijon et à Nancy (Sautour et al., 2015).

La présence d'une espèce de *Fusarium* n'est pas restreinte à une seule région ou à un type de culture (céréales, arachides...). La distribution et la prédominance de ces espèces pathogènes sont déterminées par la plante-hôte, la région et les conditions climatiques (température, humidité, durée, intensité d'ensoleillement, photopériode, pression atmosphérique...). En effet, selon les conditions climatiques, l'émergence d'une espèce ou d'une autre est observée. En raison de l'évolution climatique mondiale aujourd'hui, il est possible que des espèces émergent dans des régions où elles n'étaient pas ou peu retrouvées précédemment. Ce phénomène suit le principe de la dynamique des populations.

Ces nouvelles espèces émergentes peuvent avoir des conséquences économiques importantes, mais également sanitaires.

## 1.3 Pathogénicité des *Fusarium*

Les *Fusarium* touchent aussi bien le règne végétal que le règne animal. Les effets sont divers selon l'espèce affectée et peuvent être directs ou indirects.

### 1.3.1 Pathogénicité pour les végétaux

Dès 1930, les *Fusarium* ont été associés à des toxicoses sur des grains humides dans les fermes. Aujourd'hui, 81 des 101 plantes présentant une importance économique sont associées à une maladie à *Fusarium*. *F. graminearum* et *F. oxysporum* sont respectivement classés 4 et 5<sup>ème</sup> du point de vue des champignons pathogènes pour les plantes en raison de leur prédominance et de leur potentiel mycotoxinogène. Les trois premiers champignons du classement, réalisés par un consortium de pathologistes en association avec le journal « Molecular Plant Pathology », sont : 1. *Magnaporthe oryzae*, 2. *Botrytis cinerea*, 3. *Puccinia* spp (Dean et al., 2012).

Les infections à *Fusarium* sont communément nommées par le terme générique « fusarioses ». Cette maladie des céréales dites « à petits grains » est présente partout dans le monde. Elle engendre des pertes économiques très importantes. Ainsi, en 2011, il est estimé qu'elle a entraîné une perte de 2,7 milliards de dollars dans les états du centre et du nord des USA (Gautam, 2011).

L'impact de la maladie sur la plante se manifeste de deux manières :

- soit par une dégradation de la tige ce qui empêche les nutriments et l'eau d'atteindre le grain et de le rendre mature, d'où la baisse de rendement ;
- soit par affaiblissement du tissu des plantes entraînant une perte du port de celles-ci et donc une mauvaise récolte.

La contamination des plantes peut être de deux types :

- Endogène : si la semence est infectée avant plantation ;
- Exogène : si l'infection se fait à partir du sol ou d'un vecteur naturel :
  - o Origine biotique : oiseau ou insecte transportant des spores ;
  - o Origine non biotique : vent, pluie, mauvaises pratiques agricoles... qui permettent la dissémination des spores.

L'infection d'origine biotique est d'autant plus importante que les *Fusarium* sont capables de produire des composés volatils qui attirent les oiseaux ou les insectes, qui vont ensuite disséminer les spores et attaquer physiquement la plante, facilitant sa colonisation.

Pour les plantes, trois principaux types de fusariose sont connus :

- « Seedling blight » : fusariose des semences ;
- « Foot Rot » : fusariose du collet ;
- « Head Blight » : fusariose de l'épi, principalement sur l'orge et le blé.

Le *Fusarium* Head Blight (scab) ou fusariose de l'épi (Figure 5) peut causer d'importantes pertes au niveau des récoltes et/ou une diminution de leur qualité et a déjà entraîné des millions de dollars de pertes. Cette fusariose est généralement provoquée par *F. graminearum* et *F. culmorum*. Cependant, sur l'orge, elle peut aussi être causée par *F. poae* et *F. avenaceum*. Cette maladie est favorisée par des périodes prolongées (48 à 72h) d'humidité élevée associées à des températures élevées (24°C à 30°C). Si l'humidité persiste plus de 72h, la maladie peut apparaître même en cas de températures plus froides. Il existe des traitements fongicides azolés, tels que le Prothioconazole<sup>®</sup>, possédant une activité locale et permettant de diminuer la fusariose et la production associée de la mycotoxine DON (McMullen and Stack, 2011).

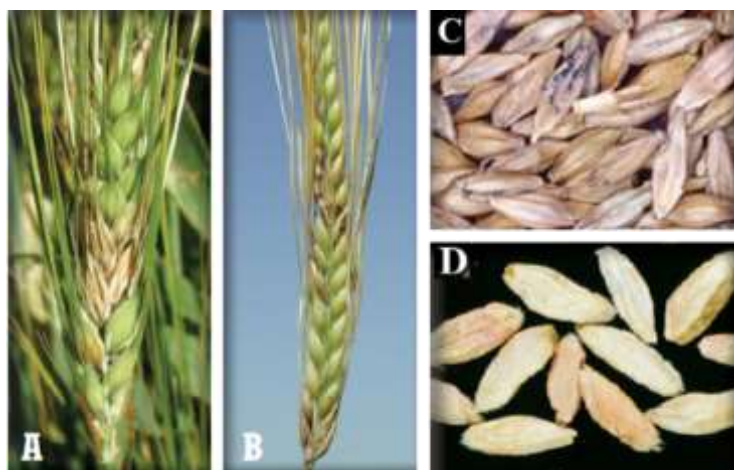


Figure 5 : Symptômes de la fusariose sur céréales : épis d'orge avec des grains fusariés (A et B), grains d'orge fusariés (C) et grains de blé ridés avec une décoloration rosâtre (D) (McMullen and Stack, 2011)

Un exemple de fusariose importante est la crise de la banane due à une sous-espèce de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dans les années 1960. La Panama disease of banana a eu un impact économique et sociologique dévastateur pour les agriculteurs et les communautés dont la vie repose sur ces cultures (Leslie and Summerell, 2006; Ploetz, 2000; Stover, 1990).

### 1.3.2 Impact chez l'homme et l'animal

Les espèces du genre *Fusarium* sont connues pour être des pathogènes de l'homme, ainsi que d'animaux principalement domestiques ou d'élevage. *F. oxysporum* et *F. solani* sont les deux espèces majoritairement impliquées dans les pathologies humaines et animales, bien que beaucoup d'autres espèces soient également isolées.

Une mycose est une infection rare chez le sujet sain. Elle dépend généralement de la pathologie sous-jacente, du niveau d'immunosuppression et des traitements associés (Ripert, 2013). Les *Fusarium* sont considérés comme des agents fongiques opportunistes émergents chez les patients immunodéprimés. Ils sont responsables de la fusariose, une maladie mortelle, dont le taux de mortalité peut atteindre près de 70% (Leslie and Summerell, 2006).

Les effets chez l'homme sont divers. Bien que rares, les infections à *Fusarium* retrouvées chez les immunocompétents sont principalement des pathologies superficielles comme des kératites, notamment chez les porteurs de lentilles de contact, des onyxis des mains ou des pieds avec ou sans périonyxis, ou, plus rarement, des mycétomes. Les patients immunodéprimés sont touchés par des infections invasives et disséminées à *Fusarium*. Des endocardites, des péritonites, des arthrites et des abcès cérébraux peuvent aussi être diagnostiqués. Les *Fusarium* sont également des colonisateurs des brûlures étendues, surtout si les brûlures touchent plus de 50% de la surface corporelle. Lors d'une revue de la littérature, il a été estimé que le taux d'incidence d'une fusariose disséminée était de 6 cas pour 1000 greffes de cellules souches hématopoïétiques. Chez les patients cancéreux, les infections à *Fusarium* spp sont retrouvées en 2<sup>ème</sup> position après *Trichosporon* comme pathogènes fongiques inhabituels (Brown and Proctor, 2013; Bullock and Khamis, 2010; Gangneux and Drogoul, 2008; Ripert, 2013).

Concernant le traitement en cas d'infection, il faut savoir que les *Fusarium* présentent une mauvaise sensibilité aux antifongiques. Lors d'une kératite à *Fusarium*, un collyre à l'amphotéricine B ou à la natamycine, de la classe des polyènes, sont les traitements de choix. Dans le cas d'une infection systémique, il est préconisé de favoriser le voriconazole, antifongique triazolé à large spectre, ou l'amphotéricine B, macrolide polyène. Les *Fusarium* sont peu sensibles aux antifongiques de la classe des échinocandines (Ripert, 2013).

Chez l'animal, un parallèle peut être fait avec les maladies retrouvées chez l'homme. Par exemple, les animaux, et plus spécifiquement les chevaux, peuvent être atteints de kératites à *Fusarium*. Les infections sont parfois sévères et invasives, même chez les animaux immunocompétents. En effet, il a été montré que *F. solani* est un pathogène virulent chez les souris immunocompétentes, provoquant 100% de mortalité sur cinq lots de 20 souris testées (Brown and Proctor, 2013; Mayayo et al., 1999).

### 1.3.3 Effets indirects

Les *Fusarium* peuvent également avoir un effet toxique indirect aussi bien chez les plantes que chez l'homme et les animaux. Par exemple, ces champignons peuvent interagir directement avec les plantes et avoir une action pathogénique, symbiotique ou endophyte. Ainsi, les phytoalexines sont des métabolites végétaux avec une activité antimicrobienne et sont produites en réponse à une invasion microbienne des tissus végétaux. Par exemple, l'ipoméamarone est produite par la patate douce (*Ipomoea batatas*) en réponse à un dommage causé par une moisissure. L'ipoméamarone est elle-même hépatotoxique, mais elle peut également être dégradée par *F. solani* et former de l'1-ipoméol qui peut causer des œdèmes du poumon chez le bétail (Moss, 1996 ; Figure 6).

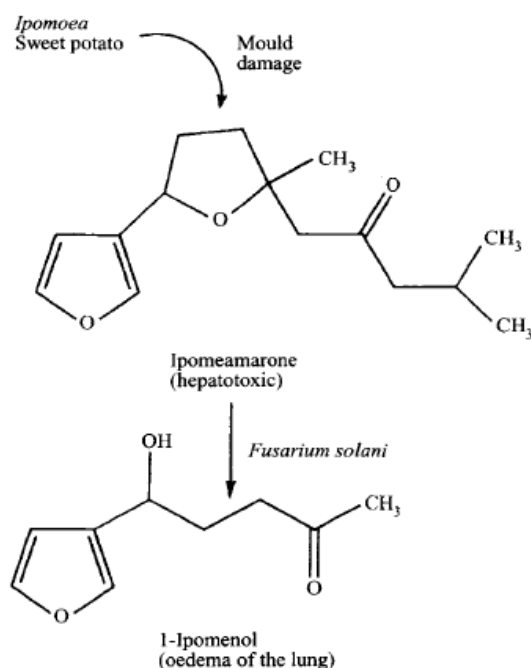


Figure 6 : Interactions entre la patate douce et les moisissures (Moss, 1996)

## 1.4 Conclusion

Les infections à *Fusarium* entraînent des maladies importantes avec un impact économique et sanitaire non négligeable. D'une part, ces contaminations sont responsables d'une diminution des rendements de culture et d'un déclassé des produits agricoles. Dans le cas d'une récolte à destination de l'alimentation humaine trop fortement contaminée, celle-ci sera, par exemple, déclassée dans les domaines de la nutrition animale ou de la cimenterie avec des marges beaucoup plus faibles pour les agriculteurs. L'impact économique est alors important pour le secteur agricole.

D'autre part, ces champignons sont des pathogènes importants, puisque la fusariose peut avoir des conséquences graves et irréversibles en provoquant jusqu'à la mort. Une vigilance est d'autant plus nécessaire que les traitements antifongiques sont souvent inefficaces. Par ailleurs, ces moisissures sont responsables de la production de mycotoxines, des métabolites secondaires, lorsque les conditions environnementales sont réunies et qui présentent un risque pour la santé puisqu'elles sont hautement pathogènes.

## 2 Mycotoxines

### 2.1 Introduction

Le terme mycotoxine provient du grec « mycos » signifiant champignon et du latin « toxicum » pour poison. Ainsi, les mycotoxines sont des substances chimiques toxiques produites par certaines moisissures, notamment lorsque celles-ci se développent sur des denrées alimentaires, telles que les céréales (Quillien, 2002).

Historiquement, l'ergotisme, dû à *Claviceps purpurea*, est une des plus anciennes mycotoxicoses connues, puisqu'elle a notamment sévi entre les VIII<sup>ème</sup> et XVI<sup>ème</sup> siècles. Cependant, l'étude de ces mycotoxines n'a débuté que dans les années 1960 avec la découverte des aflatoxines produites par *Aspergillus flavus*, responsable de la mort de près de 100 000 dindes près de Londres (Bennett and Klich, 2003; Parent-Massin et al., 2013).

Selon la définition de l'ANSES, ex-AFSSA, « les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. » Leur biosynthèse n'est pas nécessaire aux fonctions premières que sont la croissance et la reproduction (Desjardins, 2006). Ce sont des composés naturels et de faible masse moléculaire. Pour être considérées comme mycotoxines, elles doivent être toxiques lorsqu'ingérées en faible concentration et produites par les moisissures/champignons filamenteux. Les principaux producteurs de mycotoxines sont *Fusarium* spp au champ, *Aspergillus* spp, et *Penicillium* spp dans les produits de stockage (Bennett and Klich, 2003). Les mycotoxines sont retrouvées fixées au niveau de la paroi des conidies ou excrétées dans le milieu contaminé, tel que les aliments ou l'eau (Pinel et al., 1998).

Il est à noter qu'une même mycotoxine peut être sécrétée par plusieurs espèces de champignons et, à l'inverse, un champignon peut sécréter plusieurs mycotoxines. Aussi, la présence d'un champignon producteur de mycotoxines n'est pas toujours synonyme de la présence de celles-ci et un champignon responsable de la production de mycotoxines peut être absent de la denrée alimentaire, alors que la/les mycotoxines persistent (Parent-Massin et al., 2013).

La majeure difficulté avec les mycotoxines est qu'elles ne possèdent pas de structures chimiques communes, d'où les nombreuses recherches et projets en cours ces dernières décennies. Il existe différentes familles avec des degrés de toxicité variables. Pour évaluer le risque, deux types d'analyses simultanés sont nécessaires : microbiologique et mycologique. De ce fait, les dangers dus à la présence de mycotoxines sont souvent méconnus et sous-estimés (Parent-Massin et al., 2013; Steyn, 1995).

## **2.2 Conditions de production – Conditions environnementales**

Deux types de facteurs sont responsables de la production et de la dissémination des mycotoxines : les facteurs biotiques et les facteurs abiotiques.

### **2.2.1 Facteurs abiotiques**

La production de mycotoxines par les moisissures est fortement dépendante des conditions climatiques, notamment de la température et de l'humidité (rapportée à l'activité en eau), mais aussi des nutriments présents. En effet, diverses conditions doivent être réunies pour entraîner la production de fusariotoxines : le climat, la nature du substrat, les pratiques agronomiques, le conditionnement des produits, l'utilisation de produits fongicides, les facteurs environnementaux. Chaque espèce a une température optimale de croissance propre, d'où une large dispersion géographique des mycotoxines (De Boevre et al., 2012; Pinel et al., 1998; Yazar and Omurtag, 2008).

La température optimale moyenne de production est comprise entre 20 et 30°C. L'humidité du sol influence également la production et la présence de mycotoxines. Il est estimé que la production est favorisée par une humidité élevée ( $a_w > 0,93$ ). L'impact de la composition gazeuse des sols est également important. Une diminution de la concentration en  $O_2$  entraîne une diminution de la production de mycotoxines et une augmentation de la concentration en  $CO_2$  a un effet dépresseur sur la culture.

La présence d'une mycotoxine dans un lot peut résulter d'une contamination au champ ou post-récolte. La contamination au champ intervient généralement dans des conditions chaudes et humides en climat tropical et subtropical ou fraîches et humides en climat tempéré, en l'absence de fongicide. Dans le cas d'une contamination post-récolte, la mycotoxine peut avoir été produite en raison de mauvaises conditions de récolte ou de stockage avec une forte humidité (Parent-Massin et al., 2013).

Ainsi, la répartition géographique tant des moisissures que des mycotoxines peut être très hétérogène et variable d'une année à l'autre, comme le montre le Tableau III.

Tableau III : Inventaire mycologique réalisé entre 2002 et 2011 sur des témoins non traités pour des tests de fusariose par Arvalis-Institut du végétal (Arvalis-Institut du végétal, 2002)

Année	mycotoxines	2002	2002	2003	2003	2004	2005	2007	2008	2009	2010	2011
Lieu		Crécy la chapelle-77	Crisenoy-77	Maisoncelles-en Brie-77	Crisenoy-77	Maisoncelles-en Brie-77	Crisenoy-77	Vinantes-77	Bulhon-78	Le Mesnil Aubry-95	Bulhon-78	Maisoncelles-en Brie-77
Variété / précédent		Apache / maïs	Orvantis / maïs	Caphorn / betteraves	Apache / maïs	Caphorn / betteraves	Allister / maïs	Apache / maïs	Bastide / maïs	Altigo / maïs	Altigo / maïs	Apache / maïs
<i>Fusarium graminearum</i>	DON – NIV – ZEA	7%	9%	6%	3,2%	0%	1%	5%	10%	0%	0%	0%
<i>Fusarium culmorum</i>	DON – NIV – ZEA	5%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	0%	1%	0%	0%
<i>Fusarium avenaceum</i>	moniliforme	6%	11%	0%	0%	1%	0%	2%	3%	0%	0%	0%
<i>Fusarium tricinum</i>		0%	0%	1%	0%	1%	0%	6%	1%	1%	1%	1%
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisin	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Fusarium proliferatum</i>	fumonisin	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Fusarium langsethiae</i>	T2 – HT2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	T2-HT2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Fusarium poae</i>	NIV – T2 – HT2	1%	1,2%	1%	6%	1%	0%	1%	0%	13%	2%	0%

Il faut savoir que, théoriquement, plus le taux de contamination par une espèce du *Fusarium* spp est élevé, plus le risque toxique associé est important.

## 2.2.2 Facteurs biotiques

La production de mycotoxines peut également être influencée par des facteurs de stress pour la plante, tels que des dégâts causés par des insectes. Ce phénomène est notamment connu pour la production de fumonisines dans les champs de maïs, puisque la blessure sur la plante entraîne un accès direct des moisissures aux substances nutritives, ce qui leur permet une prolifération plus aisée et une production de mycotoxines. Les prédateurs tels que les acariens, les insectes ou les oiseaux, sont alors des vecteurs de spores et, donc, de dissémination des moisissures. Selon la mycoflore présente, une compétition peut également se créer entre les espèces mycologiques et favoriser un stress et donc la production de mycotoxines.

Pour permettre la diminution des lésions, les agriculteurs utilisent des fongicides, pour une action directe, et des insecticides, pour une action indirecte, ce qui entraîne une diminution des contaminations et de la production de mycotoxines (Ripert, 2013).

## 2.3 Voies d'absorption chez l'homme et l'animal

Trois voies d'absorption sont majoritairement impliquées dans les infections à toxines de *Fusarium* : l'inhalation, l'ingestion d'aliments contaminés ou, plus rarement, le contact en cas de plaie.

Dans le milieu professionnel, la voie aéroportée est la principale et, presque uniquement, la seule cause de contamination. Des publications incriminent les mycotoxines comme facteurs déclenchants ou aggravants d'alvéolites allergiques, de fièvres d'inhalation, de cancers bronchopulmonaires, hépatiques et rénaux... L'activité physiopathologique des mycotoxines dépend de facteurs multiples, susceptibles de modifier ou de potentialiser leurs effets comme la nature chimique et la concentration en mycotoxines, la durée d'exposition, la sensibilité individuelle ou d'espèce (Pinel et al., 1998).

Lors de l'absorption de particules organiques et de poussières contaminées par des mycotoxines, ces dernières sont alors solubles dans l'eau pulmonaire des alvéoles et passent dans la circulation. Ce type de contamination n'est cependant pas contagieux.

Pour les agriculteurs, le risque de contamination par inhalation dans leur milieu de travail prédomine, notamment lorsque les toxines sont présentes dans la poussière de céréales. Par exemple, lors des récoltes, les poussières de maïs infestées peuvent être inhalées en sortie de moissonneuse batteuse.

## **2.4 Facteurs de risque pour l'homme**

Les effets d'une même mycotoxine sont variables selon la mycotoxine incriminée, mais ils dépendent également des conditions individuelles de chaque personne.

Ainsi, les symptômes de la mycotoxicose dépendent de l'exposition (durée et concentration), de l'âge, de l'état de santé (infections virales, parasitaires ou bactériennes simultanées, stress), du sexe de l'individu exposé et de l'état de susceptibilité génétique individuelle. Le régime alimentaire et l'interaction avec d'autres substances toxiques peuvent également être impliqués dans la sévérité de la mycotoxicose. Ainsi, une carence vitaminique, un manque calorique, l'abus d'alcool ou une maladie infectieuse peuvent être autant de causes aggravant les symptômes causés par la toxine (Pinel et al., 1998; Steyn, 1995).

Il faut savoir également que l'immunodépression est un facteur de risque majeur de mycotoxicose, notamment suite à une neutropénie profonde et prolongée ou à une corticothérapie. Les mycotoxines sont également fréquemment isolées chez les personnes brûlées (Ripert, 2013).

## **2.5 Les fusariotoxines**

Les mycotoxines produites par les moisissures du genre *Fusarium* sont nombreuses et variées et elles sont regroupées sous le terme de fusariotoxines. Les formes et familles identifiées aujourd'hui sont les trichothécènes, les fumonisines, la zéaralénone, la moniliformine, la beauvericine et l'équisétine. Elles contaminent majoritairement les céréales et, par voie de conséquence, les produits en dérivant.

En Europe, les fusariotoxines, les plus fréquemment impliquées dans les problématiques de santé animale et humaine, dans la phytopathogénicité, ainsi que dans les baisses de productivité, sont les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone (Placinta et al., 1999). Elles sont sécrétées par diverses espèces (Tableau IV).

Tableau IV : Toxines sécrétées selon différentes espèces

Espèce	Toxines
<i>F. graminearum</i>	Trichothécènes B (DON, NIV et dérivés acétylés), zéaralénone
<i>F. poae</i>	Trichothécènes B (NIV) Trichothécènes A (T2, HT2)
<i>F. tricinctum</i>	Moniliformine, Beauvericine (Trichothécène A)
<i>F. sporotrichioides</i>	Trichothécènes A (T2, HT2)
<i>F. oxysporum</i>	Fumonisines
<i>F. langsethiae</i>	Trichothécène A (T2, HT2)

Les fusariotoxines ont des effets biologiques variés et puissants selon leur structure.

### 2.5.1 Trichothécènes

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par de nombreux *Fusarium* dont les principaux sont *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* et *Fusarium sporotrichioides*. Plus de 190 molécules ont été identifiées comme appartenant à ce groupe de mycotoxines. Dans l'alimentation, les plus fréquemment retrouvés sont le nivalénol (NIV), le déoxynivalénol (DON), les toxines T2 et HT2 et le diacétoxyscirpénol (DAS). Ces toxines sont les plus fortement associées avec des toxicoses chroniques et fatales chez l'homme, ainsi que chez l'animal (Desjardins, 2006; Li et al., 2011; Parent-Massin et al., 2013).

La toxine T2, et sa forme dé-acétylée HT2, sont celles qui ont attiré le plus l'attention ces dernières décennies en raison de leur toxicité, bien qu'elles soient peu détectées en comparaison à d'autres trichothécènes. La toxine T2 a été isolée pour la première fois en 1968 chez *Fusarium tricinctum*, renommé aujourd'hui *Fusarium sporotrichioides*, à partir de maïs moisi en France. Le DON, également appelé vomitoxine du fait des symptômes engendrés, est le trichothécène le plus important en terme d'exposition humaine, mais un des moins toxiques (Desjardins, 2006; Li et al., 2011; Richard, 2007).

#### 2.5.1.1 Structure

Les trichothécènes sont des composés à structure sesquiterpène tricyclique comprenant une fonction époxyde. Ce sont des 12,13-époxytrichothéc-9-ènes caractérisés en outre par un groupement carbonyle en C8 (Desjardins, 2006 ; Figure 7)

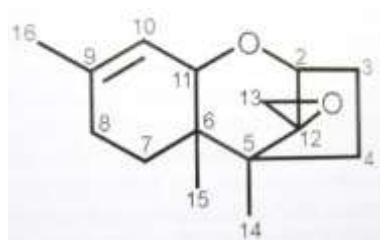


Figure 7 : Structure générale des trichothécènes (Desjardins, 2006)

Cette classe de mycotoxines est divisée en 4 groupes (A à D) selon les fonctionnalités associées. Cette classification a été proposée par Ueno en 1987 (Li et al., 2011 ; Tableau V).

Tableau V : Classification des trichothécènes (Li et al., 2011; Parent-Massin et al., 2013)

Groupe	Caractéristiques	Exemples de mycotoxines
A	Trichothécènes n'ayant pas de fonction cétone en position C8 (e.g., hydroxyle ou ester)	T2, HT2, DAS
B	Fonctionnalité cétone/groupement carbonyle en position C8	DON (et ses dérivés), NIV, fusarénone-X
C	Second cycle époxyde entre C7 et C8 ou entre C8 et C9	Crotocin, baccarin
D	Anneau macrocyclique (pont de molécules de mévalonate substitué) entre C4 et C15	Satratoxines, roridines

Seuls les groupes A et B sont produits par des souches de *Fusarium* spp (Desjardins, 2006; Rocha et al., 2005). Nous nous focaliserons donc sur ces 2 groupes (Figure 8).

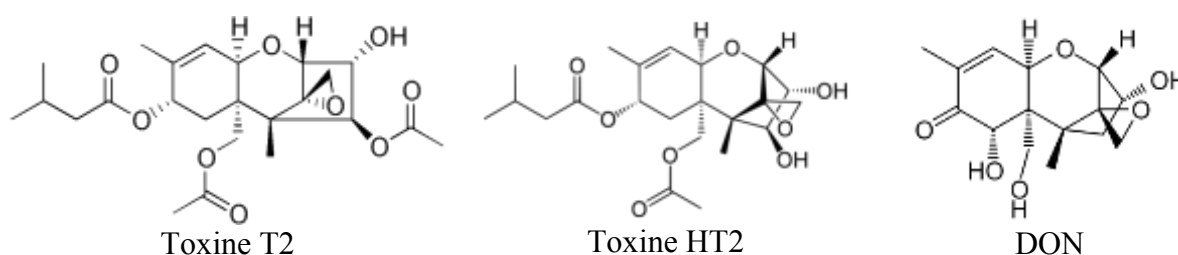


Figure 8 : Structure de 3 trichothécènes : T2, HT2 (Groupe A) et DON (Groupe B) (Moss, 1996)

### 2.5.1.2 Propriétés physico-chimiques

Les trichothécènes sont des molécules non volatiles. Elles sont insolubles dans l'eau mais hautement solubles dans l'acétone, l'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol... Ces molécules sont stables à la lumière, aux UV, à l'air, ainsi qu'à des pH neutres et acides, ce qui implique l'absence d'hydrolyse dans l'estomac après ingestion. Ces mycotoxines ne sont pas détruites par autoclavage, mais elles requièrent un chauffage à 480°C pendant 10 min ou 260°C pendant 30 min pour obtenir une inactivation complète. L'utilisation de solutions d'hypochlorite de sodium (3 à 5%) est également efficace pour les inactiver (Li et al., 2011; Rocha et al., 2005; Wannemacher et al., 1997).

Ainsi, l'élimination de cette famille de mycotoxines, sans dégrader l'aliment contaminé, est difficile une fois celle-ci présente. Le rinçage ou l'élimination des cuticules des grains peut toutefois diminuer le taux de contamination dans les produits alimentaires, le risque n'étant pas supprimé pour autant.

Le pic d'absorption UV de la NIV, l'HT2 et du DON est à 218 nm, mais les limites inférieures de détection ne sont pas satisfaisantes pour un dosage aisé et efficace de ces molécules.

### 2.5.1.3 Biosynthèse

La biosynthèse des trichothécènes s'intègre dans la voie de la synthèse des stérols, dont le précurseur est le farnésyl-pyrophosphate (FPP) (Smith and Moss, 1985). Or les stérols ont un rôle de structure chez les mycètes. Ainsi, la synthèse de mycotoxines interviendrait principalement lorsque la croissance ralentit, car la voie des stérols, suivie initialement pour le métabolisme primaire, bascule vers le métabolisme secondaire.

La voie de biosynthèse débute par une cyclisation sesquiterpénique suivie par 8 oxygénations et 4 estérifications. Cette biosynthèse nécessite également l'expression d'une protéine de transport et un réseau de gènes de régulation. Ainsi, la première étape de cyclisation à partir du FPP est catalysée par la trichodiène synthase. Cette enzyme est régulée par le gène *Tri5*, alors indispensable à la synthèse des trichothécènes (Figure 9 ; Desjardins, 2006; Desjardins and Proctor, 2007).

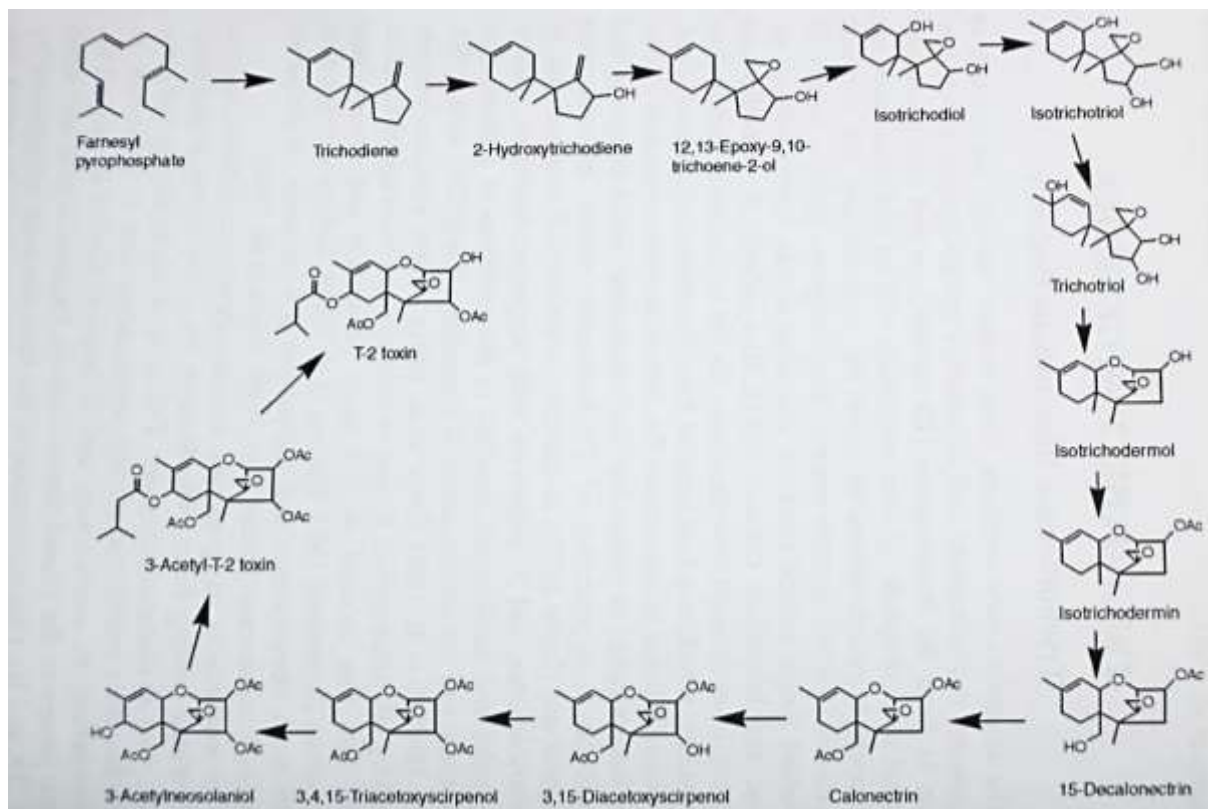


Figure 9 : Voie de biosynthèse de la toxine T2 chez *F. sporotrichioides* (selon Desjardins, 2006)

#### 2.5.1.4 Métabolisme

Le foie est l'organe principal où a lieu le métabolisme des trichothécènes. D'autres tissus sont également capables de métabolisation comme l'intestin, puisque les métabolites peuvent être retrouvés dans les urines et les fèces. Les réactions majeures sont l'hydrolyse, l'hydroxylation, la dé-époxydation et la glucuronoconjugaison (Li et al., 2011; Wannemacher et al., 1997).

Pour les plantes, la glycosylation est le procédé de détoxification mis en œuvre (Brown and Proctor, 2013).

Différentes lignées cellulaires et bactéries de ruminants sont aussi capables de métaboliser les trichothécènes comme la toxine T2. Deux mécanismes peuvent être impliqués (Wannemacher et al., 1997) :

- la dé-époxydation de la toxine en enlevant l'oxygène du cycle époxyde en position C12-C13 en formant une double liaison carbone-carbone ;
- l'oxydation des carbones en position C3' et C4' sur les chaînes isovaléryles.

Par ailleurs, des microorganismes, bactéries et champignons, présentent la capacité de la dégrader la toxine T2 (Tableau VI). Ces microorganismes sont capables de développer des mécanismes pouvant modifier la structure chimique de ces mycotoxines et ainsi en diminuer la toxicité (Sudakin, 2003).

Tableau VI : Moisissures et bactéries de l'environnement capables de détoxifier la toxine T2 (Sudakin, 2003)

Moisissures	Bactéries
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.
<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Blastobacter natatorius</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Rhodotorula</i> sp.	
<i>Ulocladium</i> sp.	

#### 2.5.1.5 Mode d'action biologique

Les trichothécènes agissent par inhibition de la synthèse protéique (Desjardins and Proctor, 2007; Wannemacher et al., 1997). Ils interfèrent avec le site actif de la peptidyl-transférase des ribosomes et entraînent une inhibition non compétitive de l'initiation, l'élongation ou la terminaison des synthèses protéiques. Dans les cellules de mammifères, ces molécules inhibent autant la synthèse d'ARN que d'ADN (Rocha et al., 2005).

Les trichothécènes sont également capables d'induire l'activation prolongée des MAPKs chez les animaux et les plantes, ce qui entraîne la mort cellulaire dans les deux systèmes écologiques (Brown and Proctor, 2013).

#### 2.5.1.6 Toxicologie

La toxicité des trichothécènes est due principalement à la fonction époxyde en 12-13 (Desjardins, 2006; Rocha et al., 2005). La réduction de cette fonction diminue considérablement la toxicité des molécules.

Le nombre et la position des groupes hydroxyles ou des estérifications peuvent également affecter la toxicité des molécules. En effet, cela peut déterminer si la toxine inhibe la synthèse protéique à l'étape d'initiation ou lors de l'étape d'élongation-terminaison (Brown and Proctor, 2013; Desjardins, 2006).

D'après de nombreuses études, il semblerait que les trichothécènes ne soient pas mutagènes. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) a seulement conclu en 1993 à la présence de preuves limitées en faveur d'une carcinogénicité de la toxine T2 chez les animaux (ANSES, 2009; Desjardins, 2006; IARC, 1993).

Bien que plusieurs études aient été menées, il n'existe aujourd'hui aucun traitement contre les intoxications à la toxine T2 ou aux autres trichothécènes.

#### 2.5.1.6.1 Doses

Différentes doses toxicologiques ont pu être déterminées suite à diverses études (Tableau VII). Seuls quelques nanogrammes de toxine T2 suffisent à provoquer les irritations sévères de la peau. La voie d'exposition semble avoir également un impact sur la toxicité et la létalité. Une exposition à des aérosols de toxine T2 peut engendrer une mortalité 10 à 50 fois plus importante que lorsqu'elle est injectée par voie parentérale (Wannemacher et al., 1997). Il n'existe cependant aucun seuil maximal légal concernant les toxines T2 et HT2 dans les aliments. Aujourd'hui, seules des recommandations de doses limites ont été émises, notamment par la Commission Européenne quant à la présence de toxines T2 et HT2 dans les céréales et les produits céréaliers (Commission Européenne, 2013).

Tableau VII : Quelques doses toxicologiques associées aux toxines T2 et HT2 (Ripert, 2013)

Types		Doses
<b>Ingestion quotidienne maximum tolérée</b>		100 ng/kg de masse corporelle (pour la somme T2 + HT2)
		60 ng/kg/j* PMTDI – JECFA/SCF (2001)
<b>LOAEL chez le porc</b>		0,029 mg/kg de masse corporelle/j
<b>LD<sub>50</sub></b>	oral chez la souris	11 µmol/kg de masse corporelle
	embryons de poulet	0,15 nmol/kg de masse corporelle

\* déterminé sur la base des effets hématotoxiques observés chez le porc, en prenant un facteur de sécurité de 500 à partir de la LOAEL.

#### 2.5.1.6.2 Symptomatologie

Selon le groupe auquel appartient la mycotoxine, les trichothécènes ont des effets physiologiques différents (De Boevre et al., 2012) :

- Groupe A : immunotoxicité, cytotoxicité et neurotoxicité ;
- Groupe B : vomissements, perte de poids, manifestations gastrointestinales.

La toxine T2 et sa forme déacétylée HT2 (groupe A) sont deux des trichothécènes les plus toxiques. En effet, ils sont des inhibiteurs de la synthèse protéique et de la fonction mitochondriale. Etant des cytotoxiques importants, ils causent, chez l'homme, des érosions de la peau et des muqueuses, réduisent les lymphocytes, altèrent les défenses immunitaires ainsi que la croissance (De Angelis et al., 2013; Kalantari and Moosavi, 2010; Sudakin, 2003).

Chez les animaux, les effets des trichothécènes sont variables selon l'espèce. Chez les porcins, les premiers signes seront le refus de s'alimenter et donc une perte de poids pouvant, à terme, entraîner la mort. A l'inverse, les volailles sont moins sensibles et les ruminants sont presque insensibles à ces molécules (Ripert, 2013). Ceci s'explique par l'évidence démontrée de la dégradation des mycotoxines par les microorganismes du rumen. La dégradation des trichothécènes peut atteindre jusqu'à 90 voire 100% en utilisant des cultures de protozoaires du rumen des animaux, ce qui permet de les considérer comme la population microbienne la plus importante du rumen impliquée dans la biodégradation de mycotoxines (Hussein and Brasel, 2001).

### 2.5.1.6.3 Maladies spécifiques

#### 2.5.1.6.3.1 L'aleucie toxique alimentaire (ATA)

Cette maladie est connue depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle en Russie et notamment pendant la période 1942-1947, où plus de 10% de la population d'Orenburg (près de la Sibérie) a été mortellement touchée par du millet, de l'orge et du blé ayant passé l'hiver. Ce syndrome a ensuite été nommé aleucie toxique alimentaire en 1943 par le ministre de la santé russe. Plus tard, il a été démontré que l'agent responsable le plus probable était la toxine T2 (Desjardins, 2006; Li et al., 2011; Wannemacher et al., 1997).

Cette maladie n'est ni contagieuse, ni infectieuse et les symptômes sont variés (Moreau, 1974). L'aleucie toxique alimentaire (ATA) cause des lésions nécrotiques de la cavité buccale, de l'œsophage et de l'estomac, ainsi qu'une forte toxicité hématologique (pancytopénie majeure). Suivant les doses reçues, la mortalité est variable et elle peut atteindre jusqu'à 60 voire 80% des personnes contaminées. La maladie se développe le plus souvent entre fin avril et fin juin, ce qui correspond à la période de production de la toxine par *Fusarium*.

L'ATA est divisée en 3 phases (Clauzon, 2009; Nelson et al., 1994; Ripert, 2013; Wannemacher et al., 1997) :

- Les **premiers symptômes** surviennent quelques heures seulement après l'ingestion de l'aliment contaminé. Il se produit alors une réaction inflammatoire, avec une sensation de brûlure au niveau des muqueuses buccopharyngées (bouche, langue, palais, gorge), puis du tractus gastro-intestinal (œsophage, estomac). Après 3 jours, peuvent survenir de la diarrhée, des nausées et des vomissements.
- La **deuxième phase** (stade leucopénique) est asymptomatique et peut durer de 2 à 8 semaines. Durant cette période, une aplasie des systèmes lymphocytaire et hématopoïétique s'installe. D'autres signes hématologiques sont décelables à la fin de cette période comme une leucopénie avec une agranulocytose marquée et une diminution importante du nombre de plaquettes sanguines. Cette phase peut être associée à des perturbations du système nerveux : fatigue, vertiges, maux de tête, palpitations, asthme.  
Si l'ingestion de la toxine est stoppée, les symptômes sont résolutifs dans une durée supérieure à 2 mois.
- Au cours de la **troisième phase** (stade angino-hémorragique), qui dure de 5 à 20 jours, d'autres symptômes graves et d'apparition brutale sont présents, tels qu'une diathèse hémorragique, une angine nécrotique, une agranulocytose totale, une fièvre modérée (39 à 40°C), une hypotonie avec hypotension (8/5), une augmentation du pouls et des ulcères de la peau et des muqueuses, ce qui peut conduire à la mort. 30% des décès sont dus à une sténose de la glotte entraînant la mort par suffocation et strangulation.

#### *2.5.1.6.3.2 Arme biologique*

Nommées pluies jaunes ou « yellow rain », les trichothécènes sont suspectés d'avoir été utilisés comme arme biologique au cours de certaines guerres en Asie du Sud-Est, en Iran, ainsi qu'en Afghanistan pendant les années 70. Bien que leur présence ait été attestée dans les urines et le sang de soldats iraniens, aucune confirmation formelle n'a été apportée. Cependant, suite à une supposition d'attaque avec un nouvel agent chimique au Laos et à Kampuchea, au Cambodge, par l'Union soviétique, des analyses ont été effectuées sur des échantillons de feuilles de la zone d'attaque et il a été retrouvé du nivalénol, déoxynivalénol et de la toxine T2, alors que les espèces productrices sont rares dans cette région. Ce ne sont que des suppositions et les preuves scientifiques sont manquantes (Bennett and Klich, 2003; Desjardins, 2006; Ripert, 2013; Wannemacher et al., 1997).

Cette arme biologique/chimique que constitue ce mélange de mycotoxines est conceptuellement très adaptée à la contre-insurrection, car elle permet, sans avoir à en assumer la responsabilité, de vider de leur population de larges zones géographiques susceptibles ensuite d'être traitées conventionnellement à peu de frais.

Par rapport à ce concept d'utilisation, l'« avantage » des trichothécènes réside dans leur rapidité d'action quasi immédiate par contact et leur possibilité de devenir létaux en cas d'exposition à quelques milligrammes de T2. La population est également touchée avec des irritations au niveau de la peau, des yeux... L'orientation des populations touchées vers les services de santé permet, en outre, d'en assurer éventuellement un suivi biométrique ou génétique. L'utilisation militaire des trichothécènes est donc fondamentalement contraire aux traités internationaux, mais extrêmement difficile à établir.

#### *2.5.1.7 Devenir dans les produits transformés*

Les matières premières les plus communément contaminées sont les produits céréaliers, tels que le maïs, le blé et l'avoine. La toxine T2 contamine environ 11% des céréales, à des taux pouvant atteindre 100 µg/kg pour le riz (Li et al., 2011; Ripert, 2013).

Les procédés de transformation de l'avoine réduisent les concentrations de T2 et d'HT2 dans les produits dérivés de cette céréale pour la consommation humaine. Le procédé le plus efficace connu aujourd'hui pour diminuer la toxicité est la décortication (Pettersson, 2008; Pettersson et al., 2011). Cependant, la contamination est multipliée par un facteur de 3 à 4 dans les coproduits, utilisés dans l'alimentation animale à l'image du fourrage (Pettersson, 2010).

#### *2.5.1.8 Utilisation*

Au cours des années 1970, les trichothécènes ont été étudiés pour leur potentielle activité anticancéreuse chez l'homme. Les études menées par le National Cancer Institute ont été conduites jusqu'à la phase II. Cependant, elles ont été stoppées en 1982 à ce stade en raison de bénéfices faibles ou inexistantes (Desjardins, 2006; Wannemacher et al., 1997).

### 2.5.2 Zéaralénone

La première description des symptômes cliniques provoqués par cette toxine a été effectuée en 1927 par Buxton, bien que la toxine elle-même n'ait pas été identifiée. En effet, elle n'a été nommée et décrite structurellement qu'en 1966 par Urry *et al.* (Desjardins, 2006; Gaumy et al., 2001). La zéaralénone est produite principalement par *Fusarium graminearum*, mais aussi *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* et *Fusarium crookwellense*, dans les champs de blé et de maïs, mais aussi dans les champs d'orge et d'avoine. La synthèse de la mycotoxine dépend des conditions environnementales, puisqu'elle est favorisée par une humidité élevée et une faible température. Elle est majoritairement produite dans les zones tropicales et/ou tempérées (Magan and Olsen, 2004; Ripert, 2013).

#### 2.5.2.1 Structure

La zéaralénone est une lactone mono- et macrocyclique dérivée de l'acide résorcyclique (zéaralane), d'où son nom qui provient de *zea*-*ral*-*en*-*one* pour *Gibberella zeae* - resorcylic acid lactone (RAL) - double liaison en C1'-C2' - cétone en C6' (Figure 10). La zéaralénone existe naturellement sous la forme *trans* (Desjardins, 2006; Gaumy et al., 2001; Summerell et al., 2001).

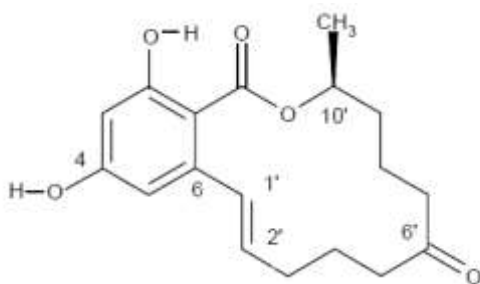


Figure 10 : Structure chimique de la zéaralénone (ANSES, 2009)

La zéaralénone et ses dérivés sont considérés comme des myco-œstrogènes non-stéroïdiens de par leur ressemblance avec des œstrogènes, tels que le 17- $\beta$ -œstradiol. Son action toxique a lieu par fixation aux récepteurs à œstrogènes (De Boevre et al., 2012; Desjardins, 2006).

Elle a pour formule chimique  $C_{18}H_{22}O_5$  et une masse moléculaire de  $318,36 \text{ g.mol}^{-1}$ .

#### 2.5.2.2 Propriétés physico-chimiques

Pure et à température ambiante, la zéaralénone se présente sous forme de cristaux blancs. La présence de la lactone macrocyclique a pour conséquence la très faible solubilité de cette molécule dans l'eau (20 mg/l à 25°C). Elle est également insoluble dans le sulfure et le tétrachlorure de carbone. Elle est faiblement soluble dans les solvants apolaires tels que l'hexane, l'heptane ou l'éther de pétrole de par ses substituants alcool et cétone. La solubilité de cette mycotoxine augmente avec la polarité des solvants : benzène, chloroforme, acétate d'éthyle, acétonitrile, acétone... (Gaumy et al., 2001).

Comme la majorité des mycotoxines, la zéaralénone est thermostable (Summerell et al., 2001). En effet, elle possède un point de fusion élevé, à environ 164-165°C, et donc résiste fortement aux divers procédés de transformation alimentaire. Par exemple, 60% de la zéaralénone persiste après la cuisson du pain et 80% lors de la production de biscuits (Magan and Olsen, 2004). Elle est également retrouvée dans la bière, malgré les procédés thermiques associés à la brasserie (touraillage, brassage, ébullition, pasteurisation).

La zéaralénone absorbe la lumière ultraviolette aux longueurs d'onde 236 nm, 274 nm et 316 nm. Le maximum d'absorption à 274 nm est le plus caractéristique et est donc le plus souvent utilisé pour la détection UV. Elle est également fluorescente et apparaît de couleur bleu-vert après une excitation à 360 nm et d'un vert plus intense à 260 nm (ANSES, 2009; Gaumy et al., 2001).

### 2.5.2.3 Biosynthèse

La biosynthèse de la zéaralénone implique la voie de l'acetate polymalonate. En effet, la synthèse par cette voie conduit à la formation d'un polycétide qui, par deux cyclisations internes et la conversion du groupement hydroxyle en cétone, aboutit à la mycotoxine (Kim et al., 2005; Magan and Olsen, 2004; Smith and Moss, 1985; Summerell et al., 2001; Figure 11).

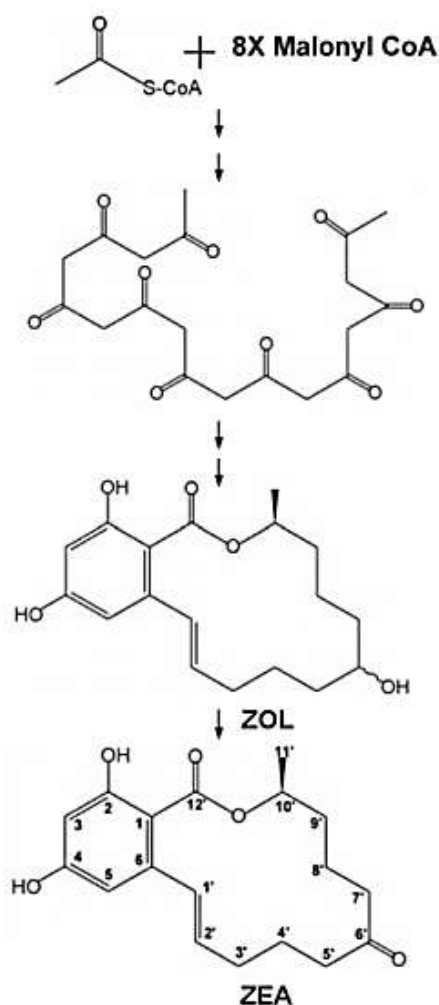


Figure 11 : Proposition de voie de biosynthèse de la zéaralénone (Kim et al., 2005)

#### 2.5.2.4 Métabolisme

La toxine est métabolisée rapidement par le foie en deux isomères du zéaralénol (Figure 12), sous l'action de la 3- $\alpha$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase. La dégradation se fait *in vivo* par la réduction du groupement cétone en C6', ce qui conduit à la formation de ces 2 isomères. La proportion entre les deux isomères formés dépend de la variabilité interspécifique d'espèces. L' $\alpha$  et le  $\beta$ -zéaralénol peuvent ensuite être glucuronoconjugués, notamment chez les ovins, en  $\alpha$  et  $\beta$ -zéaralanol qui ont le même potentiel œstrogénique que le 17- $\beta$ -œstradiol, mais cette seconde biotransformation semblerait toutefois marginale (Figure 12 ; Gaumy et al., 2001).

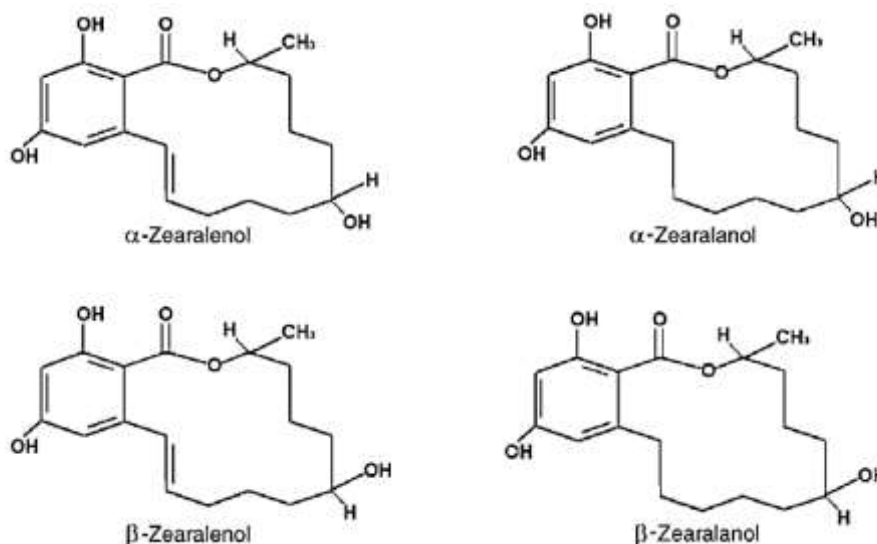


Figure 12 : Structure chimique des métabolites de la zéaralénone (Magan and Olsen, 2004)

Selon l'espèce animale, la réduction de la zéaralénone se fait en présence de NADH et/ou de NADPH. Par exemple, les vaches sont les animaux possédant la plus grande activité zéaralénone réductase NADH dépendante. Suivent ensuite les souris, les porcs, les rats, les lapins et les cobayes (Gaumy et al., 2001).

La voie d'excrétion varie selon l'espèce considérée. En effet, l'excrétion biliaire semble majoritaire chez le rat et la souris, alors que l'excrétion urinaire domine chez les lapins, les cochons et l'homme. Dans le sang, les métabolites se lient aux globulines spécifiques des hormones sexuelles (ANSES, 2009; Eriksen and Alexander, 1998).

#### 2.5.2.5 Mode d'action biologique

La zéaralénone a une affinité de fixation pour les récepteurs œstrogéniques hépatiques, utérins, mammaires et hypothalamiques, probablement car cette molécule est capable d'adopter une conformation similaire au 17- $\beta$ -œstradiol. Ainsi, la mycotoxine se comporte comme un agoniste œstrogénique artificiel se liant de manière compétitive aux récepteurs. Elle est cependant moins efficace que l'œstradiol. Des différences concernant l'efficacité de fixation entre la zéaralénone et ses métabolites ont néanmoins été observées. L'ordre général de fixation sur les récepteurs cytoplasmiques utérins de rat est 17 $\beta$ -œstradiol >  $\alpha$ -zéaralanol >  $\alpha$ -zéaralénol >  $\beta$ -zéaralanol > zéaralénone >  $\beta$ -zéaralénol (Eriksen and Alexander, 1998; Magan and Olsen, 2004; Summerell et al., 2001).

La forme synthétique (zéaralanol) est utilisée comme agent anabolique (Ralgro®) pour les jeunes agneaux et les jeunes veaux, mais elle a été bannie par l'Union Européenne (UE) en 1985. Utilisée comme intermédiaire de la synthèse du zéranol, cette molécule est encore administrée à ces animaux aux USA (Desjardins, 2006; Ripert, 2013).

Des recherches ont été menées pour utiliser cette molécule comme agent contraceptif oral ou dans le traitement des symptômes post-ménopausaux. Cependant, aucun médicament correspondant concernant n'a été produit ou commercialisé (Bennett and Klich, 2003).

### 2.5.2.6 Toxicologie

La zéaralénone a été placée dans le groupe 3 par l'IARC en 1993 (IARC, 1993). En effet, cette toxine a été considérée comme inclassable vis-à-vis de sa cancérogénicité (Annexe 1).

#### 2.5.2.6.1 Doses

La toxicité aiguë de la zéaralénone après une administration orale est faible. Différents seuils ont été établis (Tableau VIII).

Tableau VIII : Quelques doses toxicologiques établies pour la zéaralénone (Ripert, 2013)

Types	Doses
<b>Ingestion quotidienne maximum tolérée (DJMTP)</b>	0,25 µg/kg masse corporelle/jour*** EFSA, 2011
	0,5 µg/kg/j** (dose provisoire) JECFA, 2000
	0,2 µg/kg/j TDI (SCF), à partir d'une NOAEL de 40 µg/kg/j et d'un facteur de sécurité de 200.
<b>LD<sub>50</sub></b>	4 000 à 20 000 mg/kg de masse corporelle
<b>Limite toxicologique</b>	100 ng/kg/j* CSHPF, 1999
<b>NOEL</b>	40 µg/kg/j
<b>LOAEL</b>	200 µg/kg/j

\*à partir des résultats sur l'effet de la reproduction chez le singe : NOAEL 50 µg/kg/j avec un facteur de sécurité de 500 (ANSES, 2009).

\*\* sur la base d'une dose sans effet de 40 µg/kg chez le porc exposé pendant 15 jours avec un facteur de sécurité de 80 (Edwards et al., 1987).

\*\*\* sur la base de l'effet œstrogénique chez le porc.

#### 2.5.2.6.2 Symptomatologie

Chez l'homme, les effets de la zéaralénone restent encore à prouver, car cette toxine n'est associée avec aucune pathologie mortelle connue. Elle présente tout de même un risque potentiel en cas de présence dans l'alimentation, bien que les taux soient très faibles, en raison de la réaction compétitive de la zéaralénone avec les récepteurs à œstrogènes ERα et ERβ (Desjardins, 2006; Ripert, 2013).

Cette mycotoxine a des effets chez de nombreuses espèces animales, telles que la vache laitière, l'agneau, le lapin et le singe. Le porc est, comme pour les trichothécènes, l'espèce la plus touchée et la plus sensible (Ripert, 2013). Les principaux symptômes potentiels de la zéaralénone et ses dérivés sont l'infertilité, l'œdème vaginal ou l'atrophie testiculaire. Les effets sont cependant variables selon l'espèce concernée (Tableau IX).

Tableau IX : Exemples de symptomatologie suivant l'espèce animale touchée (selon Ripert, 2013)

Espèce	Effets pathologiques
Porcins	Hyperostrogénisme Féminisation des jeunes porcs
Souris	Adénomes pituitaires et hépatocellulaires
Bovins	Infertilité des vaches

Aucun effet tératogène n'a été aujourd'hui relevé lors d'une intoxication à la zéaralénone.

Il semblerait cependant que la vitamine E apporte un certain degré de protection vis-à-vis de cette mycotoxine (Ghédira-Chékir et al., 1999).

#### 2.5.2.7 Devenir dans les produits transformés

La zéaralénone est relativement stable durant les étapes de stockage, de broyage, de préparation et de cuisson des aliments. Ainsi, la mycotoxine n'est pas ou peu affectée lorsqu'elle est soumise à des traitements de température inférieure à 120°C. A l'inverse, elle est complètement dégradée lorsqu'elle est chauffée dans une solution tampon aqueuse pendant moins de 30 min à 225°C, quel que soit le pH de la solution (Milani and Maleki, 2014).

La zéaralénone est une mycotoxine qui peut être retrouvée dans divers aliments à base de maïs ou dérivés ainsi que d'autres céréales (sorgho, orge, blé, riz, avoine...). Ainsi des études ont montré que des concentrations détectables avaient été trouvées dans des pains, des céréales de petit-déjeuner, des biscuits, des pâtes... Des quantités non négligeables ont également été mesurées dans des bières produites dans des brasseries africaines. En outre, il convient d'être vigilant quant au gluten, qui est plus contaminé que le grain. Il existe aussi une contamination potentielle des bananes, de l'amarante et du poivre noir (Magan and Olsen, 2004).

Il faut savoir que la production de cette mycotoxine est faible à 32°C, mais maximale à 20°C. Par ailleurs, la production est favorisée lors de variations successives et importantes de température. Les taux peuvent alors devenir plus élevés dans notre alimentation.

### 2.5.3 Fumonisines

Cette classe de molécules a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1988 par Gelderblom *et al.* et Bezuidenhout *et al.*, à partir de *F. moniliforme* et après 18 ans de recherche sur le(s) agent(s) responsable(s) de la leucoencéphalomalacie équine (Bezuidenhout *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1988; Magan and Olsen, 2004; Marasas, 2001). Les effets des fumonisines, notamment sur les chevaux, étaient cependant connus depuis plus de 150 ans (ANSES, 2009; Quillien, 2002). Gelderblom et Bezuidenhout investiguaient également sur les causes de cas de cancers de l'œsophage fréquents dans la population sud-africaine (Bryła *et al.*, 2013).

A ce jour, près de 28 fumonisines ont été répertoriées parmi lesquelles les formes FB1, FB2 et FB3 sont les plus répandues dans l'alimentation et notamment dans le maïs et les produits dérivés. FB1 est la plus abondante et la plus toxique puisqu'elle représente environ 70 à 80 % des fumonisines contaminant l'alimentation. FB2 est présente à raison de 15-25% tandis que FB3 représente 3 et 8% des contaminations (Brown and Proctor, 2013; Magan and Olsen, 2004; Ripert, 2013).

Les fumonisines sont produites principalement par *F. verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*), *F. proliferatum* et *F. nygamai* (Bennett and Klich, 2003; Bryła *et al.*, 2013; Magan and Olsen, 2004; Richard, 2007).

#### 2.5.3.1 Structure

Les fumonisines ont une structure proche de celle de la sphingosine, composant cellulaire constituant le squelette carboné des sphingolipides. Ainsi, ces molécules sont des diesters répartis en 4 groupes (A, B, C et P). Contrairement à la plupart des mycotoxines, elles n'ont pas de structure cyclique, mais elles sont constituées d'une chaîne aminopolyhydroxyalkyle de 19 ou 20 carbones diestérifiée (Magan and Olsen, 2004).

Les fumonisines du groupe B, majoritaires, sont caractérisées par un groupement amine en position C2, et sont des diesters d'acide-1,2,3-propane tricarboxylique et de longues chaînes polyhydroxyamines (Bryła *et al.*, 2013; Desjardins, 2006; Desjardins and Proctor, 2007; Ripert, 2013; Thibault *et al.*, 1997). Ce groupe B se compose de 4 fumonisines : FB1 à 4, qui se distinguent par la position des groupements hydroxyle (Figure 13 ; Tableau X).

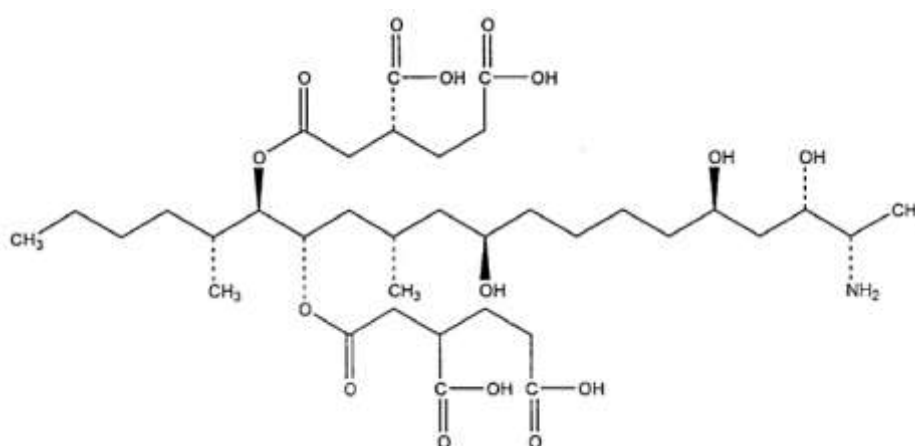


Figure 13 : Structure de la fumonisine FB1 (Bennett and Klich, 2003)

Tableau X : Structures chimiques des fumonisines du groupe B (Desjardins, 2006)

Formes	Formules chimiques	Masses moléculaires (g/mol)	Groupements sur les positions Carbone		
			C-2	C-5	C-10
<b>FB1</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>	721	NH <sub>2</sub>	OH	OH
<b>FB2</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	705	NH <sub>2</sub>	OH	H
<b>FB3</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	705	NH <sub>2</sub>	H	OH
<b>FB4</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>13</sub>	689	NH <sub>2</sub>	H	H

### 2.5.3.2 Propriétés physico-chimiques

De par la présence de 4 fonctions acides carboxyliques, les fumonisines sont des molécules hydrophiles, ce qui les rend donc difficiles à étudier. Ces composés sont polaires et ils sont solubles dans l'eau et les solutions aqueuses de méthanol et d'acétonitrile, dans lesquelles ils sont généralement extraits. Elles sont en revanche insolubles dans les solvants apolaires. Par ailleurs, c'est en raison de la faible solubilité lipidique de ces mycotoxines que leur découverte n'a pu être permise qu'en 1988 (Bryła et al., 2013; Thibault et al., 1997).

Ces mycotoxines sont également thermostables. Cependant, elles peuvent être dégradées à plus de 90% après chauffage à 175°C pendant 60 min. Elles sont aussi relativement stables lorsqu'elles sont chauffées à pH neutre. Il existe cependant un effet pH, puisque la stabilité thermique est altérée à des pH acides et basiques (Bryła et al., 2013; Thibault et al., 1997).

Les fumonisines comportant des longues chaînes aliphatiques polyhydroxylées, elles ne possèdent pas propriétés d'absorption de la lumière UV et elles ne sont pas fluorescentes. Une dérivatisation est alors nécessaire pour une détection optique par CLHP (Desjardins, 2006).

### 2.5.3.3 Biosynthèse

La synthèse des fumonisines n'est pas encore complètement élucidée. De par leur structure proche de la sphinganine, il est possible que leur biosynthèse soit similaire à la biosynthèse des sphingolipides. Ainsi, la biosynthèse des fumonisines suivrait la voie métabolique des polycétides et proviendrait de la condensation d'un acide aminé, l'alanine, sur un précurseur dérivé de l'acétate. Certains groupements méthyle dériveraient de la méthionine. Différents groupements hydroxyle dérivent de l'acétate et d'oxygène moléculaire. Par ailleurs, une partie de l'acide propane tricarboxylique serait originaire du cycle de l'acide citrique (Figure 14 ; Bryła et al., 2013; Desjardins, 2006).

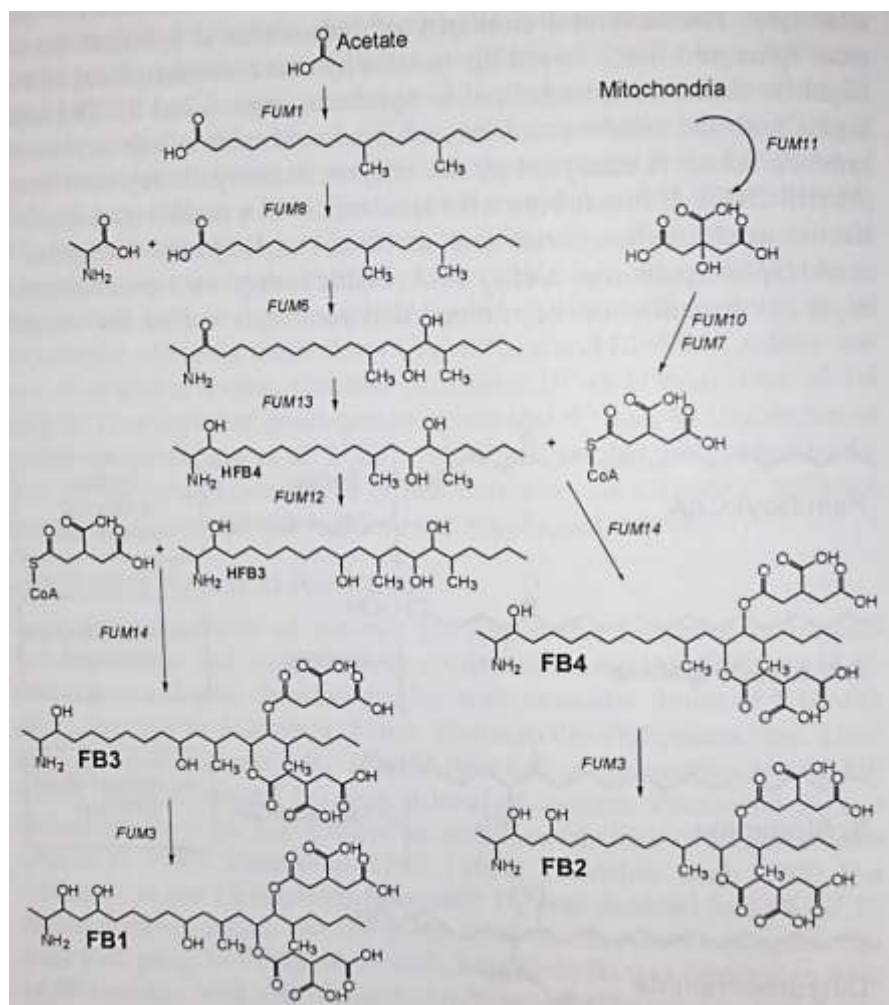


Figure 14 : Proposition de voie de biosynthèse des fumonisines par *F. verticillioides* (Desjardins, 2006)

La biosynthèse des fumonisines serait favorisée par la présence de glucides, et notamment l'amylopectine. Elle dépend également de facteurs environnementaux comme le pH du milieu, l'activité de l'eau ou la présence d'azote. Ainsi, la production optimale des fumonisines a lieu lorsque la température est comprise entre 20 et 25°C et l'activité de l'eau ( $a_w$ ) entre 0,95 et 0,99 (Bryła et al., 2013; Picot et al., 2011).

#### 2.5.3.4 Métabolisme

Lors de l'analyse des produits excrétés, il a été montré que la principale forme excrétée dans l'urine et les fèces est la molécule administrée (FB1 ou FB2). Il est retrouvé environ 51,5 % de FB1 et 37,5 % de monoesters, issus de l'hydrolyse partielle de la FB1. La métabolisation se déroulerait principalement au niveau du tube digestif et non dans le foie. En effet, aucun produit d'hydrolyse n'a été retrouvé dans des prélèvements de bile (Thibault et al., 1997).

Le métabolisme des fumonisines pourrait être dû à l'action d'enzymes digestives et/ou de micro-organismes du tube digestif (Fodor et al., 2007; Thibault et al., 1997).

### 2.5.3.5 Mode d'action biologique

Les fumonisines agissent par inhibition du métabolisme sphingolipidique de par leur structure analogue à celle des sphingolipides cellulaires. Ainsi, elles inhibent la sphingosine/sphinganine-N-acétyl transférase (céramide synthétase), ce qui entraîne une inhibition de l'acylation coA dépendante de la sphingosine et de la sphinganine. Par conséquent, le blocage complet de la céramide synthase cause une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de sphinganine libre (et de sphingosine) qui s'accumule alors dans le foie et les reins. Cette accumulation est responsable de la toxicité chez l'animal (Desjardins, 2006; Fink-Greennmels, 1999; IARC, 2002).

La sphingosine et la sphinganine jouent un rôle essentiel dans la communication cellulaire et la transduction des signaux, ainsi que dans la constitution des membranes. La toxicité peut être notamment due au groupement amine primaire (Magan and Olsen, 2004; Ripert, 2013).

Par ailleurs, les fumonisines bloquent le courant entrant de calcium induit par une dépolarisation. Cela provoque une réduction de l'amplitude de la contraction et de la tension maximale du muscle cardiaque chez les grenouilles. Ce mécanisme est rapidement réversible, mais pourrait expliquer les arrêts cardiaques parfois observés chez les chevaux atteints de leucoencéphalomalacie, ainsi que chez le rat (Thibault et al., 1997).

### 2.5.3.6 Toxicologie

Les fumonisines ont une action toxicologique différente selon leur type. La FB1 présente la plus forte toxicité de cette classe de mycotoxines. Elle provoque une carcinogénicité et elle est hépatotoxique et néphrotoxique. De par sa forte toxicité, elle est classée dans la catégorie 2B (probablement cancérigène) par l'IARC depuis février 2002. Seule la FB1 est classée dans ce groupe (Parent-Massin et al., 2013; Ripert, 2013). Nous nous focaliserons donc sur cette mycotoxine dans cette partie.

#### 2.5.3.6.1 Doses

Différents seuils ont été établis pour les fumonisines (Tableau XI). La majorité des données est connue pour la FB1 uniquement.

Tableau XI : Exemples de doses toxicologiques établies pour les fumonisines  
(Parent-Massin et al., 2013; Ripert, 2013)

Types	Doses	Fumonisines
Dose journalière tolérable (DJMTP)	5 µg/kg/j*	FB1
	2 µg/kg/j JECFA, 2001	Groupe B (seules ou en combinaison)
	2 µg/kg/j SCF, 2000	FB1
Limite toxicologique	300 ng/kg/j**	FB1

\* A partir de la LOAEL (5 mg/kg/j) chez le porc dans l'apparition de l'œdème pulmonaire, mais effet peu sensible, car apparition d'hépatotoxicité et/ou néphrotoxicité ainsi que des cancers.

\*\* NOAEL chez le rat et la souris 5 mg/kg avec facteur de sécurité de 5000.

La LD50 n'est cependant pas connue pour les différentes fumonisines.

Des seuils ont été fixés par l'Union Européenne pour une concentration maximale de fumonisines dans le maïs et les produits dérivés. Par exemple, dans le maïs ou les aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe, la concentration seuil est de 1000 µg/kg ; alors que dans les produits à base de maïs pour enfants et nourrissons ou dans toute nourriture pour bébé, le seuil est de 200 µg/kg (Commission Européenne, 2007; Richard, 2007).

#### 2.5.3.6.2 Symptomatologie

Chez les animaux, les fumonisines interfèrent avec le métabolisme sphingolipidique. Elles sont responsables de leucoencéphalomalacies chez les équidés et les lapins. Elles causent également des œdèmes pulmonaires et des hydrothorax chez les porcs et ont des effets hépatotoxiques et carcinogéniques au niveau du foie chez le rat. Les fumonisines ont aussi pour conséquence des anomalies du tube neural chez des animaux expérimentaux, des cirrhoses et des hyperplasies nodulaires du foie chez le rat ou encore des néphroses et des hépatoses chez le mouton (Bennett and Klich, 2003; Richard, 2007; Ripert, 2013).

Chez l'homme, elles provoquent notamment des cancers de l'œsophage. Une corrélation a été établie entre la présence de fumonisines et l'augmentation de l'incidence de ce type de cancer en Afrique du Sud, en Chine et dans le nord-est de l'Italie. Ces mycotoxines sont également associées à des cancers du foie (Bennett and Klich, 2003; Gelderblom et al., 1988; Warth et al., 2012).

Il est également important de noter que la FB1 peut traverser la barrière hématoencéphalique. Elle peut aussi, après ingestion, se retrouver dans le lait maternel et ainsi être ingérée lors de l'allaitement (Magoha et al., 2014; Summerell et al., 2001).

#### 2.5.3.6.3 Maladies spécifiques

Différentes maladies sont associées à une intoxication par des fumonisines. Les plus connues et fréquentes sont la leucoencéphalomalacie équine et les œdèmes pulmonaires et les hydrothorax chez le porc (Richard, 2007; Ripert, 2013).

##### 2.5.3.6.3.1 Leucoencéphalomalacie équine

Cette maladie causée par les fumonisines produites principalement par *F. moniliforme* est connue sous plusieurs noms : ELEM (*Equine Leuko-Encephalo-Malacia*), *Blind Staggers*, *Foraging disease*, *Corn stalk disease* ou encore *Moldy corn poisoning*. Comme son nom l'indique, elle touche principalement la filière équine. Cette maladie a été décrite pour la première fois aux Etats-Unis dans les années 1850, mais elle a été observée partout dans le monde (Amérique du Sud, Chine, Grèce, Allemagne, Egypte, Nouvelle Calédonie, France métropolitaine). La dose minimale induisant la maladie est difficile à préciser. Elle est dépendante de la voie d'administration et de la récurrence de l'ingestion (Ripert, 2013; Thibault et al., 1997).

La maladie se développe en plusieurs étapes allant de l'inappétence des animaux jusqu'à la léthargie et l'apparition d'effets neurotoxiques. Le syndrome se caractérise notamment par des lésions nécrotiques liquéfiantes de la matière blanche des hémisphères cérébraux chez le cheval et d'autres équidés ce qui entraîne des mouvements non coordonnés, des titubations voire des convulsions et la mort. La mort survient très rapidement : de quelques heures à quelques jours après les premiers symptômes (Ripert, 2013).

D'autres troubles peuvent également être associés à ces symptômes, comme des arrêts cardiaques et des atteintes hépatiques (nécrose et fibrose) et rénales.

#### *2.5.3.6.3.2 Œdème du poumon et hydrothorax chez le porc*

Cette maladie est la conséquence de l'ingestion de hautes doses de fumonisines (> 16 mg/kg/j). Les signes cliniques apparaissent 2 à 7 jours après l'ingestion, avec tout d'abord une diminution de la prise alimentaire. Les symptômes incluent dyspnée (difficulté à respirer), fatigue et cyanose de la peau et des muqueuses. Ils peuvent s'accompagner d'affections hépatiques et immunitaires. Les effets respiratoires s'aggravent rapidement et la mort survient en quelques jours (IARC, 1993; Thibault et al., 1997).

Il semblerait que l'œdème pulmonaire suite à l'intoxication par les fumonisines résulte d'un arrêt cardiaque provoqué par une altération de la synthèse des glycolipides (Parent-Massin et al., 2013).

#### *2.5.3.7 Devenir dans les produits transformés*

Le maïs, ainsi que les produits à base de maïs, sont les produits alimentaires majoritairement contaminés avec des fumonisines à des taux décelables (Richard, 2007). Ainsi, des fumonisines peuvent être retrouvées dans des aliments comme la farine, la semoule, la polenta ou les gruaux. Dans une moindre mesure, cette classe de mycotoxines peut être retrouvée dans le pop-corn, le maïs doux, concassé ou bouilli, le sorgho, le millet, le riz ou encore la bière (CAST, 2003; Richard, 2007; Ripert, 2013; Scott, 2012).

Puisque ces mycotoxines sont thermostables, les procédés thermiques utilisés pour sécher le maïs ou stériliser les denrées alimentaires sont insuffisants pour les détruire (Bryła et al., 2013; Thibault et al., 1997).

Les personnes atteintes de maladie cœliaque présentent plus de risque vis-à-vis des fumonisines en raison du régime sans gluten qui leur est imposé. En effet, leur alimentation se compose en plus grande proportion de riz et de maïs qui sont les plus contaminés.

Différentes études montrent que notre alimentation est contaminée. Il est ainsi estimé que plus de la moitié du maïs et des produits à base de cette Poacée sont contaminés (Pagliuca et al., 2005). En outre, de très faibles quantités (<100 ng/g) ont été détectées dans le lait, les œufs et la viande. Les taux sont également faibles dans les bières et les boissons dérivées, pour lesquelles le maïs est utilisé comme source amylacée alternative à l'orge. Néanmoins, les concentrations en fumonisines sont plus importantes dans les produits intégrant peu de procédés de transformation (Bryła et al., 2013; Magan and Olsen, 2004). Ainsi, l'UE a défini

des seuils pour les fumonisines dans l'alimentation (Tableau XII ; Commission Européenne, 2007).

Tableau XII : Réglementation de l'UE concernant les fumonisines (en µg/kg)

Produit	Concentration
Maïs non transformé à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	4000
Maïs et aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe (excepté les 2 points suivants)	1000
Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs et collations à base de maïs	800
Produits transformés à base de maïs destinés aux nourrissons et aux jeunes enfants et à l'alimentation pour bébé	200

#### 2.5.4 Autres mycotoxines

D'autres mycotoxines produites par les *Fusarium* sont aujourd'hui émergentes et de plus en plus décrites. Bien que considérées comme moins importantes en raison de leur faible probabilité de toxicité aiguë, elles ont cependant une haute prévalence dans les produits alimentaires.

Parmi ces mycotoxines émergentes, sont retrouvées (Desjardins, 2006; Escrivá et al., 2015) :

- Les moniliformines, produites par *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*. Elles ont une structure proche du pyruvate, mais leur mode d'action n'est pas encore clairement décrit. Du point de vue de la toxicité, elles altèrent le cartilage chez l'homme et peuvent également avoir un impact sur les lymphocytes.
- Les énniantines, produites par *F. avenaceum*. Ce sont des molécules ionophores inhibitrices d'enzymes comme la cholestérol-acétyltransférase chez l'homme. Isolées pour la première fois dans les années 1940, des recherches importantes sont initiées pour élucider leur lien avec le gushing, phénomène de giclage de la bière.
- La beauvericine, qui a montré des activités anti-microbiennes et anti-tumorigènes.
- La sambutoxine, décrite pour la première fois en 1995. Elle possède une toxicité sur les animaux expérimentaux.
- La furasine C, produite par *F. tricinctum*, *F. verticillioides* ou encore *F. graminearum*. Elle possède une activité mutagène bactérienne (test d'Ames positif). Elle est également associée à des cancers de l'œsophage et est responsable de cancer du sein par son action comme agoniste oestrogénique (Sondergaard et al., 2011).

### 3 Conclusion

Comme disait Paracelse, considéré comme le fondateur de la toxicologie, « tout est poison, rien n'est poison, seule la dose fait le poison ». Ainsi, les mycotoxines ont une action toxique surtout à haute dose et lorsque l'ingestion est chronique, aussi bien chez les animaux que chez l'homme. Cependant, elles ne présentent que rarement un danger en cas de toxicité aiguë. Par ailleurs, les mycotoxines les plus virulentes rencontrées dans l'alimentation humaine sont environ un million de fois moins toxiques que la plus virulente des toxines botuliques (LD50 chez la souris =  $10^{-6}$  mg/kg<sup>-1</sup>) (Moss, 1996). Cependant, il faut bien se garder de minimiser l'impact sanitaire et économique de ces molécules, responsables, rappelons-le, du déclassement d'approximativement 10% des productions agricoles mondiales. De plus, cet impact est susceptible de s'accroître notablement suite aux évolutions climatiques actuelles et à l'utilisation encore non optimisée et récurrente de produits phytosanitaires.

Parmi les différentes classes de mycotoxines, les fumonisines sont les mycotoxines plus fréquemment retrouvées dans l'alimentation dans le monde (Ripert, 2013). Il est important de noter qu'il n'existe pas de relation directe entre la présence d'une moisissure et la contamination des cultures par des mycotoxines. Par conséquent, il est nécessaire de développer des techniques d'analyses efficaces et sensibles permettant à la fois l'identification des espèces de *Fusarium*, et détection et la quantification des mycotoxines, pour un contrôle efficace de l'hygiène alimentaire et pour garantir la sécurité du consommateur.

# Partie 2 : Techniques analytiques

## 1 Introduction

La problématique de l'évaluation du risque lié à la présence de moisissures et à la production de métabolites toxiques a jusqu'ici été traitée de façon séparée avec, d'une part des analyses d'ordre microbiologique (identification et numération des moisissures), et, d'autre part, des analyses physico-chimiques et biochimiques pour la détection et le dosage des mycotoxines. Cette partie du chapitre bibliographique se propose de faire un état de l'art sur les techniques mises en œuvre à l'heure actuelle, de façon à mettre en exergue les potentialités de l'utilisation du MALDI-TOF pour un traitement rapide et global des échantillons. Cependant, avant d'aborder les problématiques analytiques pures, un paragraphe sera dédié aux problématiques d'échantillonnage, critiques dans les filières agricoles en général, et céréalières en particulier.

## 2 L'importance de l'échantillonnage

Lors d'une analyse de moisissures ou de mycotoxines, qu'elle soit qualitative ou quantitative, l'échantillonnage joue un rôle déterminant dans la qualité des résultats obtenus. En effet, un mauvais échantillonnage est responsable d'une grande partie des erreurs de quantification. Cela peut engendrer des faux positifs, entraînent des conséquences économiques potentiellement lourdes, ou des faux négatifs, avec un risque sanitaire accru et, par voie de conséquence, de nouvelles pertes économiques. Il est donc indispensable d'obtenir un échantillon représentatif du lot ou de la récolte.

La difficulté provient initialement de l'hétérogénéité de la distribution de la ou des toxines dans le champ : contamination de la plante, de l'épi, des graines (Figure 15). Par ailleurs, la contamination peut se développer plus tardivement, lors du stockage ou des procédés de traitement mis en œuvre (Grosjean et al., 2002).

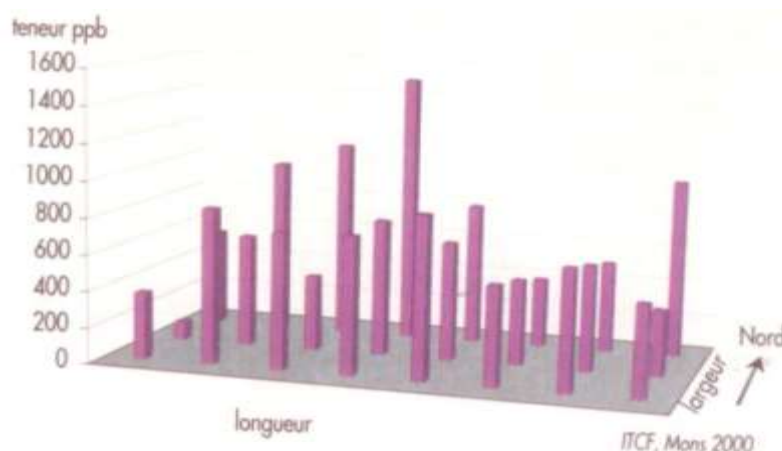


Figure 15 : Teneur en DON d'une parcelle de 10 ha contaminée par *Fusarium* (Grosjean et al., 2002)

Il est alors très peu probable qu'un contaminant soit réparti uniformément au sein d'un lot ou d'un échantillon. Un échantillonnage idéal serait un échantillon réalisé en continu au cours de la production ou en mélangeant des prélèvements de différents sacs (Magan and Olsen, 2004; Smith and Moss, 1985).

Ainsi, la taille des échantillons et leur nombre doivent être représentatifs du lot, c'est-à-dire plus ou moins importants. Pour éviter les erreurs d'échantillonnage, il peut être recommandé de réaliser des sous-échantillons (Figure 16). La FAO et la WHO recommandent qu'un prélèvement de 200 g soit réalisé pour chaque lot de 200 kg de produit afin de réaliser un premier échantillon et que celui-ci soit sous réduit en échantillons d'analyse par des divisions aléatoires (Magan and Olsen, 2004).

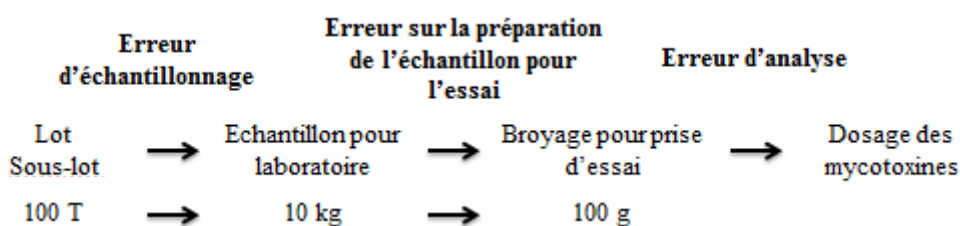


Figure 16 : L'accumulation des erreurs d'échantillonnage (selon Grosjean et al., 2002)

Différents règlements encadrent donc les méthodes d'échantillonnage de produits alimentaires dont les céréales et les produits pouvant être contaminés par *Fusarium* :

- Le règlement (CE) n°401/2006 de la commission du 23 février 2006 portant sur la fixation des modes de prélèvement d'échantillons et les méthodes d'analyse. Il a été modifié par le règlement (UE) n°178/2010 de la commission du 2 mars 2010 en ce qui concerne les arachides, les autres graines oléagineuses, les fruits à coque, les noyaux d'abricot, la réglisse et l'huile végétale.
- Le règlement (UE) N°691/2013 de la commission du 19 juillet 2013 modifiant le règlement (CE) n°152/2009 portant sur la fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinée au contrôle des aliments pour animaux.

Il est important d'adapter le mode de prélèvement des échantillons selon les situations : produits en mouvement ou statiques. Le premier cas nécessite des prélèvements à intervalle régulier avec, par exemple, un échantillonneur automatique, alors que le second cas implique d'effectuer des prélèvements en différents points au sein du contenant. Ce point est évidemment problématique, car le mode de stockage agricole le plus courant est le silo (Grosjean et al., 2002).

Cependant, des lots, où la contamination est très importante, ne peuvent être mélangés à des lots moins contaminés, ce qui entraînerait une diminution des concentrations en mycotoxines lors des tests finaux. Malheureusement, il arrive parfois que certaines coopératives ou certains industriels réalisent des analyses intermédiaires sans valeur juridique. Dans le cas où les valeurs obtenues sont supérieures aux seuils admis, un mélange du lot concerné avec des grains moins ou non-contaminés peut être opéré afin d'éviter tout déclassement.

Une solution à ces problèmes d'échantillonnage pourrait résider dans une analyse dynamique exhaustive grain par grain par spectroscopie proche infra-rouge. La mise en œuvre est cependant complexe, avec une grande difficulté de calibration, et est très difficile à mettre en œuvre.

### 3 Identification des moisissures

#### 3.1 Techniques de microbiologie directes

Les techniques d'identification microbiologiques classiques sont basées sur la taxonomie actuelle des moisissures, décrite dans le chapitre précédent, et elles sont loin d'être exhaustives et abouties. Ces techniques de référence s'appuient sur l'identification des caractères morphologiques macro- et microscopiques des moisissures.

La différenciation des espèces s'effectue à l'aide de cultures sur des milieux spécifiques, généralement sélectifs ou électifs, et ce après une phase initiale d'isolement, sur un milieu riche. Ces cultures sont alors soumises à des observations macro- et microscopiques afin d'identifier des caractéristiques distinctives selon les espèces telles que les macroconidies, les microconidies ou la pigmentation (cf. 1.1, Figure 17).

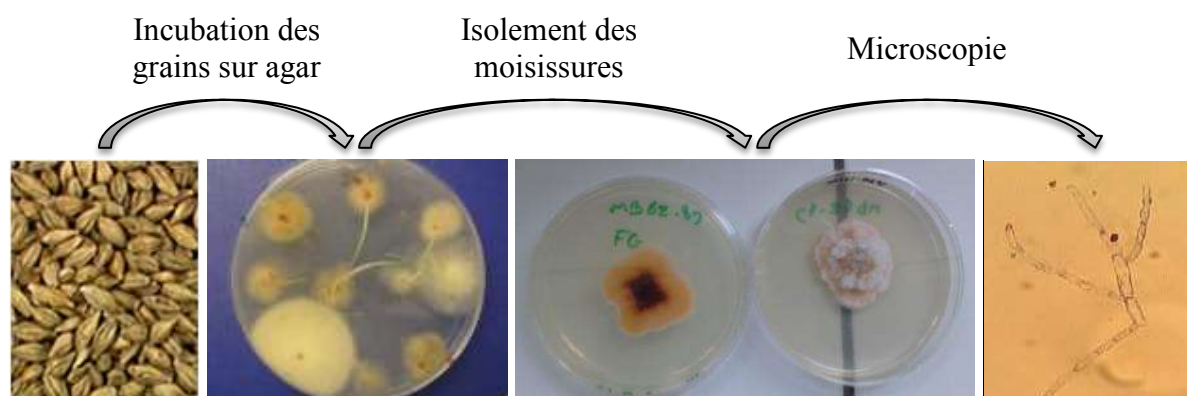


Figure 17 : Identification microbiologique des moisissures

La mise en culture des micro-organismes sur des milieux sélectifs est, aujourd'hui, la technique d'identification de référence, pour les moisissures en général, et *Fusarium*, en particulier (Le Boulc'h et al., 2000). Cette technique d'identification est longue. Classiquement, trois à cinq jours de culture sont nécessaires pour effectuer l'identification, sans tenir compte de l'étape initiale d'isolement. Une identification fongique demande au minimum une dizaine de jours, et doit être réalisée par un personnel qualifié. En conséquence, les coûts analytiques sont relativement élevés et la reproductibilité est fortement dépendante des personnels les mettant en œuvre. Ces techniques sont en outre susceptibles d'être utilisées pour quantifier des germes spécifiques (germes revivifiables uniquement), ce qui implique une complexification élevée des protocoles et une forte augmentation des coûts.

#### 3.2 Méthode de biologie moléculaire

L'autre méthode, couramment employée pour l'identification et la quantification des moisissures en général, et de *Fusarium* en particulier, repose sur l'utilisation de la PCR quantitative ou qPCR (Figure 18).

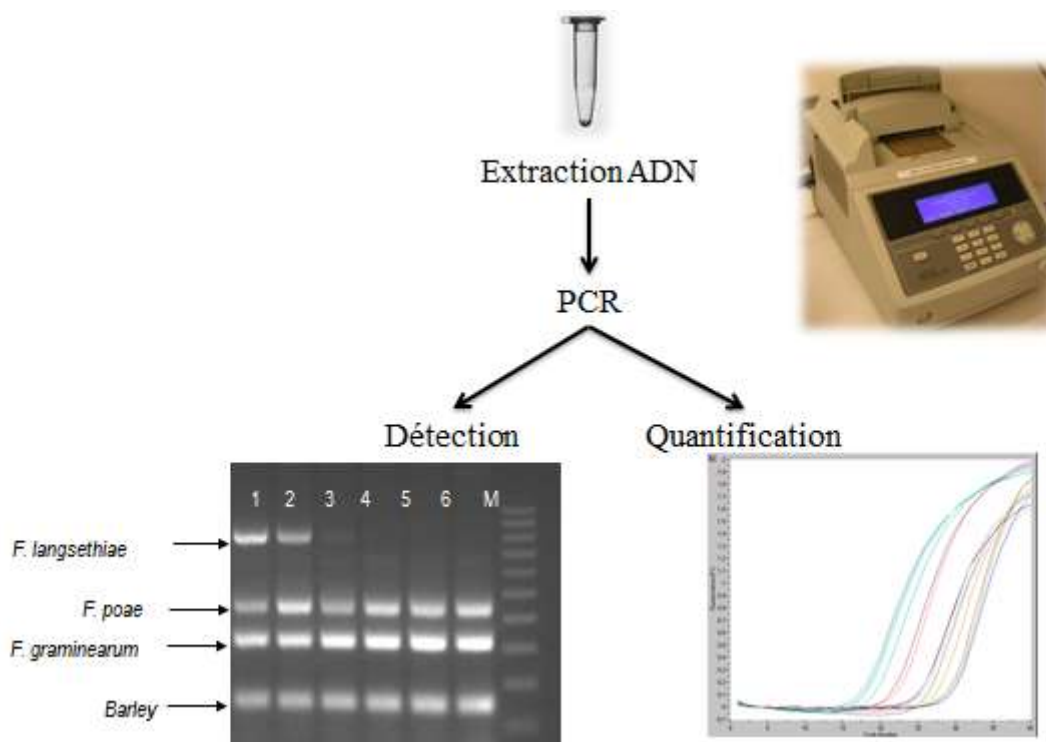


Figure 18 : Principe général de la PCR pour l'identification et la quantification de *Fusarium* (source : IFBM)

La technique PCR repose sur l'amplification *in vitro* et exponentielle d'une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. La réplication d'un ADN double brin se divise en trois étapes :

- Dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ;
- Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'amorces spécifiques ;
- Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire.

Ces étapes sont répétées sur plusieurs cycles. La technique de PCR est rapide, 2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles mais nécessite, dans ce cas à nouveau, un personnel formé, bien que cette qualification soit plus répandue que l'identification mycologique.

L'identification repose sur la disponibilité d'amorces spécifiques à chaque genre ou espèce de microorganismes recherchés. Cette condition montre l'une des limites actuelles de cette technique pour l'identification de moisissures : la disponibilité insuffisante d'amorces fiables. Les catalogues d'amorces sont encore très incomplets, mais ils sont constamment enrichis, entre autres par l'IFBM, situé à Vandœuvre-lès-Nancy, pour les *Fusarium*. Par ailleurs, toutes les amorces n'ont pas le même rendement d'amplification. Ceci est problématique pour la quantification, ce qui ne permet pas de comparer les résultats entre eux.

La quantification, outre la spécificité de la PCR, repose sur la connaissance du nombre de cycles réalisés (facteur d'amplification), rapportée à des expériences de calibration. Quant aux échantillons issus de cultures de céréales, leur quantification est également évaluée en nombre de génomes de moisissures par rapport au nombre de génomes de la plante infectée. Cet outil est utilisé à l'heure actuelle pour quantifier la flore fongique en cours de culture ou de

stockage et sert à la réalisation d'observatoires de contamination, en lien avec les pratiques agronomiques et le climat.

### 3.3 Spectrométrie de masse et MALDI-TOF

La microbiologie classique permet une identification phénotypique, macro- et microscopique. Cette technique de référence est cependant longue à mettre en place et est difficilement reproductible. Quant à la qPCR, elle permet une identification génétique, mais nécessite des amorces fiables et un personnel qualifié.

La technique MALDI-TOF est une technique innovante de plus en plus utilisée aujourd'hui. Basée sur l'identification phénotypique et la taxonomie numérique, elle est développée pour répondre à la nécessité de disposer de techniques de détection et d'identification plus rapides que la microbiologie classique. Par ailleurs, cette technique permet de s'affranchir d'amorces spécifiques nécessaires à la qPCR. L'utilisation du spectromètre de masse MALDI-TOF est déjà répandue dans le milieu hospitalier pour l'identification bactérienne et pourrait être étendue à l'identification fongique.

La désorption ionisation laser assistée par matrice couplée à une analyse de temps de vol (MALDI-TOF) est une méthode d'analyse récente et en pleine expansion. Cette technique de spectrométrie de masse non séparative a été introduite en 1985 par Hillenkamp et Karas. En effet, ces scientifiques ont montré qu'une matrice absorbante pouvait être utilisée pour ioniser et volatiliser de petites molécules. Une révolution dans le développement de cette méthode de désorption laser a été permise par Tanaka qui a étendu l'application de cette technique aux molécules de larges poids moléculaires. Ces résultats sur l'analyse par spectrométrie de masse de protéines intactes ont fait l'objet d'un brevet en 1985, ont été présentés à un symposium à Osaka en 1987 et ont ensuite valu à Tanaka et Fenn l'obtention du prix Nobel de Chimie en 2002<sup>1</sup>. Ainsi, cet outil analytique est aujourd'hui une méthode de choix pour l'étude de composés de haute masse moléculaire, tels que les protéines, mais il est également utilisé pour étudier les peptides, les biomolécules et, plus récemment, les microorganismes dans leur globalité. En effet, la méthode est très utilisée en bactériologie et de plus en plus développée pour l'identification microbienne à partir de bases de données. Aujourd'hui, les études s'orientent également vers les moisissures, mais les premières utilisations en mycologie sont très récentes. L'avantage majeur est la rapidité de la technique, puisque le résultat peut être obtenu en quelques minutes (Bouchoux and Sablier, 2005; Tanaka, 2003; [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)).

#### 3.3.1 Principes généraux de la spectrométrie de masse

Le principe de la spectrométrie de masse repose sur l'ionisation et la fragmentation de molécules à l'état gazeux conduisant à la séparation des ions produits selon le rapport  $m/z$  en ion moléculaire, isotopes et fragments.

---

<sup>1</sup> En réalité, une moitié seulement puisque l'autre moitié a été remise à Kurt Wüthrich pour ces travaux sur la résonance magnétique nucléaire permettant d'établir la structure tridimensionnelle des macromolécules en solution.

La fragmentation correspond à la sélection d'un ion, à en provoquer la fragmentation puis d'analyser la masse des différents fragments obtenus.

Ainsi, un appareil de spectrométrie de masse est constitué essentiellement de 5 éléments (Figure 19).



Figure 19 : Eléments constitutifs d'un spectromètre de masse (Bouchoux and Sablier, 2005)

L'ionisation, qui a lieu dans la chambre d'ionisation, entraîne, à partir de l'échantillon vaporisé, une interaction électron/analyte qui peut conduire à des ions positifs (par expulsion d'électron(s)), à des ions négatifs (par capture d'électron) et à des ions radicalaires.

Il existe différents procédés d'ionisation :

- A pression atmosphérique (pour les espèces en solution) : ionisation par intermédiaire de sprays (Electrospray, Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI), PhotoIonisation à Pression Atmosphérique (APPI)), Ionisation par plasma d'argon... ;
- Sous vide : par impact électronique, par ionisation chimique, par bombardement par atomes rapides (FAB : fast atom bombardment), par **ionisation laser assistée par matrice (MALDI)**...

Les analyseurs, qui mesurent le rapport masse/charge ( $m/z$ ), sont divers : analyseur à secteur magnétique, filtre quadripolaire, trappes d'ions, **analyseur de temps de vol**.

Un détecteur est ensuite nécessaire pour mesurer l'intensité du signal selon les différentes valeurs de  $m/z$  obtenues.

Enfin les spectres sont interprétés. Pour une espèce chimique donnée, le pic de base est le pic le plus intense du spectre. Le pic moléculaire n'est généralement pas le plus intense, puisque cela est fonction de l'énergie et du mode d'ionisation. Il est aussi accompagné de pics secondaires correspondant aux amas isotopiques. Les autres fragments résultent soit de ruptures de liaisons (atomes de carbone les plus substitués, doubles liaisons, liaisons en  $\alpha$ - $\beta$  d'un hétéroatome) provoquant le départ d'entités de masses bien définies (ex :  $\text{CH}_3$  latéral,  $\text{OCH}_3\dots$ ), soit d'un réarrangement intramoléculaire.

### 3.3.2 Principe détaillé du MALDI

L'échantillon à analyser est dispersé dans une matrice organique solide aromatique, comme, par exemple, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque. En effet, l'échantillon est solubilisé par cristallisation dans cette matrice pour faciliter l'ionisation. L'ensemble est irradié à l'aide d'un laser UV (50 Hz à 1 kHz) qui provoque une désorption et une photo-ionisation. Il se produit une excitation électronique et thermique des molécules matricielles. Par conséquent, la matrice joue un rôle d'accepteur ou de donneur de protons envers l'échantillon, menant ainsi à l'ionisation de celui-ci. La matrice, utilisée comme un vecteur d'énergie entre le laser

et l'échantillon, joue un rôle indispensable dans cette technique d'analyse, puisqu'elle permet la séparation des molécules de l'échantillon en réduisant les forces intermoléculaires et qu'elle facilite l'ionisation en induisant des transferts de protons (Tanaka, 2003).

Cette irradiation entraîne très peu de fragmentation, c'est pourquoi elle est considérée comme une méthode d'**ionisation douce**. Cependant, l'ionisation étant douce, son efficacité et sa reproductibilité sont par définition sujettes à variation (Figure 20), ce qui fait que cette technique analytique est considérée au mieux comme semi-quantitative.

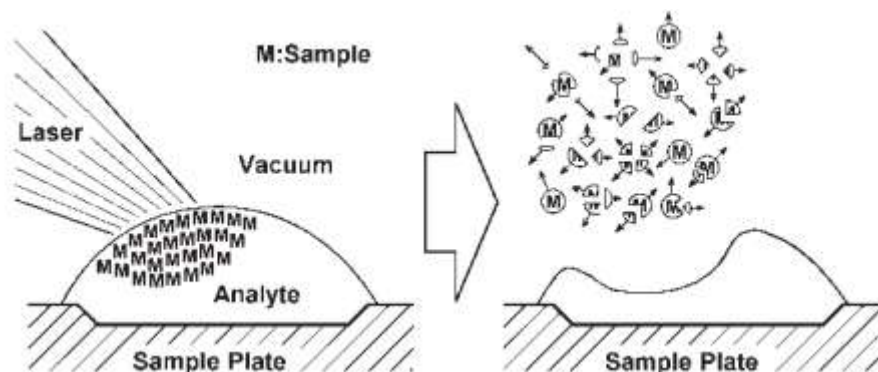


Figure 20 : Principe de la désorption laser douce (Tanaka, 2003)

Le choix de la matrice est également important puisqu'il s'effectue selon le type de composé analysé (Tableau XIII).

Tableau XIII : Matrices utilisées selon le type de molécules analysées (Howard, 2007)

Types de molécules dans l'échantillon	Matrice utilisée
<b>Peptides &lt; 10kDa</b>	Acide $\alpha$ cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)
<b>Protéines &gt; 10 kDa</b>	Acide sinapinique (SA) Acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB)
<b>Oligonucléotides</b>	DHB (<10 bases) Acide 3-hydroxypicolinique (> 3500Da) Monohydrure-2,4,6-trihydroxyacetophenone (< 3500 Da)
<b>Glycopeptides</b>	DHB Monohydrure-2,4,6-trihydroxyacetophenone
<b>Polymères</b>	CHCA DHB

### 3.3.3 Analyseur associé au MALDI pour l'identification de moisissures

L'analyse des molécules ionisées est réalisée grâce à un couplage avec analyseur de masse. Il en existe différents types utilisés en association avec le MALDI. Dans le cas de l'identification des moisissures, les principaux analyseurs sont des analyseurs linéaires comme le MALDI-MS classique ou l'analyseur linéaire de temps de vol (TOF).

### 3.3.3.1 Le TOF

L'analyseur de temps de vol permet la séparation uniquement en fonction de l'énergie cinétique acquise après l'accélération dans le champ électrique  $V$ . L'analyseur mesure alors le temps nécessaire à un ion pour parcourir une distance fixée et connue. Ce temps de parcours est fonction de la masse de l'ion considéré. Cette technique d'analyse, très simple, est d'une très grande précision. En terme de position, et donc de précision de la distance de vol, l'ordre de grandeur est de 1 à 3,5  $\mu\text{m}$  de résolution sur le trajet. Quant à la résolution, correspondant à  $m/z$  divisé par la largeur du pic à mi-hauteur, l'ordre de grandeur est dans la théorie compris entre 5000 en mode linéaire et 20000 en mode réflectron.

En effet, utilisée en premier par Dempster (Dempster, 1918), il introduit l'usage de faisceaux mono-énergétiques en appliquant une différence de potentiel  $V_0$  à la sortie de la source d'ions. Cette tension entraîne une accélération du faisceau ionique chargé. L'énergie potentielle est alors convertie en énergie cinétique ( $Ec = \frac{1}{2} mv^2$ ).

$$\text{D'où } \frac{1}{2} mv^2 = zV_0 \quad (1)$$

Il est alors possible de déduire le rapport masse/charge ( $m/z$ ), puisqu'il peut être directement corrélé à la vitesse  $v$  et donc au temps  $t$ , correspondant au temps de vol, que met un ion à parcourir une distance fixe et connue  $d$ , soit la longueur du tube de vol sous vide.

$$\text{Alors } m/z = 2 V_0 t^2 / d^2 \quad (2)$$

L'accélération provoquée par  $V_0$  entraîne un « vol » des ions dans la chambre sous vide. Ces ions iront d'autant plus vite que leur masse est faible ([www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)).

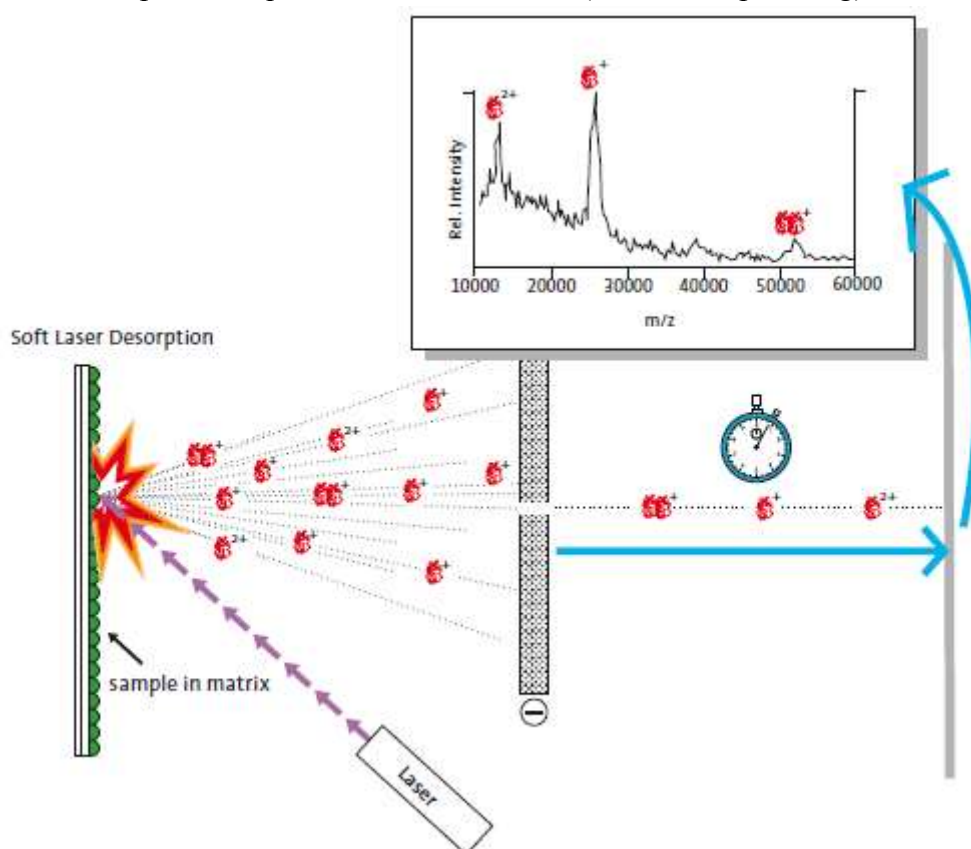


Figure 21 : Principe de l'analyseur de temps de vol après désorption ionisation  
(Source : [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org))

### **3.4 Conclusion**

Le MALDI-TOF est ainsi potentiellement intéressant pour l'identification des moisissures, à l'image des applications réalisées en bactériologie. Cependant, il est indispensable d'évaluer la faisabilité d'utiliser cette technique sur les moisissures, mais aussi de développer les bases de données. La technique MALDI-TOF n'est pas un concurrent direct des techniques de référence en raison de la mesure semi-quantitative, mais paraît être un compromis intéressant notamment vis-à-vis des techniques directes. Il permet d'obtenir des informations précises sur la structure primaire des composés et une connaissance de leur masse exacte. Par ailleurs, la rapidité de la technique présente un intérêt important. Les résultats peuvent être obtenus en moins d'une heure contrairement à l'identification morphologique qui nécessite plusieurs jours de culture et l'identification moléculaire demande plusieurs heures d'analyse.

## **4 Identification et quantification des mycotoxines**

Les méthodes générales et classiquement décrites pour l'analyse des mycotoxines sont schématisées sur la Figure 22. A ces techniques, nous pouvons aujourd'hui ajouter la méthode MALDI-TOF, qui se développe de plus en plus ces dernières années. Il existe deux catégories de méthodes : les méthodes de détection et les méthodes de dosage. Il faut savoir que les méthodes de dosage impliquent obligatoirement une séparation et de la spectrométrie de masse en tandem, notamment lorsqu'un échantillon de composition inconnue est analysé.

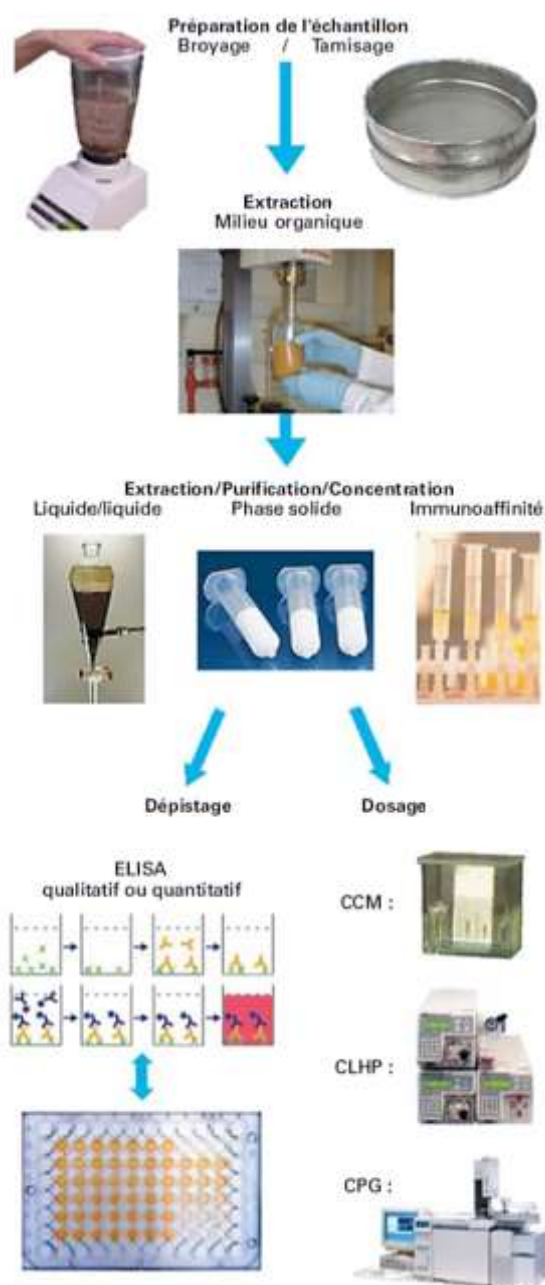


Figure 22 : Principes d'analyse des mycotoxines (Dragacci and Frémy, 2005)

#### 4.1 Techniques de référence

La chromatographie sur couche mince (CCM) a beaucoup été utilisée initialement pour doser les mycotoxines. Aujourd'hui, les analyses sont réalisées avec des instruments beaucoup plus performants afin d'améliorer la détection, la sensibilité, la spécificité et la répétabilité. Ces outils sont également utilisés pour automatiser les analyses, ce qui permet un gain de temps considérable. Cependant, les étapes de préparation des échantillons ne peuvent être automatisées, ce qui limite le gain de temps global.

Les techniques physico-chimiques utilisées (CLHP et CPG) sont des techniques de séparation couplées à la spectrométrie de masse en tandem pour permettre l'identification et la quantification des molécules analysées. En effet, bien que la chromatographie permette une séparation des différents constituants d'un mélange, il est nécessaire de recourir à la spectrométrie de masse en tandem pour bénéficier d'informations structurales complémentaires permettant d'identifier avec certitude la molécule recherchée (Arpino, 2007).

#### **4.1.1 Méthodes physico-chimiques**

Aussi bien la chromatographie liquide que la chromatographie en phase gazeuse sont utilisées pour l'analyse des mycotoxines. Un prétraitement de l'échantillon est en général appliqué, soit une extraction liquide-liquide, soit une extraction en phase solide. L'extraction des toxines par fluides supercritiques peut également être mise en œuvre, mais, en raison du coût élevé et de la nécessité d'équipement spécialisé, elle ne peut pas être utilisée en routine.

##### **4.1.1.1 Chromatographie liquide haute performance - Principe**

L'analyse par chromatographie liquide permet une analyse quantitative. Cette technique est présente un intérêt important pour la quantification des mycotoxines et elle est considérée aujourd'hui comme une méthode de choix dans ce cadre. Différentes normes définissent la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) comme méthode de dosage de référence pour certaines mycotoxines. Par exemple, la norme AFNOR NF14352 de décembre 2004 décrit la méthode de dosage pour les fumonisines dans les aliments à base de maïs. Cependant, un étalonnage (interne ou externe) est nécessaire au préalable, avant les analyses, et permet également de déterminer la gamme de mesure.

Différents types de séparation existent en fonction de la phase stationnaire utilisée : adsorption, partage (en phase normale, à polarité de phase inversée, avec appariement d'ions), échange d'ions, exclusion.

L'appareillage de la CHLP est divisé en cinq parties principales (Caude and Jardy, 1995).

- Un réservoir de solvant qui entrera dans la colonne de chromatographie comme phase mobile.
- Un système de pompage volumétrique haute pression dont le débit est précis et constant pour permettre la reproductibilité du temps de rétention  $t_R$ . Ce débit est généralement compris entre 0,2 et 2 ml/min. Ce débit dépend de la géométrie interne et externe de la colonne, du solvant utilisé, de la température et de la résolution recherchée. Le débit est également lié à la pression.
- Un système d'injection pour l'échantillon
- Des colonnes : colonnes analytiques et pré-colonnes. Les pré-colonnes sont utilisées pour protéger la colonne analytique ou réaliser une opération de pré-concentration. La phase stationnaire remplit la colonne analytique.
- Des détecteurs ayant pour objectif la visualisation de la séparation. Dans le cas de détecteurs performants, ils montrent la sélectivité et permettent l'identification des solutés.

Il existe deux types d'élution des solutés : isocratique, lorsque composition de la phase mobile n'est pas modifiée au cours de l'analyse, ou par gradient.

Dans le cas de la séparation et de la purification de mycotoxines, une chromatographie de partage est mise en place. Des colonnes normales ou à polarité de phases inversée sont utilisées, selon la polarité des mycotoxines (Tableau XIV ; Turner et al., 2009).

Pour le cas d'une colonne en phase normale, le principe est le suivant (Caude and Jardy, 1994) :

- La phase stationnaire est polaire (silices greffées de fonctions amine, nitrile, diol, phényle...). Cependant, ce matériau se dégrade dans le temps, ce qui peut impacter la reproductibilité des résultats.
- La phase mobile est apolaire avec des solvants apolaires tels que l'hexane, l'heptane, le cyclohexane ou l'isooctane. Un solvant peu polaire ou polaire, comme le chloroforme, le dichlorométhane, l'éthanol ou l'acétonitrile, est ajouté pour ajuster la force éluante de la phase mobile.
- Les solutés sont élués dans l'ordre de polarité croissante et donc les composés apolaires sont élués en premier.

Pour la CLHP en phase inverse, le principe est (Caude and Jardy, 1994) :

- La phase stationnaire est apolaire (silices greffées n-alkyle ou phényle, résines styrène-divinylbenzène). Plus la chaîne est longue, plus la silice greffée a un caractère apolaire.
- La phase mobile polaire est hydro-organique (mélange eau/solvant organique miscible comme le méthanol, éthanol, acétonitrile...). La maîtrise du pH est importante. En effet, un additif acido-basique est nécessaire pour amener sous forme moléculaire apolaire les solutés ionisables.
- Les solutés sont élués dans l'ordre de polarité décroissante. Les composés polaires sont élués avant les composés apolaires. La rétention diminue quand on augmente le caractère apolaire de l'éluant.

Tableau XIV : Comparaison des caractéristiques des deux types de CLHP

	CLHP en phase normale	CLHP en phase inverse
<b>Phase stationnaire</b>	Polaire	Apolaire
<b>Phase mobile (par gradient)</b>	Gradient de plus en plus polaire	Gradient de plus en plus apolaire
<b>Elution des composés</b>	Les plus polaires sont élués en dernier	Les plus apolaires sont élués en dernier

Lors de mélanges complexes, une élimination des impuretés est nécessaire avant l'analyse chromatographique. Dans ce cas, une extraction en phase solide (SPE) est réalisée. L'ajout d'une phase préliminaire peut influencer les résultats finaux, notamment pour une analyse quantitative. Le composé recherché et quantifié peut être retenu sur la colonne SPE, ce qui entraîne une sous-évaluation de la concentration finale.

#### **4.1.1.2 Chromatographie en phase gazeuse - Principe**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet, tout comme la CLHP, une analyse quantitative des mycotoxines.

Dans ce type de chromatographie, la phase mobile entraînant les solutés est un gaz inerte, appelé gaz vecteur. Il existe différents modes de séparation :

- Adsorption (gaz-solide), qui repose sur une interaction entre certains groupements des solutés et les sites actifs de l'adsorbant ;
- Partage (gaz-liquide), dépendant du critère de solubilité des solutés dans la phase liquide ;
- Transfert phase stationnaire-phase mobile, basé sur le passage des solutés en phase vapeur, conditionné par la pression de vapeur des solutés.

L'appareillage est divisé en quatre parties majeures : l'injecteur, le four, la colonne/phase stationnaire et le détecteur.

Il existe deux types de colonnes pour la CPG (Tranchant, 1996) :

- Les colonnes remplies, qui ne sont pratiquement plus utilisées aujourd'hui, exceptées pour les analyses de gaz ;
- Les colonnes capillaires.

Il faut noter que la CPG et la CLHP sont, en réalité, complémentaires pour l'analyse des mycotoxines. Les produits volatils et thermorésistants seront prioritairement analysés en CPG, tandis que les molécules peu volatiles, thermolabiles et solubles sont traitées, en général, par CLHP. Les mycotoxines étant peu volatiles, l'utilisation de la CPG devrait théoriquement être extrêmement réduite. Cependant, par rapport à la CLHP, en CPG, aucune réaction ne se produit entre les analytes et le vecteur (gaz inerte), avec, en plus, une grande simplicité d'identification des analytes par leur masse directe, sans passer par l'identification de nombreux adduits. Ainsi, dans certains cas, les mycotoxines sont modifiées chimiquement dans l'échantillon, afin de les rendre plus volatiles, avant de les analyser en CPG-MS.

#### **4.1.1.3 Types d'analyseurs CLHP et CPG**

Que ce soit pour la CPG ou la CLHP, il existe de nombreux types d'analyseurs. Ces derniers peuvent être utilisés seuls ou être couplés. Néanmoins, pour les analyses réglementaires, la norme repose de façon exclusive sur la spectrométrie de masse en tandem, du fait de la proximité chimique courante entre les mycotoxines d'une même famille. Les autres analyseurs peuvent cependant être intéressants dans le cas d'analyses non réglementaires (Tableau XV).

Tableau XV : Quelques types de détecteurs/d'analyseurs associés aux CLHP et CPG

Types d'analyseurs	Caractéristiques
<b>Spectrophotomètre UV - visible</b>	A longueur d'onde variable A barrette de diodes UV (deutérium) - visible (tungstène) - Enregistrement du spectre lors de l'élution des composés
<b>Spectrofluorimètre</b>	Lampes au deutérium, au xénon-mercure ou laser, nécessite la présence de chromophores
<b>Réfractomètre différentiel</b>	Carbones asymétriques
<b>Détecteur à ionisation de flamme</b>	Le plus courant en CPG,
<b>MS</b>	Le gaz de nébulisation correspond au gaz de séchage
<b>MS/MS</b>	Fractionnement des ions après une analyse primaire

#### 4.1.1.3.1 Conclusion

La CPG, couplée à des techniques de détection (MS, FID), est régulièrement utilisée pour identifier et quantifier la présence de mycotoxines dans des échantillons alimentaires. De nombreux protocoles ont été développés en ce sens. Cependant, la plupart des mycotoxines n'étant pas volatiles, il est nécessaire de les dériver pour permettre l'analyse (Turner et al., 2009). Par conséquent, cette technique est très peu utilisée dans le domaine commercial en raison de l'existence de techniques plus rapide, comme la CLHP.

### 4.1.2 Techniques rapides – La méthode ELISA

#### 4.1.2.1 Principe

La méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno-Absorbent Assay) est une méthode immuno-enzymatique. Elle est très populaire actuellement en raison de son coût relativement faible et de son application facile (Turner et al., 2009).

Cette technique repose sur la réaction Antigène-Anticorps et donc sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, monoclonaux ou polyclonaux, dirigés vers la mycotoxine. La réaction est compétitive ou non selon que le réactif est limitant (méthode indirecte) ou en excès (méthode directe). La technique la plus utilisée est la méthode indirecte, par compétition, car elle s'applique aux antigènes de toute taille, y compris les haptènes. Dans ce cas, la détection est une réaction colorimétrique avec une enzyme liée à l'anticorps.

La méthode ELISA utilisée généralement en mode compétitif se décompose en quatre étapes :

- Séparation de l'échantillon ;
- Extraction de la molécule à l'aide d'un solvant adéquat ;
- Fixation des toxines à un support solide greffé avec des anticorps – nécessité de coupler les mycotoxines à une protéine pour les rendre antigéniques et permettre la liaison antigène-anticorps ;
- Utilisation d'un réactif qui se fixe sur les anticorps libres. Une étape de lavage est réalisée pour éliminer les molécules non fixées. Lors de l'ajout du substrat, une réaction colorimétrique se produit en présence du conjugué.

L'intensité de la coloration diminue, généralement, de façon non linéaire quand la concentration en toxine augmente dans l'échantillon. Ceci nécessite l'établissement préalable d'une courbe d'étalonnage et des étapes de dilution de l'échantillon pour se placer dans la gamme de concentration et de coloration exploitable. Toutefois, de nombreux échantillons peuvent être analysés en parallèle en ayant recours à des microplaques.

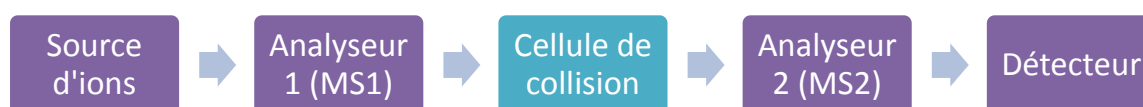
#### 4.1.2.2 Kits de dosage

Aujourd'hui, il existe des kits de dosage ELISA commerciaux pour permettre une détection rapide des mycotoxines. Ces kits, basé sur une réaction compétitive, utilisent soit un anticorps spécifique de la molécule cible, soit un conjugué enzymatique et l'anticorps. L'analyse est généralement quantitative, mais elle peut être qualitative ou semi-quantitative. Ces kits sont simples et rapides d'utilisation et ils sont portatifs, ce qui permet de les emmener partout, même directement au champ pour le cas des mycotoxines. Cependant, ils sont à usage unique et chaque kit contient une enzyme spécifique. Il est possible de trouver des kits T2/HT2, des kits fumonisines, des kits zéaralénone... Il n'est donc pas possible d'évaluer une multi-contamination en un test unique et les coûts peuvent donc devenir rapidement élevés. De plus, pour certaines mycotoxines, il n'existe, tout simplement, pas de kit, ce qui ne permet pas d'analyse (Grosjean et al., 2002; Turner et al., 2009).

Par ailleurs, la sensibilité des anticorps, mono- et polyclonaux est relativement étroite. La gamme de détection est donc restreinte. Ces kits sont parfois peu spécifiques, avec de nombreuses réactions croisées. Ceci est notamment illustré pour le dosage de la DON. En effet, les kits ne font pas de différenciation entre la DON et ses métabolites (3-ADON et 15-ADON), ce qui entraîne une surestimation dans les échantillons (Grosjean et al., 2002).

## 4.2 MALDI

Comme pour la CLHP et la CPG MS/MS, l'association en série de plusieurs spectromètres de masse est utilisée avec la technique MALDI. Le couplage MS/MS a été mis au point pour augmenter le phénomène de fragmentation des ions métastables sans être dépendant de la spontanéité de ces décompositions.



### 4.2.1 Le TOF réflectron

Le TOF réflectron associe des miroirs électrostatiques, appelés réflectrons, placés sur le trajet ionique. Ces miroirs augmentent la distance à parcourir des ions et donc leur temps de vol. La distance parcourue étant plus importante et que la précision sur la mesure du temps de vol est constante, ce mode permet de séparer des ions dont le  $m/z$  est très proche et donc d'améliorer la résolution. En effet, celle-ci est définie par le rapport masse de l'ion/étendue du pic soit  $m/\Delta m$ . La gamme de masse des molécules analysées est cependant diminuée dans ce mode d'analyse pour assurer ce niveau de résolution.

Tableau XVI : Comparaison générale des analyseurs couplés au MALDI (Lewis et al, 2000)

	TOF	TOF réflectron
<b>Précision</b>	0,05-0,2% (50 -200 ppm)	0,03 (30 ppm)
<b>Résolution</b>	2000	10000
<b>Gamme m/z</b>	>300 kDa	10 kDa
<b>Vitesse d'analyse</b>	ms	ms

#### 4.2.2 Autres analyseurs

Les modes TOF-TOF et CID (Collision-Induced Dissociation : Dissociation induite par collision) entraînent une refragmentation des molécules déjà ionisées. L'énergie est apportée à l'ion initial par collision inélastique contre un gaz rare (Argon, Hélium) ou encore l'azote.

#### 4.3 Méthode génétique

Au cours de la dernière décennie, une nouvelle technique basée sur la génétique a été mise au point. Contrairement aux méthodes immunoenzymatiques et physicochimiques, cette méthode de biologie moléculaire est mise en place en tant que test prédictif pour l'évaluation du potentiel toxigène des céréales. Cette méthode, basée sur le gène *Tri5*, est aujourd'hui utilisée pour les trichothécènes, car ce gène *Tri5* code pour la synthèse de la trichodiène synthase, enzyme agissant en amont de la synthèse des trichothécènes (Barchietto et al., 2002; Jeunot, 2005).

Cette méthode est plus rapide que les méthodes microbiologiques classiques, mais ne permet de détecter que les espèces potentiellement productrices de trichothécènes. En effet, la présence du gène *Tri5*, n'entraîne pas nécessairement la synthèse de trichothécènes, mais seulement un risque potentiel de production par la souche donnée.

Cette méthode est complémentaire des techniques analytiques physico-chimiques et immuno-enzymatiques grâce à son caractère prédictif. Elle évalue le risque de production (au champ ou pendant le stockage), alors que les autres techniques détectent la présence ou l'absence de mycotoxine. Elle ne peut cependant pas remplacer les analyses de référence dans le domaine agro-alimentaire pour justifier de la conformité d'un lot.

Cette méthode indirecte est donc très incertaine, tant qualitativement que quantitativement, et peut être surtout utilisée pour effectuer une analyse de risque.

### 5 Bilan

Au vu des conséquences économiques et, surtout, sanitaires que peuvent avoir les moisissures du genre *Fusarium* et les mycotoxines associées, il est important de bénéficier de méthodes de détection des moisissures et des mycotoxines associées robustes, simples d'utilisation, rapides, sensibles et reproductibles. L'idéal serait qu'elles puissent être utilisées en routine pour une prise de décision rapide. Ces conditions sont difficilement obtenues à l'heure actuelle avec les techniques de microbiologie classique et l'étude des caractères macroscopiques ou les techniques physico-chimiques qui sont relativement longues et nécessitent le recours à du personnel qualifié (Tableau XVII).

Tableau XVII : Avantages et inconvénients des différentes techniques analytiques

	Méthodes immunoenzymatiques	Méthodes physicochimiques	MALDI
<b>Avantages</b>	Délai court 3 à 24h Coût unitaire faible Plusieurs échantillons simultanément	Détection faible quantité (dépendant de la LOD-LOQ) Spécificité/Sensibilité Analyse multitoxines	Pas de solvant Analyse rapide (<30 min) Retour sur investissement rapide (ex : milieu hospitalier)
<b>Inconvénients</b>	Risque de faux positifs et de faux négatifs Risque de réaction croisée (notamment dus aux dérivés) Manque de spécificité Analyse monotoxine, pas d'évaluation de la multicontamination Précision inférieure aux techniques de référence	Coûts d'investissement de l'appareillage et de fonctionnement Maintenance Durée d'analyse Volume de solvant	Semi quantitatif Coût d'investissement Choix de la matrice

La technique MALDI est aujourd'hui beaucoup utilisée dans le milieu hospitalier, pour de l'identification bactérienne. Elle remplace, de plus en plus, les méthodes microbiologiques conventionnelles grâce à sa rapidité et sa précision qui permet la distinction d'espèces. De plus, les résultats obtenus sont directement liés à la phylogénie (Cassagne et al., 2011; Dhiman et al., 2011; Marklein et al., 2009; Martiny et al., 2012; Seng et al., 2009; Triest et al., 2014). Elle est mise en place en routine pour faciliter la mise en place des traitements. A l'inverse, son utilisation pour l'analyse des moisissures reste marginale.

Une revue de l'analyse des micro-organismes par MALDI-TOF a été effectuée par Fenselau et Demirev en 2001, mais la section sur les champignons filamenteux est trop brève pour être pertinente (Fenselau and Demirev, 2001; Santos et al., 2010). Depuis, de nombreuses études ont été effectuées, aussi bien sur les moisissures que sur les mycotoxines, pour combler ce manque. Cependant, les études sur *Fusarium* restent limitées et se focalisent sur un nombre limité de souches (Marinach-Patrice et al., 2009; Seyfarth et al., 2008). L'utilisation de cette technique dans l'agroalimentaire est peu répandue. Bien que balbutiante, elle suscite cependant l'intérêt particulier de la filière orge-malt-bière avec une identification des moisissures au champ ou lors du stockage.

Dans l'état actuel des connaissances, l'utilisation du MALDI-TOF pour effectuer, à la fois, l'identification de moisissures et évaluer leur potentiel toxigène semble particulièrement prometteuse. Cependant, si cette solution semble séduisante au vu de la littérature, il reste encore à en étudier la faisabilité et à déterminer les limites pratiques avant d'en faire une technique de mesure du risque mycologique et mycotoxicologique fiable et rapide.

# Partie 3 : Matériels et Méthodes

## 1 Matériels et Méthodes

### 1.1 Matériels

#### 1.1.1 Souches

Les souches de *Fusarium* et la souche *Microdochium nivale* ont été fournies par l'ANSES, Nancy, et l'IFBM, Vandœuvre-lès-Nancy. Les différentes espèces et leur code d'identification sont décrits dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Espèces de *Fusarium* utilisées au cours des essais.

	Code	Espèce	Année	Hôte	Région
ANSES	CB-37-91	<i>F. proliferatum</i>	2011	Orge	45480, Loiret, Centre
	CB-36-10	<i>F. avenaceum</i>	2011	Orge	21300, Côte d'Or, Bourgogne
	CB-36-71	<i>F. oxysporum</i>	2011	Orge	21300, Côte d'Or, Bourgogne
	CB-36-65	<i>F. tricinctum</i>	2011	Orge	21300, Côte d'Or, Bourgogne
	CB-41-76	<i>F. equiseti</i>	2011	Blé	26120, Drôme, Rhône-Alpes
	MB-70-49	<i>F. temperatum</i>	2011	Maïs	64, Pyrénées-Atlantiques
	MB-70-67	<i>F. sporotrichioides</i>	2011	Maïs	64, Pyrénées-Atlantiques
	MB-70-74	<i>F. verticillioides</i>	2011	Maïs	64, Pyrénées-Atlantiques
	MB-70-88	<i>F. poae</i>	2011	Maïs	64, Pyrénées-Atlantiques
	MB-60-5	<i>F. andiyazi</i>	2011	Maïs	Rhône-Alpes
	CB-34-28	<i>F. langsethiae</i>	2011	Orge	51260, Marne, Champagne-Ardenne
	MB-62-89	<i>F. graminearum</i>	2011	Maïs	68250, Haut-Rhin
	MB-67-73	<i>F. subglutinans</i>	2011	Maïs	64, Pyrénées-Atlantiques
	Fu 106	<i>F. culmorum</i>	2007	<i>Triticum sp.</i>	Midi Pyrénées
	Fu 129	<i>F. acuminatum</i>	2007	<i>Vitis vinifera</i>	Languedoc Roussillon
	Fu 142	<i>F. cerealis</i>	2007	<i>Zea mays sp.</i>	Bourgogne
	Fu 155	<i>F. solani</i>	2009	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Non connue
IFBM	Fu 66	<i>F. venenatum</i>	NC	<i>Triticum sp.</i>	Non connue
	Fu 69	<i>F. lateritium</i>	NC	<i>Juglans sp.</i>	Non connue
	Fu 109/413	<i>F. graminearum</i>	NC	Orge	Non connue
	Fu 11	<i>F. graminearum</i>	NC	Orge	Non connue
	Fu 12	<i>F. poae</i>	NC	Orge	Non connue
	Fu 2	<i>F. poae</i>	NC	Orge	Non connue
	Fu 08/035	<i>F. langsethiae</i>	NC	Orge	Non connue
	Fu 9	<i>F. langsethiae</i>	NC	Orge	Non connue
	Mic 08	<i>M. nivale</i>	NC	Orge	Non connue

### 1.1.2 Milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés au cours de ces essais : les milieux YM et BHI.

Le milieu majoritairement utilisé est le milieu YM électif pour les moisissures et les levures liées à la filière orge-malt-bière. Il est préparé extemporanément par suspension dans 1 L d'eau distillée de 11 g de glucose (Sigma, Isère), 5 g de peptone de caséine (Organotechnie, La Courneuve), 3 g d'extrait de malt (Organotechnie, La Courneuve) et 3 g d'extrait de levure (Fluka, Isère). Le milieu est ensuite autoclavé à 110°C pendant 10 min avant utilisation (Autoclave, Leuqueux, NC). Lors de l'utilisation de milieu YM gélosé, 15 g d'agar (Fluka, Isère) sont ajoutés et la solution est portée à ébullition avant autoclavage.

Le milieu Brain Heart Infusion (BHI) est préparé par suspension de 37 g de poudre prête à l'emploi (Milieu BHI, Fluka, Isère) dans 1L d'eau distillée. Le milieu est ensuite porté à ébullition puis autoclavé à 121°C pendant 20 min.

### 1.1.3 Réactifs

Acétonitrile	Fisher chemicals	Strasbourg
Acide trifluoroacétique	Acros organics	Gell

### 1.1.4 Standards

Mycotoxine T2	Sigma	Isère
TOF mix	Laser biolabs	Manchester
CHCA	Laser biolabs	Manchester
SA	Laser biolabs	Manchester
DHB	Laser biolabs	Manchester

### 1.1.5 Matériels de préparation des échantillons et des cultures

Autoclave	Leuqueux	NC
Vortex	Bioblock scientifique	Strasbourg
Broyeur à bille	Retsch	Eragny sur Oise
Sonicateur Vibra cell	Sonics	Newtown
Bain marie	Lauda	Roissy Charles de Gaulle
Etuve bactériologique :		
- Minitron	Infors HT	Massy
- ELGA	Sartorius stedim	Aubagne
β-glucanase	Sigma	Isère

### 1.1.6 Matériels d'analyse

MALDI-TOF Performance	Kratos Analytical	Manchester
Saramis	Biomérieux	Marcy-L'Etoile
Chromatographe liquide performance UltiMate 3000	haute Dionex	Dreieich, Allemagne
Analyseur LTQ ORBITRAP XLI	Fischer-Scientific	Walltham, USA
Colonne C18 ALLTIMA (150*2,1 ; 5 μm)	ALLTECH-LCGC	Iselin, USA

## **1.2 Méthodes**

Pour respecter les conditions d'asepsie et éviter toute contamination, les expérimentations sont réalisées à proximité d'un bec benzène conférant une zone de stérilité d'environ 20 cm de diamètre autour de la flamme.

### **1.2.1 Préparation du matériel**

Avant toute manipulation, le matériel (erlenmeyer, flacon...) est rincé à l'eau distillée puis à l'éthanol. Il est ensuite stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

### **1.2.2 Mise en culture des souches**

Les cultures sont fournies par l'ANSES et l'IFBM sous forme solide. Un repiquage sur milieu solide est réalisé à partir d'explants des cultures d'origine. Puis, un repiquage liquide peut être effectué.

Les souches sont mises en culture sur du milieu gélosé en boîte de Pétri à partir d'un repiquage d'explants. Les cultures sont placées, retournées, à la lumière afin de respecter la photopériode : influence du cycle jour/nuit pour la croissance, pendant 7 jours et à température ambiante. Ainsi, les boîtes de Pétri sont placées à proximité d'une fenêtre pendant 1 semaine.

A l'issue de cette croissance, une mise en culture des souches dans du milieu YM liquide (100 ml) à partir de milieu YM gélosé a été réalisée. Un prélèvement d'environ 1 cm<sup>2</sup> (sous forme d'un carré) de gélose a été prélevé et placé dans l'erlenmeyer. Les cultures sont ensuite placées dans une étuve sous agitation à 300 rpm, 28°C pendant 4 jours.

### **1.2.3 Préparation des échantillons**

Avant l'analyse des échantillons par LC-MS, une étape d'extraction est nécessaire. L'analyse LC-MS se fait principalement à partir de culture liquide. Un volume de 0,5 ml de milieu est filtré à l'aide de filtre millipore de 0,22 µm dans un récipient de 1,5 ml. Puis est ajouté 1 ml d'un mélange d'extraction. Les conditions d'extraction seront définies (cf. Partie 4).

### **1.2.4 Préparation du mélange d'extraction**

La préparation du mélange d'extraction est définie pour tous les essais. Ce mélange est composé d'acétonitrile et d'eau ultrapure 50%/50% (v/v). A cette solution est ajouté 0,1% de TFA, qui aide à l'ionisation et qui favorise la séparation.

### **1.2.5 Dépôts sur plaque MALDI-TOF**

Avant analyse par MALDI-TOF d'un échantillon, un récipient de 1,5 ml est préparé avec 1 ml d'un mélange d'extraction. Si la culture est réalisée sur du milieu gélosé, un carré d'environ 1 cm<sup>2</sup> de gélose avec de la matière de prélèvement est mis en suspension dans le récipient de 1,5 ml. Dans le cas d'une culture en milieu liquide, 0,5 ml de culture est prélevé après homogénéisation puis mis en suspension dans le récipient de 1,5 ml.

La durée et la température de cette étape d'extraction sont optimisées au cours de ces travaux et ne sont donc pas détaillées dans cette partie.

Sur la plaque de dépôt du MALDI-TOF, au niveau d'un même puit, sont déposés successivement :

- 0,5 µl de matrice ;
- 0,5 µl de l'échantillon, en homogénéisant le dépôt à l'aide de la pipette ;
- 0,5 µl de matrice puis homogénéisé.

Une solution tof mix, un mélange de peptides dont la masse est connue, est utilisée pour la calibration (Annexe 2). Elle est déposée, en utilisant la même technique que pour les échantillons, au centre de 8 d'entre eux comme schématisé sur la Figure 23. Une calibration à partir d'une solution tof mix doit être effectuée toutes les 8 analyses pour contrer les irrégularités possibles de la plaque, c'est pourquoi il est nécessaire de réaliser un dépôt au centre des 8 échantillons.

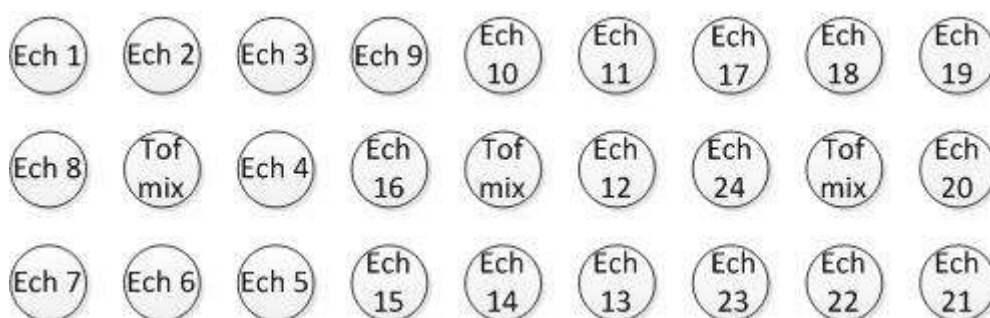


Figure 23 : Disposition des dépôts sur la plaque MALDI-TOF

Un dépôt d'1 µl de matrice seule est également nécessaire comme témoin.

Le tout est laissé à cristalliser à l'air libre, sur la paillasse, à proximité du bec Bunsen.

### 1.2.6 Analyse MALDI-TOF

La désorption-ionisation par laser est optimisée pour chacune des matrices. Le MALDI-TOF est réglé en mode linéaire avec une extraction optimisée pour 1570 Da. Un blanc est effectué pour les masses inférieures à 300 Da.

Pour l'analyse MALDI-TOF, une fois la plaque de dépôt insérée, les réglages sont programmés :

- 50 tirs par échantillon, avec déplacement du laser pour obtenir une moyenne des masses sur l'ensemble de l'échantillon ;
- Gamme de masse de 0 à 20000 Da.
- Blank à 300 Da, tous les pics inférieurs ne seront pas pris en considération car ils correspondent à des molécules simples et ubiquitaires (acides aminés, glucose...).

### 1.2.7 Utilisation de Saramis®

A partir du spectre obtenu par MALDI-TOF, un fichier ascii, de format spécifique associant les masses et les intensités, est créé pour permettre l'intégration des données dans la base de données Saramis®. Un minimum de 12 spectres par espèce est nécessaire pour la création d'un super-spectre représentatif de l'espèce. Ce super-spectre, qui recense les pics caractéristiques d'une espèce donnée, est l'outil de base utilisé lors du processus d'identification. Un premier traitement statistique est alors appliqué à cet ensemble de spectres issus de souches d'une

même espèce dans le but de recenser les pics communs aux échantillons. Ainsi, le logiciel construit un dendrogramme indiquant que les spectres ont une constitution assez proche pour être de la même espèce. Classiquement, l'ensemble de spectres considéré doit avoir une similarité supérieure à 70%. Si tel n'est pas le cas, l'appartenance des souches à l'espèce étudiée peut être remise en question et, dans le cas des moisissures, la pertinence de la classification aussi. Une tolérance est appliquée à la création du super-spectre pour qu'il soit le plus pertinent possible. Ainsi, la tolérance est réduite de 80%, c'est-à-dire qu'il est acceptable qu'un pic dit caractéristique ne soit présent que dans 80% des spectres utilisés pour construire le super-spectre. Une comparaison entre ce jeu de pics caractéristiques et l'ensemble des super-spectres de la base de données est ensuite réalisée afin de vérifier qu'il est réellement discriminant. Une deuxième étape de discrimination aura lieu en comparant ce super-spectre avec celui correspondant à l'espèce ou, à défaut au genre le plus proche. Si ces étapes sont validées avec succès, le super-spectre est considéré comme définitif et intégré dans la base de données de reconnaissance. Une validation est ensuite réalisée en utilisant un spectre issu de cette espèce. Celui-ci est introduit comme échantillon inconnu dans le système de reconnaissance de Saramis<sup>®</sup> afin de vérifier qu'une identification correcte est obtenue.

### 1.2.8 Analyse LC-MS

La colonne de chromatographie est couplée avec un spectrophotomètre à barrette de diodes et un analyseur par spectrométrie de masse.

Le volume d'injection est de 16 µl. La colonne utilisée est une colonne Alltima Alltech C18 (150 mm \* 2,1 mm ; 5 µm). La phase mobile est constituée d'un mélange A eau/méthanol 95/5 (v/v) et d'un mélange B méthanol/eau 95/5 (v/v), les deux solutions contenant par ailleurs 10 mM d'acétate d'ammonium. Le débit est de 0,2 ml/min.

Le programme du gradient d'élution commence par un mélange 50/50 (Phase A/B) à t = 0 min. Une augmentation linéaire à 100 % de la phase B est initiée sur 10 min. Un gradient isocratique à 100% phase B est ensuite programmé pendant 5 min. Puis, suit une redescende à 50/50 à 15,1 min par diminution du débit de la phase B jusqu'à 21 min.

L'analyse des échantillons se fait de la concentration la plus faible à la concentration la plus élevée pour éviter tout risque de contamination croisée des échantillons. Des rinçages intermédiaires sont également effectués automatiquement par l'équipement.

# Partie 4 : Résultats – Discussion

---

Trois axes seront abordés au cours de cette partie. Tout d’abord, nous nous focaliserons sur la mise au point de la méthode concernant différents facteurs, tels que le type de matrice utilisé et le traitement des échantillons. En effet, l’objectif est d’adapter la méthode fonctionnelle appliquée à des bactéries au traitement des moisissures. Nous déterminerons ensuite sa faisabilité pour l’identification des moisissures à partir d’un cas pratique reconnu pour la filière orge-malt-bière, le genre *Fusarium*, mais qui est également émergent dans le milieu hospitalier. Ainsi nous développerons son application à l’identification des souches du genre *Fusarium* et des contaminants de champ. Enfin, nous étendrons notre analyse en évaluant la faisabilité de la détection de métabolites secondaires associés. Nous évaluerons donc l’identification de mycotoxines associées au genre *Fusarium* et du potentiel toxigène.

## 1 Mise au point de la méthode

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions d’analyse avec la technique MALDI-TOF. Il est nécessaire de déterminer les paramètres de l’équipement, les conditions de traitement des échantillons (durée et température d’extraction), le type de matrice à utiliser... En effet, la biomasse fongique est très différente de la biomasse bactérienne et elle est plus complexe à mettre en œuvre et manipuler.

### 1.1 Optimisation des conditions d’analyse

#### 1.1.1 Etude du couple matrice - fluence

La technique MALDI-TOF est une technique d’ionisation douce qui consiste à vaporiser la matrice jouant un rôle de convoyeur de l’échantillon, immobilisé dans celle-ci. Cette matrice a donc un rôle de donneur et d’accepteur de protons et permet l’ionisation de l’analyte. Certains facteurs comme le choix de la matrice et la puissance du laser, appelée également fluence, influent directement la réponse spectrale en relation avec les composants intrinsèques pariétaux et membranaires des moisissures, très différents des bactéries. L’objectif est d’obtenir, pour un échantillon donné, des spectres avec un maximum de pics bien résolus, qui serviront ultérieurement dans les bases de données. En effet, avec le MALDI-TOF, nous travaillons dans le domaine de la taxonomie numérique, il est donc nécessaire de compléter les bases de données telles que Saramis<sup>®</sup> avec des données exploitables.

##### 1.1.1.1 Choix de la matrice et de la fluence

La souche *F. graminearum* (MB 62-89) a été cultivée dans du milieu YM liquide puis a été déposée sur plaque MALDI selon la méthode décrite §1.2.5 (Partie 3). Cette souche est un témoin des filières céréalières et est utilisée pour la qualification des produits phytosanitaires. Trois matrices les plus couramment utilisées ont été testées : le CHCA, le DHB et la SA dont les propriétés sont décrites dans le Tableau XIX. Il faut noter que la cristallisation des trois matrices est différente (Tableau XIX ; Figure 24). L’extraction par laser est étudiée pour chacune des trois matrices avec des fluences comprises entre 10 et 150 J/m<sup>2</sup>.

Tableau XIX : Propriétés des matrices utilisées

Matrice	Cristaux : taille et distribution	Mode de balayage	Composés détectés
<b>CHCA</b>	Petits et homogène	Rectangulaire	Petits et gros peptides
<b>SA</b>	Gros et homogène	Rectangulaire	Protéines
<b>DHB</b>	Moyens et hétérogène	Annulaire	Glycoprotéines et polysaccharides



Figure 24 : Cristallisation des différentes matrices  
De gauche à droite : SA ; CHCA ; DHB

#### 1.1.1.2 Résultats

Le choix de matrice s'effectue en évaluant, pour les différentes puissances de laser, l'intensité des pics et leur résolution, ainsi que le nombre de pics détectables. Une fluence trop élevée risque de dégrader les liaisons entre les composés et les résultats ne seront pas reproductibles.

Pour les trois matrices, les fluences de 10 et 20 J/m<sup>2</sup> ne donnent aucun résultat pour les petites masses. Pour les hautes masses, aucun pic n'est distingué à une fluence inférieure à 40 J/m<sup>2</sup>. A une fluence élevée, supérieure à 90 J/m<sup>2</sup>, un décollement de la ligne de base est observé.

Pour le CHCA, une fluence de 50 J/m<sup>2</sup> produit des pics définis et l'intensité maximale (70 mV) pour les faibles masses. Pour les hautes masses (> 1000 Da), cette fluence ne permet pas d'obtenir l'intensité maximale (34 mV), mais elle donne la meilleure résolution de pics (603 et 1050). Les résultats sont présentés Figure 25 et Figure 26.

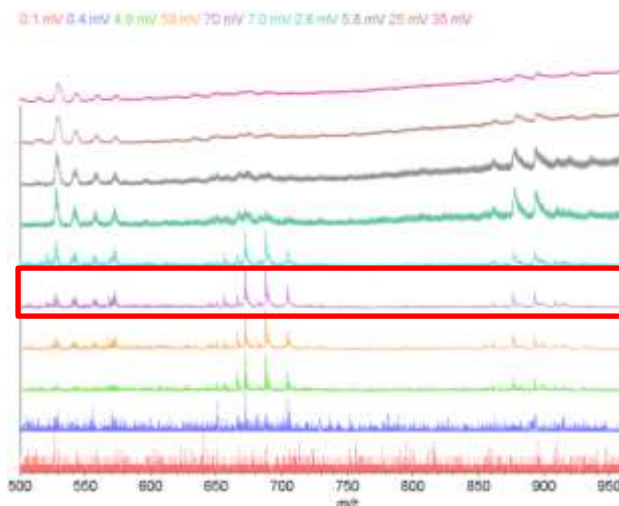


Figure 25 : Profils de *F. graminearum* avec du CHCA - Faibles masses

De bas en haut : **1.** Fluence de 10 J/m<sup>2</sup>, **2.** Fluence de 20 J/m<sup>2</sup>, **3.** Fluence de 30 J/m<sup>2</sup>, **4.** Fluence de 40 J/m<sup>2</sup>, **5.** Fluence de 50 J/m<sup>2</sup>, **6.** Fluence de 60 J/m<sup>2</sup>, **7.** Fluence de 70 J/m<sup>2</sup>, **8.** Fluence de 80 J/m<sup>2</sup>, **9.** Fluence de 90 J/m<sup>2</sup>, **10.** Fluence de 100 J/m<sup>2</sup>.

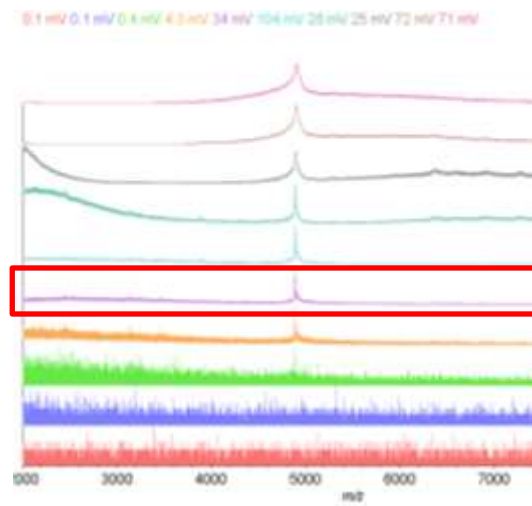


Figure 26 : Profils de *F. graminearum* avec du CHCA - Hautes masses

Lors de l'utilisation de SA, les profils avec les pics les mieux définis sont obtenus avec une fluence de 70 J/m<sup>2</sup>. Avec cette puissance, l'intensité la plus importante pour les hautes masses est de 85 mV avec une résolution de 1000, pour les faibles masses, elle est de 161 mV pour une résolution moyenne de 600 (Figure 27 et Figure 28).

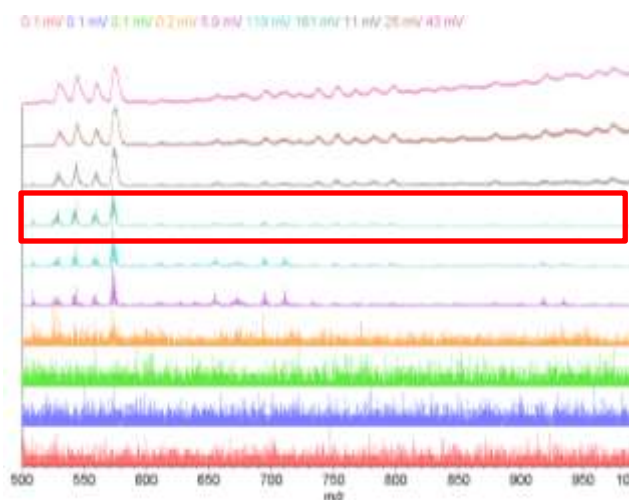


Figure 27 : Profil de *F. graminearum* avec du SA - Faibles masses

De bas en haut : **1.** Fluence de 10 J/m<sup>2</sup>, **2.** Fluence de 20 J/m<sup>2</sup>, **3.** Fluence de 30 J/m<sup>2</sup>, **4.** Fluence de 40 J/m<sup>2</sup>, **5.** Fluence de 50 J/m<sup>2</sup>, **6.** Fluence de 60 J/m<sup>2</sup>, **7.** Fluence de 70 J/m<sup>2</sup>, **8.** Fluence de 80 J/m<sup>2</sup>, **9.** Fluence de 90 J/m<sup>2</sup>, **10.** Fluence de 100 J/m<sup>2</sup>.

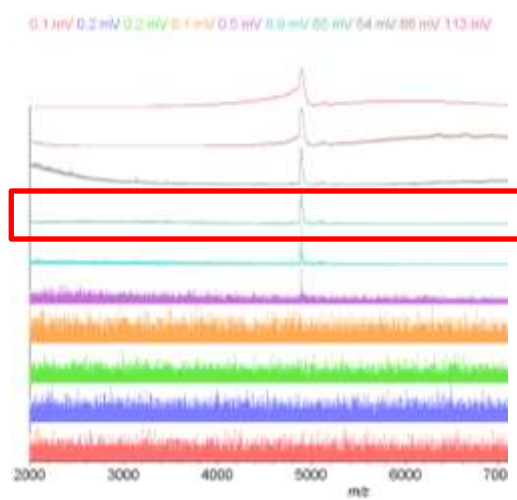


Figure 28 : Profil de *F. graminearum* avec du SA - Hautes masses

Avec la matrice DHB (Figure 29 et Figure 30), une fluence plus importante que les autres (80 J/m<sup>2</sup>) est nécessaire pour faire apparaître des pics. L'intensité et la résolution sont plus faibles comparées aux autres matrices (17 mV). Cette matrice ne semble donc pas adaptée pour l'analyse des moisissures.

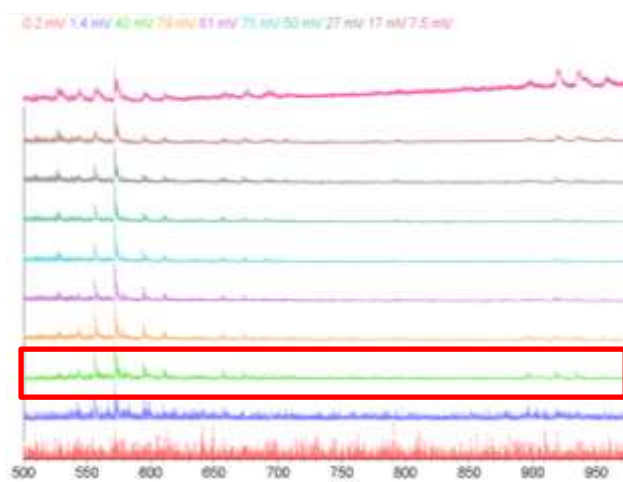


Figure 29 : Profil de *F. graminearum* avec du DHB - faibles masses

De bas en haut : 1. Fluence de 60J/m<sup>2</sup>, 2. Fluence de 70J/m<sup>2</sup>, 3. Fluence de 80J/m<sup>2</sup>, 4. Fluence de 90J/m<sup>2</sup>, 5. Fluence de 100J/m<sup>2</sup>, 6. Fluence de 110J/m<sup>2</sup>, 7. Fluence de 120J/m<sup>2</sup>, 8. Fluence de 130J/m<sup>2</sup>, 9. Fluence de 140J/m<sup>2</sup>, 10. Fluence de 150J/m<sup>2</sup>.

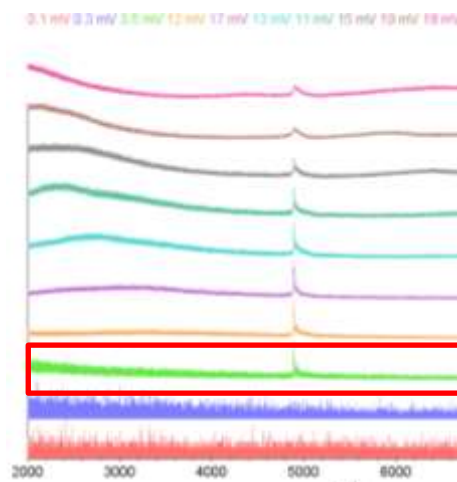


Figure 30 : Profil de *F. graminearum* avec du DHB - hautes masses

Pour effectuer une identification de souches, il convient de vérifier si la matrice ne présente pas de pic commun à ceux détectés lors d'un échantillon de souche, aussi bien pour les faibles masses que pour les hautes masses (Figure 31 et Figure 32).

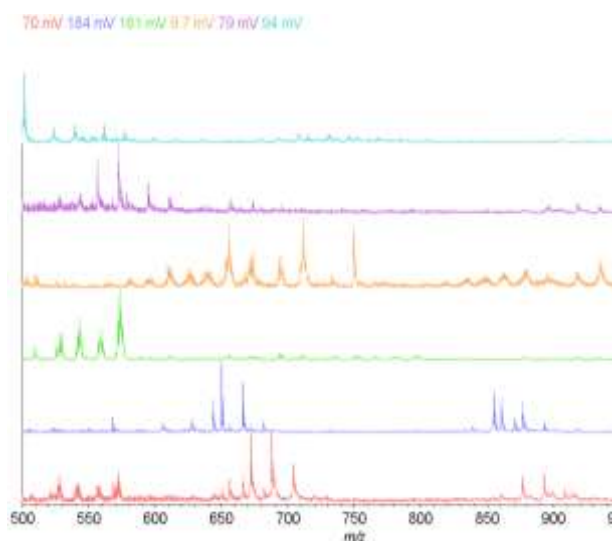


Figure 31 : Profils de *F. graminearum* pour les trois matrices – faibles masses

De bas en haut : 1. *F. graminearum* + CHCA, 2. Témoin CHCA, 3. *F. graminearum* + SA, 4. Témoin SA, 5. *F. graminearum* + DHB, 6. Témoin DHB.

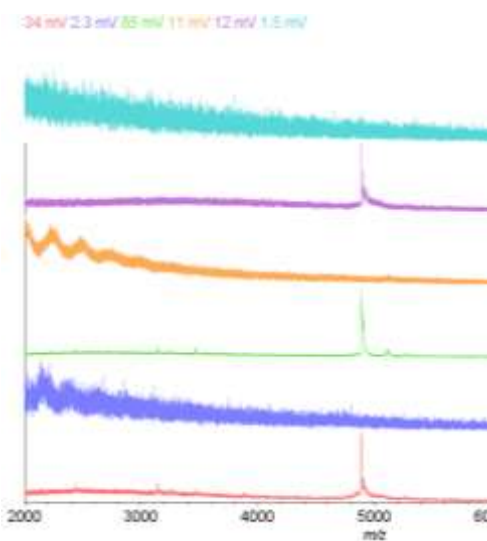


Figure 32 : Profils de *F. graminearum* pour les trois matrices – hautes masses

En comparant les profils aux faibles masses, les matrices présentent des pics interférents. Néanmoins, les pics observés hors de la matrice sont bien définis, spécialement avec le CHCA et le SA, qui serviront pour l'identification de la souche. Il faut noter qu'un blanc est réalisé à 300 Da quelle que soit la matrice, en raison d'une forte densité spécifique de la matrice entre 0 et 300 Da. Il ne serait donc pas possible de détecter des pics spécifiques de genre ou d'espèce dans cette zone spectrale.

Pour les hautes masses, aucune interférence des différentes matrices n'est observée. L'intensité maximale des profils représentant la souche *F. graminearum* est nettement supérieure à celles des différentes matrices. Tous les pics semblent donc provenir de l'échantillon (souche et milieu de culture) avec un pic majoritaire à 4892 Da commun aux trois matrices.

#### **1.1.1.3 Conclusion**

Lors de l'analyse MALDI-TOF de moisissures, les intensités spectrales sont très faibles en comparaison aux intensités retrouvées lors de l'analyse de bactéries. En dépôt direct, les intensités pour les bactéries sont de l'ordre du volt, alors que, pour les moisissures, les intensités sont de l'ordre de 10 à 100 mV. La biomasse étudiée étant très complexe, il est important d'avoir des spectres avec une intensité et une résolution optimale pour pouvoir, à terme, les confronter à des bases de données, telles que Saramis<sup>®</sup>, voire de les compléter.

Ainsi, la détermination des conditions optimales d'analyse est une étape indispensable pour obtenir des résultats spectraux interprétables aussi bien qualitativement que quantitativement. Par exemple, l'utilisation d'une matrice inappropriée entraînera, à la place d'une ionisation douce, une fragmentation forte et excessive des protéines (Santos et al., 2010). Le DHB avec sa cristallisation annulaire est plus difficile à mettre en œuvre et n'est pas recommandé pour une analyse automatique. En effet, il faudra vérifier chaque dépôt sur la plaque avant l'analyse MALDI-TOF et focaliser le laser sur des zones spécifiques et précises pour un résultat optimal. Bien que le SA soit plus performant en terme d'intensité, pour l'analyse des hautes masses, le CHCA représente un compromis intéressant pour l'analyse des petites et des hautes masses et sera donc utilisé pour la suite de l'étude.

#### **1.1.2 Modalités de l'extraction**

Pour les moisissures, il est impossible, contrairement aux bactéries, de prélever une colonie pour la déposer directement dans un sandwich de matrice sur une plaque MALDI. Il est donc nécessaire de réaliser une extraction des composants cellulaires de l'échantillon, soit à partir d'un prélèvement de culture liquide, soit à partir d'un explant.

En raison de l'importance de cette étape pour la contribution spectrale, les conditions d'extraction des composants cellulaires de l'échantillon sont évaluées. La durée de l'extraction, ainsi que la température et le temps de stockage des échantillons dans ce mélange sont importants, car une incubation inadéquate dans ce mélange acétonitrile/eau et TFA risque de dégrader l'échantillon et de rendre les résultats inexploitable.

Ainsi, une étude de la durée d'extraction et de la durée et de la température de stockage des échantillons est réalisée pour optimiser l'extraction sans dégrader l'échantillon et obtenir la meilleure réponse spectrale.

### 1.1.2.1 Durée d'extraction

#### 1.1.2.1.1 Mise en œuvre

Deux souches ont été utilisées pour l'analyse : tout d'abord, nous avons évalué la faisabilité avec la *F. poae*, puis, pour vérifier que les conditions optimales étaient robustes, nous les avons appliquées à *Microdochium nivale*. Le choix de ces deux souches s'explique par le fait de mettre en culture deux souches très différentes pour tester la stabilité et la reproductibilité de l'expérimentation. Ces deux souches sont cultivées sur milieu YM gélosé.

Les essais sont réalisés à température ambiante et les dépôts sur la plaque MALDI sont réalisés après différents temps d'incubation. Les temps testés sont 0 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 4h30, 5h30 et 72h.

Ainsi, un temps minimum de 30 mn d'extraction peut être appliqué à température ambiante, pour une analyse extemporanée. De plus, les spectres conservant le même aspect (pas de dégradation visible) et des intensités du même ordre de grandeur jusqu'à concurrence de 72 h, l'analyse peut ainsi être différée de trois jours à partir du début de l'opération d'extraction.

#### 1.1.2.1.2 Résultats

Les résultats spectraux sont étudiés sur une zone réduite et principalement sur la gamme de masses 800 Da – 920 Da. Les résultats obtenus pour *F. poae* sont présentés Figure 33.

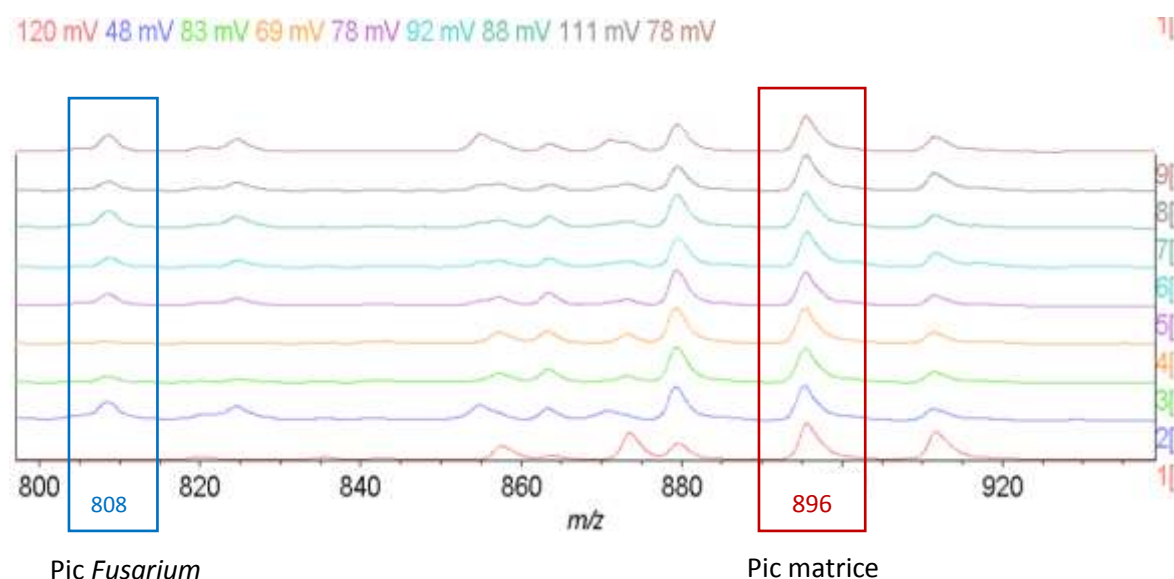


Figure 33 : Profils pour *F. poae* après différents temps d'extraction  
De bas en haut : 1. Matrice CHCA, 2. t=0 min, 3. t=30 min, 4. t=1h, 5. t=1h30, 6. t=2h, 7. t=4h30, 8. t=5h30, 9. t=72h.

Sur cette zone de masse, sélectionnée à titre d'exemple, nous pouvons observer un pic matrice, commun à tous les spectres à 896 Da. Un pic spécifique du genre *Fusarium* est également obtenu à 808 Da. Quel que soit le temps d'extraction, l'intensité des spectres est relativement stable de 30 min à 72h. Les résultats sont similaires pour *M. nivale*.

Ainsi, nous pouvons donc définir un temps d'extraction des échantillons compris entre 30 min et 72h pour une dégradation optimale et un résultat spectral interprétable. Il est alors possible de différer le dépôt et l'analyse spectrale suite à l'extraction. Par ailleurs, aucune dégradation de l'échantillon ne semble se produire au cours des 72h à température ambiante.

### **1.1.2.2 Conditions de stockage**

#### **1.1.2.2.1 Mise en œuvre**

Deux souches utilisées pour l'analyse sont, comme pour l'essai précédent (1.1.2.1), *M. nivale* et *F. poae*. Ces deux souches sont cultivées sur milieu YM gélosé. L'objectif de ces expériences était d'étudier, cette fois-ci, l'effet combiné du temps et de la température de stockage d'un échantillon suite à l'étape d'extraction.

L'effet de trois températures de stockage a été évalué : -20°C ; 4°C, 20°C. Pour chaque température, des prélèvements avec dépôts et analyses MALDI-TOF sont réalisés pour les temps de stockage suivants : 1h, 2h, 4h30, 5h30, 72h.

#### **1.1.2.2.2 Résultats**

A l'image de ce qui a été observé lors des expériences précédentes, les intensités et allures des spectres restent globalement stables quels que soient la température et le temps considérés. Seule une baisse des intensités spectrales pour *M. nivale* a pu être mise en évidence à 20°C. En l'absence de données de stockage à plus long terme, celui-ci sera réduit à 72 heures et la température fixée à -20°C par mesure de précaution et pour standardiser les procédures de stockage d'échantillons biologiques.

## **1.2 Influence du type de culture et de la nature du milieu**

Les milieux de culture sont des matrices physico-chimiques complexes composées de protéines, de peptides et de polysaccharides. Lors d'une analyse MALDI, un prélèvement liquide ou un explant est mis en suspension dans le mélange d'extraction. Cependant, que la culture soit liquide ou gélosée, cet échantillon contient un extrait de ce milieu de culture. Il est donc important d'en évaluer l'impact pour permettre *in fine* une identification rigoureuse. Les essais suivants ont pour objectif d'identifier si les milieux de culture utilisés ont une contribution spectrale sur les profils de masse. Par ailleurs, le temps de culture est aussi à optimiser, puisqu'en fonction de l'âge de la culture, les composés cellulaires varient. Ceci peut influencer les données spectrales.

### **1.2.1 Interférences du milieu de culture et influence du temps de culture**

#### **1.2.1.1 Influence du milieu**

Une pré-culture de *F. graminearum* (MB62-89) dans du milieu YM liquide est réalisée selon les conditions décrites Partie 3-§1.2.2. Deux cultures sont ensuite ensemencées dans du milieu YM liquide et BHI liquide à partir d'1 mL de cette pré-culture. Le choix de ces deux milieux semi-définis et complexes s'explique par le fait qu'ils sont très différents dans leur composition et l'objectif est de maximiser cette différence pour observer l'impact sur les spectres MALDI-TOF.

Des échantillons de 500 µL de chacune de ces deux cultures sont prélevés à 17h, 24h, 41h, 48h, 65h, 72h et 89 h puis homogénéisés dans 1 mL d'un mélange d'extraction et déposés sur la plaque pour une analyse MALDI-TOF.

### 1.2.1.2 Résultats

La comparaison des deux types de milieu de culture montre des résultats significativement différents (Figure 34 et Figure 35).

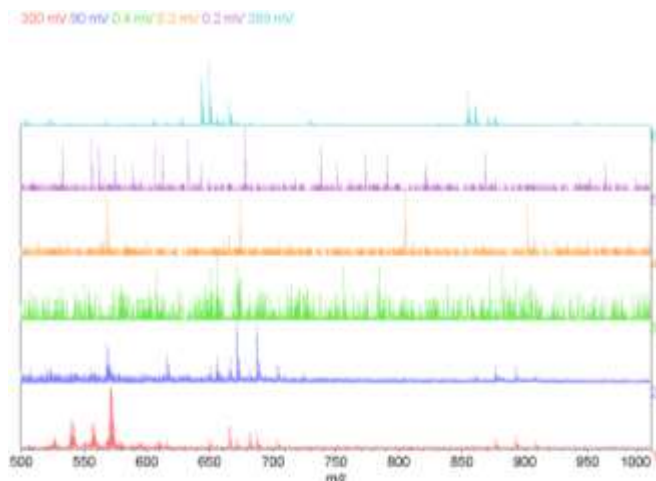


Figure 34 : Comparaison de profils de *F. graminearum* en milieu YM et BHI - faibles masses

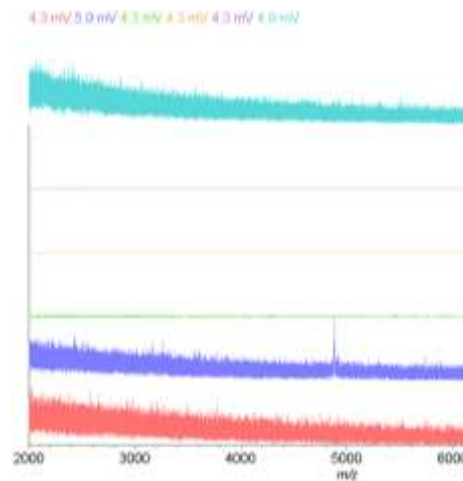


Figure 35 : Comparaison de profils de *F. graminearum* en milieu YM et BHI - hautes masses

De bas en haut : 1. Pré-culture de *F. graminearum*, 2. *F. graminearum* dans un milieu YM, 3. Témoin de YM, 4. *F. graminearum* dans un milieu BHI, 5. Témoin de BHI, 6. Témoin CHCA

Pour les faibles masses, seul du bruit de fond est détecté pour les profils 3, 4 et 5. L'intensité du pic majoritaire est inférieure à 1 mV pour ces trois profils, ce qui signifie qu'aucun pic n'est observé. Ces résultats montrent également qu'aucun pic spécifique de *F. graminearum* n'est obtenu lors d'une culture en milieu BHI liquide aussi bien pour les faibles masses que pour les hautes masses. Ce milieu n'est pas adapté à la croissance des moisissures.

Pour le milieu YM, aucun pic du milieu n'est détecté pour les hautes comme pour les faibles masses. L'intensité maximale pour le spectre étant de 0,4 mV, seul du bruit de fond est mesuré. Ainsi, les pics observés lors d'une analyse d'espèce appartiendront soit à la matrice, soit à la souche. Nous pouvons supposer que les éléments du milieu sont dilués au cours de l'extraction. Lors d'étude d'identification, il conviendra de vérifier que les pics détectés soient spécifiques de la moisissure avec un dépôt de matrice seule à chaque analyse. Il ne sera pas nécessaire de réaliser un dépôt de milieu seul à chaque essai.

Concernant la cinétique de croissance de *F. graminearum* en milieu YM liquide, les résultats sont présentés Figure 36 et Figure 37.

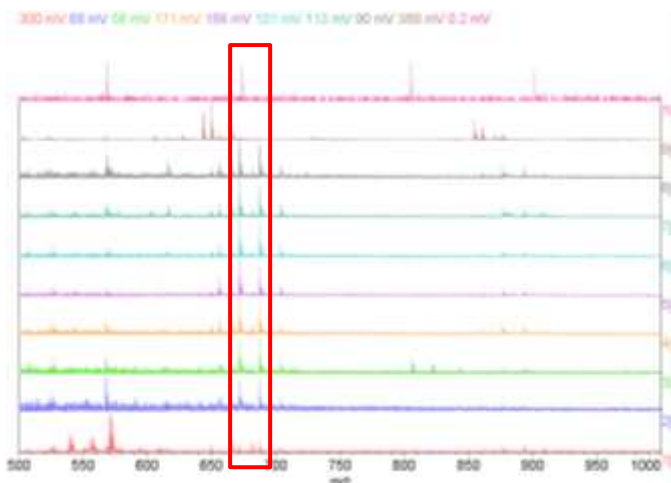


Figure 36 : Profils cinétiques de *F. graminearum* - faibles masses - milieu YM

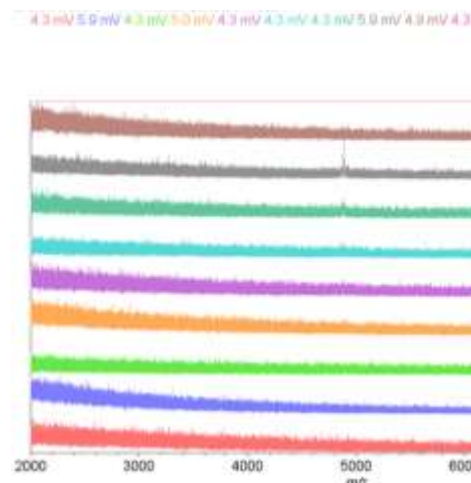


Figure 37 : Profils cinétiques de *F. graminearum* - hautes masses - milieu YM

De bas en haut : **1.** Pré-culture de *F. graminearum*, **2.** Profil après 17 h, **3.** Profil après 24 h, **4.** Profil après 41 h, **5.** Profil après 48 h, **6.** Profil après 65 h, **7.** Profil après 72 h, **8.** Profil après 89 h, **9.** Témoin CHCA, **10.** Témoin YM.

Pour les faibles masses, les profils de *F. graminearum* sont très proches. Les intensités sont relativement stables à tous les temps de prélèvement. Pour les hautes masses, un pic à 4890 Da apparaît au bout de 89 h mais avec une intensité très faible (5,9 mV).

### 1.2.1.3 Conclusion

Ces résultats montrent que le milieu YM est adapté à la culture fongique et présente un intérêt certain pour l'analyse des souches du genre *Fusarium*. En effet, ce milieu ne contribue pas aux spectres, ce qui facilite l'interprétation des résultats. Par ailleurs, contrairement au milieu BHI, ce milieu est adapté pour la croissance et une analyse MALDI-TOF après 89 h de culture permet d'obtenir des pics dans les petites et hautes masses avec une intensité suffisante pour leur détection et leur identification.

### 1.2.2 Nature du milieu : liquide vs gélifié

La production des mycotoxines par *Fusarium* spp peut être influencée par la physiologie de la moisissure, ainsi que par son mode de culture. Par conséquent, le signal obtenu par analyse MALDI-TOF en serait impacté. Nous venons de montrer que le milieu YM liquide est favorable à la croissance et est adapté à une analyse MALDI-TOF.

La nature du milieu, liquide ou gélifié, peut également influencer la croissance de la moisissure ou la production de mycotoxines. En effet, la nature du milieu influe sur les conditions expérimentales (eg. agitation vs statique) et, par voie de conséquence, elle peut impacter les résultats spectraux.

Par ailleurs, le milieu gélifié contient de l'agar qui n'est pas consommé au cours de la culture. Il est donc possible que ce composé soit présent suite à l'extraction. Il convient donc d'évaluer l'impact.

### 1.2.2.1 Mise en œuvre

Pour cet essai, la souche *F. graminearum* de l'ANSES (MB 62-89) est cultivée dans du milieu YM liquide et gélosé selon les conditions décrites dans la partie « matériels et méthodes ».

### 1.2.2.2 Résultats

Pour les faibles masses (Figure 38), de nombreux pics sont communs aux deux types de culture, notamment dans les zones 500 – 560 Da et 680 -710 Da.

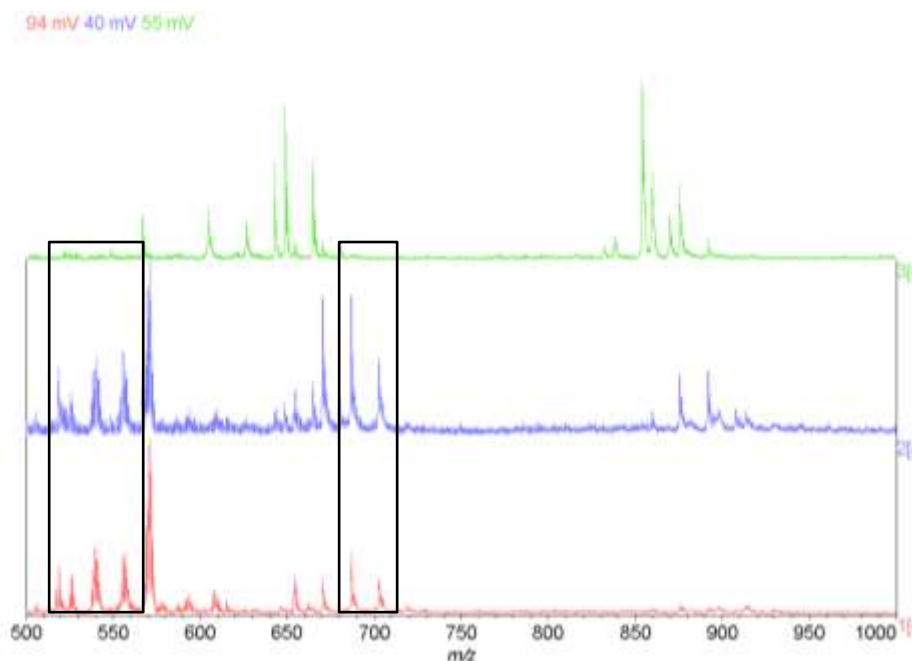


Figure 38 : Comparaison des profils liquide/gélose de *F.graminearum* - faibles masses  
De bas en haut : 1. Profil de *F.graminearum* sur gélose, 2. Profil de *F.graminearum* en liquide, 3. Témoin CHCA

Pour les hautes masses (Figure 39), de nombreux pics sont obtenus quel que soit le type de culture, liquide ou gélosé. 12 pics sont retrouvés lors d'une culture liquide et 11 pics en culture sur milieu solide. Cependant, seulement 7 pics sont communs aux deux types de culture. Ils sont encadrés en noir sur la Figure 39. Il convient de noter que tous les pics ne sont pas observables sur ce spectre global puisque les différents pics sont représentés en fonction de celui ayant l'intensité maximale.

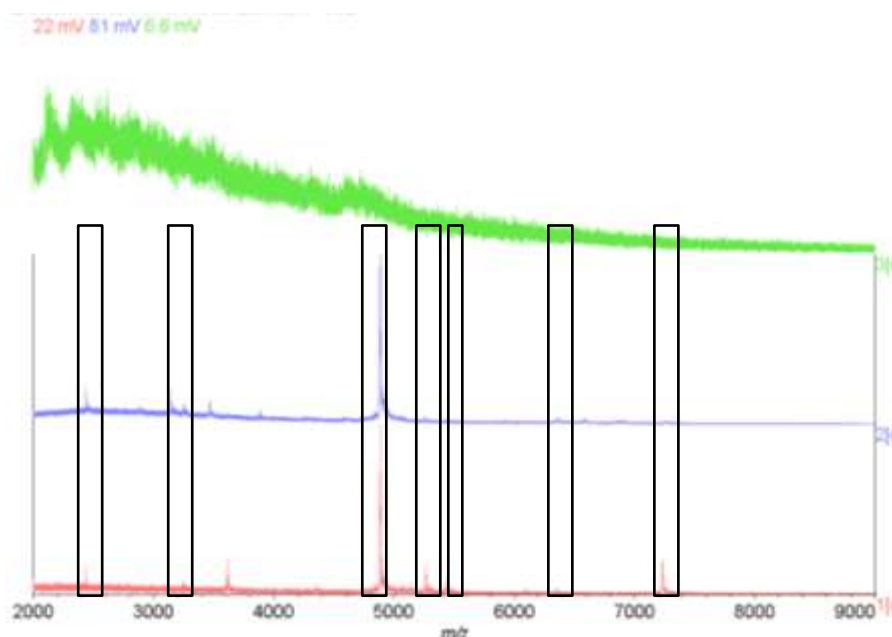


Figure 39 : Comparaison des profils liquide/gélose de *F. graminearum* - hautes masses  
De bas en haut : 1. Profil de *F. graminearum* sur gélose, 2. Profil de *F. graminearum* en liquide, 3. Témoin CHCA

### 1.2.2.3 Conclusion

Cet essai montre que selon le mode de culture, les informations spectrales diffèrent. Nous retrouvons des pics communs mais également des pics spécifiques du type de culture, notamment dans les hautes masses. Il est donc nécessaire de renseigner l'origine de l'échantillon, son mode culture et d'adapter la structure de la base de données à ces différences pour la fiabiliser. Il pourrait donc être difficile d'avoir une méthode d'identification robuste, si le protocole initial variait pour le mode de culture.

### 1.2.3 Traitement des échantillons

Pour construire une base de données fiable, il est nécessaire d'optimiser l'analyse spectrale en optimisant l'intensité du signal ainsi que le nombre de pics détectables. Ces informations permettront de discriminer le plus spécifiquement les espèces, mais également de détecter la présence de métabolites secondaires. Ainsi, un traitement des souches avant l'extraction et l'analyse est étudié, en évaluant son impact sur les spectres obtenus par MALDI-TOF. Ces essais ont été réalisés en amont de mes travaux. Ils sont présentés ici dans le cadre de la stratégie globale de la mise au point de la méthode.

Trois types de traitements sont mis en place sur les prélèvements de moisissure avant l'analyse MALDI-TOF :

- Un traitement enzymatique, avec l'utilisation d'une  $\beta$ -glucanase, capable de dégrader la paroi des champignons ;
- Différents traitements mécaniques : vortex et broyeur à billes ;
- Un traitement physique par sonication.

La souche *F. graminearum* de référence de l'ANSES (MB62-89) est cultivée dans 200 mL de milieu YM liquide. Le choix d'une culture liquide est fait pour minimiser les contraintes liées

au transfert de matière et d'énergie lors de l'analyse. Des échantillons de cette culture ont été soumis aux différents traitements.

### 1.2.3.1 Digestion enzymatique

#### 1.2.3.1.1 Mise en œuvre

Une suspension de 1 mL de moisissures est centrifugée pendant 1 mn et lavée avec de l'eau MilliQ et du tampon citrate. 200  $\mu$ L de cette suspension sont mis en contact avec 200  $\mu$ L d'enzyme à différentes concentrations : 10 mg/mL, 1 mg/mL et 0,1 mg/mL. Le mélange est ensuite incubé dans un bain-marie à 55°C pour un temps de traitement de 30 et 60 mn. Une dilution au tiers est effectuée avec le mélange d'extraction. Un volume de 0,5  $\mu$ L est déposé grâce à la méthode de sandwich avec du CHCA comme matrice.

#### 1.2.3.1.2 Résultats

Lors d'une analyse des faibles masses (500-1000 Da), une forte influence de la préparation enzymatique est observée, notamment par une contribution spectrale importante à 656 Da et 867 Da (Figure 40). Afin de visualiser la présence de pics d'intérêt, nous nous focalisons sur la zone 660-850 Da (Figure 41).

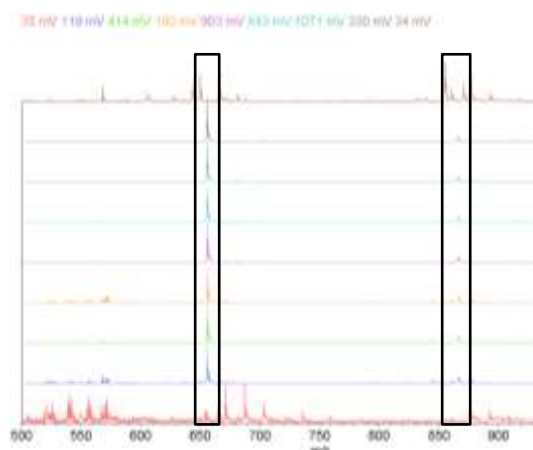


Figure 40 : Profils de *F. graminearum* après digestion enzymatique - faibles masses

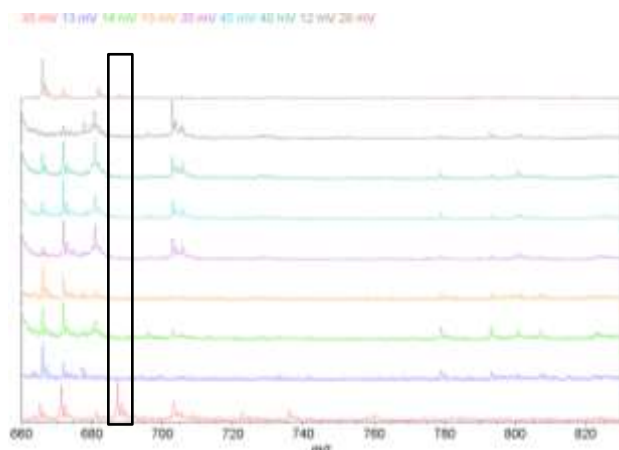


Figure 41 : Observation des profils de *F. graminearum* sur la zone spectrale 660-850 Da

De bas en haut : **1.** Témoin non traité, **2.** Enzyme 0.1 mg/mL pendant 30 min, **3.** Enzyme 0.1 mg/mL pendant 60 min, **4.** Enzyme 1 mg/mL pendant 30 min, **5.** Enzyme 1 mg/mL pendant 60 min, **6.** Enzyme 10 mg/mL pendant 30 min, **7.** Enzyme 10 mg/mL pendant 60 min, **8.** Enzyme seule, **9.** Témoin CHCA.

Sur la partie 660-830 Da (Figure 41), les profils sont similaires quel que soit le profil. Il n'apparaît pas de différence significative. Cependant, le pic d'intérêt à 688 Da est complètement dégradé et n'est retrouvé sur aucun spectre après traitement.

Pour les hautes masses (Figure 42), aucun pic d'intérêt n'est observé après le traitement enzyme, quel que soit la concentration enzymatique utilisée et le temps de traitement. Seul le profil de l'échantillon non traité présente un pic spécifique à 4890 Da.

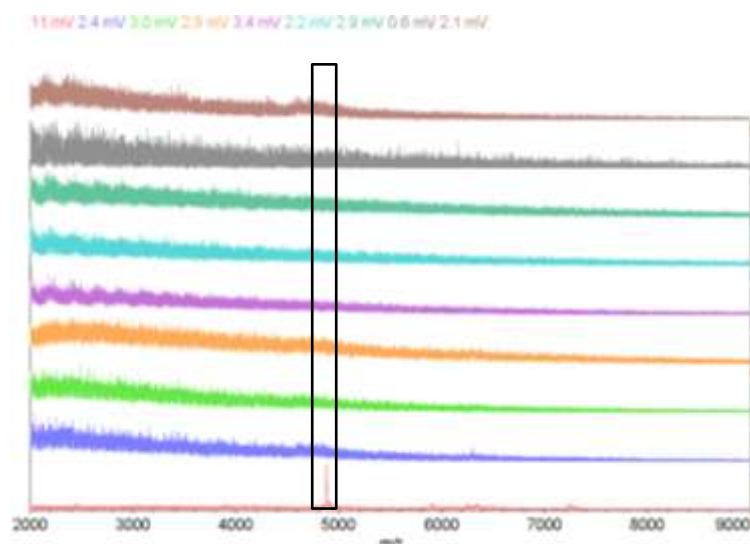


Figure 42 : Profils de *F. graminearum* après différents traitements de digestion enzymatique - hautes masses

De bas en haut : **1.** Témoin non traité, **2.** Enzyme 0.1 mg/mL pendant 30 min, **3.** Enzyme 0.1 mg/mL pendant 60 min, **4.** Enzyme 1 mg/mL pendant 30 min, **5.** Enzyme 1 mg/mL pendant 60 min, **6.** Enzyme 10 mg/mL pendant 30 min, **7.** Enzyme 10 mg/mL pendant 30 min, **8.** Témoin enzyme, **9.** Témoin CHCA.

Pour conclure, une dégradation importante des molécules de haut poids moléculaire est observée et peu de nouveaux pics apparaissent.

### 1.2.3.2 Traitement par vortex

#### 1.2.3.2.1 Mise en œuvre

Une suspension de 500  $\mu$ L est déposée dans un tube Eppendorf contenant 1 mL du mélange d'extraction et 250  $\mu$ L de billes de diamètre compris entre 200 et 600  $\mu$ m. Cette suspension est ensuite traitée par vortex à agitation maximale pendant 30, 60 et 120 secondes. Une analyse MALDI-TOF est ensuite effectuée.

#### 1.2.3.2.2 Résultats

La Figure 43 représente les profils sur les faibles masses pour chaque traitement. Aucune modification significative du profil n'est observée. Les pics d'intérêt sont toujours présents et détectables. Pour les hautes masses (Figure 44), le bruit de fond augmente avec une perte des pics d'intérêt à 5900 et 7250 Da pour une agitation de 120 s.

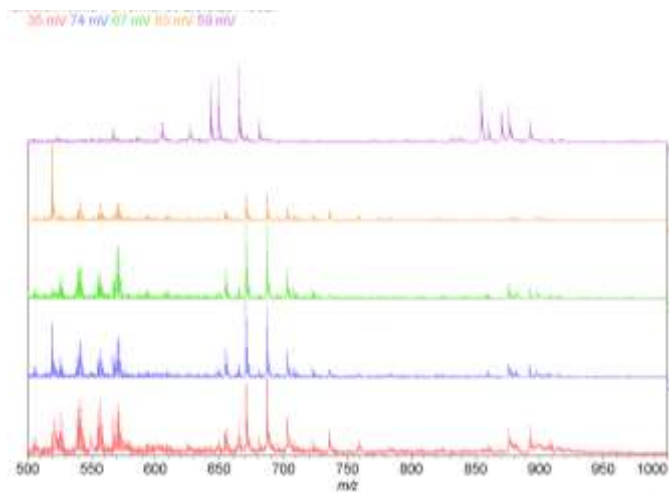


Figure 43 : Profils de *F. graminearum* après traitement au vortex - faibles masses

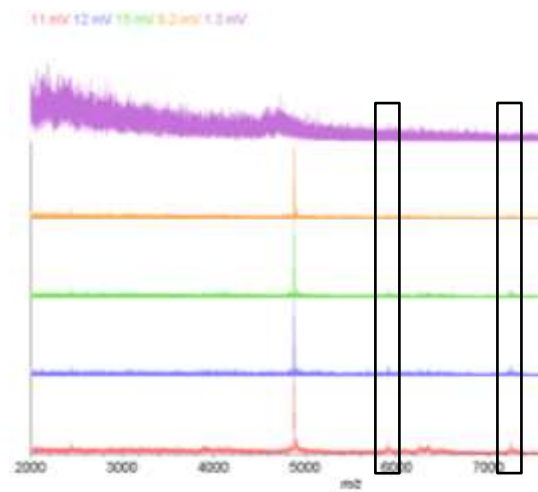


Figure 44 : Profils de *F. graminearum* après traitement au vortex - hautes masses

De bas en haut : 1. Témoin non traité, 2. Traitement de 30s, 3. Traitement de 60s, 4. Traitement de 120s, 5. Témoin CHCA.

Un traitement par vortex n'apporte donc pas d'information complémentaire en comparaison à un échantillon n'ayant pas subi de traitement avant l'extraction.

### 1.2.3.3 Traitement par un broyeur à billes

#### 1.2.3.3.1 Mise en œuvre

Un volume de 500  $\mu\text{L}$  est déposé dans un tube Eppendorf contenant 1 mL du mélange d'extraction et 250  $\mu\text{L}$  de billes dont le diamètre est compris entre 200 et 600  $\mu\text{m}$ . Cette suspension est ensuite traitée à différentes fréquences : 5, 10, 15 et 30 agitations/s pendant 30 et 60 s. Un volume de 0,5  $\mu\text{L}$  de cette suspension est analysé selon les conditions définies auparavant.

#### 1.2.3.3.2 Résultats

Pour les petites masses (Figure 45), les profils correspondant aux traitements de 5, 10 et 15 agitations/s, quel que soit le temps de traitement (profils 2 à 7), sont proches du profil de la culture de *F. graminearum* témoin, sans traitement (profil 1). Des pics spécifiques sont retrouvés pour ces différents profils. Pour les profils 8 et 9, correspondant à 30 agitations/s, les pics sont dégradés dans la zone 500-600 Da. Par ailleurs, les pics de la zone 850-900 Da présentent une résolution plus faible.

Il en est de même pour les profils obtenus au niveau des hautes masses (Figure 46). Pour les profils 8 et 9 (30 agitations/s), nous observons une dégradation importante des pics d'intérêt avec une forte diminution de l'intensité maximale du spectre (2,1 et 2,4 mV).

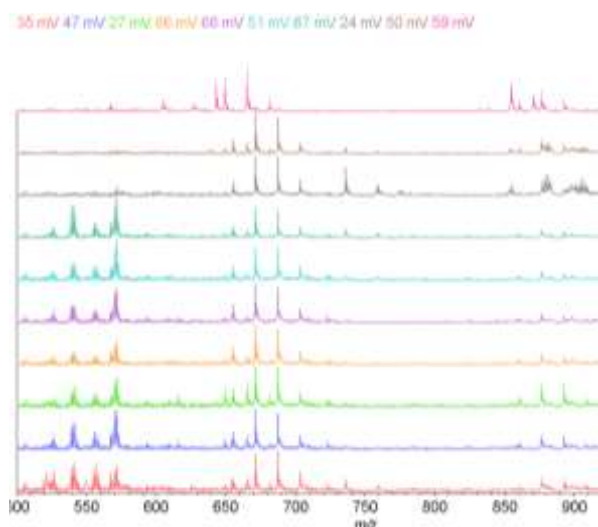


Figure 45 : Profils de *F. graminearum* après traitement au broyeur à billes - faibles masses

De bas en haut : **1.** Témoin non traité, **2.** Traitement 5 agitations/s pendant 30s, **3.** Traitement 5 agitations/s pendant 60s, **4.** Traitement 10 agitations/s pendant 30s, **5.** Traitement 10 agitations/s pendant 60s, **6.** Traitement 15 agitations/s pendant 30s, **7.** Traitement 15 agitations/s pendant 60s, **8.** Traitement 30 agitations/s pendant 30s, **9.** Traitement 30 agitations/s pendant 60s, **10.** Témoin CHCA

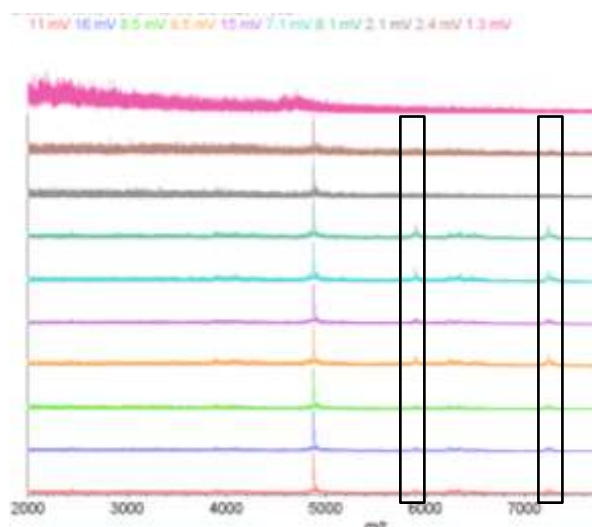


Figure 46 : Profils de *F. graminearum* après traitement au broyeur à billes - hautes masses

Un traitement par broyeur à billes n'apporte donc pas d'information complémentaire en comparaison à un échantillon n'ayant pas subi de traitement avant l'extraction.

### 1.2.3.4 Traitement par sonication

#### 1.2.3.4.1 Mise en œuvre

500  $\mu$ L de culture est ajouté à 2 mL du mélange d'extraction acétonitrile/eau/TFA dans un tube à hémolyse. Cette suspension subit ensuite une étape de sonication à une fréquence de 20 KHz et 130 W pendant 15, 30, 45 et 60 s dans un bac contenant de la glace, pour éviter un échauffement de l'échantillon. Un volume de 0,5  $\mu$ L de cette suspension est déposé pour analyse MALDI-TOF.

#### 1.2.3.4.2 Résultats

Pour les faibles masses (Figure 47), les pics d'intérêts sont toujours présents. On note l'apparition de nouveaux pics à 576, 600 et 615 Da. Par ailleurs, les pics observés dans la zone 870-920 Da sont mieux résolus. Pour les hautes masses (Figure 48), tous les pics d'intérêts sont dégradés, notamment celui à 4890 Da.

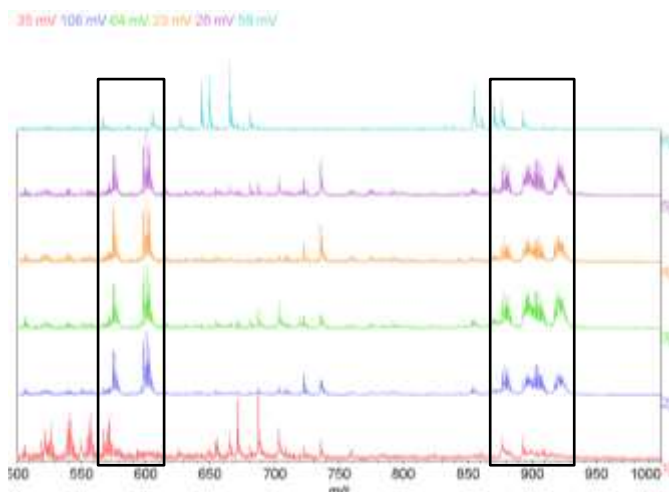


Figure 47 : Profils de *F. graminearum* après sonication - faibles masses

De bas en haut : **1.** Témoin non traité, **2.** Sonication pendant 15 s, **3.** Sonication pendant 30 s, **4.** Sonication pendant 45 s, **5.** Sonication pendant 60 s, **6.** Témoin CHCA.

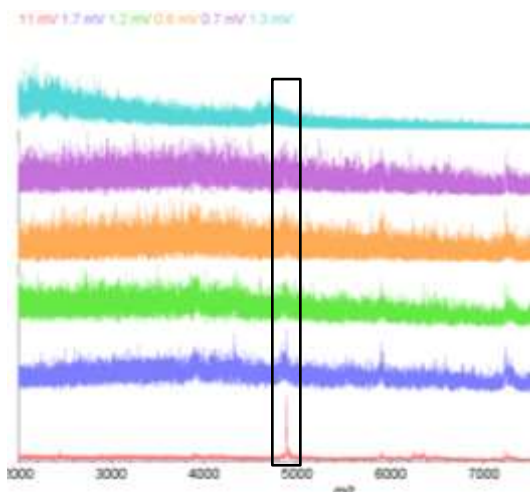


Figure 48 : Profils de *F. graminearum* après sonication - hautes masses

La sonication permet d'améliorer la résolution spectrale sur les faibles masses et de détecter de nouveaux pics. Cependant, pour les molécules de haut poids moléculaire, elle n'apporte pas d'information complémentaire en comparaison à un échantillon n'ayant pas subi de traitement avant l'extraction. Une dégradation du composé correspondant a eu lieu lors du traitement.

#### 1.2.3.5 Conclusion de l'essai

Le traitement enzymatique n'a pas permis d'apporter d'informations complémentaires notamment en raison de problème d'interférence qui entraîne une perte de données. Les traitements mécaniques par vortex et broyeur à billes ne sont pas concluants. Ils ne permettent pas d'obtenir d'information complémentaire par rapport à un échantillon non traité. La sonication est la technique la plus pertinente. En effet, les temps de traitement sont courts, le volume nécessaire est faible et le risque de contaminations croisées entre deux échantillons successifs est réduit. Cependant, bien que les résultats au niveau des faibles masses soient améliorés suite au traitement, nous observons une perte totale de l'information dans les hautes masses par rapport à un échantillon de suspension de culture témoin, non traité.

La sonication peut être intéressante dans le cas où un simple spectre ne permet pas d'identifier un germe. Les données à partir d'un simple échantillon seront ainsi multipliées. Pour les essais ultérieurs, nous n'effectuerons pas ce traitement en première intention.

### 1.3 Conclusions générales et perspectives sur la mise au point de méthode

Ces différents essais de mise au point nous ont permis de fixer les conditions expérimentales pour obtenir des spectres MALDI-TOF dont l'intensité et le nombre de pics seront optimaux. Ainsi, la matrice utilisée sera le CHCA en combinaison avec une fluence paramétrée à 50 J/m<sup>2</sup>. Il sera nécessaire de toujours comparer les échantillons analysés à un témoin de matrice seul, car les pics spécifiques de la matrice peuvent être retrouvés sur les profils des souches.

L'étape d'extraction des composants cellulaires est effectuée dans un mélange défini d'acétonitrile/eau/TFA. Cette étape peut durer entre 30 min et 72h à température ambiante et les échantillons peuvent être stockés également à -20°C jusqu'à 72h sans risquer de perdre des informations spectrales.

Pour les cultures fongiques de *Fusarium*, le milieu YM est adapté à l'analyse MALDI-TOF, d'autant plus qu'il n'apporte pas de contribution aux spectres. Une analyse après 4 jours de culture permet d'obtenir les informations nécessaires à l'identification. Il convient cependant de préciser la nature du milieu, liquide ou gélifié, car les informations spectrales obtenues pour les souches diffèrent.

Aucun traitement des échantillons préalables ne sera effectué dans l'immédiat, car les traitements testés ne permettent pas d'obtenir des résultats significativement différents des profils témoins, à l'exception de la sonication. Cependant, nous n'appliquerons ce traitement seulement si l'identification n'est pas possible.

Différents essais peuvent être mis en perspective pour poursuivre l'optimisation de la méthode. Ainsi, le choix de la matrice a été le CHCA car il présentait un compromis entre les faibles et les hautes masses. Il conviendrait de tester l'impact d'un mélange des deux matrices CHCA et SA sur la réponse spectrale et d'en définir les proportions optimales.

Par ailleurs, suite à des discussions avec l'équipe de développement de la société Kratos Analytical, une amélioration du mélange d'extraction peut être effectuée en le réalisant comme suit : eau/acétonitrile/méthanol (33%/33%/33% v/v/v) et en ajoutant 3% de TFA. L'augmentation de la proportion en TFA améliore grandement le signal. Cependant, cette information nous est parvenue après ces essais d'optimisation.

## 2 Faisabilité de l'identification fongique

La méthode étant optimisée pour l'obtention de spectres par analyse MALDI-TOF, nous allons évaluer la faisabilité de l'identification fongique en appliquant les paramètres opératoires définis ci-dessus. Les souches utilisées pour cette étude ont été choisies car ce sont des contaminants majeurs de la filière et des producteurs importants de mycotoxines. L'analyse est focalisée sur quatre souches principalement : *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* et *F. langsethiae*. Des mélanges de souches seront également effectués pour connaître la sensibilité du MALDI pour la discrimination d'un mélange défini de moisissures, c'est-à-dire pour déterminer la capacité à identifier, quasi-individuellement des germes dans un mélange complexe. Cette condition permet de se rapprocher des conditions réelles, au champ, et d'en évaluer la faisabilité.

### 2.1 Identification de souches pures

Dans un premier temps, nous nous focalisons sur l'identification de souche pure, afin de réaliser une identification de genre et de l'espèce. L'objectif est d'identifier des pics spécifiques du genre *Fusarium*, ainsi que des pics propres à chacune des espèces mises en culture pour discriminer les moisissures selon des caractères phénotypiques.

### 2.1.1 Mise en œuvre de l'étude

Pour cet essai, nous nous focalisons sur trois espèces du genre *Fusarium*, considérées comme des contaminants majeurs de la filière orge-malt-bière.

- *F. graminearum* (MB62-89) ;
- *F. poae* (MB70-88) ;
- *F. langsethiae* (CB34-28) ;
- *F. sporotrichioides* (MB70-67).

Ces souches sont cultivées sur milieu YM gélosé pendant 4 jours. Un explant déposé est mis au contact d'1 mL du mélange d'extraction dans un récipient adapté pour une analyse MALDI.

### 2.1.2 Résultats

Les résultats obtenus sont présentés, pour les faibles masses, Figure 49 et, pour les hautes masses, Figure 50.

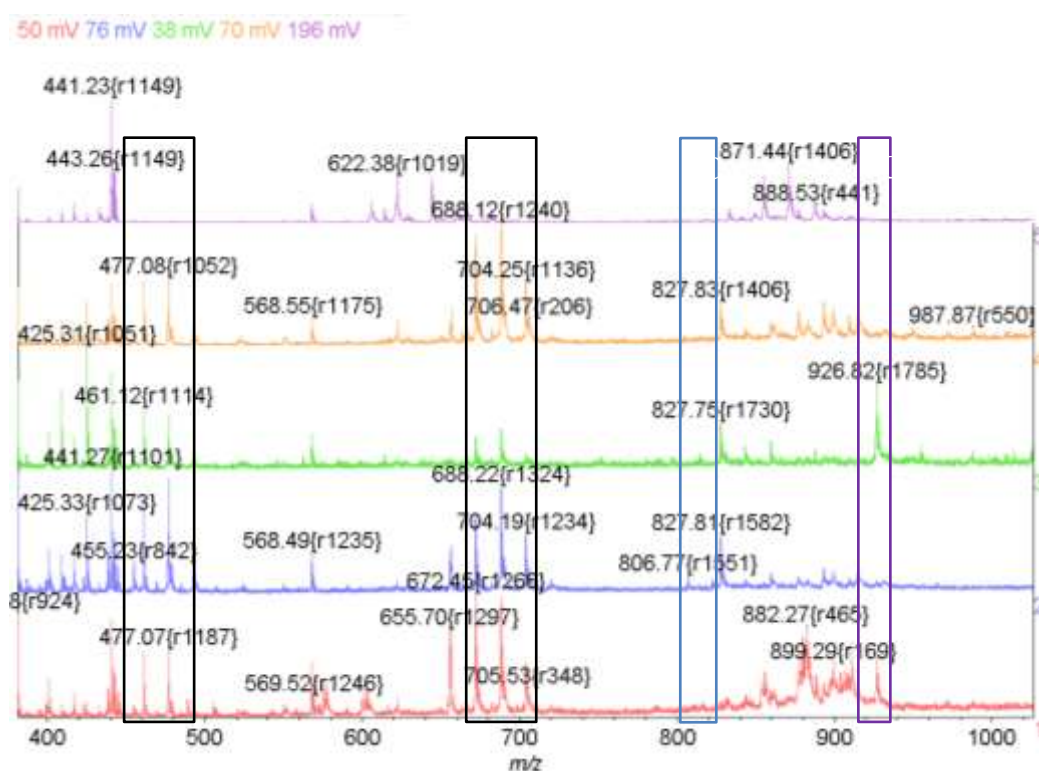


Figure 49 : Comparaison des profils de *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* et *F. graminearum* - faibles masses

De bas en haut : 1. *F. sporotrichioides*, 2. *F. poae*, 3. *F. langsethiae*, 4. *F. graminearum*, 5. Témoin CHCA

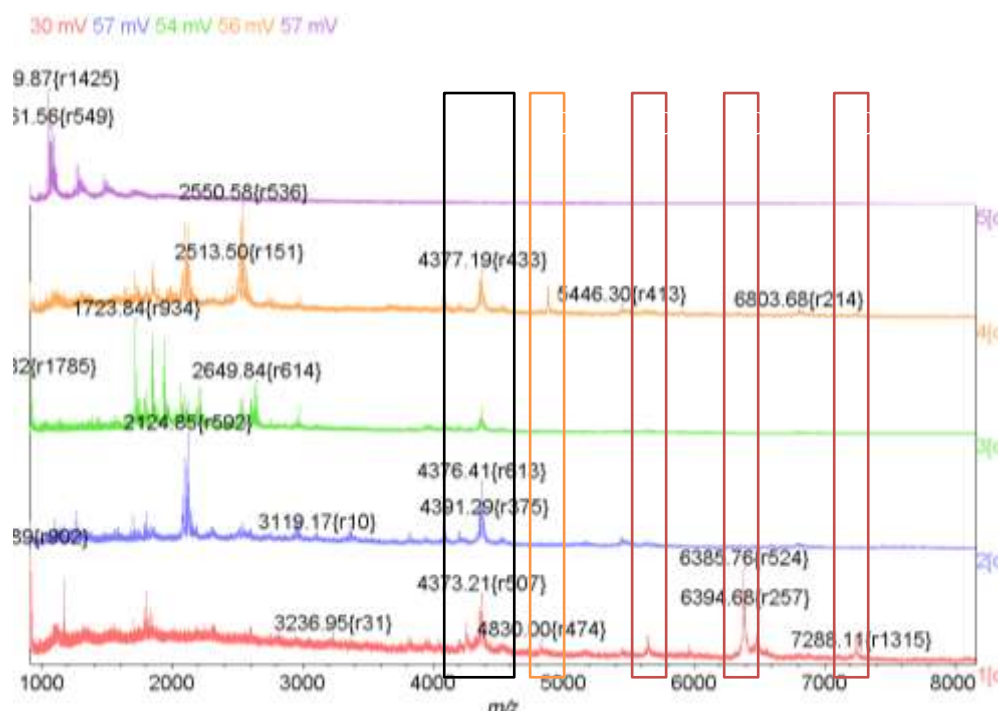


Figure 50 : Comparaison des profils de *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* et *F. graminearum* - hautes masses

De bas en haut : 1. *F. sporotrichioides*, 2. *F. poae*, 3. *F. langsethiae*, 4. *F. graminearum*, 5. Témoin CHCA

Pour les faibles masses, différents pics sont communs aux quatre espèces du genre *Fusarium* à 461, 477, 672, 688 et 704 Da. Cependant, peu de pics sont spécifiques. Bien que peu visibles sur la Figure 49, deux pics sont observés pour *F. poae* à 806 et 823 Da. Nous retrouvons par contre des pics communs à deux ou trois espèces. Par exemple, le pic à 926 Da est commun à *F. sporotrichioides* et à *F. poae*. Ces pics communs peuvent permettre une classification phylogénique des espèces.

Pour les hautes masses (Figure 50), la discrimination des quatre souches est plus évidente. Un seul pic commun aux quatre espèces est retrouvé à 4376 Da. Par ailleurs, de nombreux pics spécifiques de chacune des souches sont détectés :

- *F. sporotrichioides* à 5650, 6385, 6394 et 7288 Da ;
- *F. poae* à 4290, 5747, 6018, 6552, 7353, 7438 Da ;
- *F. langsethiae* à 4089 Da ;
- *F. graminearum* à 2444, 4890, 5138 Da.

### 2.1.3 Conclusion

La faisabilité de l'identification avec la technique MALDI-TOF est démontrée à l'intérieur du genre *Fusarium* pour quatre espèces. Des pics spécifiques à chacune de ces espèces ont été identifiés et permettent une discrimination des souches. Par ailleurs, il sera nécessaire de réaliser une comparaison entre les espèces du genre *Fusarium* et des espèces d'autres genres pour confirmer que les pics communs sont bien caractéristiques du genre.

Cependant, ces comparaisons sont visuelles uniquement. A la suite des essais réalisés sur ces quatre souches et à partir des spectres acquis pour chacune d'entre elles (une dizaine minimum), des super-spectres d'identification ont été construits sous la Database Saramis®

(AnagnosTec, Postdam-Golm, Germany), avec entre 20 et 50 pics significatifs pour chacune des espèces. Ces super-spectres ont été validés *a posteriori* en confrontant des échantillons d'espèces connues dans la Database, qui les a identifiées. Il faut néanmoins rester prudents, la base de données est très parcellaire concernant les moisissures. Les témoins externes sont insuffisants pour avoir une vision globale sur les champignons.

Pour conforter ces résultats, il conviendra d'étendre cette analyse à toutes les espèces du genre *Fusarium*, et notamment les espèces majeures pour la filière orge-malt-bière, afin de montrer la spécificité de chacune des espèces.

La comparaison avec d'autres essais de la littérature est difficile. Par exemple, les résultats de Marinach-Patrice *et al.* sont très intéressants (Marinach-Patrice et al., 2009). Dans leur étude, 62 souches appartenant à 9 espèces du genre *Fusarium* ont été analysées par MALDI-TOF. Parmi elles, 57 souches ont été identifiées correctement en les soumettant à une base de données interne. Cependant, les conditions de culture et la méthode d'analyse sont différentes. Une comparaison des résultats ne semble donc pas appropriée en l'état. Au vue de la complexité des analyses de moisissures, il convient de standardiser la méthode pour une comparaison robuste et efficace.

## 2.2 Elargissement à l'identification dans des co-cultures

Suite à l'identification des souches pures, nous recherchons la faisabilité de la détection des souches dans des mélanges définis de deux à quatre souches. L'objectif est de pouvoir identifier les espèces composant un mélange afin de se rapprocher des conditions au champ et ainsi s'affranchir de l'étape d'isolement avant identification.

Ces essais ont été réalisés en deux parties :

- 1<sup>ère</sup> phase : le mélange de souches est réalisé juste avant l'extraction dans le mélange acétonitrile/eau/TFA à partir de cultures pures.
- 2<sup>ème</sup> phase : les mélanges sont réalisés au moment de la mise en culture pour évaluer l'influence de la compétition entre les espèces.

### 2.2.1 Mélanges

Pour la première phase, 125 µl de culture de chaque souche sont prélevés et homogénéisés dans le mélange d'extraction. Huit mélanges ont été réalisés selon le schéma suivant :

<b>Mélanges doubles</b>	1 : <i>F. graminearum</i> + <i>F. poae</i>
	2 : <i>F. graminearum</i> + <i>F. langesthiae</i>
	3 : <i>F. graminearum</i> + <i>F. sporotrichoides</i>
	4 : <i>F. poae</i> + <i>F. langesthiae</i>
	5 : <i>F. sporotrichoides</i> + <i>F. langesthiae</i>
	6 : <i>F. sporotrichoides</i> + <i>F. poae</i>
<b>Mélange triple</b>	1 : <i>F. graminearum</i> + <i>F. poae</i> + <i>F. langesthiae</i>
<b>Mélange quadruple</b>	1 : <i>F. graminearum</i> + <i>F. poae</i> + <i>F. langesthiae</i> + <i>F. sporotrichoides</i>

Pour la seconde phase, les cultures sont réalisées en erlenmeyers avec du milieu YM liquide. 5 mL de préculture de chacune des souches considérées sont mis en suspension dans 100 mL de milieu YM frais. Les conditions expérimentales sont : 300 rpm, 28°C pendant 4 jours (Figure 54). Pour cet essai, seuls des mélanges doubles sont mis en culture :

- *F. sporotrichioides* + *F. poae*
- *F. poae* + *F. langesthiae*
- *F. sporotrichioides* + *F. langesthiae*

## 2.2.2 Résultats

### 2.2.2.1 Première partie : mélange avant extraction

Lors de culture de mélanges complexes, qu'ils soient binaires, tertiaires ou quaternaires, il a été possible de distinguer des pics caractéristiques des espèces mises en culture, aussi bien dans les faibles masses moléculaires (Figure 51) que dans les hautes masses moléculaires (Figure 52).

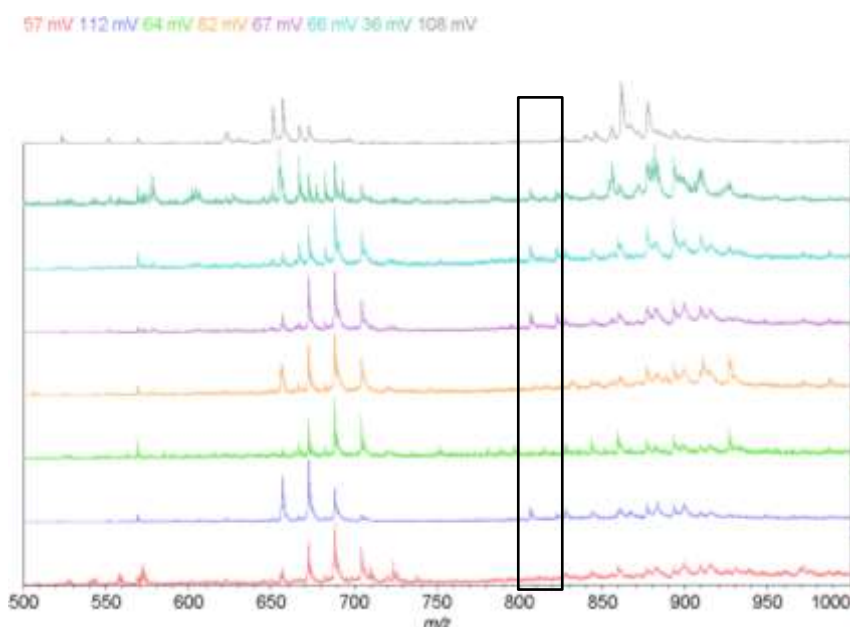


Figure 51 : Comparaison des différents mélanges de souches aux souches seules  
Faibles masses

De bas en haut : **1.** *F.graminearum*, **2.** *F.poa*, **3.** *F.langesthiae*, **4.** *F.sporotrichoides*,  
**5.** *F.graminearum* + *F.poa*, **6.** *F.graminearum* + *F.poa* + *F.langesthiae*,  
**7.** *F.graminearum* + *F.poa* + *F.langesthiae* + *F.sporotrichoides*, **8.** Témoin CHCA

De nombreux pics sont observés et beaucoup sont communs aux quatre espèces, notamment dans les zones 650-720 Da et 850-920 Da. Par contre, deux pics caractéristiques de *F. poae*, observés pour la souche seule à 806 et 821 Da, sont retrouvés dans les trois mélanges de culture réalisés.

Pour les hautes masses, les résultats sont présentés Figure 52 et Figure 53.

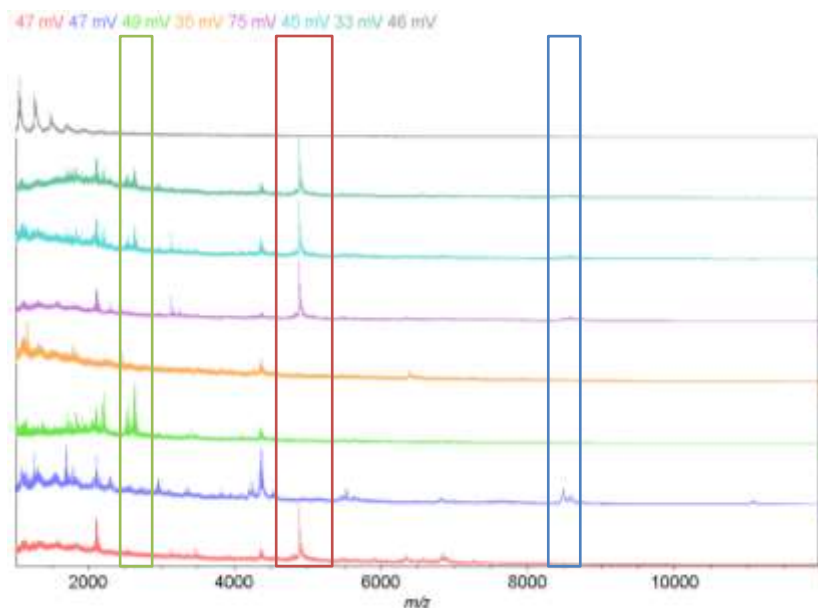


Figure 52 : Comparaison des différents mélanges de souches aux souches seules

#### Hautes masses

De bas en haut : **1.** *F.graminearum*, **2.** *F.poeae*, **3.** *F.langsethiae*, **4.** *F.sporotrichoides*,  
**5.** *F.graminearum* + *F.poeae*, **6.** *F.graminearum* + *F.poeae* + *F.langsethiae*,  
**7.** *F.graminearum* + *F.poeae* + *F.langsethiae* + *F.sporotrichoides*, **8.** Témoin CHCA

Pour les hautes masses moléculaires, les souches *F. graminearum*, *F. poae* et *F. langsethiae* sont retrouvées dans chacun des mélanges où elles ont été cultivées. *F. graminearum* présente de nombreux pics spécifiques retrouvés ensuite dans chacun des mélanges à 3139, 3250, 3474, 4785, 4889, 5532 et 6260 Da. *F. poae* avec des pics à 8340, 8492 et 11090 Da est détecté dans le mélange binaire, ternaire et quaternaire. *F. langsethiae* présente aussi des pics à 2533 et 2646 Da détectés dans les mélanges. Par contre, aucun pic spécifique n'est observé pour *F. sporotrichoides*.

Une focalisation sur la zone de masse de 5000 à 12000 Da montre les pics spécifiques de *F. poae* (Figure 53).

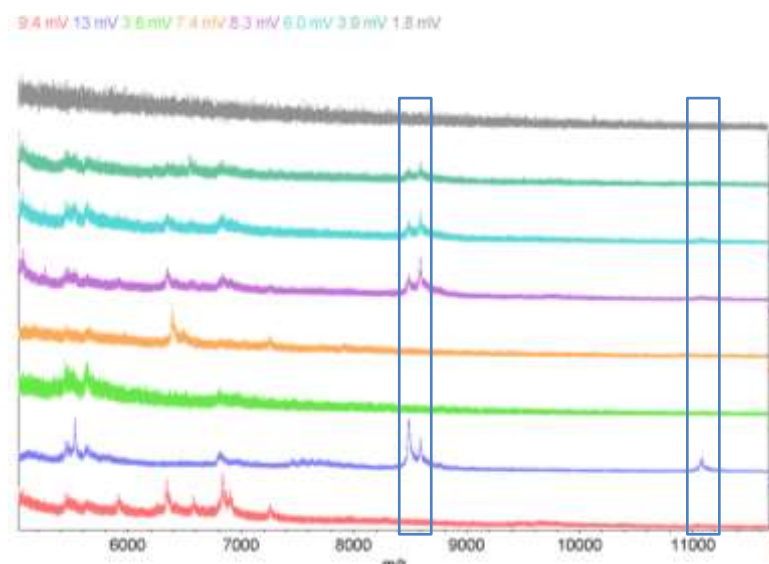


Figure 53 : Focalisation sur la zone 5000-12000 Da

De bas en haut : **1.** *F.graminearum*, **2.** *F.poae*, **3.** *F.langsethiae*, **4.** *F.sporotrichoides*,  
**5.** *F.graminearum* + *F.poae*, **6.** *F.graminearum* + *F.poae* + *F.langsethiae*,  
**7.** *F.rgaminearum* + *F.poae* + *F.langsethiae* + *F.sporotrichoides*, **8.** Témoin CHCA

Pour conclure, il semble possible visuellement d'identifier des espèces à partir d'un mélange réduit d'espèces, présentes en quantité équivalente, connue et importante.

#### 2.2.2.2 Deuxième partie : mélange en culture

Au cours de la croissance de ces co-cultures, une coloration marquée de certains mélanges est observée, notamment pour les mélanges constitués à partir de *F. sporotrichioides* (Figure 54).



Figure 54 : Exemple de 3 bi-mélanges liquides après 4 jours de culture

De gauche à droite : **1.** *F. sporotrichioides* + *F. langsethiae* ; **2.** *F. poae* + *F. langsethiae* ;  
**3.** *F. sporotrichioides* + *F. poae*

Cette observation laisse supposer que les espèces entrent en compétition au cours de la culture et l'une peut prendre le dessus sur la deuxième. Ces résultats sont à confronter aux analyses MALDI-TOF. Quelques résultats sont présentés Figure 55 et Figure 56

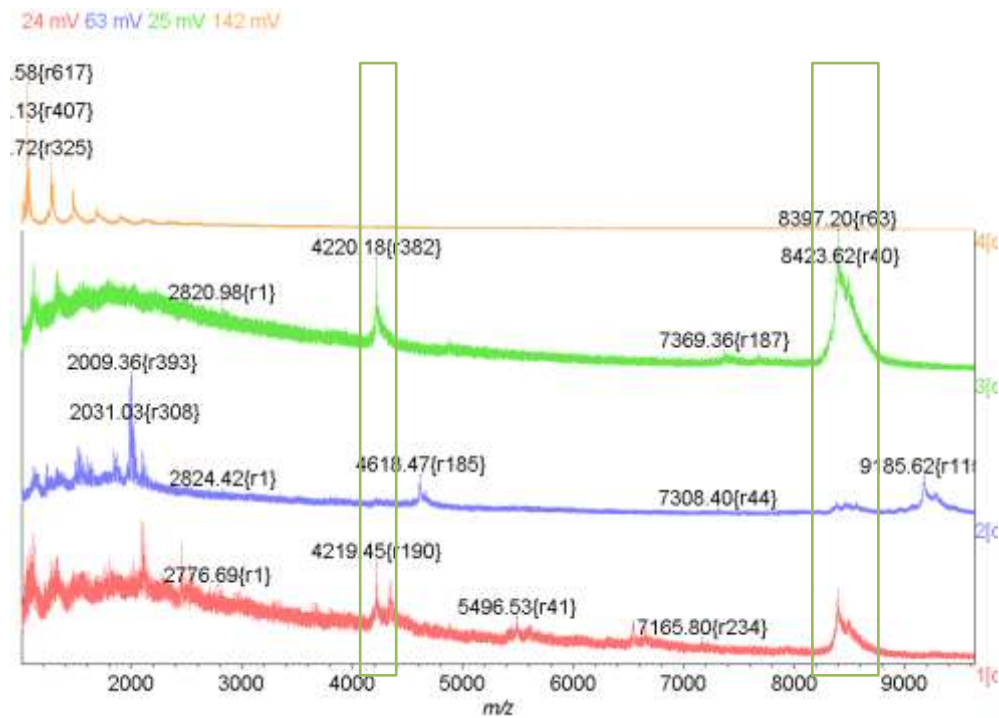


Figure 55 : Comparaison des profils obtenus pour le mélange *F. langsethiae*-*F. poae*  
Hautes masses

De bas en haut : 1. *F. langsethiae* + *F. poae*, 2. *F. langsethiae*, 3. *F. poae*, 4. Témoin CHCA

Pour le mélange *F. langsethiae*-*F. poae*, nous retrouvons principalement des pics spécifiques de l'espèce *F. poae* à 4220 et 8397 Da. Cette espèce peut être devenue majoritaire dans le mélange.

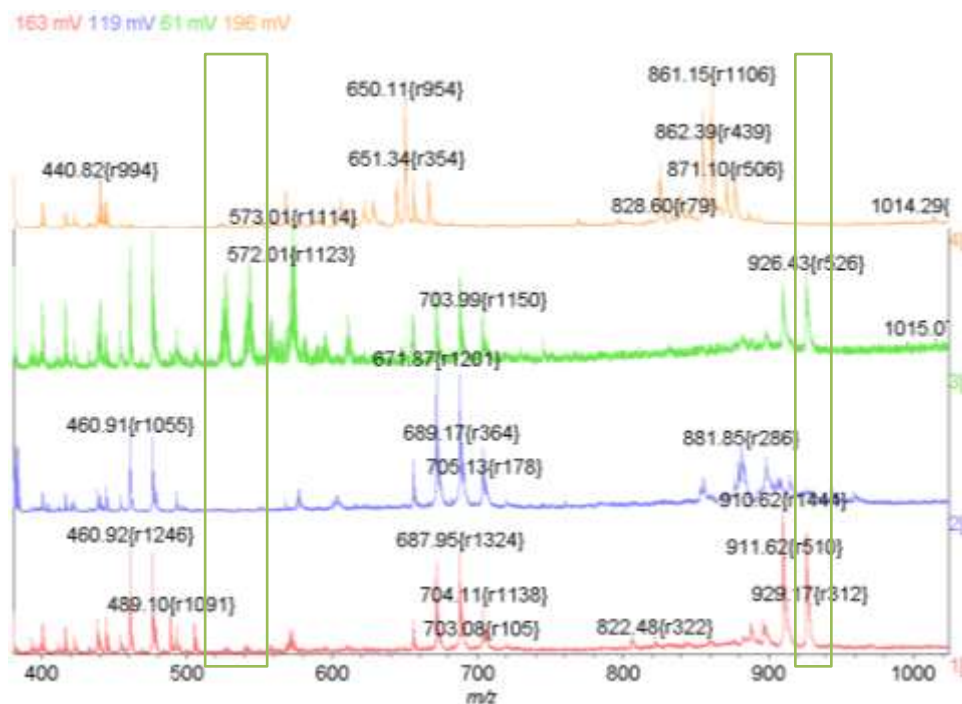


Figure 56 : Comparaison des profils obtenus pour le mélange  
*F. langsethiae*-*F. sporotrichioides* - Faibles masses

De bas en haut : 1. *F. langsethiae* + *F. sporotrichioides*, 2. *F. langsethiae*, 3. *F. sporotrichioides*,  
4. Témoin CHCA

Pour le mélange *F. langsethiae*-*F. sporotrichioides*, nous retrouvons principalement des pics spécifiques de l'espèce *F. sporotrichioides* à 425, 443 et 926 Da. Cette espèce peut être devenue majoritaire dans le mélange. Ceci expliquerait alors la couleur rouge du mélange (Figure 54). Il convient cependant d'être prudent concernant ces résultats et plus particulièrement pour le pic observé à 926 Da. En effet, les résultats d'identification de souche pure montraient un pic caractéristique à 926 Da (Figure 49). Cependant celui-ci était également présent sur le profil de *F. langsethiae*. Or, il n'est pas retrouvé ici pour *F. langsethiae* seul dans le cas de cette analyse.

Figure 57 : Comparaison des profils obtenus pour le mélange *F. poae*-*F. sporotrichioides* - Faibles masses  
De bas en haut : **1.** *F. poae* + *F. sporotrichioides*, **2.** *F. poae*, **3.** *F. sporotrichioides*,  
**4.** Témoin CHCA

### 2.2.3 Conclusion

Les spectres ont également été confrontés à la base de données de Saramis<sup>®</sup>, puisque celle-ci indique le pourcentage de similarité avec les super-spectres de souches pures. Saramis<sup>®</sup> est capable d'identifier jusqu'à trois espèces les plus probables d'un mélange. Cependant, ce n'est pas un outil adapté à ce type d'utilisation. En effet, pour les co-cultures, en raison des

dynamiques de population, certaines espèces peuvent être masquées ou être inférieures au seuil de détection. La base de données ne sera donc pas en mesure de les détecter et les identifier.

## 2.3 Discussions

Comme Marinach-Patrice *et al.* (Marinach-Patrice *et al.*, 2009), nos résultats montrent qu'il est possible, par MALDI-TOF, d'identifier les espèces majeures du genre *Fusarium*. Par ailleurs, notre étude a été étendue à 19 espèces au total, soit 10 de plus que Marinach-Patrice *et al.*, ce qui représente un progrès notable. Cependant, en dehors de cette capacité avérée d'identification, la comparaison de nos spectres avec ceux obtenus par Marinach-Patrice *et al.* montre de profondes différences. Il apparaît donc très clairement qu'il est indispensable de standardiser les conditions analytiques pour permettre une comparaison adéquate des résultats. Cette standardisation devrait à terme permettre de développer des bases de données universelles et compatibles.

De plus, le travail sur des mélanges de souches a mis en avant la capacité de cette technique à réaliser des co-identifications, pour l'instant dans des mélanges simples. D'un point de vue purement technique, il conviendrait de déterminer la limite inférieure de détection d'un germe donné, de façon à affiner notre connaissance sur les potentialités du MALDI-TOF. En outre, les logiciels de traitement de spectres existants tels que BioTyper<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Allemagne) ou Saramis<sup>®</sup> (AnagnosTec GmbH, Potsdam-Golm, Allemagne) sont peu appropriés aux opérations de co-identification. Il conviendrait de les doter de modules chimiométriques adaptés intégrant, par exemple, des fonctions de déconvolution de spectres.

## 2.4 Perspectives immédiates

Une analyse sur un échantillon biologique, dans les conditions que nous pouvons trouver au champ, pourrait être mise en place. L'objectif serait d'évaluer la faisabilité de la détection et de l'identification d'une souche connue sur un échantillon biologique dans les conditions réelles, au champ.

Un premier essai a été réalisé en phytotron sur orge avec une contamination par *F. langsethiae* dans le cadre de l'évaluation d'un traitement préventif avec *Geotrichum candidum*. Les symptômes de la fusariose ont été observés proche de la maturation des épis. Un point noir qui semble localisé juste sous la cuticule apparaît sur les grains contaminés (Figure 58). Ces points peuvent, dans de rares cas, devenir de fines lignes noires sur le grain.



Figure 58 : Épi d'orge contaminé par *F. langsethiae*  
La flèche rouge indique le symptôme de contamination observé.

Cependant, l'essai n'a pas permis d'obtenir des résultats concluants, l'infection n'ayant *a priori* pas fonctionné. En effet, le taux de contamination des épis témoins *F. langsethiae* était anormalement très faible et les premiers essais MALDI-TOF n'ont pas montré de pic spécifique de cette espèce. Il faut savoir que l'infection artificielle par *Fusarium* est très difficile à maîtriser, puisqu'elle est réalisée par vaporisation d'une culture de l'espèce sur les épis. A l'inverse, *G. candidum* a été identifié par MALDI-TOF, ce qui montre l'intérêt de cette technique pour le suivi de traitements biologiques. Ces essais sont donc à approfondir.

### 3 Identification de mycotoxines et du potentiel toxigène

L'objectif général est de réaliser, simultanément, en une seule et même analyse, l'identification du ou des germes présents et de déterminer leur potentiel toxigène. Nous souhaitons ainsi évaluer la faisabilité d'une évaluation rapide du risque.

En raison de leur impact sanitaire, nous nous focaliserons sur la mycotoxine T2 et sa forme déacétylée HT2.

#### 3.1 Mise au point de la méthode

Pour atteindre notre objectif général, il est, dans un premier temps, nécessaire de valider la mise au point de la méthode sur la mycotoxine T2 pure et dans le milieu YM seul. Cela permet de vérifier les capacités de détection de la mycotoxine. Dans un second temps, nous étendrons l'analyse à des cultures d'espèces du genre *Fusarium*, connues comme étant des producteurs de mycotoxines ou non (témoins positifs et négatifs). Nous pourrions ainsi évaluer la faisabilité de la méthode en milieu complexe.

##### 3.1.1 T2 pure

Pour évaluer le seuil de détection de la mycotoxine, un gradient de concentration est réalisé par dilution, de la mycotoxine pure (10 mg/mL) à  $10^{-6}$ , soit 10 ppb à 10 000 ppm. Deux conditions de dilution sont appliquées : dans l'eau distillée et dans le milieu de culture YM liquide.

Les échantillons sont analysés par MALDI-TOF puis comparés aux résultats obtenus par LC-MS pour les mêmes échantillons. L'objectif est de comparer le seuil de détection afin d'effectuer une éventuelle corrélation quantitative et de mettre les résultats en relation avec les recommandations actuelles.

##### 3.1.1.1 Analyse MALDI-TOF

Le poids moléculaire de la mycotoxine T2 est de 466,57 g/mol. Pour l'analyse MALDI-TOF, aucun pic n'est observé à cette masse. Cependant, deux adduits sont retrouvés à 489,5 et 505,5 Da, correspondant, respectivement, à l'adduit sodium et à l'adduit potassium. Ces pics spécifiques sont retrouvés aussi bien dans les dilutions de T2 dans l'eau et de T2 dans le milieu YM de culture (Figure 59 et Figure 60).

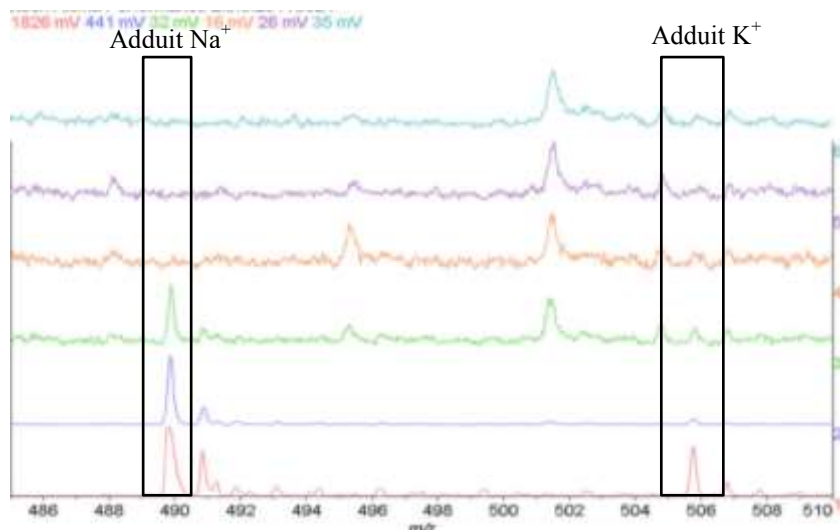


Figure 59 : Profils de la mycotoxine T2 diluée dans l'eau de la concentration pure à  $10^{-4}$   
De bas en haut : 1. T2 à 10000 ppm, 2. T2 à 1000 ppm, 3. T2 à 100 ppm, 4. T2 à 10 ppm,  
5. T2 à 1 ppm, 6. Témoin CHCA

Les résultats montrent que la mycotoxine est détectable jusqu'à la concentration 100 ppm, ce qui correspond à 50 ng de toxine dans l'échantillon.

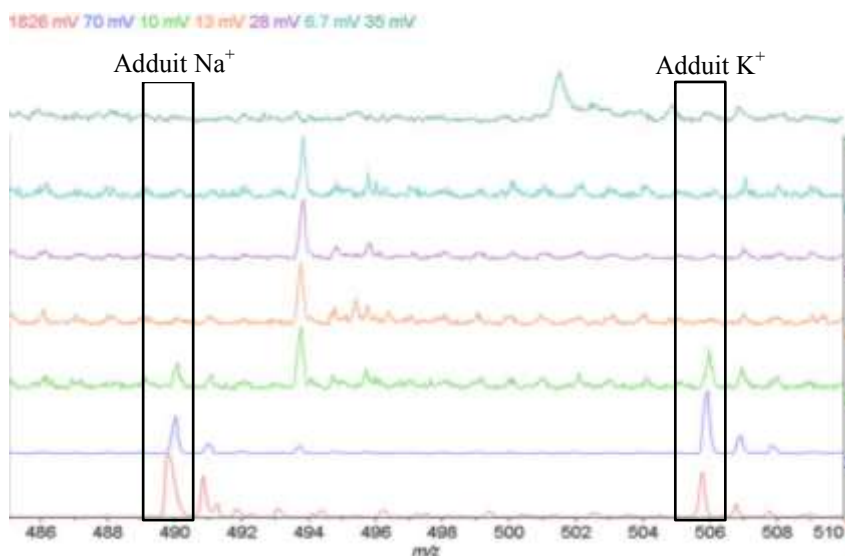


Figure 60 : Profils de la toxine T2 diluée dans le milieu YM de la concentration pure à  $10^{-4}$   
De bas en haut : 1. T2 à 10000 ppm, 2. T2 à 1000 ppm, 3. T2 à 100 ppm, 4. T2 à 10 ppm,  
5. T2 à 1 ppm, 6. Milieu YM, 7. Témoin CHCA

Les résultats obtenus dans le milieu YM sont similaires puisque la mycotoxine est détectable jusqu'à la concentration  $10^{-2}$  g/L. Il est à noter qu'un faible décalage des masses est observé. Cependant, les pics sont distants de 16 Da, ce qui permet de conclure que ce sont bien les adduits sodium et potassium.

Ainsi, l'analyse de la mycotoxine T2 diluée dans de l'eau distillée ou dans le milieu de culture montre qu'elle est détectable à de faibles concentrations. Il est possible de détecter l'adduit  $\text{Na}^+$  jusqu'à 50 ng dans les deux conditions de dilution. L'adduit  $\text{K}^+$  est détectable distinctement jusqu'à 50 ng lors de la dilution dans le milieu de culture et jusqu'à 500ng lors de la dilution classique.

### 3.1.1.2 Vérification par méthodes de référence

La technique MALDI-TOF étant semi-quantitative, les données sont complétées par une analyse LC-MS. Les mêmes conditions sont appliquées, à savoir une dilution dans de l'eau seule et dans le milieu de culture ; La gamme de concentration est identique à celle de l'essai par MALDI-TOF, c'est-à-dire de la solution à 1000 ppm à la solution diluée à  $10^{-6}$ . La solution pure n'a pas été évaluée par LC-MS car, à 10 g/L, la solution est trop concentrée. Les résultats sont présentés sur la Figure 61.

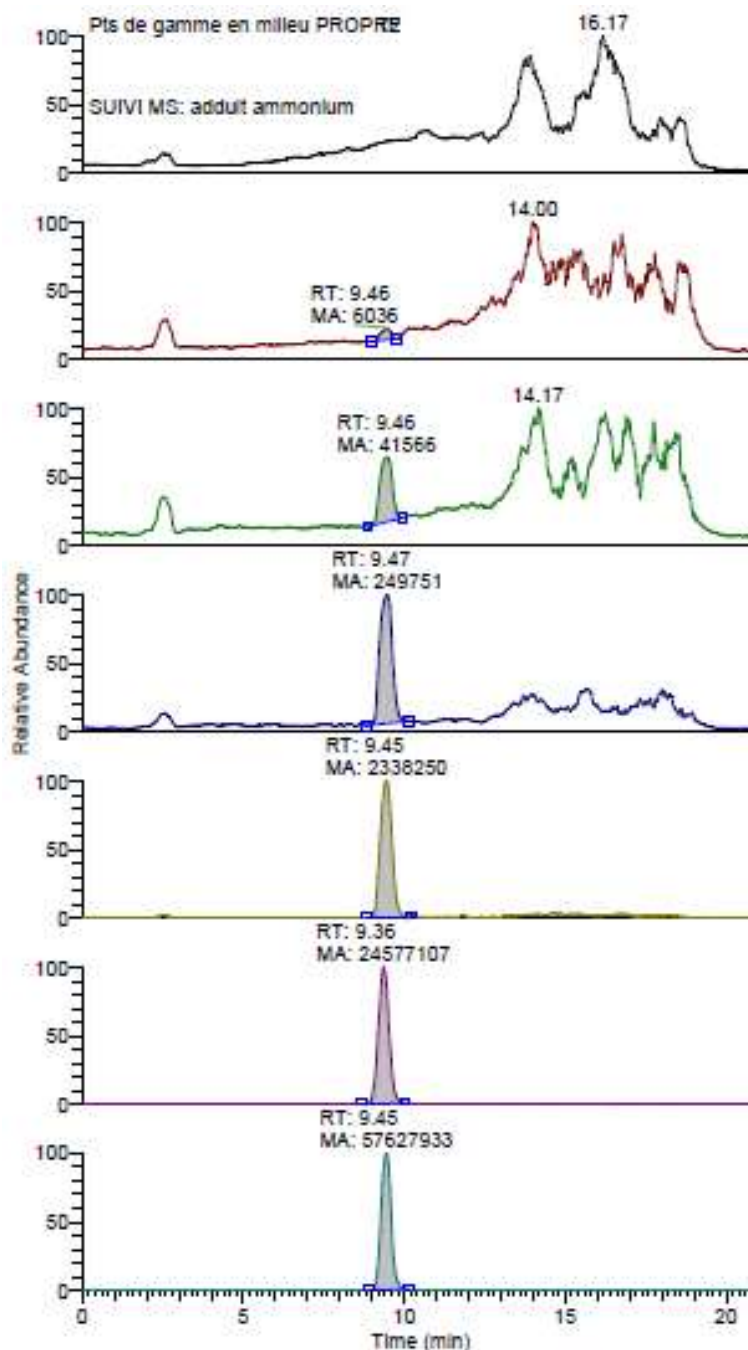


Figure 61 : Comparaison des résultats de dilution de T2 dans l'eau distillée obtenus par LC-MS

De bas en haut : 1. T2 à 1000 ppm, 2. T2 à 500 ppm, 3. T2 à 100 ppm, 4. T2 à 10 ppm, 5. T2 à 1 ppm, 6. T2 à 100 ppb, 7. T2 à 10 ppb

Cette analyse par LC-MS de dilution de la mycotoxine T2 dans l'eau distillée montre que l'adduit ammonium est retrouvé à un temps de rétention de 9,45 min. La mycotoxine est détectée jusqu'à la concentration 100 ppb. Une corrélation peut être directement établie entre la concentration en toxine T2 et l'aire du pic détecté (Figure 62).

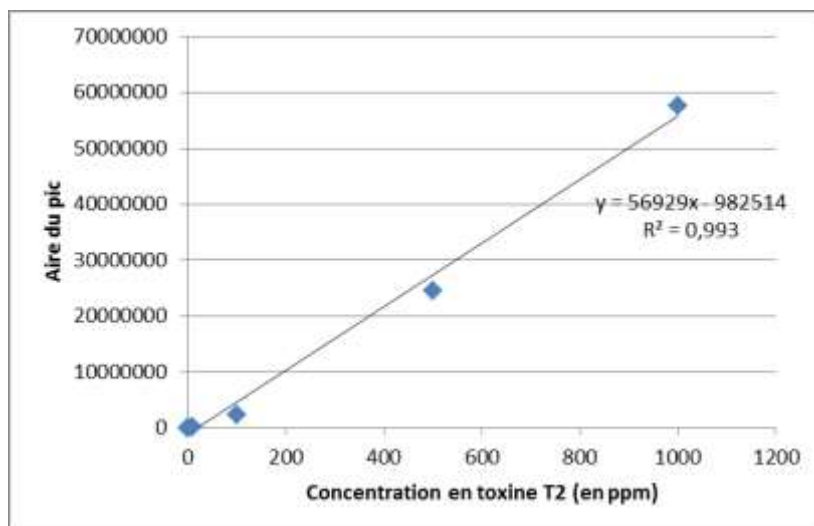


Figure 62 : Corrélation entre la concentration en toxine T2 diluée dans l'eau et l'aire du pic détecté en LC-MS

Une analyse en milieu YM est également réalisée pour se rapprocher des conditions expérimentales, après isolement de la souche. Les résultats sont présentés sur la Figure 63.

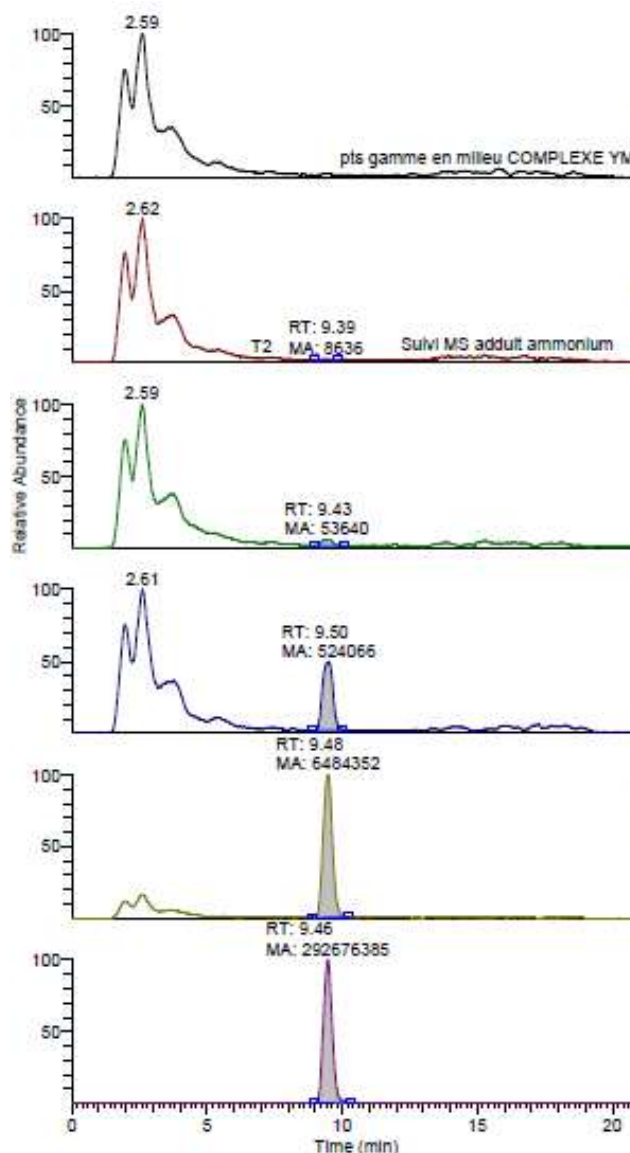


Figure 63 : Profils de dilution de la toxine T2 dans le milieu YM par LC-MS  
De bas en haut : 1. T2 à 1000 ppm, 2. T2 à 100 ppm, 3. T2 à 10 ppm,  
4. T2 à 1 ppm, 5. T2 à 100 ppb, 6. T2 à 10 ppb

Les résultats de dilution dans le milieu YM sont similaires à ceux obtenus lors de la dilution de la mycotoxine dans l'eau distillée. Il est possible de détecter et quantifier la mycotoxine jusqu'à la dilution 100 ppb. Une corrélation peut également être établie entre la surface du pic et la concentration en toxine T2 diluée dans le milieu YM ( $r^2=0,994$ ). Un pic important apparaît également à un temps de rétention de 2,61 min à partir de la dilution 500 ppm. L'intensité relative de ce pic augmente lorsque la dilution de ce pic augmente.

Pour vérifier qu'il n'y a pas d'interférence du milieu YM pour la quantification, une analyse témoin est réalisée. Le résultat est présenté sur la Figure 64.

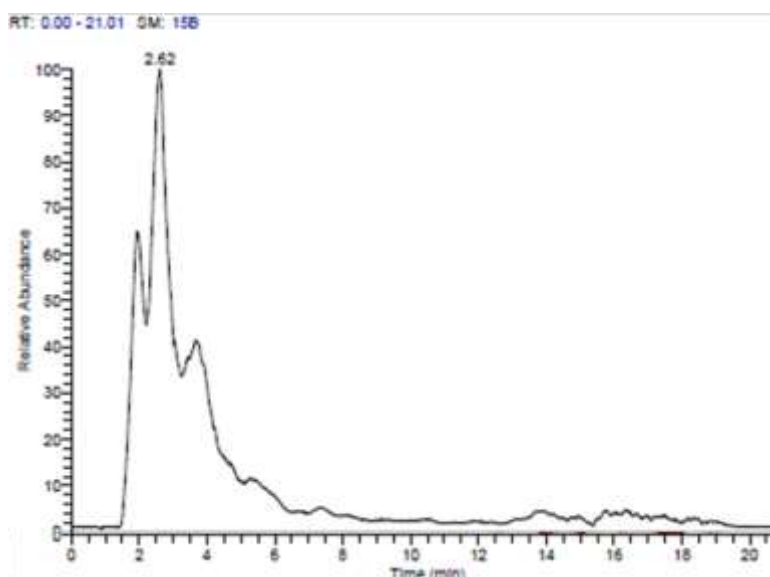


Figure 64 : Profil du milieu YM seul par LC-MS

Un pic majoritaire du milieu YM est obtenu à un temps de rétention ( $t_R$ ) de 2,62 min. Ce pic correspond donc au pic observé à  $t_R=2,61$  min sur les graphes de dilution de la toxine dans le milieu YM. Par ailleurs, aucun pic n'est observé à un  $t_R=9,45$  min. Par conséquent, nous pouvons quantifier la mycotoxine par LC-MS sans interférence du milieu YM.

La faisabilité de la détection de la mycotoxine par MALDI-TOF a été démontrée jusqu'à une concentration de 100 ppm. La technique étant semi-quantitative, il est alors possible de déterminer un seuil de détection de la mycotoxine à cette concentration. Une évaluation peut alors être réalisée à partir de culture de souches.

### 3.1.2 Détection T2 en culture

Suite à l'étude sur la faisabilité de la détection de la toxine T2, nous souhaitons évaluer la détection en culture. Trois souches ont été mises en culture sur milieu YM gelosé pendant 4 jours puis analysées par MALDI-TOF. Les trois souches étudiées sont : *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* et *F. langsethiae*. Ces deux dernières sont connues comme étant des producteurs importants de trichothécènes et de mycotoxine T2. *F. graminearum*, quant à lui, ne dispose pas de la capacité à produire les mycotoxines T2 et HT2.

Sur la Figure 65, les pics de T2 ont été détectés chez les producteurs que sont *F. langsethiae* et *F. sporotrichioides*. Néanmoins, le témoin *F. graminearum*, un non-producteur de T2, est négatif pour la mycotoxine. Il faut cependant noter le léger décalage de masse entre les profils pour la toxine.

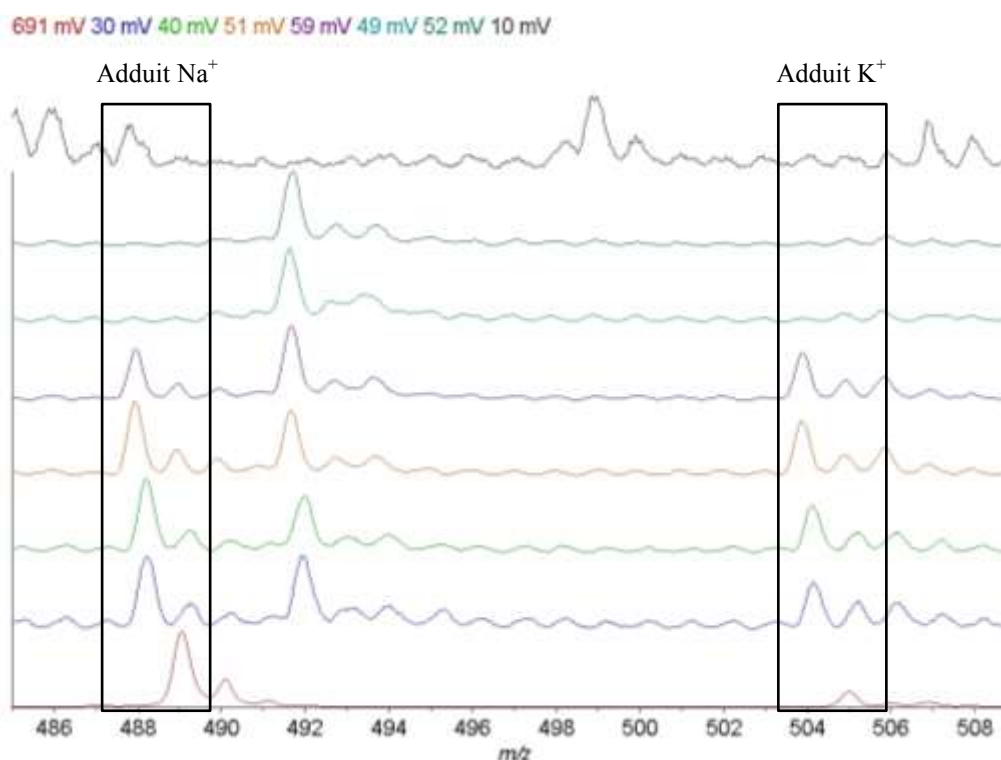


Figure 65 : Comparaison des profils de trois souches et observation de la production en mycotoxine T2

De bas en haut : 1. Toxine T2 pure témoin, 2. *F.langsethiae*, 3. *F.langsethiae*, 4. *F.sporotrichioides*, 5. *F.sporotrichioides*, 6. *F.graminearum*, 7. *F.graminearum*, 8. Témoin CHCA

### 3.1.3 Conclusion

La LC-MS permet une détection plus sensible et donc à des concentrations plus faibles. Cette méthode est donc plus fiable et reste la méthode de quantification par excellence. Par contre, la technique MALDI-TOF n'est pas une technique d'analyse utilisée pour la quantification de produits mais permet de déterminer la présence de mycotoxines à partir d'un certain seuil. Si la mycotoxine n'est pas détectée, cela signifie l'absence de la mycotoxine ou sa présence mais à une concentration inférieure à la limite de détection et du seuil de concentration qui peut être préalablement défini. Ainsi, dans notre cas, il est possible de détecter des concentrations supérieures ou égales à 100 ppm, soit 50 ng de T2 dans le volume déposé. La limite courante de détection du MALDI-TOF est le nanogramme, ce qui est cohérent. Des optimisations seront à envisager pour améliorer le seuil de détection et donc la sécurité. Par exemple, l'impact d'une concentration de l'échantillon ou d'une étape de SPE peut être testé.

Par ailleurs, la technique MALDI-TOF est beaucoup plus rapide et facile d'utilisation que la LC-MS puisque l'analyse de l'échantillon est inférieure à 5 min (dépôt + analyse), contre 25 min par LC-MS pour la détection de la mycotoxine T2 seule. Cette technique peut s'avérer suffisante pour une évaluation rapide de risque au niveau de produits alimentaires.

En outre, l'utilisation du MALDI-TOF permet de s'affranchir d'une étape d'extraction au préalable en cas d'analyse d'échantillons complexes.

Ainsi, les deux méthodes sont complémentaires et le choix pour l'une ou l'autre méthode peut être fait en fonction de l'objectif visé :

- une quantification précise, dans ce cas la LC-MS sera privilégiée
- une détection ou semi-quantification, où l'on pourra utiliser uniquement le MALDI-TOF.

Les deux techniques peuvent être utilisées en parallèle, la LC-MS validant les résultats obtenus avec le MALDI-TOF. Le MALDI n'a pas vocation de remplacer la LC-MS, mais est un compromis intéressant, permettant d'avoir des résultats rapide pouvant être confirmés en parallèle.

# Conclusions générales - Perspectives

---

Les problématiques liées à la présence et au développement des *Fusarium* et des mycotoxines sont, aujourd'hui, non négligeables pour des raisons aussi bien épidémiologiques qu'économiques. La fusariose connue dans l'agriculture et chez les animaux est considérée comme une pathologie émergente grave chez l'homme, notamment chez les immunodéprimés. Les mycotoxines associées et leur toxicité montrent également l'importance d'y porter de l'intérêt, puisque de nombreux produits de notre alimentation quotidienne sont touchés par ces mycotoxines.

Ces travaux montrent que l'application de la technique de traitement des échantillons et d'analyse des bactéries aux moisissures permet l'obtention de spectres interprétables. Les résultats d'identification en laboratoire, culture comprise, sont obtenus en 5 jours, alors que 2 semaines sont nécessaires en microbiologie classique. Malgré un investissement initial important, la rapidité des analyses et la sensibilité de la méthode en fait une méthode semi-quantitative d'intérêt.

L'identification est faisable par MALDI-TOF pour les espèces du genre *Fusarium* et il est possible de remplir la base de données associée Saramis<sup>®</sup>. Elle peut alors être complétée avec d'autres espèces du genre, et notamment, avec les 19 espèces mises à disposition par l'ANSES. Par ailleurs, il est aujourd'hui possible de faire une co-identification jusqu'à trois espèces de *Fusarium*, ce qui permet de se rapprocher des conditions naturelles en cas de multi-contamination des échantillons. De plus, la détection de mycotoxines est réalisable en parallèle de l'identification de la souche pour la toxine T2, avec un seuil de détection situé au même niveau que les recommandations. La méthode pourra être étendue aux autres mycotoxines émergentes et ayant un impact sur la santé.

Par rapport à la problématique initiale, l'objectif est atteint concernant la faisabilité de l'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des moisissures du genre *Fusarium* et des mycotoxines associées, ce qui a permis de présenter ces résultats lors du congrès The World Mycotoxin Forum – 8th conference, Vienna, Austria, Nov 10-12, 2014, avec une présentation orale et un poster (Annexe 3). Cette problématique ne présente pas seulement de l'intérêt pour la filière agroalimentaire, mais également pour les fournisseurs et les développeurs d'équipements analytiques directement. Ainsi, j'ai pu présenter ces résultats à Monsieur Kozo Shimazu, PDG de Kratos Analytical, ainsi qu'à des membres de son équipe.

Cependant, les résultats suscitent un certain nombre de réflexions et de perspectives. Il est nécessaire de poursuivre le développement de la méthode en vue d'une standardisation. Le but est de pouvoir avoir des résultats comparables d'un équipement à l'autre ou d'un site à l'autre et ainsi n'avoir plus qu'à considérer les variabilités inter- et intra-laboratoires. Dans le cas contraire, les résultats ne seront toujours que locaux. Par ailleurs, il conviendra d'envisager une évolution du logiciel vers la co-identification, si possible en milieu complexe, pour permettre une analyse directe et globale des échantillons. Pour ce faire, il faudra y associer une étude chimiométrique. De plus, concernant le dosage des mycotoxines, une

amélioration de la méthode pourra être testée afin de réduire les seuils de détection, par exemple, en ajoutant une étape de concentration par speedvac ou une SPE, tout en s'assurant de l'identité de la molécule analysée. Dans ce cadre, le mode collision sera privilégié. Enfin, un logiciel global, regroupant aussi bien la co-identification, qu'une base de données sur les mycotoxines, pourra être développé. De même pour l'appareillage, un équipement adapté au besoin, moins complexe, mais sensible et spécifique permettrait de favoriser sa diffusion dans les domaines agro-alimentaires. Ainsi, la prise en charge directement au champ, mais aussi de la récolte incriminée, pourra être rapidement adaptée (déclassement voire élimination). Le MALDI-TOF deviendrait, ainsi, un outil efficace de surveillance des cultures et de contrôle des crises alimentaires.

# Bibliographie

---

De Angelis, E., Monaci, L., Pascale, M., and Visconti, A. (2013). Fate of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins and their glucoside conjugates from flour to bread: an investigation by high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30, 345–355.

ANSES (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale - Rapport final.

Arpino, P. (2007). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. I. Techniques de L'ingénieur Chromatographie et Techniques Séparatives *base documentaire : TIB385DUO*.

Arvalis-Institut du végétal (2002). Actualité Phyto Ile de France. n°28.

Barchietto, T., Caloara, V., and Petat, J.-M. (2002). Sécurité des aliments : l'exemple du blé : recherche et mise au point d'une méthodologie innovante : le test Tri5.

Bennett, J.W., and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497–516.

Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G., and Vleggaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 743–745.

De Boevre, M., Di Mavungu, J.D., Maene, P., Audenaert, K., Deforce, D., Haesaert, G., Eeckhout, M., Callebaut, A., Berthiller, F., Van Peteghem, C., et al. (2012). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29, 819–835.

Bouchoux, G., and Sablier, M. (2005). Spectrométrie de masse - Principe et appareillage. Techniques de L'ingénieur - Spectrométries *base documentaire : TIB390DUO*.

Le Boulc'h, V., Bédouret, S., Poyet, V., and et al. (2000). Evaluation de la qualité sanitaire du blé : à propos des mycotoxines et des moyens de les détecter.

Brown, D.W., and Proctor, R.H. (2013). *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology* (Norfolk: Caister Acad. Press).

Bryła, M., Roszko, M., Szymczyk, K., Jędrzejczak, R., Obiedziński, M.W., and Sękul, J. (2013). Fumonisins in plant-origin food and fodder – a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30, 1626–1640.

Bullock, J.D., and Khamis, H.J. (2010). A retrospective statistical analysis of the *Fusarium keratitis* epidemic of 2004-2006. *Ophthalmic Epidemiol* 17, 179–184.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., and Gooday, G.W. (2001). *The Fungi* (Gulf Professional Publishing).

Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.-C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., Hendrickx, M., and Piarroux, R. (2011). Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One* 6.

CAST (2003). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems, Report No. 139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.

Caude, M., and Jardy, A. (1994). Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. Techniques de L'ingénieur - Chromatographie et Techniques Séparatives *base documentaire : TIB385DUO*.

Caude, M., and Jardy, A. (1995). Chromatographie en phase liquide - Appareillage et applications. Techniques de L'ingénieur - Chromatographie et Techniques Séparatives *base documentaire : TIB385DUO*.

Clauzon, L. (2009). Guerre biologique et bioterrorisme ou comment la nature devient une arme. Thèse d'exercice. Université de Nancy I. UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques.

Commission Européenne (2007). Règlement (CE) N°1126/2007 De la commission du 28 septembre 2007 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs.

Commission Européenne (2013). Recommandation 2013/165/UE de la commission du 27 mars 2013 concernant la présence de toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits à base de céréales.

Dean, R., Van Kan, J. a. L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.

Dempster, A.J. (1918). A new Method of Positive Ray Analysis. *Phys. Rev.* 11, 316–325.

Desjardins, A.E. (2006). *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology* (APS Press).

Desjardins, A.E., and Proctor, R.H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119, 47–50.

Dhiman, N., Hall, L., Wohlfel, S.L., Buckwalter, S.P., and Wengenack, N.L. (2011). Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1614–1616.

Dragacci, S., and Frémy, J.-M. (2005). Analyse et détection des mycotoxines. Techniques de L'ingénieur. Analyse et Caractérisation.

Edwards, S., Cantley, T.C., Rottinghaus, G.E., Osweiler, G.D., and Day, B.N. (1987). The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology* 28, 43–49.

- Eriksen, G.S., and Alexander, J. (1998). Fusarium toxins in cereals: a risk assessment (Nordic Council of Ministers).
- Escrivá, L., Font, G., and Manyes, L. (2015). In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology* 78, 185–206.
- Fenselau, C., and Demirev, P.A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 157–171.
- Fink-Grenmels, J. (1999). Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* 21, 115–120.
- Fodor, J., Meyer, K., Gottschalk, C., Mamet, R., Kametler, L., Bauer, J., Horn, P., Kovacs, F., and Kovacs, M. (2007). In vitro microbial metabolism of fumonisin B1. *Food Additives & Contaminants* 24, 416–420.
- Gangneux, J.-P., and Drogoul, A.-S. (2008). Infections fongiques invasives : nouvelles données épidémiologiques et écologiques. *Hématologie* 14, 5–11.
- Gaumy, J.L., Bailly, J.D., Burgat, V., and Guerre, P. (2001). Zearalenone: propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de Médecine Vétérinaire* 152, 217–234.
- Gautam (2011). Type I host resistance and Trichothecene Accumulation in Fusarium-infected Wheat Heads. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6, 231–241.
- Gelderblom, W.C., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R., and Kriek, N.P. (1988). Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1806–1811.
- Ghédira-Chékir, L., Maaroufi, K., Creppy, E.E., and Bacha, H. (1999). Cytotoxic and Genotoxic Effects of Zearalenone: Prevention by Vitamin E. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 18, 355–368.
- Grosjean, F., Leuillet, M., Berhaut, P., Niquet, G., and Orlando, D. (2002). Dossier Mycotoxines. *Perpescives Agricoles -N°278* 28–42.
- Howard, K.L. (2007). Quantitative Analysis of Cyanobacterial Toxins by MALDI-TOF Mass Spectrometry (ProQuest).
- Hussein, H.S., and Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101–134.
- IARC (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Vol. 56: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.
- IARC (2002). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Vol. 82: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

IARC (2006). Preamble to the IARC monographs. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

Jeunot, B. (2005). Les fusariotoxines sur céréales: détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse d'exercice. Université de Nancy I. UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques.

Kalantari, H., and Moosavi, M. (2010). Review on T-2 Toxin. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 5, 26–38.

Kim, Y.-T., Lee, Y.-R., Jin, J., Han, K.-H., Kim, H., Kim, J.-C., Lee, T., Yun, S.-H., and Lee, Y.-W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. Molecular Microbiology 58, 1102–1113.

Leslie, J.F., and Summerell, B.A. (2006). The Fusarium Laboratory Manual (Ames, Iowa: Wiley-Blackwell).

Li, Y., Wang, Z., Beier, R.C., Shen, J., Smet, D.D., De Saeger, S., and Zhang, S. (2011). T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 3441–3453.

Magan, N., and Olsen, M. (2004). Mycotoxins in Food: Detection and Control (Woodhead Publishing).

Magoha, H., De Meulenaer, B., Kimanya, M., Hipolite, D., Lachat, C., and Kolsteren, P. (2014). Fumonisin B1 contamination in breast milk and its exposure in infants under 6 months of age in Rombo, Northern Tanzania. Food and Chemical Toxicology 74, 112–116.

Marasas, W.F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. Environmental Health Perspectives 109, 239.

Marinach-Patrice, C., Lethuillier, A., Marly, A., Brossas, J.-Y., Gené, J., Symoens, F., Datry, A., Guarro, J., Mazier, D., and Hennequin, C. (2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. Clinical Microbiology and Infection 15, 634–642.

Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horr , R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., et al. (2009). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. J Clin Microbiol 47, 2912–2917.

Martiny, D., Busson, L., Wybo, I., El Haj, R.A., Dediste, A., and Vandenberg, O. (2012). Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 50, 1313–1325.

Mayayo, E., Pujol, I., and Guarro, J. (1999). Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. Journal of Medical Microbiology 48, 363–366.

McMullen, M.P., and Stack, R.W. (2011). Fusarium head blight (scab) of small grains.

Milani, J., and Maleki, G. (2014). Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. J. Sci. Food Agric. 94, 2372–2375.

- Moreau, C. (1974). *Moisissures toxiques dans l'alimentation* (Paris: Masson).
- Moss, M.O. (1996). Mycotoxins. *Mycological Research* 100, 513–523.
- Nelson, P.E. (1991). History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology* 81, 1045–1048.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., and Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 7, 479–504.
- O'Donnell, K. (1996). Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. *SYDOWIA-HORN-* 48, 57–70.
- Pagliuca, G., Zironi, E., Ceccolini, A., Matera, R., Serrazanetti, G.P., and Piva, A. (2005). Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B1 and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography--fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 819, 97–103.
- Parent-Massin, Ficheux, and Galtier (2013). *Mycotoxines et sécurité alimentaire*. EMC - Pathologie Professionnelle et de L'environnement 8, 1–14.
- Pettersson, H. (2008). T-2 and HT-2 toxins in oats and oat products (Brussels).
- Pettersson, H. (2010). T-2 and HT-2 toxins in oats and oat Products (Brussels).
- Pettersson, H., Brown, C., Hauk, J., Hoth, S., Meyer, J., and Wessels, D. (2011). Survey of T-2 and HT-2 toxins by LC–MS/MS in oats and oat products from European oat mills in 2005–2009. *Food Additives and Contaminants: Part B* 4, 110–115.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Piraux, F., Caron, D., Lannou, C., and Richard-Forget, F. (2011). The Dent Stage of Maize Kernels Is the Most Conducive for Fumonisin Biosynthesis under Field Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8382–8390.
- Pinel, C., Parat, S., Grillot, R., and Perdrix, A. (1998). *Mycotoxines*. Pathologie professionnelle et de l'environnement 8, 1–5.
- Placinta, C.M., D'mello, J.P.F., and Macdonald, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21–37.
- Ploetz, R.C. (2000). Panama Disease: A Classic and Destructive Disease of Banana. *Plant Health Progress*.
- Quillien, J.-F. (2002). *Les mycotoxines* (Paris: Institut national de la recherche agronomique).
- Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3–10.
- Ripert, C. (2013). *Mycologie médicale* (Lavoisier).
- Rocha, O., Ansari, K., and Doohan, F.M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 22, 369–378.

Santos, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A., and Lima, N. (2010). Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* *108*, 375–385.

Sautour, M., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Laurent, J., Barbezant, M., Sixt, N., Aho, S., Hartemann, P., Bonnin, A., and Dalle, F. (2015). Contamination des circuits d'alimentation en eau par *Fusarium*. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* *25*, e95–e96.

Scott, P.M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* *29*, 242–248.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., Scola, B.L., Fournier, P.-E., Rolain, J.M., and Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Infect Dis.* *49*, 543–551.

Seyfarth, F., Ziemer, M., Sayer, H.G., Burmester, A., Erhard, M., Welker, M., Schliemann, S., Straube, E., and Hipler, U.-C. (2008). The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Exp. Dermatol.* *17*, 965–971.

Smith, J.E., and Moss, M.O. (1985). *Mycotoxins: formation, analysis and significance* (Chichester, Royaume-Uni, Etats-Unis: Wiley).

Sondergaard, T.E., Hansen, F.T., Purup, S., Nielsen, A.K., Bonefeld-Jørgensen, E.C., Giese, H., and Sørensen, J.L. (2011). Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast cancer cells in vitro. *Toxicol. Lett.* *205*, 116–121.

Steyn, P.S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters* *82*, 843–851.

Stover, R.H. (1990). *Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease*. (APS Press), pp. 1–7.

Sudakin, D.L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* *143*, 97–107.

Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., and Burgess, L.W. (2001). *Fusarium* : Paul E. Nelson Memorial Symposium (St. Paul, Minnesota: APS Press).

Summerell, B.A., Salleh, B., and Leslie, J.F. (2003). A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease* *87*, 117–128.

Tanaka, K. (2003). The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* *42*, 3860–3870.

Thibault, N., Burgat, V., and Guerre, P. (1997). Les fumonisines : nature, origine et toxicité. *Revue de Médecine Vétérinaire* *148*, 369–388.

Tranchant, J. (1996). Chromatographie en phase gazeuse. *Techniques de L'ingénieur - Chromatographie et Techniques Séparatives base documentaire : TIB385DUO*.

Triest, D., Stubbe, D., Cremer, K.D., Piérard, D., Normand, A.-C., Piarroux, R., Detandt, M., and Hendrickx, M. (2014). Use of Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry for Identification of Molds of the *Fusarium* Genus. *J. Clin. Microbiol.* JCM.02213–14.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* 632, 168–180.

Wannemacher, R.W., Wiener, S.L., Sidell, F.R., Takafuji, E.T., and Franz, D.R. (1997). Trichothecene mycotoxins. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* 6, 655–676.

Warth, B., Sulyok, M., Fruhmann, P., Mikula, H., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Hametner, C., Abia, W.A., Adam, G., Fröhlich, J., et al. (2012). Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26, 1533–1540.

Yazar, S., and Omurtag, G.Z. (2008). Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2062–2090.

# Webographie

---

[www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org) – Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002 – 9 october 2002 ; consulté le 4 avril 2015

# Glossaire

---

Activité en eau ( $a_w$ ) : Part de l'eau libre dans un produit, c'est-à-dire disponible par exemple pour la croissance de micro-organismes. Plus l' $a_w$  est élevée, plus il y a d'eau disponible pour le développement de ces micro-organismes. La mesure de l' $a_w$  est comprise entre 0 et 1.

Adduits : Produit d'une réaction d'addition entre deux unités moléculaires distinctes donnant un produit unique qui contient tous les atomes initiaux mais liés différemment entre eux.

Agranulocytose : Absence dans le sang des globules blancs.

Anamorphe : Stade asexué d'une moisissure. Seules des conidies ou des spores sont obtenues, par multiplication végétative.

Chlamydospore : Spore mycélienne de multiplication végétative des champignons et à paroi épaisse.

Conidie : Bouture unicellulaire de champignon, jouant le rôle d'une spore dans la dispersion de l'espèce. Elle assure la multiplication asexuée.

Endophyte : Organisme qui se développe à l'intérieur des tissus végétaux.

Fluence : Dose d'énergie délivrée par un tir laser exprimée en J/m<sup>2</sup>.

Forme imparfaite : Champignon dont la reproduction est asexuée.

Forme parfaite : Champignon dont la reproduction est sexuée.

Leucopénie : Diminution de la concentration sanguine des leucocytes.

LD50 : Dose létale correspondant à la dose entraînant la mort de 50% de la population considérée.

Mycélium : Partie végétative des champignons, formée de filaments souterrains ramifiés, généralement blancs.

Neutropénie : Diminution de la concentration sanguine des polynucléaires neutrophiles (globules blancs contribuant à l'élimination des bactéries).

Oestrogénique : Relatif aux oestrogènes - Hormone sécrétée par l'ovaire et dont le taux sanguin, en augmentant, joue un rôle dans l'ovulation.

Onyxis : Inflammation de l'ongle

Pancytopenie : Diminution du nombre des cellules dans les trois lignées de cellules du sang : globules rouges, plaquettes, globules blancs.

Phialide : Cellule produisant les spores et se situant à l'extrémité des conidiophores des champignons. Il peut y en avoir une (monophialide) ou plusieurs (polyphalides).

Reproduction végétative : La reproduction végétative traduit un mode de reproduction asexuée.

Saprophyte : Se dit des végétaux supérieurs, des champignons et des micro-organismes qui se nourrissent de matière organique morte.

sp. : S'emploie après un nom de genre pour désigner une espèce indéterminée ou non précisée

Spore : Organe de dispersion et de multiplication caractéristique du règne végétal, et constitué par une très petite diaspore, aux cellules généralement haploïdes, et très souvent unicellulaire.

Symbiose : Association permanente et spécifique entre deux micro-organismes ne pouvant vivre l'un sans l'autre, chacun tirant un bénéfice de cette association.

Téléomorphe : Stade sexué d'une moisissure.

# Annexes

---

Annexe 1 : Classification des agents par l’IARC en fonction de leur potentiel cancérigène (IARC, 2006).....	115
Annexe 2 : Composition solution Tof mix – calibration standard .....	116
Annexe 3 : Poster présenté à The World Mycotoxin Forum - Vienna.....	117

Annexe 1 : Classification des agents par l'IARC en fonction de leur potentiel cancérogène  
(IARC, 2006)

Groupe	Définition
Groupe 1	Agent cancérogène pour l'homme
Groupe 2A	Probablement cancérogène pour l'homme
Groupe 2B	Possiblement cancérogène pour l'homme
Groupe 3	Inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme
Groupe 4	Probablement pas cancérogène pour l'homme

Annexe 2 : Composition solution Tof mix – calibration standard

Composés	Masse $[M+nH]^{n+}$ Monoisotopique (Da)
Bradykinine 1-7	757,40
Angiotensine II	1046,54
Angiotensine I	1296,69
Glu1 – Fibrinopeptide B	1570,68
N-Acetyl rénine	1800,94
ACTH 1-7	2093,09
ACTH 18-39	2465,20
ACTH 7-38	3657,93



## Adaptation of bacteriological protocols for the fast fungal identification and associated mycotoxins detection by Maldi-TOF

<sup>1</sup>Julien Billard, <sup>2</sup>Sophie Heit, <sup>3</sup>Philippa Hart, <sup>4</sup>Cedric Paris, <sup>4</sup>Renaud Ioss, <sup>2</sup>Omar Belgacem, <sup>1</sup>Xavier Framboisier and <sup>1</sup>Emmanuel Rondags

<sup>1</sup> Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS (UMR 7274), Université de Lorraine, 13, rue du bois de la Champelle, 54500 Vandœuvre France

<sup>2</sup> Kratos analytical, Trafford Wharf Road, Manchester, M17 1GP, United Kingdom

<sup>3</sup> ENSAIA, Laboratoire commun d'analyses, 2, avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

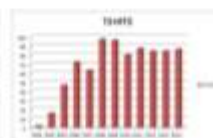
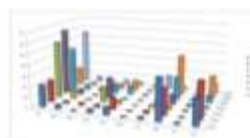
<sup>4</sup> ANSES, Laboratoire de la Santé des Végétaux - Unité de Mycologie, Domaine de Pédécourt - Bât. 1, CS 4009, 54220 Malzeville, France

### Context

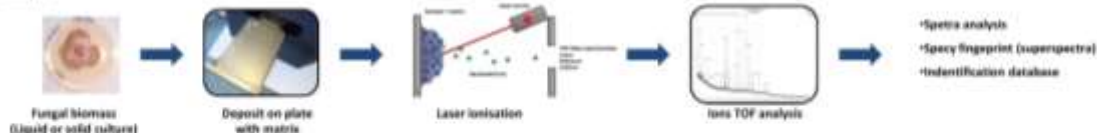
Rising and evolving fungal contamination in the Barley-Malt-Beer chain.  
Health, productivity and technological concerns mainly due to *Fusarium* genus  
Mycotoxins (T2 and enniatins), hydrophobins (gushing), cutinases

### Objectives

Assessment of the feasibility of the fast Maldi-TOF identification of fungi  
Focus on the *Fusarium* genus  
Metabolites detection (T2 toxin)

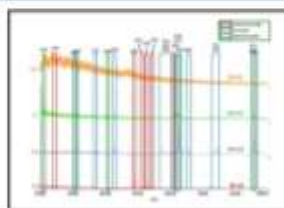
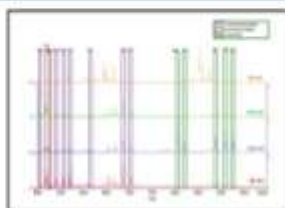


### Principle



### Application to *Fusarium*

Matrix nature  
DHB, CHCA, SA  
Laser power  
10 to 100: 10  
Extraction solvent  
ACN/water/TFA/EtOH



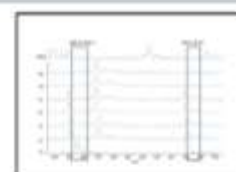
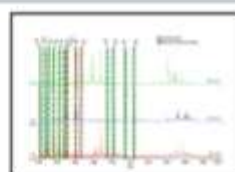
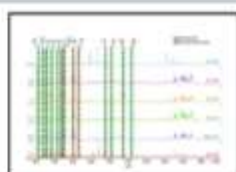
### Maldi-TOF fingerprints

Species	Samples	Species	Samples
<i>F. lateralis</i>	6	<i>F. verticillioides</i>	8
<i>F. acuminatum</i>	2	<i>F. sporotrichoides</i>	5
<i>F. salm</i>	6	<i>F. subglutinans</i>	7
<i>F. equiseti</i>	11	<i>F. temperatum</i>	9
<i>F. andrysi</i>	7	<i>F. graminearum</i>	7
<i>F. culmorum</i>	5	<i>F. nivale</i>	2
<i>F. cerealis</i>	10	<i>F. proliferatum</i>	9
<i>F. avenaceum</i>	7	<i>F. oxysporum</i>	9
<i>F. longipes</i>	8	<i>F. venenatum</i>	4
<i>F. poae</i>	17		

### Method improvement

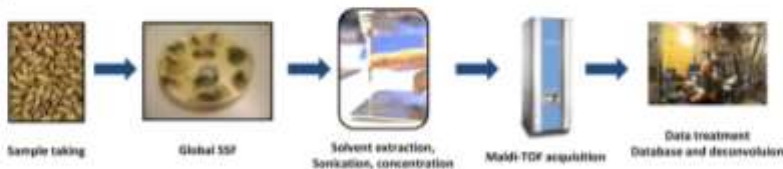
Sample Treatment  
Hydrolyses  
French press

Mycotoxins detection  
T2  
Enniatins



### Conclusions-perspectives

Feasibility of:  
Fusarium identification  
Associated Mycotoxins detection



Fast global assessment  
Contaminants  
Mycotoxins  
Hydrophobins...



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 03/09/2015

<p><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Sophie HEIT</p> <p><u>Sujet</u> : Identification de <i>Fusarium</i> et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. Raphaël DUVAL, Professeur Directeur : M. Emmanuel RONDAGS, Maître de conférences Juges : M. Jean-Yves JOUZEAU, PU-PH, Pharmacien M. Dominique DECOLIN, Maître de conférences, Pharmacien M. Patrick CHAIMBAULT, Professeur M. Xavier FRAMBOISIER, Ingénieur de Recherche</p>	<p>Vu,</p> <p>Nancy, le 23/07/2015</p> <p>Le Président du Jury      Directeur de Thèse</p> <p>M. DUVAL      M. RONDAGS</p> <p><i>[Signature]</i>      <i>[Signature]</i></p>
<p>Vu et approuvé,</p> <p>Nancy, le</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p><i>Béatrice FAIVRE</i> <i>Vice-Doyen</i></p> <p><i>Francine PAULUS</i></p>	<p>Vu,</p> <p>Nancy, le 28 AOUT 2015</p> <p>Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p><i>[Signature]</i></p> <p><i>Pierre MUTZENHARDT</i></p> <p>N° d'enregistrement : 7051</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines  
associées par MALDI-TOF**

Thèse soutenue le 3 septembre 2015

Par Sophie HEIT

**RESUME :**

**Contexte :** Les champignons du genre *Fusarium* sont, aujourd'hui, de plus en plus associés à des pathologies aussi bien chez les plantes que chez les animaux et l'homme. Les conséquences sont aussi bien économiques, avec la réduction des rendements des cultures, que sanitaires, du fait de leur émergence au niveau hospitalier et de leur association à un taux de mortalité élevé. Par ailleurs, les *Fusarium* ont la capacité de produire des métabolites secondaires toxiques, appelés mycotoxines, et dont les conséquences peuvent être dramatiques puisqu'elles se retrouvent, malgré les procédés de transformation, dans l'alimentation humaine et animale. Dans ce contexte, la technique MALDI-TOF pourrait apporter rapidement des informations pertinentes à la gestion des crises associées aux *Fusarium*. Déjà largement utilisé en bactériologie, le MALDI-TOF n'est encore que peu utilisé dans l'identification fongique. Ainsi, ce travail propose d'évaluer la faisabilité de cette technique analytique pour l'identification rapide de moisissures du genre *Fusarium* et la détection des mycotoxines associées.

**Méthodes :** Différentes espèces du genre *Fusarium* ont été mises en culture en se focalisant sur quatre souches d'importance sanitaire et économique dans les filières céréalières : *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*. Dans un premier temps, une analyse de ces souches est effectuée par MALDI-TOF pour évaluer la faisabilité de leur identification seule et en co-culture. Dans un deuxième temps, une évaluation du potentiel mycotoxinogène est mise en place en analysant spécifiquement la mycotoxine T2. Une détection par MALDI-TOF, puis une comparaison par LC-MS sont réalisées pour déterminer un seuil de détection.

**Résultats :** La faisabilité de l'utilisation de la technique MALDI-TOF pour l'identification fongique a été démontrée. Il est, par ailleurs, possible de distinguer les espèces du genre *Fusarium* entre elles par l'identification de pics spécifiques. Cette caractérisation des espèces permet également de les différencier dans un mélange complexe et de compléter des bases de données telles que Saramis®. Par ailleurs, la technique MALDI-TOF permet aussi de détecter la mycotoxine T2 associée à partir de 100 ppb, seuil décrit dans les recommandations. En outre, elle est détectée efficacement dans des cultures d'espèces de *Fusarium*, connus pour être des producteurs importants de cette toxine.

**Conclusion :** Cette étude montre que le MALDI-TOF est une technique semi-quantitative d'intérêt pour l'identification de *Fusarium* et la détection de la mycotoxine T2. La rapidité et la facilité d'utilisation peut en faire une technique de choix de mesure de risque, aussi bien pour le domaine hospitalier, que pour le domaine agricole.

**MOTS CLES :** *Fusarium*, mycotoxines, identification, détection, MALDI-TOF, LC-MS, toxine T2

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Pr Raphaël DUVAL  Dr Emmanuel RONDAGS	Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy	Expérimentale	<input checked="" type="checkbox"/>
	Maître de Conférences, ENSAIA	Bibliographique	<input type="checkbox"/>
		Thème	<input checked="" type="checkbox"/>

**Thèmes**

☒ 1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
☒ 4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle