



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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
2005

Double

FACULTE DE PHARMACIE

**LES FUSARIOTOXINES SUR CEREALES :
DETECTION, RISQUE ET NOUVELLE
REGLEMENTATION**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 juin 2005

pour obtenir



le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Benoît JEUNOT**
né le 16 juillet 1979

DB 34837

Membres du Jury

Président : Mme Françoise HINZELIN, Maître de Conférences

Juges : M. Emile BENIZRI, Professeur, ENSAIA - Nancy
Mme Laurence MUNERET, Professeur, ENSAIA - Nancy

BU PHARMA-ODONTOL



104 070166 2

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
2005

FACULTE DE PHARMACIE

**LES FUSARIOTOXINES SUR CEREALES :
DETECTION, RISQUE ET NOUVELLE
REGLEMENTATION**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 juin 2005

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Benoît JEUNOT**
né le 16 juillet 1979

DS 31837



Membres du Jury

Président : Mme Françoise HINZELIN, Maître de Conférences

Juges : M. Emile BENIZRI, Professeur, ENSAIA - Nancy
Mme Laurence MUNERET, Professeur, ENSAIA - Nancy

Membres du personnel enseignant 2004/2005

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MORTIER François

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mlle IMBS Marie-Andrée

Mme POCHON Marie-France

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

Mlle BATT Anne-Marie

M. BLOCK Jean-Claude

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Mme FINANCE Chantal

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mlle GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. JOUZEAU Jean-Yves

M. LABRUDE Pierre

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

M. LALLOZ Lucien

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MERLIN Jean-Louis

M. NICOLAS Alain

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

M. RIHN Bertrand (Professeur associé)

Mme SCHWARTZBROD Janine

M. SIEST Gérard

M. SIMON Jean-Michel

M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Toxicologie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Virologie, immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Bioanalyse du médicament

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Pharmacognosie

Chimie organique

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Biologie cellulaire oncologique

Chimie analytique

Chimie Thérapeutique

Biochimie

Bactériologie, parasitologie

Biochimie

Droit officinal, législation pharmaceutique

Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérard	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M.	CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
M.	LAMPRECHT Alf	Pharmacie galénique
Mme	LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication et santé
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

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 ».

A NOTRE PRESIDENT ET DIRECTEUR DE THESE

Madame Françoise HINZELIN

Maître de conférences – Laboratoire de Mycologie et
Botanique de la faculté de Pharmacie de Nancy

*Vous nous faites l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.*

*Nous vous remercions pour votre
accueil chaleureux, votre disponibilité
et vos précieux conseils.*

*Veillez trouver dans cet ouvrage
l'expression de notre profonde
reconnaissance.*

A NOTRE JUGE

Monsieur Emile BENIZRI

Professeur – Ecole National Supérieure d’Agriculture et
d’Industries Alimentaires (ENSAIA) de Nancy.

*Vous vous êtes profondément investis
dans ce travail et vous nous faites
l’honneur de le juger.*

*Nous vous remercions pour votre
disponibilité, votre rigueur et vos
conseils avisés.*

*Que ce travail soit le témoignage de
notre profond respect et de toute notre
gratitude.*

A NOTRE JUGE

Madame Laurence MUNERET

Professeur – Ecole National Supérieure d’Agronomie et
d’Industries Alimentaires (ENSAIA) de Nancy

*Nous vous remercions de l'intérêt que
vous avez bien voulu porter à ce
travail en acceptant de le juger.
Nous vous remercions pour votre
accueil et vos conseils.
Que ce travail soit le témoignage de
notre sympathie.*

A mes parents, pour leur soutien et leur affection durant ces années d'études

A mes frères,

A ma famille,

A la famille LEGRAND,

A Jaja et Stouf, pour les trois superbes années passées en leur compagnie

A la "Pinder" et à tous mes amis, pour ces années de fac inoubliables et tous les bons moments passés ensemble

Je dédie cette thèse...

SOMMAIRE



PARTIE I : Le genre <i>Fusarium</i>	7
1. Généralités	8
1.1. Habitat	8
1.2. Morphologie	8
1.3. Classification	10
1.3.1. L'anamorphe	10
1.3.2. Les téléomorphes	10
1.4. Les principaux <i>Fusarium</i> des céréales en France	11
2. Taxonomie des <i>Fusarium</i>	12
3. Fiches d'identification de quelques <i>Fusarium</i> rencontrés sur céréales	13
3.1. <i>FUSARIUM CULMORUM</i>	14
3.2. <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i>	15
3.3. <i>FUSARIUM MONILIFORME</i>	16
3.4. <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	17
3.5. <i>FUSARIUM AVENACEUM</i>	18
4. Détermination d'un <i>Fusarium</i>	18
4.1. Introduction	18
4.2. L'identification des <i>Fusarium</i> sur milieux gélosés	19
4.2.1. L'isolement	19
4.2.2. L'identification	20
4.2.2.1. Caractères observés sur PDA	20
4.2.2.2. Caractères observés sur SNA	20
4.3. L'identification par des méthodes de biologie moléculaire	22
5. Cycle de développement : cas de la fusariose des céréales	22
5.1. Introduction	22
5.2. Sources de contamination	23
5.3. La dissémination	23
5.4. L'infection et la colonisation des épis	24
5.5. Le climat propice aux infections	25
5.6. Les symptômes observés	26
5.6.1. Introduction	26
5.6.2. A la levée	27
5.6.3. Sur tiges à la montaison	27
5.6.4. Sur feuilles dès la montaison	27
5.6.5. Sur le col de l'épi	28
5.6.6. Sur l'épi	28
5.6.7. Sur grains	28
6. Conclusion	29

PARTIE II : Les Fusariotoxines.....30

1. Qu'est-ce qu'une mycotoxine ?.....	31
1.1. Introduction.....	31
1.2. Les mycotoxines sur céréales.....	31
2. Les fusariotoxines.....	32
2.1. La zéaralénone.....	33
2.1.1. Structure.....	33
2.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	33
2.1.3. Voie métabolique de synthèse.....	33
2.1.4. Les <i>Fusarium</i> producteurs.....	33
2.1.5. Toxicité.....	34
2.1.5.1. Mode d'action.....	34
2.1.5.2. Effets chez l'animal.....	34
2.1.5.3. Effets chez l'homme.....	34
2.2. Les Trichothécènes.....	35
2.2.1. Structure.....	35
2.2.2. Propriétés physico-chimiques.....	36
2.2.3. Voie métabolique de synthèse.....	36
2.2.4. Les <i>Fusarium</i> producteurs.....	40
2.2.5. Toxicité.....	40
2.2.5.1. Mode d'action.....	40
2.2.5.2. Effets chez l'animal.....	41
2.2.5.3. Effets chez l'homme.....	42
2.3. Les fumonisines (FBs).....	43
2.3.1. Structure.....	43
2.3.2. Propriétés physico-chimiques.....	43
2.3.3. Voie métabolique de synthèse.....	43
2.3.4. Les <i>Fusarium</i> producteurs.....	44
2.3.5. Toxicité.....	44
2.3.5.1. Effets chez l'animal.....	44
2.3.5.2. Effets chez l'homme.....	44
2.4. La moniliformine.....	44
2.5. Conclusion.....	45
3. Conditions écophysiologiques de la toxionégèse.....	46
3.1. Les facteurs abiotiques.....	46
3.1.1. Humidité et température.....	46
3.1.1.1. Humidité.....	46
3.1.1.2. La Température.....	49
3.1.2. Acidité du milieu (pH).....	50
3.1.3. Oxygénation.....	50
3.1.4. Facteurs chimiques.....	51
3.2. Facteurs biotiques.....	52
3.2.1. Substrats.....	52
3.2.2. Insectes et acariens.....	52
3.2.3. Interactions entre microorganismes.....	52
3.3. Conclusion.....	53

PARTIE III : Prévention et moyens de lutte.....54

1. Généralités.....	55
1.1. Introduction.....	55
1.2. Les possibilités d'action.....	56
2. Méthodes de lutte aux champs.....	55
2.1. Le choix variétal.....	55
2.1.1. Généralités.....	55
2.1.2. Les différences de sensibilité variétale.....	56
2.2. Traitement des semences.....	57
2.3. La rotation des cultures.....	57
2.3.1. Généralités.....	57
2.3.2. Le problème de la culture du maïs.....	58
2.4. Traitements phytosanitaires.....	58
2.5. Fertilisation.....	60
2.6. L'importance des interactions entre les facteurs à risques.....	61
3. Méthodes de lutte après la récolte.....	63
3.1. Introduction.....	63
3.2. Traitement des grains.....	63
3.3. Gestion des résidus de récolte.....	64
3.4. Les techniques en développement.....	65
4. Méthodes de lutte utilisées par les industriels.....	66
4.1. La prévention.....	66
4.2. Moyens de lutte.....	66
4.2.1. Les méthodes physiques.....	67
4.2.2. Les méthodes chimiques.....	67
4.2.3. Les méthodes microbiologiques.....	67
4.2.4. Une méthode indirecte : le rôle positif des ruminants.....	68
5. Conclusion.....	68

PARTIE IV : La détection des mycotoxines.....69

1. Les difficultés d'échantillonnage.....	70
2. Les méthodes d'analyse et de quantification.....	72
2.1. Techniques physico-chimiques.....	73
2.1.1. Principe des techniques de séparation chromatographique.....	74
2.1.2. Avantages.....	74
2.1.3. Limites.....	75
2.2. Techniques immunochimiques et techniques rapides.....	75
2.2.1. Principe des analyses par tests immunoenzymatiques.....	75
2.2.2. Tests rapides de détection immunoenzymatiques.....	76
2.2.3. Avantages.....	77
2.2.4. Limites.....	77
2.2.5. Comparaison entre les méthodes immunoenzymatiques et les techniques de séparation chromatographique	78
2.3. Technique de biologie moléculaire : le test <i>Tri 5</i>	78

2.3.1. Principe général.....	79
2.3.2. Principe de la méthode.....	79
3. Les techniques de dosage des fusariotoxines.....	79
3.1.1. Dosage de la zéaralénone.....	79
3.1.1.1. Méthodes de dosage.....	79
3.1.1.2. Analyse de la zéaralénone dans les produits d'origine végétale.....	79
3.1.2. Dosage des trichothécènes.....	80
3.1.3. Dosage des fumonisines.....	80
3.1.3.1. Méthodes de dosage.....	80
3.1.3.2. Analyse des fumonisines dans les produits d'origine végétale.....	80
3.1.3.3. Statut de la méthode et champ d'application.....	81
4. Conclusion.....	81

PARTIE V : La réglementation des Fusariotoxines.....84

1. Les Fusariotoxines présentes dans les céréales destinées à l'alimentation.....	85
1.1. Le DON.....	85
1.2. La zéaralénone dans les aliments à base de céréales.....	85
1.3. Les fumonisines dans les aliments à base de céréales.....	86
1.4. Plan de surveillance de la contamination des produits céréaliers.....	87
2. La gestion du risque.....	89
2.1. Détermination des normes.....	89
2.2. Caractérisation des dangers chez l'homme.....	90
2.3. Evaluation du risque.....	90
3. La Réglementation européenne.....	90
3.1. Introduction.....	90
3.2. La réglementation dans l'alimentation humaine.....	91
3.3. Echéance du règlement.....	93
3.4. La réglementation dans l'alimentation animale.....	93
3.5. Seuils et méthodes en question.....	93
4. Conclusion.....	94

INTRODUCTION



Au début de ce troisième millénaire, la peur du chimique et le rêve du naturel ont remplacé dans les esprits les peurs alimentaires de nos ancêtres : la carence et la famine...

L'alimentation "industrielle" et l'envahissement du "chimique" sont de plus en plus accusés d'être des dangers pour la santé et l'environnement.

Cependant, sachant ces risques, il ne faut pas négliger certains dangers naturels, notamment ceux occasionnés par les mycotoxines que peuvent produire des champignons phytopathogènes, au champ et/ou lors du stockage, et que la protection phytosanitaire et de post-récolte, souvent chimique, permet d'éviter.

En effet, même si parmi les mycotoxines actuellement connues, nombreuses sont celles qui ne semblent avoir qu'un rôle très secondaire en pathologie humaine ou animale, quelques-unes se sont révélées être des substances extrêmement dangereuses.

Les observations les plus anciennes concernant les dangers des substances produites par les moisissures se rapportent à l'ergotisme (*Claviceps purpurea*) et aux intoxications dues à des champignons se développant sur céréales, intoxications graves observées notamment en URSS durant la seconde guerre mondiale. Mais c'est depuis 1960 que l'attention s'est portée sur les mycotoxines après une intoxication animale très importante, survenue en Grande-Bretagne, dont la cause était la consommation de tourteaux d'arachide contaminés par *Aspergillus flavus*, moisissure saprophyte considérée jusque là comme un contaminant très banal. Les recherches engagées conduisirent à la découverte des aflatoxines et depuis lors, de nombreuses molécules toxiques élaborées par des moisissures ont été isolées et caractérisées soit en tant que contaminants naturels dans diverses matières premières alimentaires, soit "*in vitro*", en laboratoire.

Les toxines de *Fusarium* regroupées sous le terme fusariotoxines ont été plus récemment étudiées. Si les connaissances concernant ces toxines ont considérablement progressé depuis une vingtaine d'années, bon nombre de problèmes restent encore posés. Même si la plupart se situent aujourd'hui dans le domaine économique, voire même politique, de nombreuses questions d'ordre scientifique restent encore incomplètement étudiées.

L'étude des moisissures des *Fusarium* et des fusariotoxines doit permettre à terme de développer des méthodes de luttés et de détection les plus efficaces afin de réduire au maximum les teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires.

PARTIE I :

Le genre *Fusarium*

1. Généralités

C'est en 1809 que Link décrit le genre *Fusarium* pour la première fois.

Le genre *Fusarium* tient son nom du latin *Fusus*, car ses spores sont en forme de fuseau.

1.1. Habitat

Les champignons du genre *Fusarium* sont très répandus et peuvent être isolés de la plupart des sols, des insectes, de l'eau courante, des racines, graines et autres tissus d'une grande variété de plantes herbacées et ligneuses sauvages ou cultivées. Ces organismes sont retrouvés aussi bien sous les climats tempérés que sous les climats sub-tropicaux. Certaines espèces s'attaquent plus particulièrement aux céréales et sont plus fréquemment rencontrées sur les cultures françaises.

1.2. Morphologie

Les *Fusarium* ont un thalle à croissance généralement rapide, blanc à crème, jaune brunâtre, rose, rouge, violet ou lilas. Les conidiophores parfois très ramifiés forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores d'aspects graisseux (photographie 1).



Photographie 1 : Mycélium, sporodochie et spores de *Fusarium species* (x2500),
(Champion, 1997)

Les phialides sont plus ou moins allongées et peuvent produire deux types de conidies :

- des macroconidies fusiformes, souvent courbées, pluriseptées, avec une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon,
- des microconidies petites, généralement septées, piriformes, fusiformes ou ovoïdes.

Certaines espèces produisent les deux types de spores, d'autres ne forment que des macroconidies (tableau 1).

Les chlamydospores sont présentes ou absentes, terminales ou intercalaires, différenciées par le mycélium ou par les conidies (Botton *et al.*, 1985).

Tableau 1 : Caractères distinctifs des principales espèces et variétés de *Fusarium* rencontrées sur semences (extrait de Messiaen et Cassini, 1968)

<i>Microconidies présentes</i>	
Microconidies piriformes ou quasi-sphériques Conidiophores en forme de bouteille Microconidies elliptiques Macroconidies de taille moyenne, rarement 5 cloisons Mycélium blanc grisâtre ou rougeâtre suivant les espèces	<i>F. tricinctum</i> = <i>F. poae</i>
Microconidies en bouquet sur conidiophores ramifiés Macroconidies de tailles et de courbures irrégulières Mycélium blanc rosé à rouge carmin plus ou moins fauve	<i>F. roseum</i> var. <i>arthrosporioides</i>
Microconidies en chaînes Macroconidies présentes Colonies poudreuses Mycélium blanc rosé à violacé en vieillissant	<i>F. moniliforme</i>
Microconidies en fausses têtes Macroconidies présentes Colonies poudreuses Mycélium blanc rosé à violacé en vieillissant	<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
Microconidies en fausses têtes Conidiophores courts Macroconidies inférieures ou égales à 4 µm en largeur Chlamydospores présentes Mycélium rose orangé à violacé	<i>F. oxysporum</i>
Microconidies souvent produites avec des macroconidies dominantes, supérieures ou égales à 4 µm en largeur Conidiophores allongés Chlamydospores présentes Mycélium blanchâtre ou fauve	<i>F. solani</i>
<i>Microconidies absentes</i>	
Macroconidies produites en masses roses à la lumière, obtuses aux deux extrémités Mycélium blanc...	<i>F. nivale</i> = <i>Microdochium nivale</i>
Macroconidies de plus de 5 µm de largeur peu pointues Chlamydospores présentes Mycélium rosé à rouge brique avec reflets jaunes	<i>F. roseum</i> var. <i>culmorum</i>
Macroconidies de 3 à 6 µm de largeur Absence de chlamydospores Mycélium rosé à rouge brique avec reflets jaunes	<i>F. roseum</i> var. <i>graminearum</i>
Macroconidies de moins de 3 à 6 µm de largeur, très longues et minces Absence de chlamydospores Mycélium blanc rosé	<i>F. roseum</i> var. <i>avenaceum</i>

1.3. Classification

1.3.1. L'anamorphe

C'est la forme imparfaite des champignons dont la reproduction asexuée est connue. La multiplication asexuée fait intervenir des conidies de formes et d'organisations très variées (Bouchet *et al.*, 2000).

Dans la classification conservant la division des Deuteromycota, le genre *Fusarium* doit être placé dans :

Classe : Hyphomycètes, thalle filamenteux septé

Ordre : Tuberculariales, présence de sporodochies

Famille : Tuberculariaceae : seule famille de l'ordre (Botton *et al.*, 1985).

1.3.2. Les téléomorphes

C'est la forme parfaite des champignons dont la reproduction sexuée est connue. Les téléomorphes de *Fusarium* sont des Hypocréales appartenant à la sous-division des Ascomycotina.

Classe : Hymenoascomycètes, présence d'un ascocarpe avec couche fertile.

Ordre : Hypocréales

Sous-classe : Pyrenomycetideae, l'ascocarpe est un périthèce

Famille : Hypocreaceae, ascospores non filiformes multiseptées (Botton *et al.*, 1985).

Les formes parfaites de *Fusarium* sont :

- *Gibberella* Sacc.
- *Nectria* (Fr.)

Ainsi, un champignon dont les formes parfaites et imparfaites sont connues sera nommé de la manière suivante : *Gibberella zeae* f.c. *Fusarium graminearum* (f.c. = forme conidienne)

La double nomenclature enlève toute ambiguïté.

Le genre *Nectria* a plusieurs anamorphes et le genre *Fusarium* a plusieurs téléomorphes.

1.4. Les principaux *Fusarium* des céréales en France

En 2001, Ioos du LNPV (Laboratoire National de la Protection des Végétaux) de Nancy classe les *Fusarium* pathogènes sur céréales en trois groupes :

- TROIS espèces très pathogènes et dites « à trichothécènes » : *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. crookwellense* (moins fréquent en France). Ce sont les principaux producteurs de trichothécènes de type B (cf. 2^{ème} partie).
- DEUX espèces moins pathogènes et « à mycotoxines » : *F. avenaceum*, *F. poae*.

- HUIT espèces secondaires : *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. intricans*, *F. moniliforme*, *F. subglutinans*, *F. heterosporum*. Elles s'installent sur les épis en parasites de faiblesse ou en saprophytes (Ioos, 2001).

Il existe également *Microdochium nivale* autrefois appelé *Fusarium nivale*. Il a été exclu du genre *Fusarium* dans les années 80. Cette espèce est responsable de fusarioses importantes et provoque les mêmes symptômes sur céréales que les autres *Fusarium*, c'est pourquoi les *Microdochium nivale* sont communément cités dans les publications avec les *Fusarium*, même s'ils ne produisent pas de mycotoxines (Ioos, 2001). Les *M. nivale* sont classés en deux sous-variétés : *M. nivale* var. *nivale* et *M. nivale* var. *majus* (Nicholson *et al.*, 1996).

Les différents *Fusarium* s'attaquent préférentiellement à une culture céréalière. Ainsi *Fusarium moniliforme* se développera principalement sur des cultures de maïs, alors que *Fusarium graminearum* se développera sur orge, blé ou maïs (tableau 2).

Tableau 2 : Les *Fusarium* pathogènes primaires sur orge, blé, maïs en France
(Site Internet n°1)

		Les céréales touchées		
		Orge	Blé	Maïs
Les <i>Fusarium</i> pathogènes primaires	<i>F. culmorum</i>	+	+	Rarement
	<i>F. graminearum</i>	+	+	+
	<i>F. avenaceum</i>	+	+	
	<i>F. poae</i>	+	+	
	<i>F. tricinctum</i>	+		
	<i>F. moniliforme</i>			+
	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>	+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i>	+		
	<i>F. subglutinans</i>			+
	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>	+	+	

2. Taxonomie des *Fusarium*

Historique

La taxonomie des *Fusarium* a longtemps été confuse et soumise à controverse, (Messiaen et Cassini, 1968) et les *Fusarium* ont fait l'objet de nombreuses tentatives de classification aux cours du 20^{ème} siècle (figure 1).

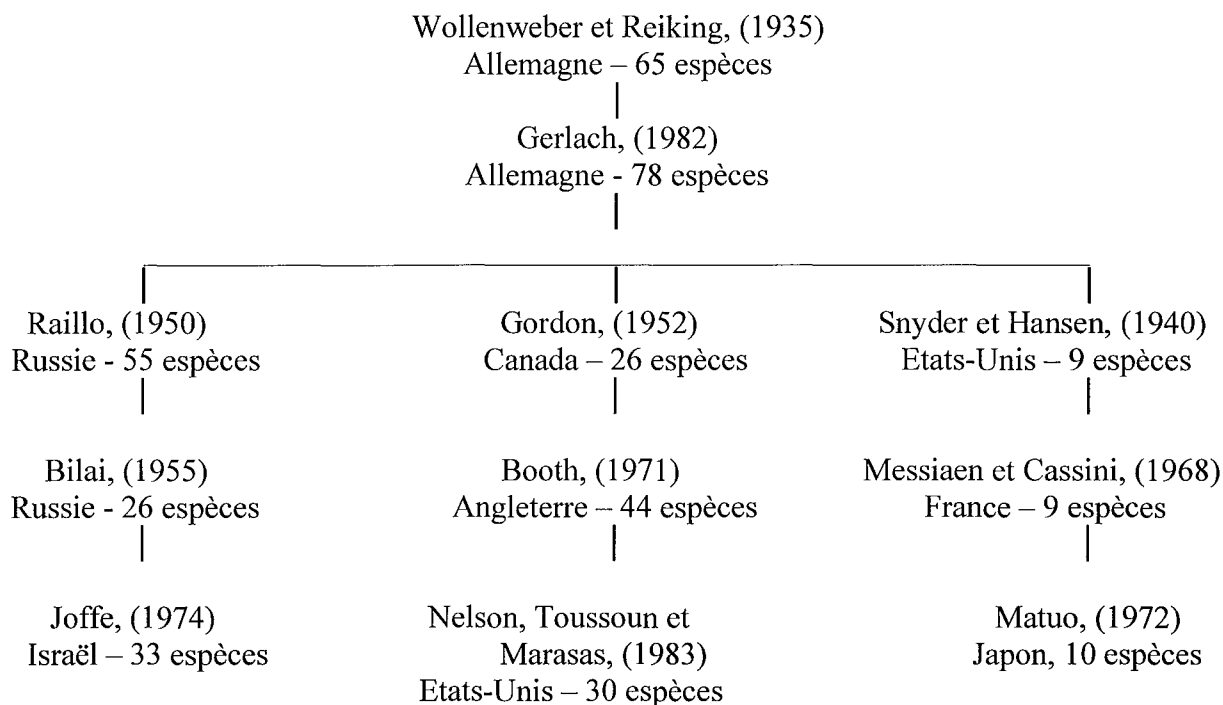


Figure 1 : Les principaux systèmes taxonomiques du genre *Fusarium* (d'après Nelson, 1991)

La taxonomie des *Fusarium* débute par la publication du système de classification de Wollenweber et Reiking en 1935. Ils définirent 16 sections et 65 espèces (Wollenweber et Reiking, 1935). La séparation en section reposait sur des caractères morphologiques assez simples, mais la différenciation des espèces à l'intérieur des sections étaient moins aisée. En effet, elle reposait sur des caractères culturels sujets à variations donc aléatoires. Finalement, cette classification ne fut pas reconnue par la suite.

En 1940, Snyder et Hansen proposèrent de regrouper plusieurs sections en une même espèce, mais cette modification fut l'objet de controverse de par les études réalisées par la suite.

Le système de Nelson, Toussoun et Marasas développé en 1983 est aujourd'hui le plus couramment utilisé. Il reprend certains éléments taxonomiques des systèmes précédents (tableau 3). C'est ainsi qu'en adéquation avec les recherches qu'ils ont effectuées, Nelson *et al.*, (1983) ont pu proposer une nouvelle clé d'identification.

Tableau 3 : Sections et espèces de *Fusarium* suivant les principaux systèmes taxonomiques.

Sections de Wollenberg et Reiking (1935)	Espèces de Snyder et Hansen (1940)	Espèces de Messiaen et Cassini (1968)	Système de Nelson <i>et al.</i> (1983)	
<i>Submicrocera</i>			Sections	Espèces
<i>Pseudomicrocera</i>				
<i>Macroconia</i>	<i>F. epispaeria</i>	<i>F. epispaeria</i> var <i>gigas</i>		
<i>Eupionnotes</i>		<i>F. epispaeria</i> <i>F. epispaeria</i> var <i>dimerum</i>	<i>Eupionnotes</i>	<i>F. aquaeductuum</i> <i>F. merismoïdes</i> <i>F. dimerum</i>
<i>Spicarioïdes</i>	<i>F. rigidiscula</i>	<i>F. rigidisculum</i>	<i>Spicarioïdes</i>	<i>F. decemcellular</i>
<i>Arachnites</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. nivale</i>	<i>Arachnites</i>	<i>F. nivale</i> ► <i>M. nivale</i>
<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. tricinctum</i> <i>F. poae</i> <i>F. sporotrichioïdes</i> <i>F. chlamydosporum</i>
<i>Roseum</i>	<i>F. roseum</i>	<i>F. roseum</i> var <i>avenaceum</i> <i>F. roseum</i> var <i>arthrosporioïdes</i>	<i>Roseum</i>	<i>F. avenaceum</i> (dont <i>F. arthrosporioïdes</i>) <i>F. graminum</i>
<i>Arthrosporiella</i>			<i>Arthrosporiella</i>	<i>F. semitectum</i> <i>F. camptoceras</i>
<i>Gibbosum</i>		<i>F. roseum</i> var <i>gibbosum</i>	<i>Gibbosum</i>	<i>F. equiseti</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. longipes</i>
<i>Discolor</i>		<i>F. roseum</i> var <i>sambucinum</i> <i>F. roseum</i> var <i>graminearum</i> <i>F. roseum</i> var <i>culmorum</i>	<i>Discolor</i>	<i>F. heterosporum</i> <i>F. retuclatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>
<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i> <i>F. udum</i>
<i>Liseola</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. moniliforme</i> <i>F. moniliforme</i> var <i>subglutinans</i>	<i>Liseola</i>	<i>F. moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. anthophilum</i>
<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Martiella</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	<i>Martiella</i>	<i>F. solani</i>
<i>Ventricosum</i>			<i>Ventricosum</i>	

Actuellement, le développement des techniques de biologie moléculaire permet de préciser des connections, des phylogénies entre les sections et espèces de *Fusarium* qui étaient inconnues jusqu'alors (Leslie *et al.*, 2001).

Le paragraphe suivant est illustratif et présente des fiches décrivant certains *Fusarium* notamment les plus étudiés actuellement même si tous les pathogènes primaires n'y figurent pas. Les caractéristiques morphologiques des *Fusarium* notamment sur culture en boîte de Pétri y sont présentées. Ce paragraphe fait également état des caractéristiques des parties reproductrices des *Fusarium*, caractères distinctifs qui sont à la base de la classification des *Fusarium* actuellement, ceci sous forme de figure.

3. Fiches d'identification de quelques *Fusarium* rencontrés sur céréales

3.1. *FUSARIUM CULMORUM*

Pas de forme parfaite connue.



◀ Photographie 2 : *F. culmorum*
(Site Internet n°2), (x0.5)



◀ Photographie 3 : Gros plan de *F. culmorum*. Mycélium lâche avec sporodochie abondamment orange et rouge. Développement rapide.
(Site Internet n°2), (x0.5)

Le thalle est à croissance rapide, d'abord blanc à jaunâtre ou rose puis ocracé à rouge brunâtre avec un revers rouge à pourpre (photographies 2 et 3). Les microconidies sont absentes. Les phialides sont courtes et larges formées sur le mycélium aérien ou groupées en sporodochies. Les macroconidies sont fusiformes, courbes, septées, à cellule apicale courte et pointue. Les chlamydospores sont intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies, subglobuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (Botton *et al.*, 1985), (figure 2).

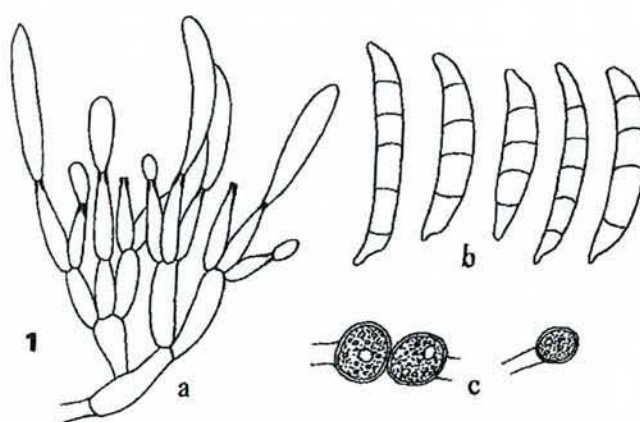
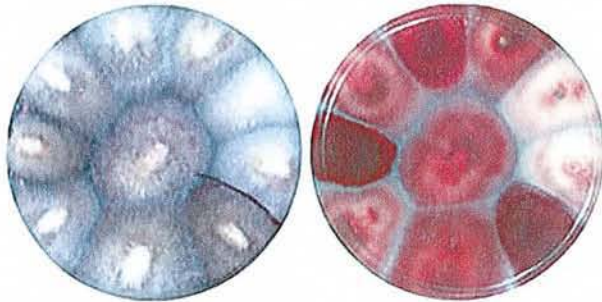


Figure 2 : Caractéristiques de *Fusarium culmorum* (Botton *et al.*, 1985), (x750).

1- *Fusarium culmorum* : a- macrophialides et macroconidies ; b- macroconidies ; c- chlamydospores

3.2. *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Forme parfaite: *GIBBERELLA ZEAE*



Photographie 4 :

Vue de dessous et de dessus de *F. graminearum* qui se développe à partir de grain de blé (Site Internet n°2), (x0.5)



Photographie 5 : Gros plan de *F. graminearum*. Généralement mycélium rouge, parfois avec teinte jaune. La sporodochie n'est pas toujours bien développée, et principalement ou exclusivement rouge. (Site Internet n°2), (x0.5)

Le thalle est rose grisâtre ou rouge à pourpre devenant brun vineux, floconneux (photographies 4 et 5). Il n'y a pas de microconidies. Les phialides peuvent s'agréger en sporodochies. Les macroconidies sont fusiformes, courbes, septées, à cellule terminale longue et pointue. Les chlamydospores sont intercalaires, globuleuses, hyalines à brun pâle, formées par le mycélium, ou plus rarement dans les macroconidies.

Les périthèces sont formés dans la nature sur un grand nombre de graminées. Les asques sont clavés et octosporés. Les ascospores sont hyalines ou brunes très claires, fusoïdes, triseptées. (Botton *et al.*, 1985), (figure 3).

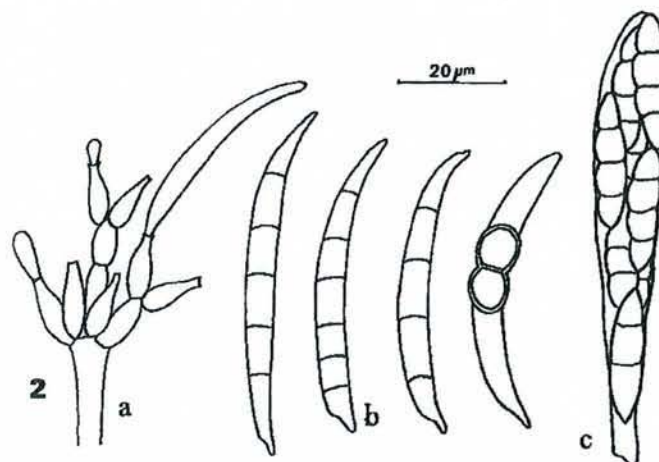


Figure 3 : Caractéristiques de *Fusarium graminearum* (Botton *et al.*, 1985)

2- *Fusarium graminearum* : a- macrophialides et macroconidies ; b- macroconidies ; c- asque octosporé

3.3. *FUSARIUM MONILIFORME*

Forme parfaite: *GIBBERELLA FUJIKUROI*

Synonyme: *F. VERTICILLIOIDES*

Le thalle est blanc à pêche ou rose saumon devenant vinacé à violet, à mycélium aérien dense et floconneux, d'aspect poudreux. Le revers est violet foncé, lilas, vinacé ou crème. Les microphialides tubulées sont formées sur le mycélium aérien. Les microconidies se disposent en chaînes, et sont fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées. Les macrophialides sont groupées par 2-3 sur une ramification courte. Les macroconidies, rares chez certains isolats, sont en fuseau allongé, septées. Il n'y a pas de chlamydospores (figure 4), (Botton *et al.*, 1985).

C'est un parasite important de plusieurs graminées cultivées, d'un très grand nombre de Monocotylédones et de Dicotylédones. *Fusarium moniliforme* est biochimiquement intéressant, en particulier pour la production de gibbérellines.

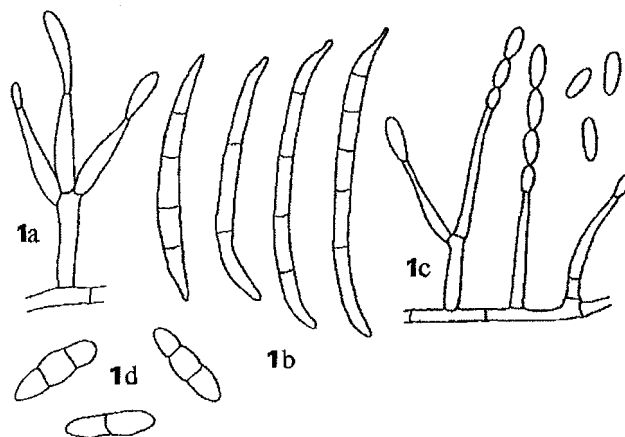


Figure 4 : Caractéristiques de *Fusarium moniliforme* (Botton *et al.*, 1985), (x750)

1 -*Fusarium moniliforme* : 1a -macrophialides ;
1b -macroconidies ; 1c -microphialides et microconidies en chaîne; 1d -ascospores.

3.4. *FUSARIUM OXYSPORUM*

Pas de forme parfaite connue.

Le thalle est à croissance modérée, blanc, pêche, rose saumon à violet. Le revers est pourpre. Les microphialides sont isolées ou sur de courts conidiophores ramifiés, ellipsoïdaux. Les microconidies sont abondantes, variables, ovoïdes. Les macrophialides sont éparses ou groupées en sporodochies.

Les macroconidies sont fusoïdes, plus ou moins courbes, pointues aux deux extrémités, septées. Les chlamydospores sont terminales ou intercalaires, hyalines, subglobuleuses, présentes dans le mycélium et dans les conidies (figure 5), (Botton *et al.*, 1985).

C'est un saprophyte tellurique et pathogène pour de nombreuses plantes cultivées.

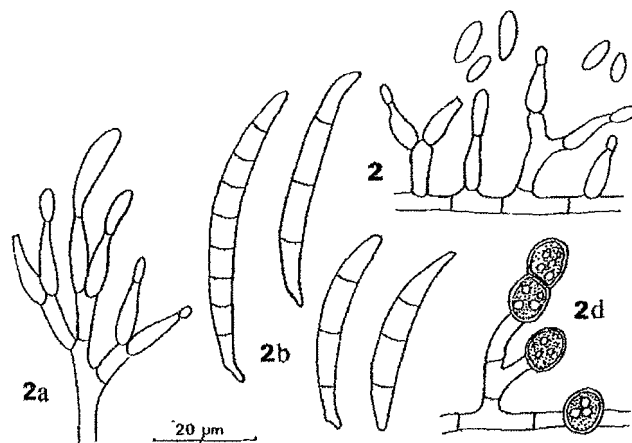


Figure 5 : Caractéristiques de *Fusarium oxysporum* (Botton *et al.*, 1985).

2 -*Fusarium oxysporum* : 2a –macrophialides ; 2b -macroconidies ; 2c -microphialides et microconidies 2d- chlamydospores

3.5. *FUSARIUM AVENACEUM*

Pas de forme parfaite connue.



◀ Photographie 6 : *F. avenaceum* (Site Internet n°2), (x0.5)



◀ Photographie 7 : Gros plan de *F. avenaceum*. Mycélium blanc dense donnant à la culture l'apparence d'un tampon d'ouate. De revers, il a souvent une bordure blanche autour de la colonie. (Site Internet n°2), (x0.5)

Des amas de macronidies roses saumon peuvent être observés dans le mycélium. Les spores sont effilées, longues et arquées et possèdent jusqu'à 7 cloisons. Elles mesurent 30-80 μ de longueur et ont moins de 3 μ de largeur (Champion, 1997).

4. Détermination d'un *Fusarium*

4.1. Introduction

Actuellement, les principales techniques d'identification de *Fusarium* sont basées sur l'isolement à partir de grains et la mise en culture du microorganisme sur des milieux sélectifs dans le but de visualiser les caractères phénotypiques qui permettent son identification (Le Blou'ch *et al.*, 2000). Ces techniques sont longues, coûteuses, nécessitent un personnel spécialisé et sont peu reproductibles. De plus, elles ne permettent pas de détecter la présence de ces microorganismes lorsqu'ils sont morts.

En se plaçant au niveau du génome, les techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction), permettent d'échapper aux variations phénotypiques dues aux variations des conditions de culture et aux dégénérescences. En effet, l'expression des gènes est variable selon le milieu de culture et une culture peut avoir des éléments de détermination peu fiables notamment en cas de polycontamination. Le génome, quant à lui, subit très peu de variation.

La mise en place de cette technique de PCR doit cependant se faire en se basant sur l'identification visuelle classique pour notamment sélectionner la moisissure parmi d'autres avant de réaliser des analyses plus poussées. Cependant, la PCR permet de détecter les microorganismes même morts à partir de leur ADN et les analyses peuvent de plus s'effectuer *à posteriori* sur les produits finis comme la bière ou les aliments du petit déjeuner.

4.2. L'identification des *Fusarium* sur milieux gélosés

Pour réaliser l'identification des champignons, il faut les isoler dans un premier temps sur un milieu suffisamment sélectif, à partir de plantes ou de grains. Dans un second temps, les souches sont repiquées sur un ou plusieurs milieux sélectifs (Site Internet n°3 ; Ioos, 2001).

L'identification des *Fusarium* comme pour beaucoup de champignons, nécessite une certaine expérience car les descriptions qui sont données s'appuient souvent sur des observations faites à partir de cultures typiques. Dans la pratique, de nombreuses cultures atypiques peuvent se présenter en raison notamment de la présence d'espèces de *Fusarium* en mélange, de champignons saprophytes sur la même graine, de la présence de bactéries, etc. (Champion, 1997).

4.2.1. L'isolement

Différentes stratégies sont envisageables pour l'isolement de *Fusarium* à partir de grains de céréales.

La méthode Geves consiste à déposer des grains, préalablement désinfectés en surface, sur milieu gélosé. Ceci permet de déterminer la mycoflore interne du grain.

La méthode, suivant la norme AFNOR n°V-18-301 (Site Internet n°4), consiste à broyer les grains ou les épis puis à étaler des dilutions de ces broyâts sur des milieux gélosés. Les colonies se développent à partir de spores ou de fragments de mycélium issus du broyage. L'inconvénient majeur de cette technique est que les espèces qui sporulent beaucoup sont largement favorisées puisque chaque spore présente dans la suspension au cours du broyage peut donner naissance à une colonie (Le Blou'ch *et al.*, 2000).

Au fil des années, plusieurs milieux sélectifs ont été utilisés. D'une façon générale, le milieu doit contenir un anti-bactérien et un fongicide sélectif qui permettent d'inhiber la croissance des autres champignons. Ce fongicide doit en outre permettre la croissance de toutes les espèces du genre *Fusarium*. Jusque dans le milieu des années 80, un milieu contenant de la streptomycine comme antibiotique et du PCNB (Pentachloronitrobenzène) comme fongicide a été largement utilisé. Ce milieu a ensuite été abandonné du fait du fort potentiel cancérigène du PCNB. De plus, bien qu'il soit fortement inhibiteur des autres champignons, il ne permet pas d'obtenir des colonies distinctes. D'autres milieux contenant du dichloran comme fongicide ont alors été mis au point. Le milieu le plus utilisé aujourd'hui est le DCPA (Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar) développé par Andrews et Pitt (Andrews et Pitt, 1986). Il contient du dichloran et du chloramphénicol comme antibiotique. Il est simple d'utilisation, puisque le chloramphénicol peut être autoclavable, contrairement à la streptomycine. Il permet la sélection de toutes les espèces de *Fusarium* ainsi que celles de quelques hyphomycètes dématiaceae (*Alternaria*, *Drechslera*, *Curvularia*). Il inhibe les *Penicillium*, *Aspergillus* et les *Mucoraceae*. Il permet en outre la formation de colonies distinctes.

4.2.2. L'identification

Au cours des 10 à 15 dernières années, l'identification des moisissures s'est développée autour des principes suivants :

- La culture pour l'examen des caractères microscopiques doit se faire sur des milieux pauvres en éléments nutritifs comme le SNA (Synthetischer Nährstoffärmer Agar).
- Le développement optimal des sporodochies et des macroconidies exige une exposition au moins à la lumière fluorescente, mais de préférence aussi aux UV proches.
- La gélose glucosée à la pomme de terre (PDA : Potato Dextrose Agar ou milieu gélosé à base de pomme de terre), largement utilisée dans le passé dans des études de micromorphologie, est utile seulement pour étudier les caractères cultureux et ne devrait pas servir pour des études de micromorphologie ou pour de la conservation de souches. La haute teneur en sucres dans ces milieux encourage la mutation chez plusieurs espèces de *Fusarium* (Site Internet n°3 ; Ioos, 2001).

Certains auteurs comme Nelson *et al.* préconisent de transférer les cultures en n'utilisant qu'une conidie (Nelson *et al.*, 1983). D'autres estiment que ce n'est pas nécessaire dans la plupart des cas (Site Internet n°3 ; Ioos, 2001).

L'identification des cultures de *Fusarium* fait appel à l'observation attentive et au sens du détail. Les ouvrages d'identification qui sont disponibles offrent des clés synoptiques (Nelson *et al.*, 1983), des clés dichotomiques (Booth, 1971). La plus utilisée à l'heure actuelle est la clé synoptique de Nelson *et al.*.

4.2.2.1. Caractères observés sur PDA

La vitesse de croissance : elle sert principalement à différencier les espèces à croissance lente (*Fusarium oxysporum*) des espèces à croissance rapide (*Fusarium culmorum*).

Le mycélium aérien : il est constitué d'hyphes qui croissent au-dessus de la surface du milieu gélosé, il prend une forme bombée et un aspect visqueux ou cotonneux. La couleur du mycélium aérien est parfois spectaculaire chez certaines cultures.

L'envers des colonies : sa couleur peut aussi être variable chez une espèce donnée. Le pourpre peut être caractéristique chez certaines espèces de la section *Liseola*. L'absence de coloration rouge est aussi un critère d'identification pour certaines autres espèces.

4.2.2.2. Caractères observés sur SNA

Les nappes de conidies : la plupart des espèces produisent des nappes de conidies de couleur crème, jaune ou orange. *F. crookwellense* est facilement reconnaissable à ses nappes de conidies brun rougeâtre ou rouge brique.

Aspect des macroconidies : ce caractère est primordial pour une identification appropriée et demande une certaine habitude. Il est important d'observer de vraies macroconidies produites en sporodochies. La définition des différentes catégories de macroconidies est basée sur le degré de courbure et sur le rapport longueur/largeur.

Section la plus large de la macroconidie : c'est un caractère primordial pour plusieurs espèces. Pour les macroconidies de *F. culmorum* et *F. sambucinum*, la partie la plus large se retrouve au-dessus de la partie médiane de la spore.

Dimension des macroconidies : la dimension des macroconidies produites en sporodochies est considérée sans valeur dans plusieurs systèmes taxonomiques. Mais, cette donnée est utile pour différencier les espèces à macroconidies habituellement courtes, longues ou larges. Il est important d'utiliser la dimension moyenne.

Cloisonnement des macroconidies : la plupart des espèces produisent en sporodochies des macroconidies de 3 à 7 cloisons. Le fait qu'une culture produise des macroconidies à 1 cloison ou à plus de 8 cloisons peut constituer une information très importante.

Cellule basale : la cellule à la base de plusieurs macroconidies de *Fusarium* est souvent dite «pédiforme». Elle se termine par une papille séparée du reste de la cellule par une encoche. Chez certains isolats de *F. equiseti* ou de *F. longipes*, cette protubérance est longue de plus de 2 µm.

Longueur de la cellule apicale : la longueur relative de la cellule apicale par rapport à la cellule voisine est un caractère utile pour reconnaître certaines espèces notamment *F. culmorum* et *F. sambucinum* qui ont une cellule apicale plus courte que l'avant dernière.

Forme de la cellule apicale: elle est souvent difficile à saisir. Chez la plupart des espèces, la cellule apicale est dite conique. Pour être considérée comme busquée, elle doit être manifestement arquée.

Abondance relative des microconidies dans le mycélium aérien : quelques espèces de *Fusarium* produisent dans le mycélium aérien des conidies morphologiquement différentes, plus petites et à cloisons moins nombreuses que les macroconidies produites en sporodochies. Elles sont appelées microconidies. Elles se rencontrent notamment chez *F. moniliforme*.

Microconidies en fausses têtes ou en chaînes : la plupart des espèces de *Fusarium* produisent, à l'extrémité d'un conidiophore des microconidies sur des têtes visqueuses (*F. poae*), quelques autres les produisent en chaîne (*F. moniliforme*).

La forme des microconidies : la présence de microconidies globuleuses est particulièrement significative pour distinguer *F. sporotrichioides* de *F. chlamydosporum* et pour reconnaître *F. poae*. Celles «citriformes» sont produites en abondance seulement par *F. tricinctum*. L'interprétation des formes de conidies fusiformes est plus compliquée.

Les chlamydospores : ce sont des spores de résistance. Elles peuvent être produites dans la gélose, dans le mycélium aérien ou dans les macroconidies et se retrouvent solitaires, en paires, en chaînes ou en bouquets. Plusieurs espèces sont très lentes à produire des chlamydospores et parfois n'en produisent que sur milieux spécifiques. Certaines espèces comme *F. avenaceum* n'en produisent jamais (Nelson et al., 1983 ; Site Internet n°3 ; Ios, 2001).

4.3. L'identification par des méthodes de biologie moléculaire

Plusieurs méthodes sont envisageables pour identifier les *Fusarium* par biologie moléculaire (Mentré et Montgermont, 2003).

Il y a tout d'abord la technique de PCR-RFLP. Elle consiste à amplifier la même portion d'ADN pour toutes les espèces, puis à digérer les amplifiats par des enzymes de restriction. Du fait d'un polymorphisme de séquences, les sites de coupures enzymatiques sont variables d'une espèce à l'autre. Le polymorphisme de longueur est révélé sur gel pour chaque espèce (Edel *et al.*, 1996). Une technique dérivée consiste à amplifier, là aussi, la même portion d'ADN pour toutes les espèces, puis à séquencer les amplifiats. La séquence est variable d'une espèce à l'autre (Hennequin *et al.*, 1999). Une autre technique consiste à amplifier l'ADN avec des amorces établies au hasard : la RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction), (Schilling *et al.*, 1996). Elle est essentiellement utilisée pour mettre au point des amorces (Parry et Nicholson, 1996 ; Nicholson *et al.*, 1996). Les chercheurs travaillent actuellement par PCR avec des couples d'amorces spécifiques de chaque espèce. Par la suite, il sera possible, en mettant au point des sondes fluorescentes spécifiques de la séquence du fragment amplifié, de quantifier l'ADN présent grâce à un thermocycleur qui quantifie l'ADN amplifié en temps réel (Lightcycler, Schnerr *et al.*, 2001).

5. Cycle de développement : cas de la fusariose des céréales

5.1. Introduction

Les *Fusarium* survivent sur les débris de culture contaminés sous forme de spores. Pour qu'il y ait infection de l'épi, il faut que les spores soient transportées du sol jusqu'aux épis. Si l'humidité est suffisamment élevée, les spores présentes sur les anthères peuvent germer. Le champignon colonise d'abord ce tissu puis progresse dans la fleur où le grain est en formation. Par la suite, le champignon peut se propager aux fleurs et épillets voisins (figure 6). Les infections qui surviennent pendant cette période causent les dommages les plus sévères tels la stérilité florale, la réduction du nombre et de la grosseur des grains. Les températures après l'infection vont aussi jouer un rôle important dans le développement de la maladie. En général, un temps chaud et humide favorise le développement du *F. graminearum*, l'espèce la plus virulente.

Une infection peut survenir plus tardivement, lorsque les grains sont déjà bien formés, ce qui ne réduit pas les rendements de façon significative.

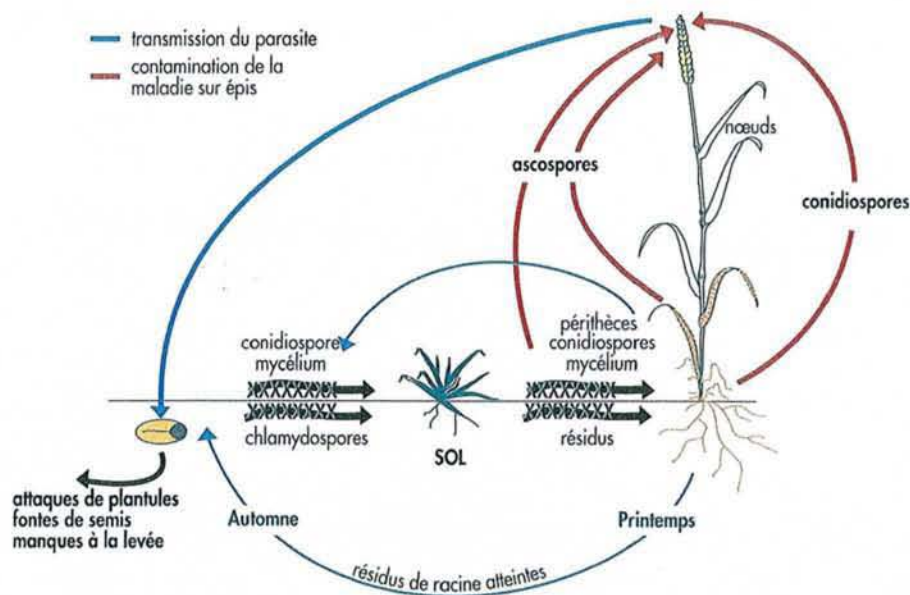


Figure 6 : La contamination (Fusariose des blés © ITCF. Décembre 1999)
(ITCF, Institut Technique des Céréales et des Fourrages, a été rebaptisé Arvalis Institut du végétal)

5.2. Sources de contamination

La contamination se fait par les propagules qui se trouvent sur le sol, dans les débris végétaux où le champignon se conserve. Toutes les espèces de *Fusarium* sont capables de survivre en saprophytes sur les débris végétaux (Parry *et al.*, 1994). La principale source d'inoculum vient donc des débris de céréales qui donnent aux moisissures un site d'abondante sporulation durant la saison de croissance végétale suivante.

La contamination peut se faire par les conidies germées et tombées sur le sol, par des fragments de mycélium ou par les spores de résistance du champignon : les chlamydospores. Dans le cas de formes sexuées de *Fusarium* comme *Giberrella zeae* f.c. *Fusarium graminearum*, les ascospores représentent également une importante source de contamination des épis.

5.3. La dissémination

Les spores sont principalement dispersées par temps de pluie par les éclaboussures qui projettent les conidies ou les ascospores sur les plants de céréales et leurs épis. Les hauteurs et distances maximales de dispersion sont pour *F. culmorum* et *F. poae* de 60 cm et 70 cm, respectivement (Horberg, 2002).

Cependant lorsque les ascospores sont entraînées par le vent, elles peuvent être dispersées sur de plus longues distances. Un élément contaminant peut être détecté à plusieurs kilomètres de distance de sa source de production (Bergstrom et Shields, 2002 ; Fracl *et al.*, 1999).

D'une manière générale, les ascospores semblent être les éléments contaminants les plus prolifiques dans la fusariose des épis ce qui explique que les *Fusarium graminearum*, dont la forme sexuée est connue, soient les plus virulents dans la fusariose des épis.

Les agents contaminants peuvent également être dispersés par les insectes. Ces derniers constituent une source de dissémination qui peut être très importante, surtout dans les pays chauds.

Les insectes et larves d'insectes endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration de l'inoculum à l'intérieur de la graine. Plusieurs types d'insectes attaquent la plante et prédisposent celle-ci à une infection par des champignons avant que l'épi ne se forme. C'est le cas des pucerons et des asticots (Widstrom, 1992). Les insectes (asticot, larves de racine, coléoptère) jouent un rôle important dans l'envahissement du maïs par *F. moniliforme*.

5.4. L'infection et la colonisation des épis

Une fois que les inoculi de *Fusarium* ont été dispersés sur les épis, plusieurs facteurs permettent le développement de la maladie.

Le développement des anthères semble être la période de plus grande sensibilité des épis de céréales à l'infection par *Fusarium*.

Arthur (1891) était le premier à affirmer que la fusariose des épis était une infection de la fleur en évoquant le fait que les spores disséminées par le vent se logent dans les parties internes des fleurs.

L'hypothèse d'Arthur fut confirmée plus tard par Atanasoff (1920). Celui-ci inocula des épis de blé à des stades de développements différents et démontra que la maladie était plus sévère quand l'inoculation se faisait à la floraison.

Des études similaires de Dickson *et al.* (1921) révélèrent que l'infection du blé par *F. avenaceum* et *F. culmorum* était plus sévère lorsque l'inoculation se faisait à la floraison.

D'autres études confirment l'augmentation de l'infection des épis de céréales lors du développement des anthères (Pugh *et al.*, 1933 ; Andersen, 1948 ; Strange et Smith, 1971).

De tels résultats laissent supposés que les anthères sont le site initial de l'infection. Ceci fut confirmé par les études de Dickson *et al.* (1921), qui remarquèrent que l'infection initiale se faisait *via* les anthères libres.

Cependant, Tu (1930) suggéra plus tard que l'infection se faisait aussi par les glumes. En effet, il réussit une infection des épis quand les anthères étaient absentes.

Pourtant, d'après des études histologiques réalisées par Pugh *et al.*, 1933, l'infection initiale se fait principalement par les anthères et non pas par les glumes : après avoir inoculé des épis de deux cultivars de blé avec *F. graminearum*, ces chercheurs observèrent que l'infection commence fréquemment sur les anthères avant de gagner les autres parties de l'épi notamment les ovaires.

Pugh *et al.*, 1933 montrèrent également que si l'entrée dans les tissus se faisait rapidement, *F. graminearum* se développait à la fois au niveau intra et intercellulaire et dans le grain tout entier.

D'autres preuves de l'infection initiale des anthères furent apportées par Mackay et Loughmane (1945), et plus tard par Strange et Smith (1971). Ils montrèrent que l'émasculation des épis de blé diminuait significativement l'incidence des épis infectés avec *F. graminearum*. Ces découvertes et l'observation de l'extension de la colonisation des épis de blé depuis les anthères par Andersen (1948), aboutirent à émettre l'hypothèse que des stimulants de la croissance fongique étaient présents sur ces pièces florales.

Ikeda *et al.*, (1955) trouvèrent des teneurs élevées en glucose et en fructose sur les glumes de blé et d'orge. Cependant, les effets de ces composés ne semblent pas modifier considérablement la croissance des *Fusarium*.

Deux autres substances furent isolées par Strange *et al.* (1978), sur des extraits d'anthères de blé. Ce sont la choline chlorure et la bétaine hydrochlorure. Strange et Smith (1978) évaluèrent alors l'effet de ces molécules sur la germination et la croissance des conidies de *F. avenaceum*, *F. culmorum* et *F. graminearum*. Ils démontrèrent que ces produits favorisaient l'extension des hyphes mycéliens mais pas la germination des spores. Bien que ces deux composants puissent être isolés d'autres parties de la plante telles les glumes, le rachis ou le grain, ils sont présents à des concentrations plus élevées dans les anthères (Pearce *et al.*, 1976).

5.5. Le climat propice aux infections

L'incidence et la sévérité de la fusariose des épis durant la saison de croissance sont influencées à la fois par l'inoculum mais aussi par les conditions météorologiques (Andersen, 1948).

Suite à l'inoculation d'épis de blé avec *F. graminearum*, les premiers symptômes d'infection sont observés après six jours dans des conditions humides (Atanasoff, 1920). Quand les conditions deviennent sèches, les symptômes ne sont observés qu'à la faveur d'une première pluie ou d'une forte rosée. Ainsi, une rapide progression du développement de la fusariose des épis peut s'enregistrer après 3-4 jours de temps chaud et humide (Dickson *et al.*, 1921). Quand les épis de blé sont inoculés avec *F. graminearum* à 25°C, et exposés pendant 36 à 48h avec une humidité constante, respectivement 18% et 77% des épis apparaissent infectés (Pugh *et al.*, 1933). L'humidité et la température influent également sur la quantité d'épis infectés au niveau d'une parcelle : il faut, par exemple, 20°C et 60h d'humidité constante pour obtenir 30% d'épis infectés. Cependant, lorsque les températures sont trop faibles, l'infection est très limitée ; c'est le cas pour des températures de l'ordre de 15°C.

Le cas de *Fusarium graminearum* :

L'infection par *F. graminearum* apparaît fréquemment à 25°C et peu d'épis développent des symptômes sans une période d'humidité d'au moins 24h après l'inoculation (Andersen, 1948). A 20°C, la fréquence d'infection est moyenne, mais seulement après une exposition à l'humidité d'au moins 60-72h. A 15°C, l'infection des épis est négligeable. Ainsi, l'infection des épis de céréales par *Fusarium graminearum* est optimale après 24h à 25°C et 100% d'humidité relative.

Les autres *Fusarium* :

Des études réalisées avec *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* et *M. nivale* ont également montré que comme pour *F. graminearum*, des températures au-dessus de 15°C et une période d'humidité d'au moins 24h sont requises pour une infection optimale des épis de blé d'hiver (P. Jenkinson, données non publiées).

De façon générale, les *Fusarium* se développent sur épis à la faveur d'une forte humidité à partir de l'épiaison (au moins 48 heures à 100% d'humidité).

Les *Fusarium roseum* préfèrent des températures assez chaudes, au-dessus de 20°C et les *M. nivale* se développent à des températures plutôt inférieures à 20°C.

Lors des années humides favorables aux fusarioses, les parcelles de blés implantées après une culture de maïs, sorgho, voire céréales à paille, sont les plus touchées, en particulier si les résidus de ces précédents n'ont pas été enfouis.

Le blé dur est plus sensible que le blé tendre.

Le développement de la maladie, depuis la formation des périthèces sur les résidus de maïs jusqu'à la production éventuelle de toxines pendant la maturation des grains, dépend de nombreux paramètres climatiques (tableau 4).

Beaucoup de publications confirment que les ascospores sont transportées par les courants d'air chaud après une pluie, directement des cannes de maïs aux épis du blé. En Bavière, un plan de surveillance a été mis en œuvre depuis 1989 concernant la fusariose. Le modèle utilisé exige une précipitation d'au moins 4 millimètres entre les stades AS 39 (dernière feuille sortie) à GS 69 (fin floraison), suivie d'un jour avec une température moyenne supérieure à 18°C, ou de plusieurs jours consécutifs avec au moins 16°C.

Les épis de blé sont très sensibles aux contaminations pendant les stades de croissance GS 55 (mi-épiaison) à GS 69 (fin floraison). Pendant cette période, les ascospores peuvent infecter les épis de blé, si pendant deux jours consécutifs, la température moyenne est d'au moins 17°C avec 2 mm de pluie par jour. Ces conditions climatiques favorisent la dissémination et la contamination des ascospores. En Bavière, ces conditions correspondent à un temps chaud et ensoleillé avec quelques orages. Mais, il y a aussi les contaminations par les conidies en conditions humides et froides. Quand les ascospores sont déposées sur les feuilles supérieures et que quelques jours de pluie suivent immédiatement, une deuxième génération de conidies se développe et elles sont projetées par les éclaboussures de pluies vers les fleurs de blé. Cette multiplication de spores sur les parties supérieures du blé se produit sans aucun symptôme évident (Massé *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Conditions climatiques favorables à la fusariose des épis (*Gibberella zeae*),
(d'après Massé *et al.*, 2002)

<p>1) Dissémination des ascospores</p> <p>-aux stades GS 39/41-61 , au moins 1 pluie ≥ 4 mm -puis 1 jour avec température moyenne $> 18^{\circ}\text{C}$ ou plusieurs jours consécutifs avec température $\geq 16^{\circ}\text{C}$</p>
<p>2a) Contamination des épis par les ascospores après dissémination par les ascospores -aux stades GS 55/69, 2 jours avec température $\geq 17^{\circ}\text{C}$ et pluie ≥ 2 mm ou</p> <p>2b) Production de macroconidies sur les feuilles supérieures et contamination des épis. Immédiatement après dissémination des ascospores avec pluies ou rosée ≥ 5 jours</p>

5.6. Les symptômes observés

5.6.1. Introduction

La fusariose des céréales se manifeste à différentes étapes de la croissance des végétaux. Comme la figure 7 le présente, l'infection peut se manifester à la levée, à la montaison, sur feuilles dès la montaison, sur le col de l'épi, sur l'épi et sur les grains.

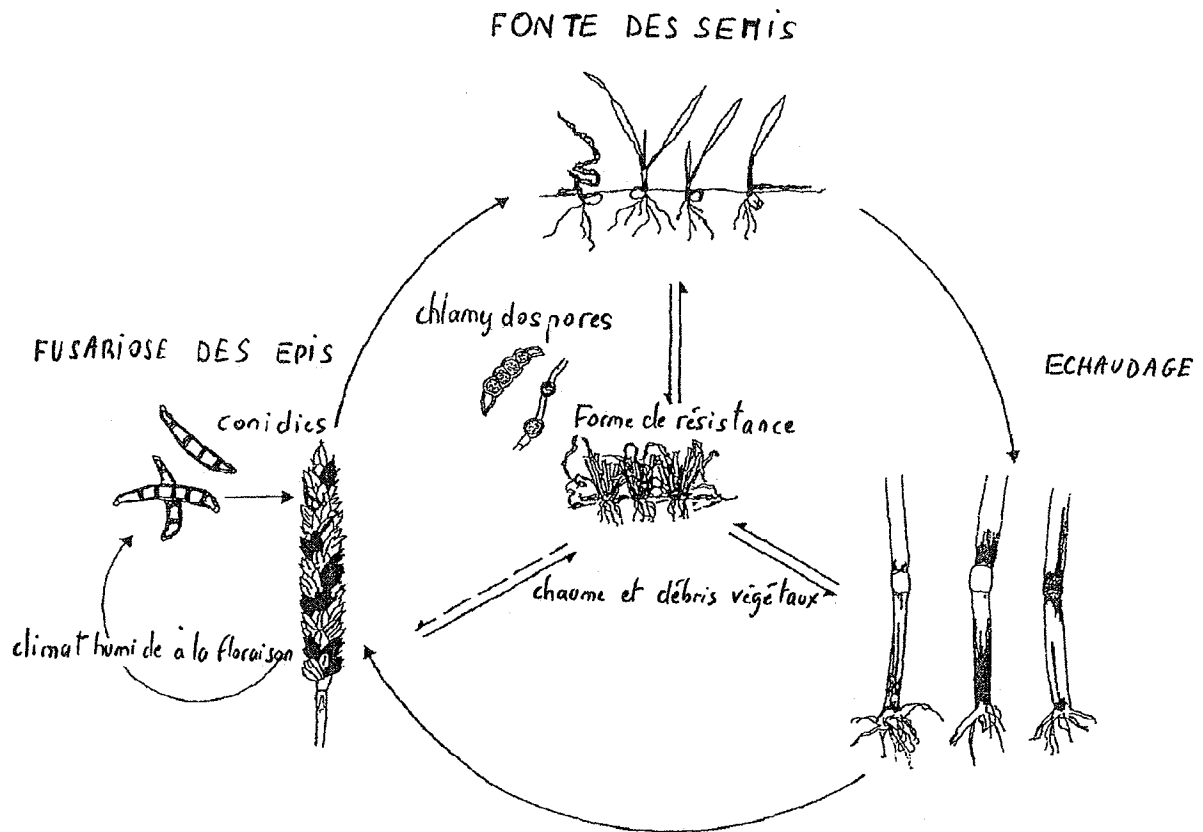


Figure 7 : Cycle général de la fusariose sur céréales à petits grains (d'après Parry *et al.*, 1994)

5.6.2. A la levée

Les pertes à la levée sont importantes avec des semences d'épis fusariés. Les *Fusarium* (*F. roseum* mais aussi *Microdochium nivale*) sont présents dans tout le grain (téguments, réserves et embryon).

Des traitements de semences spécifiques sont indispensables.

5.6.3. Sur tiges à la montaison

A début de la montaison, les attaques de *Fusarium* sur tige sont souvent superficielles.

A la fin de la montaison, le *Fusarium roseum* peut s'installer sur la couronne racinaire (pourriture brune) notamment après des alternances sécheresse-humidité. Ces symptômes entraînent de l'échaudage en fin de cycle.

En période hivernale humide, c'est *Microdochium nivale* qui s'installe à la base du pied et sur les gaines.

5.6.4. Sur feuilles dès la montaison

Microdochium nivale entraîne l'apparition de symptômes dès la fin de la montaison lorsque les conditions sont humides et fraîches. Nous pouvons aussi les observer après floraison.

Ces symptômes se traduisent par l'apparition au départ d'une tache ovale et verdâtre virant au marron et au dessèchement.

5.6.5. Sur le col de l'épi

Un brunissement du col de l'épi peut apparaître dès l'épiaison, avec parfois progression des symptômes sur le rachis en cours de remplissage des grains.

5.6.6. Sur l'épi

Les spores roses de *F. roseum* sont observables sur les épis. Des taches sur les glumes apparaissent également (photographie 8). Il peut s'en suivre un dessèchement de l'épis.



Photographie 8 : *F. roseum* sur épis (x1). (Fusariose des blés© ITCF. Déc. 1999)

5.6.7. Sur grains

Les grains fusariés sont blancs, roses ou en partie noirâtres, d'aspect duveteux, avec une amande souvent dégradée (photographie 9).

En contamination, par *M. nivale*, ces grains n'ont pas de coloration rose. Par contre, une augmentation de la moucheture peut être constatée.

Les pertes de rendement sont directement liées à la proportion de grains fusariés.



Photographie 9 : grains fusariés et non fusariés (x2). (Fusariose des blés© ITCF. Déc. 1999)

6. Conclusion

Les *Fusarium* sont donc des moisissures très répandues notamment sur céréales et maïs.

Les anciennes classifications reposent sur des caractères morphologiques assez simples comme la forme, le nombre de septum des macronidies mais également l'absence ou la présence de micronidies. Cependant ces caractères sont difficiles à observer sur culture. La taxonomie des *Fusarium* est relativement complexe de part le nombre de familles différenciées. Les techniques de biologie moléculaire permettent de nos jours de découvrir des phylogénies jusqu'alors inconnues entre les espèces.

Le cycle de développement de ces champignons est quant à lui assez simple. Il ressort des études réalisées que la dissémination des *Fusarium* est optimale par temps chaud, humide et notamment lors de fortes pluies. Le chapitre suivant sur les fusariotoxines montrera également l'importance de l'humidité et de la température sur la toxinogénèse.

PARTIE II :

Les Fusariotoxines

1. Qu'est-ce qu'une mycotoxine ?

1.1. Introduction

Les mycotoxines sont des composés chimiques non protéiques, de faible poids moléculaire et thermostables donc difficilement détruits par traitements physiques ou chimiques.

Ce sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Le métabolisme primaire est commun à tous les champignons. Il permet la synthèse des glucides, lipides ou protéines. Le métabolisme secondaire diffère du primaire par la nature aléatoire de son activation, par la diversité des composés formés et la spécificité des souches impliquées. Il n'est pas lié à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (modifications du climat, un choc thermique, sécheresse...) et de sa relation avec son hôte. Le métabolisme secondaire peut être spécifique d'une espèce, voire d'un groupe fongique et de ses caractéristiques génétiques. Les mycotoxines seront donc par familles relativement spécifiques des groupes fongiques qui les sécrètent.

Compte tenu de la grande diversité d'espèces de champignons, les molécules qu'ils peuvent produire sont très nombreuses et de nouvelles mycotoxines sont régulièrement découvertes par les spécialistes. Il existe environ 300 mycotoxines produites par environ 30 espèces de champignons.

1.2. Les mycotoxines sur céréales

Parmi les familles de mycotoxines pouvant être présentes dans les céréales, cinq d'entre elles sont particulièrement bien connues. Il s'agit des fumonisines, trichothécènes, zéaralénones, ochratoxines et aflatoxines (tableau 5).

En France, les aflatoxines ne sont pas rencontrées (sauf importations de denrées contaminées) mais par contre l'ochratoxine, la zéaralénone, le DON (déoxynivalénol qui fait partie de la famille des trichothécènes) et des fumonisines sont parfois retrouvées dans les denrées alimentaires.

Principales mycotoxines	Localisation
Fumonisines	Europe
Trichothécènes (DON)	Monde entier
Zéaralénone	Monde entier
Aflatoxine B1	Afrique, Asie
Ochratoxine A	Europe du nord, Balkans

Tableau 5 : Les principales mycotoxines et leur localisation, (Site Internet n°5).

Au moins 25% des grains produits chaque année dans le monde sont contaminés par des mycotoxines (Charmley et Trenholm, 2002).

Ce sont les conditions climatiques qui déterminent en premier lieu l'existence et le développement de tel ou tel champignon sur les céréales et la production de mycotoxines qui lui sont attachées. Les conditions de transport et de stockage sont également importantes.

La toxicité de ces mycotoxines est fonction de la nature et du caractère de la molécule, du risque d'exposition, de la quantité absorbée et de la nature du récepteur de ces mycotoxines chez l'homme et les animaux. Elles peuvent avoir un impact sanitaire et économique certain notamment dans la production de denrées de consommation humaine ou animale. Les

intoxications aiguës sont rares chez l'homme. Ce dernier évite la consommation d'éléments visiblement moisissés et les méthodes de détection s'affinent de plus en plus. Le risque viendrait plutôt d'une intoxication chronique avec de petites doses ingérées quotidiennement (Braly, 2003).

2. Les fusariotoxines

Les moisissures du genre *Fusarium* produisent plusieurs types de mycotoxines regroupées sous le terme de fusariotoxines : la zéaralénone, les fumonisines, les trichothécènes, la moniliformine, la beauvéricine, la fusarine C et l'acide fusarique. Les trois premières sont les plus étudiées actuellement.

Ces toxines contaminent surtout les céréales.

Elles ont des origines métaboliques communes pour certaines (figure 8).

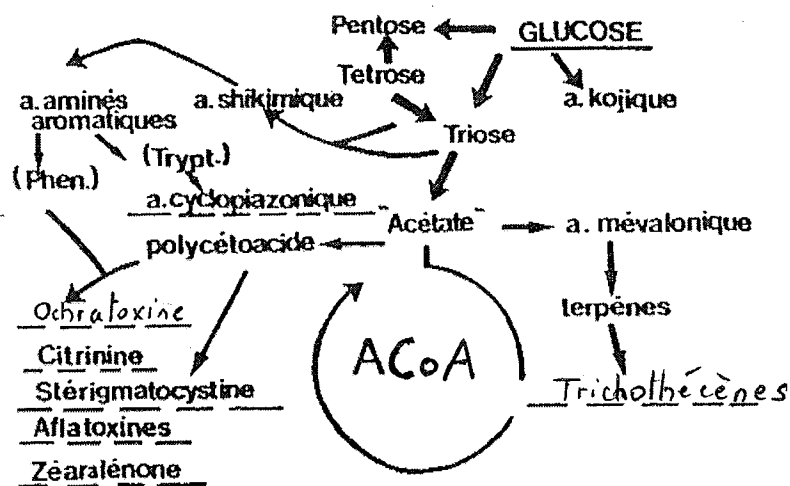


Figure 8 : Origine métabolique de différentes mycotoxines (d'après Cahagnier, 1993).
(AcoA = Acetyl Coenzyme A)

2.1. La zéaralénone (ZEN ou ZEA)

2.1.1. Structure

La zéaralénone est la lactone désaturée à fonction cétone de l'acide résorcyclique (*Zea* : mais ; RAL : Resorcyclic acid lacton ; ène ; one). Elle a un poids moléculaire de 318. Le cycle de la lactone comporte 11 atomes de carbone. La double liaison 1'-2' permet une isométrie cis-trans (figure 9).

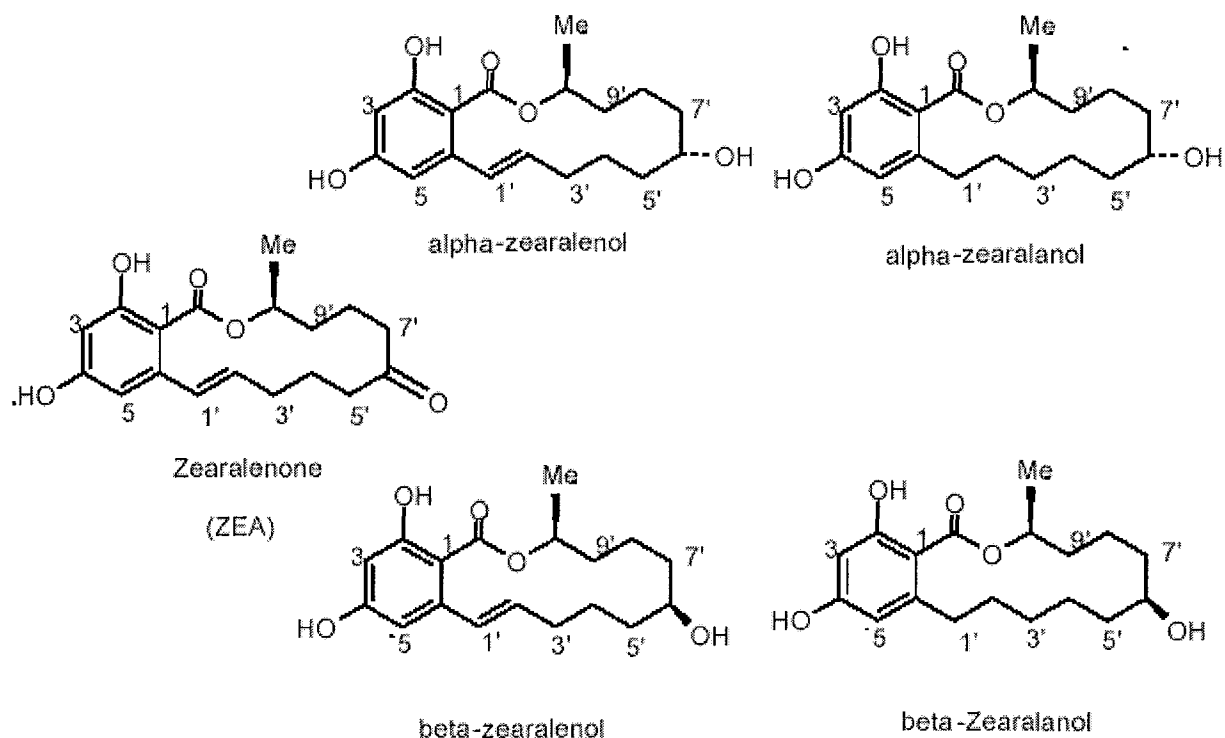


Figure 9 : Structure chimique de la zéaralénone et de ses métabolites (Site Internet n°6).

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

Elle est insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions aqueuses alcalines. Elle est également soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétonitrile, le benzène et les cétones ; mais elle n'est que légèrement soluble dans l'éther de pétrole de sorte que ce solvant ne peut être utilisé pour délipider les extraits. Elle a une fluorescence dans le bleu vert lorsqu'elle est irradiée à 365nm et en vert à 260 nm. Son absorption UV à 274nm est utilisable pour les analyses.

2.1.3. Voie métabolique de synthèse

La zéaralénone provient du métabolisme des polyacétides comme d'autres mycotoxines très nocives telles les aflatoxines (figure 8).

2.1.4. Les *Fusarium* producteurs

La zéaralénone est principalement produite par *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. crookwellense*. La toxine est retrouvée principalement sur le maïs, mais elle est également retrouvée sur d'autres céréales comme le blé, le riz ou le sorgho dans des conditions de température adéquate.

2.1.5. Toxicité

2.1.5.1. Mode d'action

De nombreuses études ont prouvé que la zéaralénone se fixe sur les récepteurs œstrogéniques et induit un effet œstrogène-like. Elle est métabolisée dans plusieurs tissus, mais notamment dans le foie où elle est transformée en deux métabolites : l' α -zéaralénol et le β -zéaralénol. La zéaralénone n'est pas hautement toxique. Néanmoins, l' α -zéaralénol a une meilleure affinité pour les récepteurs aux œstrogènes et induit une toxicité plus forte. La zéaralénone est ensuite métabolisée par glucuroconjugaison. L'importance des effets observés sur les espèces animales sensibles est donc fonction du taux de transformation en α -zéaralénol et des capacités de glucuroconjugaison de ces espèces animales.

2.1.5.2. Effets chez l'animal

Le principal effet observé s'apparente à un hyperœstrogénisme, incluant une diminution de la fertilité.

Les cochons sont l'espèce la plus sensible. Les mâles sont moins sensibles que les femelles, mais sont, malgré tout, sujets aux effets œstrogéniques de la zéaralénone. Chez les jeunes porcs mâles, une atrophie des testicules et un développement des glandes mammaires peuvent s'observer.

L'élargissement ou le gonflement de la vulve (vulvo-vaginite) est l'anomalie la plus souvent signalée chez la truie, mais la baisse de fertilité reste le problème principal, notamment pour la gestion de la reproduction pour les éleveurs. Tous ces effets sont caractéristiques des effets des œstrogènes : féminisation et effets anti-androgènes (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

2.1.5.3. Effets chez l'homme

La question des possibles effets de la zéaralénone chez l'homme se pose à plus long terme car la sensibilité est faible comme les doses ingérées.

La zéaralénone peut être génotoxique et immunotoxique à haute dose. Il n'est pas encore clairement établi que la zéaralénone est cancérigène même si l'IARC (Agence Internationale de Recherche sur le Cancer) classe cette molécule dans la catégorie « probablement pas cancérigène pour l'homme ».

Les groupes suivants ont été définis par le CIRC (Centre International de la Recherche sur le Cancer) :

Groupe 1 : Le produit ou le procédé est cancérigène pour l'homme.

Groupe 2A : Le produit est probablement cancérigène pour l'homme.

Groupe 2B : Le produit est un cancérigène possible pour l'homme.

Groupe 3 : Il n'est pas possible de se prononcer quant à la carcinogénicité du produit pour l'homme (probablement pas cancérigène pour l'homme).

La zéaralénone appartient donc au groupe 3 (tableau 7 p45).

Les viandes et lait consommés par l'homme peuvent être considérés comme exempts de zéaralénone.

En ce qui concerne les céréales françaises, la présence de zéaralénone est rarissime.

2.2. Les Trichothécènes

2.2.1. Structure

Les trichothécènes sont des époxydes sesquiterpéniques, c'est pourquoi le nom d'époxytrichothécènes leur est également donné. Ils ont tous un noyau tricyclique et une fonction époxyde en C₁₂-C₁₃ essentielle pour leur toxicité (Gledhill *et al.*, 1991).

Leur structure chimique varie selon la position et le nombre de fonctions hydroxyles ainsi que les différents esters qui sont rattachés au cycle.

Ils sont divisés en quatre catégories ou types (A, B, C, D). Les trichothécènes des groupes A et B sont largement présents sur céréales et denrées alimentaires tandis que les types C et D sont rarement rencontrés et ne seront pas étudiés (figures 10 et 11).

Groupe A : ce sont les trichothécènes qui ne possèdent pas de fonction cétone en C8

Groupe B : ce sont les trichothécènes caractérisés par une fonction cétone en C8

Au sein des groupes A et B, les trichothécènes les plus fréquemment rencontrés sont la toxine T-2, la toxine HT-2 du groupe A, le déoxynivalénol (DON) et le nivalénol (NIV) du groupe B (Parent-Massin, 2000), (Krska *et al.*, 2001).

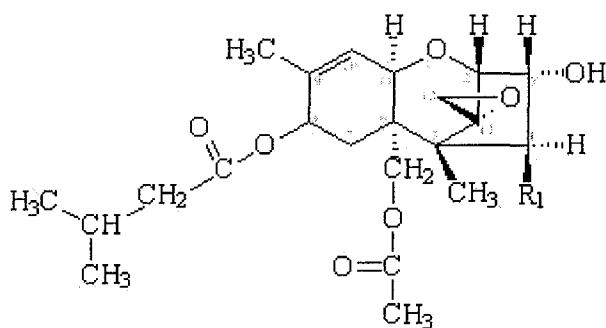


Figure 10 : Structure chimique des trichothécènes du groupe A (Site Internet n°6).

T-2 : (R1 = OAc)

HT-2 : (R1 = OH)

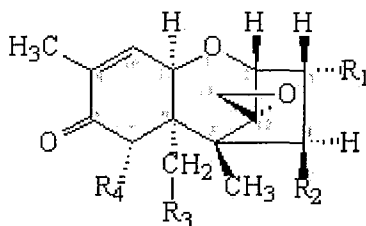


Figure 11 : Structure chimique des trichothécènes du groupe B (Site Internet n°6).

DON (R1 = OH, R2 = H, R3 = OH, R4 = OH)

NIV (R1 = OH, R2 = OH, R3 = OH, R4 = OH)

NIV = Nivalénol

DON = Déoxynivalénol

2.2.2. Propriétés physico-chimiques

Les trichothécènes sont solubles dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol, le butanol et le toluène. Ils sont moins solubles dans le chloroforme, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Ils ne possèdent pas une propriété d'absorption sous la lumière UV, ni une activité fluorescente, d'où la difficulté de leur dosage.

2.2.3. Voie métabolique de synthèse

La voie de biosynthèse des trichothécènes est une des mieux documentée à ce jour avec celles des aflatoxines. De nombreux travaux sont menés afin de mieux comprendre les mécanismes biochimiques et génétiques de leur production. Les études génétiques ont montré que, comme pour les gènes intervenant dans la synthèse des aflatoxines, les gènes impliqués dans la synthèse des trichothécènes sont regroupés en cluster dans le génome (Desjardins et Hahn, 1997). La voie commence par la "cyclisation" du farnesyl pyrophosphate formé par condensation de trois molécules d'isoprène, unité de base des stérols et des stéroïdes. La molécule ainsi formée, le trichodiène, est le précurseur commun à tous les trichothécènes (Savard et Sinha, 1989), (figure 12).

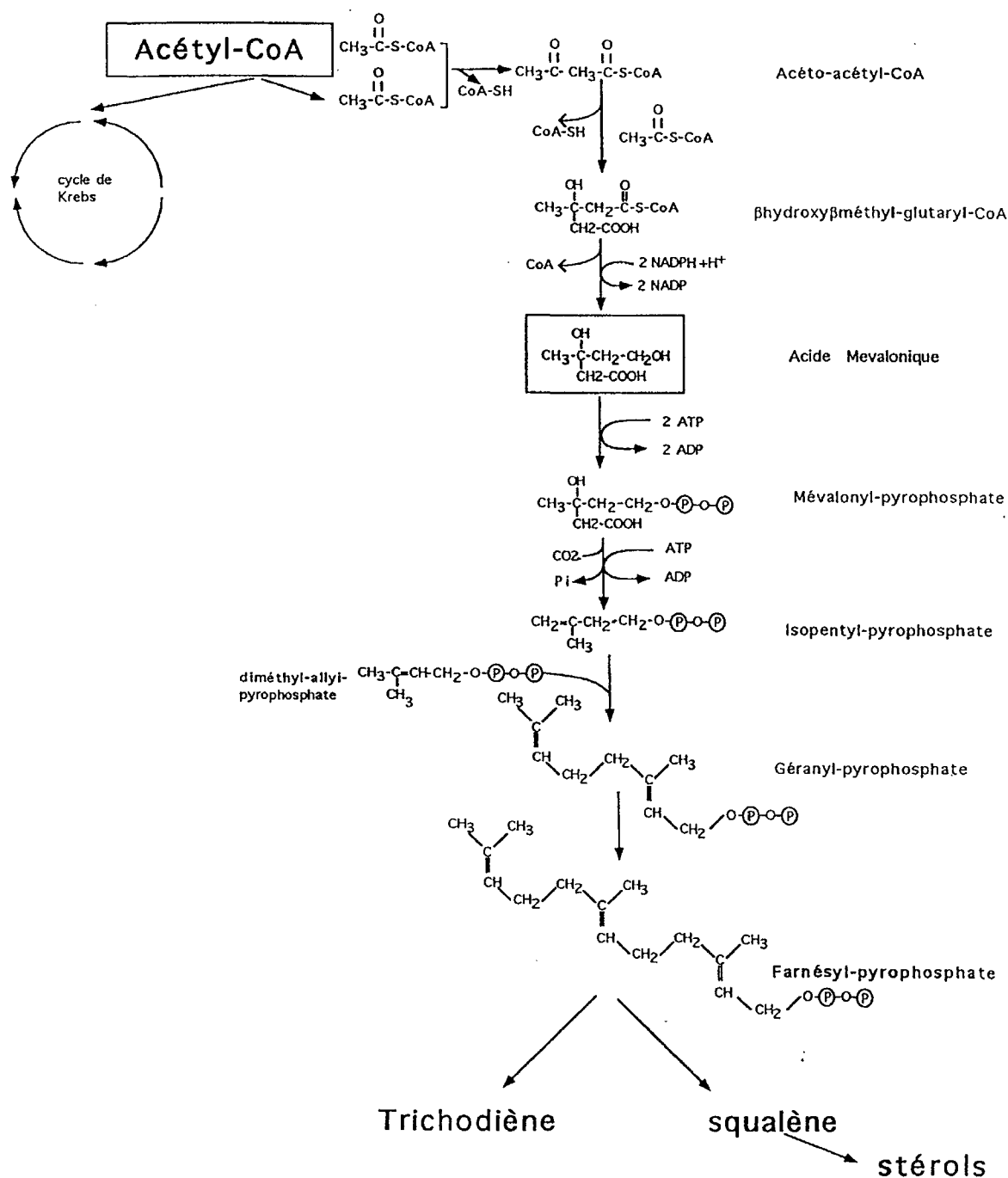


Figure 12 : Biosynthèse et cyclisation du farnésyl-pyrophosphate (Alexander *et al.*, 1997)

La biosynthèse des trichothécènes constitue donc une dérivation de la synthèse des stérols. Le trichodiène subit ensuite trois étapes d'oxygénation jusqu'à l'isotrichodiol, puis, chez *Fusarium*, la voie se poursuit, *via* l'isotrichotriol, l'isotichodennol et l'isotrichodermine, aboutissant aux différents trichothécènes (figure 13).

L'enzyme codée par le gène *Tri8* contribue à la réaction d'estérification en C8 (addition d'un groupe isovalérate) du 3-acétylnéosolaniol. Cette protéine serait une unité indispensable d'un complexe enzymatique multifonctionnel catalysant cette estérification et permettant ensuite la synthèse de la toxine T-2.

Tri12 code une protéine présentant une forte homologie avec la protéine membranaire SGEI de *Saccharomyces cerevisiae* qui facilite les échanges de composés cellulaires. *Tri12* jouerait ainsi un rôle dans l'excrétion des trichothécènes par les *Fusarium* (Alexander *et al.*, 1997).

Plus récemment, un second gène de régulation de la transcription, *Tri10*, a été identifié et caractérisé. *Tri10p* régule positivement l'expression du gène de la FPP synthase (enzyme catalysant la formation du précurseur immédiat du trichodiène), des gènes *Tri4*, *Tri5* et de l'autre gène de régulation *Tri6*. Ce facteur de régulation semblerait plus particulièrement impliqué dans la régulation de la biosynthèse des trichothécènes de type A (T-2 toxine). En effet, la disruption du gène entraîne la diminution de l'accumulation des autres gènes *Tri*, alors que sa sur-expression entraîne l'effet inverse chez *F. sporotrichioides*. Il semble que tous les gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes soient régulés par *Tri10* et *Tri6* ainsi que la voie de biosynthèse des isoprénoïdes.

Le rôle des autres gènes du cluster, *Tri9* et *Tri14*, n'a pas encore été établi.

D'autres gènes, requis pour la biosynthèse des trichothécènes, sont localisés à l'extérieur du cluster. *Tri1* code pour une cytochrome P450 monooxygénase impliquée dans une étape de la synthèse de la toxine T-2. Il est situé en amont d'un autre gène codant pour une acétyl transférase et régulé à la fois par *Tri10* et par *Tri6*. Ce nouveau gène semble aussi impliqué dans la biosynthèse des trichothécènes, ceci suggérant la présence d'un deuxième cluster *Tri* (Meek *et al.*, 2003). Le gène *Tri10* code pour la trichothécène 3-O-acétyltransférase qui permet au champignon d'inactiver le facteur de virulence et ainsi de «s'auto protéger» (figure 14).

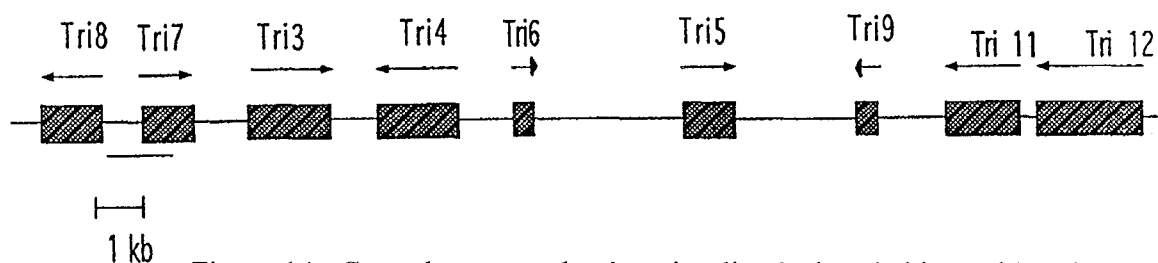


Figure 14 : Carte du groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes chez *F. sporotrichioides* (Les flèches indiquent le sens de transcription), (Alexander *et al.*, 1997).

La connaissance de la biosynthèse des trichothécènes est une avancée importante. Elle permettra l'élaboration de méthodes spécifiques de biologie moléculaire permettant de détecter des souches de *Fusarium* producteurs de trichothécènes en détectant les gènes codant pour les mycotoxines. Cela sera étudié dans la partie consacrée à la détection des trichothécènes.

2.2.4. Les *Fusarium* producteurs

Il y a plusieurs espèces de champignons toxiques qui sont capables de produire des trichothécènes. Les trichothécènes sont souvent produits par des *Fusarium*, mais également par d'autres espèces des genres *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Trichothecium*...

Les *Fusarium* producteurs de ces toxines sont énumérés dans le tableau 6 (Sweeney et Dobson, 1998). Les quatre producteurs les plus importants sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides* et *F. poae*.

Tableau 6 : Les espèces de *Fusarium* produisant des trichothécènes
(d'après Sweeney et Dobson, 1998)

<i>F. acuminatum</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. avenaceum</i>	<i>F. poae</i>
<i>F. camptoceras</i>	<i>F. proliferatum</i>
<i>F. chlamydosporium</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>F. compactum</i>	<i>F. scirpi</i>
<i>F. crookwellense</i>	<i>F. semictum</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>F. solani</i>
<i>F. equiseti</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
<i>F. graminearum</i>	<i>F. subglutinans</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>F. tricinctum</i>
<i>F. nigamai</i>	<i>F. venenatum</i>

Le déoxynivalénol (DON) est le trichothécène le plus répandu sur les céréales. Il est retrouvé le plus fréquemment sur l'orge, le blé et le maïs en Amérique du Nord, au Japon et en Europe (Pittet, 1998).

L'invasion par les moisissures et la production de cette toxine prédominent surtout avant la récolte (Site Internet n°6).

F. graminearum et *F. culmorum* sont les plus importants producteurs de trichothécènes du groupe B (Birzele *et al.*, 2000 ; Homdork *et al.*, 2000). Deux chémotypes de *F. graminearum* sont connus. Le type I ou chémotype capable de former le DON avec ses dérivés acétylés et le type II ou chémotype ayant la plus importante production de NIV (Sydenham *et al.*, 1991 ; Perkowski *et al.*, 1997).

Le producteur majeur de toxines T2 est *F. sporotrichioides*. Il apparaît principalement dans les zones tempérées à froides sur les céréales qui ont été semées avant l'hiver.

2.2.5. Toxicité

2.2.5.1. Mode d'action

Des études de toxicité ont démontré que les trichothécènes agissent comme inhibiteurs de la synthèse des protéines eucaryotes. Les trichothécènes se lient à une des sous-unités ribosomiale et interagissent avec la peptidyltransférase. Cette interaction conduit à l'inhibition de la formation des peptides. La structure chimique du trichothécène est importante dans l'interaction avec la sous-unité ribosomiale (Cundlife et Davies, 1977).

Les trichothécènes sont actifs sur toutes les cellules en voie de division rapide et leur ingestion provoque souvent des troubles digestifs suivis de diarrhées sanglantes ou d'hémorragies intestinales (Cahagnier, 1997).

2.2.5.2. Effets chez l'animal

✓ Les trichothécènes du groupe B

L'absorption de trichothécènes provoque chez l'animal une leucopénie. Ces composés ont un pouvoir immunosuppresseur, leurs actions sur les lymphocytes thymiques provoquent une diminution des défenses immunitaires (Cahagnier, 1997).

Le déoxynivalénol (DON)

-Toxicité aiguë

Chez le porc principalement, mais aussi chez les volailles, le DON entraîne une diminution de la consommation d'aliments. Ce n'est pas à proprement parler un effet toxique, mais cette mycotoxine a des conséquences économiques importantes pour les éleveurs. Le DON entraîne une mauvaise assimilation des acides aminés par les cellules de l'animal et provoque *via* un excès de tryptophane circulant dans le sang une augmentation de la sérotonine sanguine qui agit sur le centre de la satiété au niveau du système nerveux central. Cette diminution de la consommation survient rapidement après ingestion du DON et est proportionnelle à la dose ingérée. Pour des doses de 15000 µg/kg d'aliments, le DON fait vomir les porcs d'où sont nom de vomitoxine. Cependant, les céréales françaises en contiennent le plus souvent moins de 750 µg/kg (Grosjean, 2002).

-Toxicité chronique

Les autres effets du DON sont variés et faibles. Le DON agit sur le système immunitaire des mammifères et des oiseaux. Chez le porc, il augmente la teneur en immunoglobulines A, d'où sa toxicité possible pour les reins.

Le DON agit également sur le foie ce qui affecte la dégradation et l'élimination des toxines par l'organisme (Grosjean, 2002).

Le nivalénol (NIV)

Consommé à fortes doses par les rongeurs, le NIV peut avoir des effets génotoxiques, embryotoxiques, immunodépresseurs et peut diminuer la consommation. Ses effets lors de sa consommation à petites doses ne sont pas connus.

✓ Les trichothécènes du groupe A

Ils sont plus toxiques que ceux du groupe B.

Chez les animaux, notamment chez les plus jeunes, la toxine T2 entraîne une série de manifestations diverses : sous-consommation, nécrose des épithéliums (peau et muqueuse de l'appareil digestif), hémorragies, hypotension. Une consommation élevée prolongée peut avoir un effet immunodépresseur et un effet hématotoxique (réduction du nombre de leucocytes), (Grosjean, 2002).

La toxine T2 est rapidement assimilable et rapidement métabolisée, sans accumulation notoire dans les organes chez les animaux.

2.2.5.3. Effets chez l'homme

Le DON

Dans la toxicologie chronique, le DON peut affaiblir les défenses naturelles des personnes les plus vulnérables (jeunes enfants, personnes âgées, ...).

Les symptômes décrits sont des douleurs abdominales, de nausées, de vertiges, de maux de tête, d'irritation de la gorge, des vomissements, des diarrhées et la présence de sang dans les selles. Ces symptômes sont rapidement réversibles (Li *et al.*, 2002 ; Sudakin, 2003).

Il n'y a pas de preuves expérimentales ou épidémiologiques de propriétés mutagènes ou carcinogènes du DON et cette mycotoxine est classée dans le groupe 3 (non classé comme carcinogène pour l'homme, tableau 7 p45) défini par l'IARC (IARC, 1993).

La Toxine T2

La toxine T2 a été impliquée dans deux déclenchements de mycotoxicoses aiguës chez l'homme. La première s'est produite en Sibérie durant la Seconde Guerre Mondiale déclenchant une maladie appelée Aleucie Toxique Alimentaire (ATA). Des milliers de personnes qui avaient été obligées de consommer des céréales mal conservées tout l'hiver ont été touchées et des villages entiers furent décimés. Les symptômes de l'ATA se traduisent par de fortes fièvres, des vomissements, des inflammations aiguës du tractus digestif, de l'anémie, des troubles circulatoires et des convulsions. Ces trichothécènes ont également empoisonné des personnes au Kashmir en Inde en 1987. L'empoisonnement était dû à la consommation de pain fait avec de la farine moisie. Les symptômes majeurs consistaient en des douleurs abdominales avec inflammation de la gorge, des diarrhées, du sang dans les selles et des vomissements. La toxine T2 fut isolée de la farine avec d'autres trichothécènes, notamment le DON, le NIV et le déoxynivalénol monoacétate.

2.3. Les fumonisines (FBs)

Les fumonisines ont été mises en évidence en 1988 par Bezuidenhout *et al.*.

Ce sont des contaminants courant des végétaux et plus particulièrement du maïs.

Ce sont les mycotoxines les plus fréquemment rencontrées dans le monde, (Shepard *et al.*, 1996).

2.3.1. Structure

Elles ont une structure similaire à celle de la sphingosine qui sert d'ossature aux sphingolipides. Six structures de fumonisines ont été identifiées à ce jour, mais seules les structures de la série B sont des produits retrouvés dans la nature, la fumonisine B1 (FB1) restant la plus abondante (figure 15).

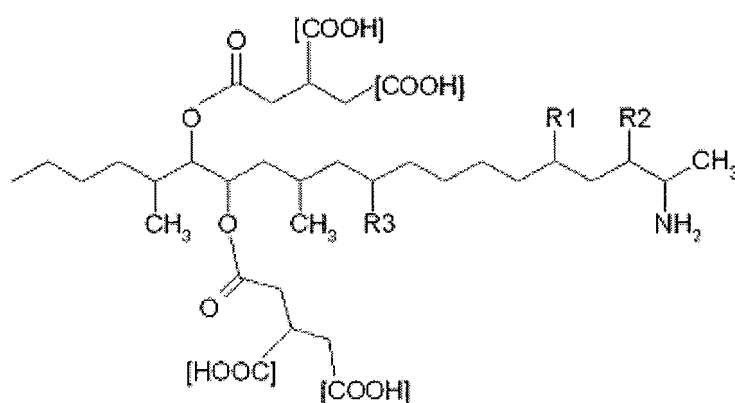


Figure 15 : Structure des fumonisines B1-B4 (Site Internet n°6).

Fumonisine B1 : R1= OH ; R2= OH ; R3= OH ;

Fumonisine B2 : R1= H ; R2= OH ; R3= OH ;

Fumonisine B3 : R1= OH ; R2= OH ; R3= H ;

Fumonisine B4: R1= H ; R2= OH ; R3= H ;

2.3.2. Propriétés physico-chimiques

Ce sont des molécules polaires. Les fumonisines sont des solides amorphes solubles dans l'eau, mais non solubles dans les solvants apolaires. Elles ont un poids moléculaire de 722g/mole. Le point de fusion est d'environ 105°C (Vesonder *et al.*, 1992). Les FBs n'absorbent pas les ultraviolets et ne sont pas fluorescentes, c'est pourquoi, pour les détecter, il convient de les dériver. Les spectres infrarouges révèlent des pics d'absorption à 3450, 2934, 1729 et 1632 cm⁻¹. La Fumonisines B1 a une rotation optique $[\alpha]_D = -28^\circ$.

2.3.3. Voie métabolique de synthèse

Les fumonisines sont synthétisées par condensation de l'alanine avec un précurseur d'un dérivé acétate (Branham et Plattner, 1993).

2.3.4. Les *Fusarium* producteurs

Les fumonisines sont produites par les espèces de la section *Liseola* (tableau 3 p13). Le principal producteur est de loin *F. moniliforme* qui est rencontré dans le monde entier. C'est aussi l'un des champignons les plus couramment rencontrés sur maïs. Ce dernier peut contenir de fortes teneurs en fumonisines bien que les épis montrent une apparence normale c'est-à-dire sans pourriture ni décoloration des grains.

2.3.5. Toxicité

2.3.5.1. Effets chez l'animal

Les fumonisines sont associées chez le porc à des œdèmes pulmonaires pouvant entraîner la mort. Chez le cheval, elles entraînent la leucoencéphalomalacie (LEM), maladie du cerveau pouvant conduire à la mort. La FB1 est également toxique pour le foie, le pancréas, les poumons et les reins chez de nombreuses espèces animales.

2.3.5.2. Effets chez l'homme

Dans certaines régions du monde (en particulier au Transkei, province d'Afrique du sud), une corrélation a été établie entre les cancers de l'œsophage chez l'homme et la contamination du maïs servant de base alimentaire. Les fumonisines sont classées dans le groupe des cancérogènes probables pour l'homme par l'IARC (tableau 7 p45). Elles sont connues pour être hépatotoxiques et immunotoxiques.

2.4. La moniliformine

C'est une mycotoxine de très faible poids moléculaire (98g/mol).

Il n'y a, pour le moment aucune donnée sur la voie de biosynthèse de cette toxine.

La moniliformine (MON) a été extraite de cultures de plusieurs espèces de *Fusarium* comme *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. avenaceum* et *F. tricinctum*.

Le mécanisme d'action probable est l'inhibition enzymatique de la pyruvate deshydrogénase et de l' α cétooglutarate déshydrogénase (Abramson, 2002 ; Yannikouris et Jouany, 2002).

Chez l'animal, les denrées alimentaires contaminées par la MON peuvent engendrer des réductions de performance, des troubles hématologiques et une mortalité chez les poulets, canards, cochons et les rongeurs. Actuellement, elle est considérée comme cytotoxique mais pas génotoxique.

Chez l'homme, elle est en cause dans la maladie de Keshan, un trouble cardiaque qui existe dans les régions rurales de Chine et Afrique du sud où le maïs constitue la base alimentaire.

2.5. Conclusion

Les fusariotoxines dans les aliments posent des problèmes de santé publique et de santé animale. Elles entraînent notamment des baisses de rendement au sein des élevages lorsqu'elles sont présentes sur les céréales à paille destinées à l'alimentation des animaux (zéaralénone, trichothécènes). Chez l'homme, la toxine T2 est la fusariotoxine qui présente un risque vital en cas de toxicité aiguë. La toxicité chronique des fusariotoxines n'a pas été pour l'instant assez étudiée pour cerner si des effets importants peuvent se produire sur le long terme suite à l'ingestion de petites quantités régulières de denrées alimentaires faiblement contaminées. En ce qui concerne les risques cancérogènes, les connaissances évoluent très rapidement et des classifications existent déjà en ce qui concerne l'aflatoxine B1, l'ochratoxine A, les fumonisines. Comme le montre le tableau 7, les études réalisées sur la zéaralénone ou la vomitoxine n'apportent respectivement que des données limitées ou insuffisantes sur l'évidence de la carcinogénicité de ces produits. Les aliments suspectés de contamination doivent par conséquent faire l'objet de contrôles réguliers et d'études plus poussées.

Tableau 7 : Résumé des évaluations concernant la carcinogénicité des mycotoxines (d'après l'IARC 1987, 1993, 2002).

Produit de la carcinogénicité	Degré d'évidence globale		Evaluation	Classe
	chez l'homme	chez l'animal		
Toxines dérivées de <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> et <i>F. crookwellense</i> Zéaralénone Vomitoxine Nivalénol	I ADS		L I I	3
Toxines dérivées de <i>F. sporotrichioides</i> T2-toxine		ADS	L	
Toxines dérivées de <i>F. moniliforme</i> Fumonisine B ₁ Fumonisine B ₂	I		S S I	2 B 2 B

ADS: Absence de données suffisantes ; S: Preuve Suffisante ; L: Preuve Limitée ;
I: Preuve Insuffisante

3. Conditions écophysiologicals de la toxionégèse

La contamination par un champignon, son développement et la production de toxines peuvent se produire aux champs, lors du stockage ou durant ces deux périodes (Sauer, 1978 ; Abramson, 1991). Aux champignons présents après récolte, succèdent les champignons de stockage (Sinha *et al.*, 1969 ; Abramson *et al.*, 1990 a et b). Pendant le stockage, les céréales perdent de leur qualité et deviennent plus susceptibles aux infections fongiques ainsi qu'à l'attaque des insectes (Sinha, 1961, 1992). Il y a diminution des teneurs en protéines, en aminoacides, en vitamines et acidification des grains, à l'origine d'une baisse de la valeur nutritive des céréales.

La présence de champignons ne signifie pas nécessairement la production de mycotoxines. La formation de mycotoxines est en effet conditionnée par plusieurs facteurs d'ordre biologique, physique et chimique (D'Mello *et al.*, 1997).

Ainsi, les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité et appartiennent aux genres *Alternaria*, *Fusarium* et *Cladosporium*, alors que la microflore de stockage nécessite une humidité moindre et est représentée principalement par les *Aspergillium* et les *Penicillium* (Sauer, 1978).

Les facteurs qui affectent la production de mycotoxines par une moisissures sont multiples et complexes. Ces facteurs peuvent être des facteurs abiotiques ou des facteurs biotiques. Les premiers incluent l'humidité et la température, l'acidité du milieu, l'oxygénation et les facteurs chimiques. Les facteurs biotiques ont pour conséquence une altération des enveloppes des graines et sont notamment dus à la présence d'insectes, à des interactions entre microorganismes et à la nature du substrat de développement des moisissures (Hesseltine, 1976 ; Sinha *et al.*, 1986).

3.1. Les facteurs abiotiques

3.1.1. Humidité et température

3.1.1.1. Humidité

Dans les régions tempérées, les moisissures qui se développent sur les grains de céréales peuvent être classées en 3 catégories suivant l'humidité nécessaire à leur croissance : les moisissures de terrain, de stockage et de détérioration (Christensen, 1965).

Les moisissures se développant aux champs, comme celles se développant sur le matériel de putréfaction nécessitent une forte humidité (20 à 25 %) pour leur croissance (Hesseltine, 1976.) Par contre, les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant seulement de 10 à 18 % d'humidité (Lillehoj et Elling, 1983). Comme le montre la figure 16, les *Fusarium* sont plutôt des espèces hygrophiles, nécessitant des degrés d'hygrométrie avoisinant les 95%.

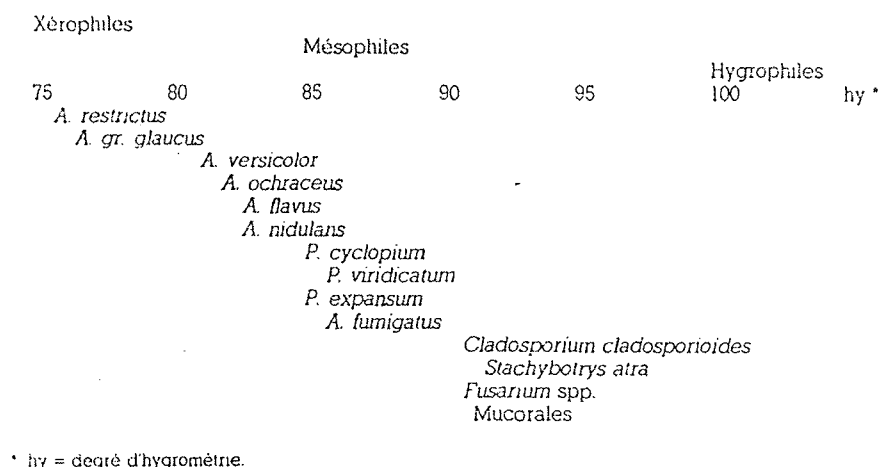


Figure 16 : Classification des moisissures en fonction de leurs besoins en eau
(d'après Le Bars et Le Bars, 1996)

Au lieu du taux d'humidité, la disponibilité en eau (A_w) d'une substance est utilisée pour exprimer les besoins du champignon. L' A_w est définie comme le rapport de la tension de vapeur sur l'eau pure (Pitt et Hocking, 1985). Ce facteur tient compte de l'équilibre de l'eau disponible entre le substrat et l'air ambiant, à une température donnée. Plus l' A_w est faible, moins il y aura d'eau disponible pour la croissance du champignon.

La croissance de tous les microorganismes est caractérisée par une A_w minimum, optimum et maximum. L' A_w minimum pour la plupart des espèces fongiques contaminant les céréales est de l'ordre de 0,7 (Northolt *et al.*, 1979 ; Lacey, 1989).

Les *Fusarium* nécessitent plus d'humidité avec une A_w entre 0,98 et 0,995, (Sauer, 1978).

Concernant les toxines de *Fusarium*, les seuils de synthèse sont de l'ordre de 0,90, c'est-à-dire des valeurs également limitantes pour la croissance de ces espèces (tableau 8).

Cependant, dans les conditions optimales concernant la température et la composition du milieu de culture, la synthèse de fumonisines B1 a pu être observée pour des A_w voisines de 0,80 sur arachides.

Tableau 8 : A_w limite pour la toxinogénèse (valeurs minimales rapportées),
(d'après Cahagnier, 1997)

MYCOTOXINES	ESPECES PRODUCTRICES	A_w
Zéaralénone	<i>Fusarium sp.</i>	0,90
Trichothécènes	<i>Fusarium sp.</i>	0,90
Moniliformine	<i>Fusarium sp.</i>	0,90

Fusarium moniliforme a besoin d'une Aw minimum de 0,87 pour croître et est connu pour produire ses toxines à une Aw de 0,92 (Marin *et al.*, 1995). Aux valeurs seuils d'activité de l'eau de 0,85-0,86, il n'y a pas de production de toxines par ce champignon (Cahagnier *et al.*, 1997).

La production de toxines par *Fusarium proliferatum* est quant à elle possible dans un intervalle d'activité de l'eau de 0,97 à 0,92.

La disponibilité en eau a une influence déterminante. La figure 17 présente l'évolution de la production des mycotoxines en fonction de la teneur en eau. Il n'y a pas de toxinogénèse au seuil de développement de la moisissure. Puis la toxinogénèse devient progressivement modérée et semble proportionnelle à la teneur en eau. Ensuite, dans la mesure où les autres facteurs ne sont pas limitant, elle croît de manière exponentielle. Enfin, pour des teneurs en eau élevées, la toxinogénèse est plus faible du fait d'un défaut d'oxygénation.

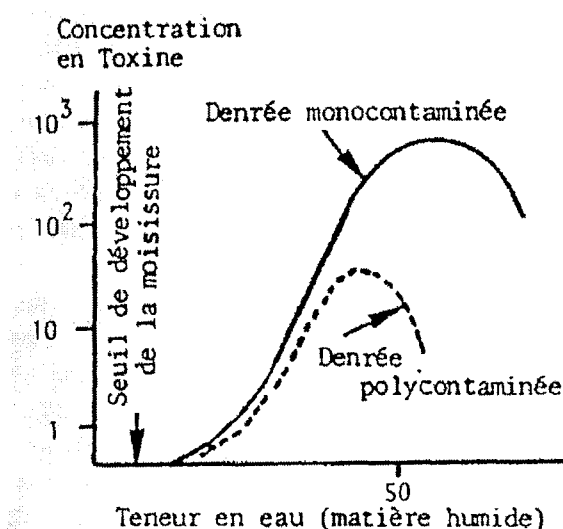


Figure 17 : Evolution de la production de mycotoxine en fonction de la teneur en eau (Le Bars, 1982)

L'activité en eau a également une influence primordiale sur le devenir de l'ensemble de la microflore hébergée dans un aliment. Pour des faibles valeurs, elle joue essentiellement un rôle de facteur limitant et, au fur et à mesure qu'elle augmente, elle permet le développement d'un plus grand nombre d'espèces fongiques. Il en résulte un déplacement plus ou moins important, selon le pouvoir compétitif, des groupes de populations présents.

L'influence de l'eau sur la mycotoxinogénèse apparaît être liée également chez les *Fusarium* à la durée d'imprégnation en eau des grains qui influe sur la production de fumonisines B1 comme le montre la figure 18.

Concentrations en fumonisines B1

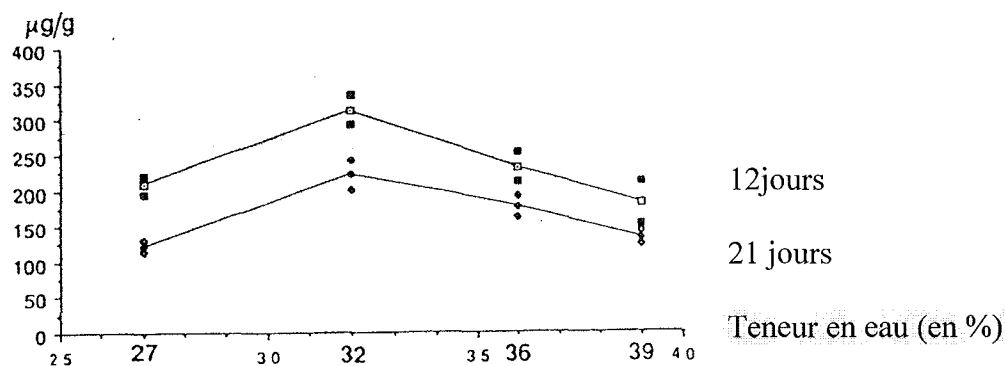


Figure 18 : Concentrations en fumonisines B1 dans les céréales à différentes teneurs en eau et maintenues à une humidité relative correspondante pendant 12 et 21 jours.
(d'après Le Bars *et al.*, 1994)

La présence d'une quantité suffisante d'eau dans une substance qui puisse favoriser la croissance du champignon peut avoir différentes origines. Cela peut provenir d'un séchage insuffisant avant stockage, de la pénétration de la pluie, de la neige dans les entrepôts ou bien encore une migration de l'eau du fait de l'existence d'un gradient de température dans les bacs de stockage (Christensen et Kaufmann, 1974 ; Sauer, 1978 ; Lacey, 1989). La température n'est pas la même dans toutes les parties des bacs de grain, ce qui peut entraîner un transfert de vapeur d'eau des zones chaudes vers les parties froides. Le grain peut se charger en humidité par absorption à partir d'un air chaud et humide ou à l'inverse par condensation lors d'un contact avec de l'air froid (Anderson *et al.*, 1943 ; Lacey, 1989).

3.1.1.2. La température

La température est un autre facteur déterminant pour la croissance du champignon et la production de mycotoxines. En ce qui concerne les *Fusarium*, ils sont généralement associés aux climats froids. La température optimale de toxicogénèse (aflatoxine, ochratoxine A, stérigmatocystine, patuline) est en général voisine de la température optimale de croissance du champignon. Toutefois, elle demeure légèrement inférieure si l'on considère la toxicogénèse proprement dite, c'est-à-dire la production de toxine par unité de croissance du champignon.

Pour la zéaralénone (*F. graminearum*) l'optimum de production se situe vers 12-15°C, la croissance de la moisissure est quant à elle maximale vers 25°C. Les trichothécènes (*F. tricinctum*) sont produits en plus grande quantité à basse température (1-4°C), sur des grains subissant le gel par exemple.

Fusarium culmorum, qui est un important producteur de DON, est capable de croître à une température de 0°C. Il a une température optimum de croissance de 21°C et un maxima à 31°C. Il est capable de produire de la zéaralénone aux alentours de 25°C.

Fusarium proliferatum est un producteur majeur de fumonisines B1, B2 et B3. La production de toxine par *Fusarium proliferatum* est plus importante à 25°C qu'à 30°C.

La production de plusieurs mycotoxines de natures différentes peut se faire par une même espèce de *Fusarium*. La température peut alors avoir une influence sur l'importance de la production d'une mycotoxine par rapport à une autre. Comme le montre le tableau 9, *Fusarium graminearum* produit un maximum de zéaralénone à 25°C, alors que deux fois plus de déoxynivalénol est produite à 28°C (Greenhalgh *et al.*, 1983).

Tableau 9 : Influence de la température sur la formation de zéaralénone et déoxynivalénol (Greenhalgh *et al.*, 1983).

Température °C	Concentration en ppm	
	Zéaralénone	Déoxynivalénol
19,5	57,7 ± 7	6,1 ± 0,6
25	120 ± 13	149 ± 14
28	98 ± 34	365 ± 15

3.1.2. Acidité du milieu (pH)

Magan et Lacey (1984 a) ont analysé l'effet conjugué de l'Aw, de la température et du pH. Comme le montre le tableau 10, la production de fumonisine B1 est variable suivant le pH. C'est à **pH 3,7** que la production en fumonisine B1 (FB1) est la plus importante alors que la croissance du champignon est maximale à **pH 5,6** (Blackwell *et al.*, 1994 ; Keller *et al.*, 1997).

pH	Biomasse (g / l)	FB ₁ (µg / g)
2,2	11,7 ± 2,7	9,4 ± 4,5
2,6	11,1 ± 1,1	33,3 ± 10,2
3,0	12,0 ± 2,6	261,6 ± 338, 1
3,7	13,8 ± 1,4	436,7 ± 118,0
4,2	16,7 ± 1,6	432,3 ± 66,9
5,6	24,4 ± 2,0	16,9 ± 9,2

Tableau 10 : Effet du pH sur la production de FB1 et de *F. proliferatum* (d'après Keller *et al.*, 1997).

Fusarium graminearum, le plus répandu des *Fusarium* sur blé, a une croissance optimale entre 24 et 26°C et croît à une Aw de 0,90 au minimum. L'effet du pH sur la croissance est dépendant de la température, avec des valeurs minimales de 2,4 unités de pH à 30°C et 3,0 unités de pH à 25°C et 37°C (Wheeler *et al.*, 1991).

3.1.3. Oxygénation

La plupart des moisissures ont besoin d'oxygène pour se développer (Pitt et Hocking, 1985). Les plus exigeantes pousseront à l'extérieur de la substance qu'elles contaminent, les moins exigeantes se développeront en profondeur. Certaines moisissures sont capables de se développer en complète anaérobiose. D'une manière générale, la production de mycotoxines est plus sensible à une variation de la composition gazeuse que la croissance de la moisissure (Paster et Bullerman, 1988). Une concentration faible en O₂ (< 1 %) et/ou une augmentation du taux de CO₂ sont efficaces pour prévenir le développement des champignons et la formation de mycotoxines (Paster et Bullerman, 1988). En effet, le taux d'oxygénation affecte

non seulement la production de FB1, mais également la croissance du champignon. De plus, l'absence d'O₂ inhibe totalement la production de FB1 et réduit considérablement la quantité de moisissures (tableau 11).

Magan et Lacey (1984 b) indiquent par ailleurs que la sensibilité du champignon au taux d'O₂ est influencée par l'Aw et la température.

	Poids sec g/l	FB ₁ (µg/g)
Présence d'O ₂	14,1 ± 0,5	533 ± 88,4
Absence d'O ₂	4,3 ± 0,3	ND*

* Non décelable

Tableau 11 : Effet de la présence ou de l'absence en oxygène sur la biomasse de *F. proliferatum* et la formation de FB1 (Keller *et al.*, 1997).

3.1.4. Facteurs chimiques

L'emploi d'insecticides et d'acaricides réduit l'apparition de mycotoxines en prévenant les lésions dues aux insectes et aux acariens. Certains de ces insecticides ont par ailleurs des propriétés antifongiques, ce qui valorise leur utilisation. Enfin, certains exercent une action directe sur la toxino-génèse elle-même.

Ainsi l'utilisation des produits phytosanitaires est particulièrement intéressant puisqu'ils sont largement employés pour contrôler les maladies des plantes. Lorsque les fongicides sont utilisés avec succès, le risque de contamination en mycotoxine est faible. Cependant un certain nombre d'études ont montré qu'à concentration sub-létale, la production de mycotoxines est favorisée (Moss et Frank, 1987). L'utilisation de tébuconazole et de triadiménol réduit l'incidence de *Fusarium*, tandis que la production de nivalénol est augmentée (Gareis et Ceynowa, 1994). Par ailleurs, le tridémorphe, fongicide d'action systémique, a un effet variable suivant sa concentration d'utilisation sur la biosynthèse de toxine T-2 produite par *Fusarium sporotrichoïdes* (Moss et Frank, 1985). Des concentrations de 6 à 8 ppm favorisent la croissance du champignon, mais diminuent la synthèse de toxine T-2. Des concentrations de 30 à 50 ppm inhibent totalement la croissance de la moisissure mais en revanche stimulent la production de toxine T-2 (Moss et Frank, 1987).

Le dichlorvos est un insecticide inhibant la biosynthèse de l'aflatoxine, de la zéaralénone (Berisford et Ayres, 1976), de la citrinine, de la patuline et de l'ochratoxine. D'autres insecticides diminuent la synthèse de mycotoxines sans affecter la croissance des champignons (Draughton et Ayres, 1978, 1979, 1982).

Par contre, il convient de ne pas mal interpréter ces résultats et supposer que l'usage de fongicides ou autres produits phytosanitaires est plus néfaste que bénéfique. Il est clair, cependant, que la maîtrise de l'utilisation de pesticides doit être judicieuse. Cela sera présenté dans la partie concernant les moyens de lutte contre les mycotoxines.

3.2. Facteurs biotiques

3.2.1. Substrats

La composition chimique de la denrée est plus importante pour la toxinogénèse que pour la croissance de la moisissure même si un champignon n'est pas forcément capable de se développer sur n'importe quel substrat (Madhyastha *et al.*, 1990). Cette spécificité de substrat provient de différences physiques (activité en eau, conductivité thermique, oxygénation) et chimiques (composition du substrat en lipides, protéines, acides aminés, acides gras, minéraux), (Le Bars, 1982 ; Lacey, 1989).

3.2.2. Insectes et acariens

Les insectes et les acariens sont les vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent (Le Bars, 1982). Une infestation par les insectes prédispose les grains à une contamination par les moisissures et à la production éventuelle de mycotoxines (Farrar et Davis, 1991).

Au champ, comme nous l'avons vu dans la première partie sur le genre *Fusarium* et la fusariose des épis, plusieurs types d'insectes attaquent la plante et prédisposent celle-ci à une infection par des champignons avant que l'épi ne se forme. C'est le cas des pucerons et des asticots (Widstrom, 1992). Par exemple, les insectes et leurs larves jouent un rôle important dans l'envahissement du maïs par *F. moniliforme*. En effet, ils provoquent des dommages dans les épis de maïs et les tiges et créent ainsi des lésions à partir desquelles les spores de moisissures pourront se développer (Davis *et al.*, 1989 ; Sobek, 1996).

Au cours du stockage, les acariens vivant sur les grains moisies, transportent les spores de champignons sur leur corps, mais également dans leur tube digestif et leurs fèces. De ce fait, l'infestation de grains sains se produit lorsque les acariens arrivent en contact avec ces grains (Griffiths *et al.*, 1959). Les insectes et les acariens ne se développent pas en dessous de 18°C, mais certains tolèrent des activités en eau inférieure à l'activité en eau minimale pour la croissance des moisissures. Dans ce cas, toute réhydratation de la denrée provoque un développement fongique intense et les risques mycotoxiques consécutifs. Au cours de la conservation de céréales non protégées, les oiseaux et les rongeurs interviennent de manière similaire comme vecteurs de propagules fongiques (Le Bars, 1982).

3.2.3. Interactions entre microorganismes

La présence simultanée d'autres micro-organismes, que ce soient des bactéries ou d'autres moisissures, perturbe la croissance du champignon et la production de mycotoxines. Il y a, en effet, compétition entre différents champignons. L'association d'autres espèces fongiques à une souche toxigène a généralement un effet dépressif sur la concentration en toxines pour deux raisons principales. D'une part, en fonction du contexte écologique, il existe une compétition pour le substrat ; d'autre part, certaines souches peuvent dégrader la toxine. Ceci se confirme souvent lors d'examens microbiologiques d'échantillons contaminés par une seule espèce fongique. Ils présentent généralement un taux en mycotoxines bien plus important que les échantillons envahis par une mycoflore complexe. La présence de *F. moniliforme* dans les épis de maïs protège celui-ci d'une contamination par *A. flavus* et réduit le taux d'AF (Wicklow *et al.*, 1988; Zummo et Scott, 1992). La présence de *F. moniliforme* protège également le maïs des contaminations par *F. graminearum* (VanWyck *et al.*, 1988).

3.3. Conclusion

Les facteurs permettant la toxicogénèse dans les conditions optimum sont résumés dans le tableau 12. Les fusariotoxines nécessitent des A_w optimales toujours supérieures à 0,90. La température de production de ces mycotoxines est beaucoup plus variable, notamment pour les trichothécènes qui sont produits à une température optimale comprise entre 1 et 4°C. Il convient de rappeler que la température optimale de croissance de la moisissure est généralement supérieure à la température optimale de production de la mycotoxine.

Tableau 12 : Facteurs favorisant la production de mycotoxines.

Facteurs favorisants			
Mycotoxines	Température optimale	Activité de l'eau A_w	Autres
Zéaralénone	Température optimale entre 15 et 20°C	Activité de l'eau $A_w > 0,95$	Périodes prolongées de temps frais et humide, et à l'époque des moissons lors du stockage si le maïs est mal séché ou s'il est exposé à l'humidité.
Trichothécènes	Température optimale entre 1 et 4°C	Activité de l'eau $A_w > 0,9$	Périodes prolongées de stockage à des températures voisines de 0°C en atmosphère humide. Possibilité de développement même en milieu confiné
Fumonisines	Température optimale entre 22 et 25 °C	Activité de l'eau $A_w > 0,9$	Nécessite la présence d'oxygène Attaque par des insectes et grains déjà fusariés (<i>F. graminearum</i>) Conditions climatiques chaudes et sèches, Péricarpe peu résistant, Hybrides cultivés hors de leur zone d'adaptation.

Ainsi, la bonne connaissance des caractéristiques physiques, chimiques, écophysiologiques de la toxino-génèse devrait permettre le développement de méthodes efficaces de prévention et de lutte contre ces mycotoxines.

PARTIE III :

Prévention

et moyens de lutte

1. Généralités

1.1. Introduction

Les mycotoxines nécessitent une grande surveillance. Leur présence dans les céréales et les oléagineux mais également dans les animaux de production laisse penser qu'une suppression totale des mycotoxines est irréalisable. Cela aboutirait en fait à l'élimination de plusieurs milliers de tonnes de produits agricoles aussi bien lors de la récolte que lors de la transformation des céréales ou dans la distribution des produits finis.

1.2. Les possibilités d'action

Les facteurs écologiques favorables à l'infection, à la croissance et à la production de toxines ont été développés dans la partie relative à l'étude des mycotoxines de *Fusarium*. Leur bonne compréhension est nécessaire à la mise au point de stratégies efficaces de réduction des mycotoxines dans les productions agricoles (Quillien, 2000).

Pour qu'il y ait développement d'une maladie, trois conditions sont essentielles. Tout d'abord l'agent pathogène doit être présent. Ensuite, il faut une culture sensible aux *Fusarium* et enfin les conditions environnementales doivent être favorables à l'infection et au développement de la maladie. Si l'une de ces trois conditions n'est pas respectée, il ne peut y avoir de maladie.

Le facteur climatique est celui qui a le plus d'impact sur la maladie, cependant aucun contrôle n'est malheureusement possible sur le climat. C'est la raison pour laquelle aucune autre mesure ne doit être négligée pour limiter le plus possible l'incidence de la fusariose et la production éventuelle de mycotoxines sur les grains.

Pour prévenir la production de mycotoxines, il convient d'agir en tenant compte des facteurs d'apparition de ces dernières. Comme il y a deux sortes de mycotoxines (mycotoxines dites de champ et mycotoxine de stockage), il convient donc de différencier les moyens de lutte en fonction de l'origine de production de la mycotoxine.

2. Méthodes de lutte aux champs

2.1. Le choix variétal

2.1.1. Généralités

Le choix de la variété a son importance. Tout d'abord, la variété doit être bien adaptée aux conditions climatiques locales. L'objectif est de permettre une récolte à maturité dans des conditions optimales et pour une date de récolte qui ne dépasse pas le 1^{er} novembre (pour le maïs) (Benetrix et Barrier-Guillot, 2003).

D'une part, il est préférable de choisir une variété pas trop tardive (semi-hâtive) afin d'éviter que les grains prennent l'humidité.

D'autre part, la récolte hâtive, décidée grâce à un diagnostic précoce au champ de l'infection par des moisissures, évite la progression de la maladie et une trop grande production de mycotoxines.

Des différences de sensibilité variétale aux fusarioses sont établies par le GEVES. Des notes de sensibilité à la fusariose peuvent être utilisées pour choisir des variétés peu sensibles. ARVALIS propose un classement des variétés de céréales en trois groupes : peu sensibles : note GEVES 6-7, moyennement sensibles : note GEVES 4-5, sensibles : note GEVES 1-3.

Il convient de choisir des variétés tolérantes au *Fusarium* pour les céréales à paille (orge, avoine, blé) comme le blé Fundulea, le blé Ac Voyageur, ou l'orge Winthrop et des variétés résistantes à la fusariose concernant le maïs (Site Internet n°7).

2.1.2. Les différences de sensibilité variétale

Des différences de sensibilité variétale aux fusarioses sont clairement établies. En première approximation, il est possible de relier la variété, les symptômes observés sur grains et la teneur en DON. Si la liaison entre ces variables n'est pas parfaite, elle peut malgré tout orienter le choix variétal.

Un classement plus précis, fonction de la teneur en DON enregistrée en présence d'une contamination proche des conditions naturelles, est présenté sur la figure 18.

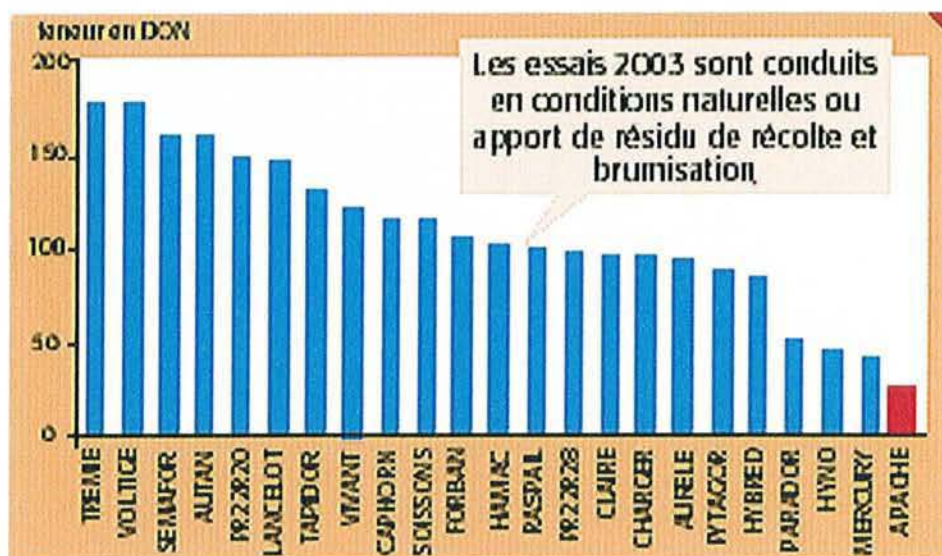


Figure 18 : Teneur en DON (µg/kg) en fonction du cultivar utilisé (Gatel *et al.*, 2004).

L'état actuel des connaissances permet de distinguer trois mécanismes qui expliquent les différences de sensibilité variétale aux attaques de fusarioses :

- La résistance à la contamination tout d'abord. Elle met en jeu un mécanisme qui rend toute contamination inopérante.
- La résistance à la propagation ensuite. Dans ce cas, la contamination reste localisée à l'épillet touché. Elle ne se propage pas à l'ensemble de l'épi.
- Enfin, la résistance à l'accumulation du DON, qui met en jeu un processus de dégradation du DON (certaines variétés posséderaient la faculté de détruire les mycotoxines).

Les différences variétales se rencontrent surtout pour les deux derniers types de résistances.

La figure 19, réalisée à partir de l'analyse de résultats obtenus en 2002 à Boigneville montre clairement, qu'indépendamment de tout traitement, le fait de privilégier la variété Apache plutôt que la variété Trémie permet de diviser par deux le taux de DON présent, après contamination artificielle. Certaines variétés sont donc à privilégier, mais, cependant le seul choix d'une variété résistante ne peut être considéré comme suffisant pour se placer totalement à l'abri d'un éventuel risque.

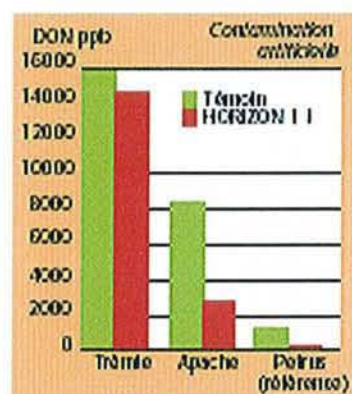


Figure 19 : Teneur en DON en fonction du cultivar utilisé (Gatel *et al.*, 2004).

2.2. Traitement des semences

Le traitement des semences est une méthode à ne pas négliger pour limiter la prolifération des moisissures. Une étude a été réalisée avec des échantillons de blé et d'orge infectés par *Fusarium graminearum*. Ces échantillons ont été placés à 50, 60, 70 et 80 °C dans une étuve à séchage pendant des périodes pouvant atteindre 24 jours. Pour déterminer les taux d'infection des grains traités, ces grains ont été déposés sur de la gélose dextrosée à base de pomme de terre. Par ailleurs afin d'évaluer leur viabilité, ils ont été placés sur du papier filtre humide. Le taux d'infection initial était de 23 % pour le blé et de 84 % pour l'orge. Le *Fusarium graminearum* a été éliminé des grains de blé après 15 jours à 60°C, 5 jours à 70°C et 2 jours à 80°C. Le *F. graminearum* a été éliminé des grains d'orge après 21 jours à 60 °C, 9 jours à 70 °C et 5 jours à 80 °C. Chez le blé, les températures et les temps de traitement suffisants pour éradiquer *F. graminearum* n'ont pas entravé la faculté germinative des grains, mais pour l'orge, une légère diminution dans la viabilité des grains placés à 80°C a été observée. Ainsi, le traitement thermique est recommandé comme moyen de lutter contre la propagation du *F. graminearum* par les semences à l'échelle internationale (Site Internet n°8).

2.3. La rotation des cultures

2.3.1. Généralités

La rotation des cultures est un des contrôles du *Fusarium*. La culture de blé doit avoir été absente d'un champ pendant au moins 2 ans avant d'y ressemer du blé.

L'introduction d'une dicotylédone (pois ou luzerne) permet de briser le cycle de la maladie en minimisant la contamination par les spores présentes dans le sol et sur les résidus de culture. Cependant, en Allemagne, Obst *et al.* (1997) ont reporté que les teneurs en DON sur blé après une culture de céréales étaient moins importantes que les teneurs en DON sur blé après une culture de pommes de terre ou de betteraves à sucre. Cela peut être expliqué par le fait que plusieurs espèces de *Fusarium* qui sont pathogènes pour les céréales le sont aussi pour des cultures non céréalières (Smith *et al.*, 1988).

D'autres études ont été réalisées notamment à Saskatchewan (Canada) où *F. avenaceum* est l'agent pathogène le plus couramment isolé dans la fusariose de l'épis sur le blé. Dans cette région l'incidence de *F. avenaceum* est plus grande lorsque le précédent cultural est une légumineuse que lorsque le blé est cultivé en continu (Fernandez *et al.*, 2001).

Ainsi, même si certains résultats sont contradictoires, l'effet du précédent cultural est important (tableau 13). Il ressort, en particulier, que c'est dans le cas d'un précédent maïs que les teneurs en DON, sur blé, sont les plus importantes.

Tableau 13 : Effet du précédent cultural sur la quantité de DON dosé à la récolte sur 938 parcelles de blé. La moyenne des dosages est de 663 ppb, (d'après le Cahier de Recherche du CERAAP n°2, 2002).

EFFET DU PRÉCÉDENT	
Colza :	325 ppb
Blé tendre :	338 ppb
Autres cultures :	358 ppb
Pommes de terre :	358 ppb
Betterave sucrière :	365 ppb
Pois :	444 ppb
Tournesol :	550 ppb
Maïs ensilage :	1 074 ppb
Maïs grain :	1 790 ppb

D'une manière générale, il faut éviter la monoculture. Cependant, si la rotation est impossible, il convient de prévoir un labour hâtif afin d'assurer une décomposition rapide des résidus des cultures précédentes.

2.3.1. Le problème de la culture du maïs

Dans la mesure du possible, les distributeurs conseillent d'éviter les antéprécédents maïs et sorgho qui hébergent le champignon. Dans le cas où ces deux cultures ne pourraient être évitées, il est alors vivement conseillé d'enfouir au maximum leurs résidus. Le maïs grain présente un risque supérieur au maïs ensilage, car les tiges restent aux champs et offre un site de conservation approprié pour les *Fusarium* (Brady, 2003 ; Obst *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il ne faut pas cultiver du blé, de l'orge ou de l'avoine à proximité d'un champ de maïs pour éviter le transfert des spores produites sur ce maïs vers ces autres cultures. Il est également important de choisir des densités de semis pas trop élevées pour ne pas augmenter le taux d'humidité (Site Internet n°7).

2.4. Traitements phytosanitaires

Il est possible également d'utiliser des traitements chimiques pour prévenir l'apparition des mycotoxines. Le choix variétal est plus important que l'avantage qui pourrait être potentiellement fourni par les fongicides. En effet, l'efficacité des fongicides connaît de sérieuses irrégularités qui s'expliquent par la date de traitement, la technique d'application ou le choix des produits et de leur dose (figure 20).

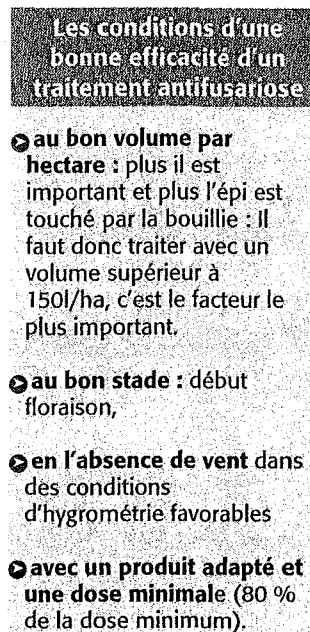


Figure 20 : Les conditions d'une bonne efficacité d'un traitement antifusariose (Gatel *et al.*, 2004).

Les produits antifongiques principalement utilisés sur céréales sont les strobilurines et les triazoles.

Toutes les strobilurines actuellement sur le marché affichent une efficacité marquée sur *Michrodochium nivale*. Moins efficaces sur les espèces de *Fusarium* toxinogènes, elles peuvent laisser le champ libre à leur développement. Dans certains cas, des inversions de flore sont observées et des teneurs en DON comparables, voire supérieures à celles observées en l'absence de traitement, sont enregistrées. Si les strobilurines ne sont pas la solution la plus satisfaisante du point vue écologique, elles assurent un rendement plutôt supérieur. En revanche, lorsque le risque fusariose est important, il faut résolument opter pour des triazoles (tébuconazole ou metconazole) qui restent la solution la plus efficace sur les espèces de *Fusarium* toxinogènes (figure 21). Actuellement, les regards se portent vers la nouvelle strobilurine de Basf qui afficherait une efficacité sur l'ensemble des fusarioses de l'épi. Cette molécule est en phase d'homologation et devrait être commercialisée à l'automne 2005 (Gatel *et al.*, 2004).

Par ailleurs, Bayer développe une nouvelle triazole, le prothiconazole qui aurait une activité sur les *Fusarium* et sur *Michrodochium nivale*.

Rendements (q/ha), grains fusariés (%) et teneurs en DON (ppb) en condition naturelle après traitement au stade début floraison (Z61), 11 essais - 3 ans

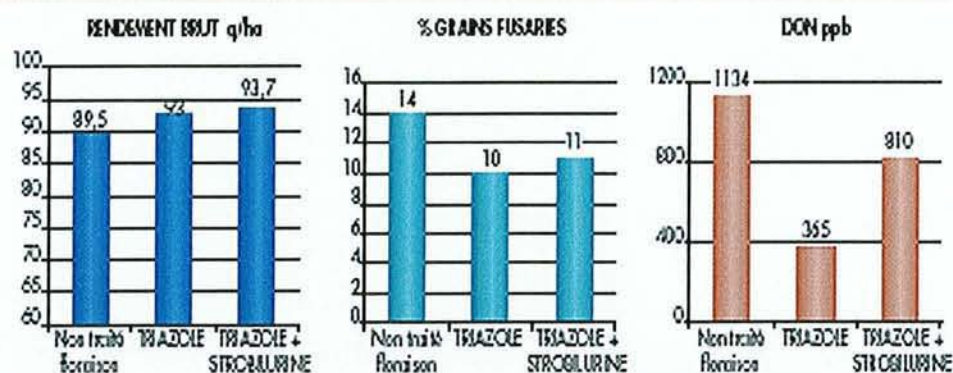


Figure 21 : Utilisation des antifongiques dans les situations à risque de fusariose (Gatel *et al.*, 2004)

La difficulté principale reste de savoir s'il est rentable de traiter spécifiquement contre les fusarioses de l'épi. En effet, les conditions climatiques sont déterminantes, sans compter qu'un fongicide n'empêche jamais complètement la contamination. Dans le meilleur des cas, les fongicides permettent de diviser par deux les attaques de fusarioses et les teneurs en mycotoxines. En outre, la fenêtre d'intervention est courte. L'expérience de 2003 en France a révélé qu'un traitement fongicide « fusariose » n'était pas toujours rentabilisé. En effet, le coût du traitement n'est pas forcément rentable par rapport à la perte de rendement dû aux développement de moisissures.

La perspective d'une réglementation « fusariotoxines » beaucoup plus stricte risque de changer considérablement le comportement des agriculteurs par rapport à l'utilisation des fongicides.

En effet, si leurs récoltes montrent des taux dépassant les futures limites en fusariotoxines, les récoltes devront alors être jetées. Les agriculteurs privilégieront sûrement alors un traitement fongicide.

2.5. Fertilisation

A l'évidence, la fertilisation peut affecter la fusariose des épis, mais deux hypothèses s'opposent quant à l'utilisation de fertilisants.

D'une part, la plupart des pratiques culturales visent à obtenir une bonne vigueur des plants. Des plantes plus faibles seront plus sensibles aux infections. L'augmentation de la fertilisation azotée sur culture de blé va généralement augmenter la croissance du peuplement végétal, sa teneur en azote, son nombre d'épis. Compte tenu du mode de contamination des épis par la fusariose, l'augmentation de la fertilisation azotée, en augmentant la densité du peuplement-épis, est susceptible de limiter l'atteinte des épis par les spores contaminantes, le feuillage plus dense constituant un obstacle physique à leur dispersion.

D'autre part, l'augmentation de la teneur en azote des tissus peut être un facteur d'aggravation des maladies cryptogamiques. Teich (1989) et Martin *et al.* (1991) ont observé que l'augmentation de la fertilisation azotée augmente à la fois l'incidence de la fusariose des épis mais aussi le nombre de grains infectés.

D'une manière générale, la fertilisation doit être équilibrée et l'apport d'azote doit être fractionné. La forme azotée a également son importance. Une culture de blé fertilisée à l'urée

montre moins de symptômes d'attaques que la même culture fertilisée avec des nitrates (Martin *et al.*, 1991 ; Teich, 1989 ; Site Internet n°9).

2.6. L'importance des interactions entre les facteurs à risques

Quand les 3 facteurs de risque principaux (techniques culturales simplifiées, précédent maïs et variété sensible à la fusariose) sont rassemblés la production de mycotoxines est importante (tableau 14), mais cela reste un cas peu courant dans la pratique.

Tableau 14 : Interaction des facteurs de risque
(d'après le Cahier de Recherche du CERAAP n°2, 2002)

Teneur en DON (en ppb)	285	371	451	597	623	1432	1883	4376
Techniques culturales simplifiées								
Précédent maïs								
Variété sensible à la fusariose								

Néanmoins, certains instituts agricoles ont mis en place des grilles de préconisations destinées aux agriculteurs. C'est ainsi que le SPV (Service de Protection des Végétaux) et ARVALIS-Institut du végétal en mai 2003, préconisent d'utiliser la grille de décision développée par ARVALIS-Institut du végétal comme outil de lutte prophylactique. L'avancée des connaissances a permis de réadapter cette grille de recommandations qui propose désormais une hiérarchisation des facteurs. Ainsi, tous les facteurs placés sur un même plan en 2003, sont maintenant pondérés par des coefficients. Elle permet d'ajuster les préconisations en terme de traitements fongicides avant que le climat n'intervienne vraiment. Dans tous les cas, la décision finale tiendra prioritairement compte du climat pendant la période épiaison-début floraison. Il est important de rappeler que le traitement fongicide est le seul levier qui permet d'intervenir en cours de culture.

Grille de décision fusariose sur blé tendre déclinée par ARVALIS - Institut du végétal, 2003

Potentiel infectieux				Note	Votre parcelle	Niveau de risque	
Cultures précédentes et travail du sol	Maïs grain ou sorgho	Non labour	7		10	Fort	
	Mais ensilage	Non labour	6		9		
	Maïs grain ou sorgho	Labour	5		8	Moyen à fort	
	Mais ensilage	Labour	4		7		
	Autres	Indifférent	0		6		
Effet variété						5	Faible à moyen
Sensibilité variétale	Sensibles, note Geves 2 et 3		3		4		
	Moyennement sensibles, note 4 et 5		1		3	Faible	
	Peu sensibles, note 6 et plus		0		2		
Note totale (Niveau de risque) =					1		
					0		

Si le risque est moyen ou fort (note totale > 5) : il aurait été souhaitable de modifier le système de culture pour revenir à un niveau de risque inférieur (ex : labour et/ou variété moins sensible). Il faut prévoir un traitement à base de triazole* utilisé seul à la floraison, efficace contre *Fusarium roseum* dans votre programme prévisionnel.

Si le risque est faible à moyen (note totale = 4 à 5), prévoir une protection fongicide à la floraison à base de triazole*, utilisé seul à 0,75 N minimum si l'objectif prioritaire est la qualité sanitaire, ou associé avec une strobilurine dans un objectif de rendement

Si le risque est faible (note totale < 4), pas de recommandation particulière a priori.

Attention, la décision finale de traitement devra tenir prioritairement compte du climat pendant la période épiaison-début floraison.

* Triazoles efficaces contre *Fusarium roseum* = produits à base de tébuconazole, metconazole, bromuconazole

De plus, certaines recommandations sont émises en fonction du type cultural rencontré.

Pour les céréales à paille, il est recommandé :

- d'éviter une rotation trop chargée en céréales et particulièrement en maïs ;
- en cas de travail du sol sans incorporation complète des résidus de plantes, il convient de ne pas cultiver du blé ou de la triticales après du maïs, ni de la triticales après du blé ;
- de ne pas utiliser de fongicide telles les strobilurines après le stade gonflement ;
- de surveiller régulièrement le champ au mois de septembre, date d'apparition possible des maladies. En cas d'apparition des premiers symptômes, il convient d'envisager une récolte précoce qui sera alors plus saine.

3. Méthodes de lutte après la récolte (Mycotoxines de champ et de stockage)

3.1. Introduction

La récolte et la collecte doivent être coordonnées. En effet, plus la récolte sera propre (pas d'impuretés, peu de grains cassés) et meilleure sera la qualité car les mycotoxines sont essentiellement concentrées dans les brisures, les poussières et débris de culture. Le rythme des chantiers de récolte et ceux de collecte et séchage doivent être synchronisés afin d'éviter le pré-stockage des grains qui peuvent devenir humides. L'intervalle entre la récolte et le séchage doit être inférieur à 24 heures. La ventilation adéquate permet d'empêcher le développement des toxines dans le silo.

3.2. Traitement des grains

Elimination à la récolte

A la récolte, le battage des grains permet l'élimination des grains les plus fusariés (contenant éventuellement les fusariotoxines) car ils sont plus petits. Ils sont rejetés au champ. Par ailleurs, le réglage des moissonneuses batteuses (écartement batteur et contre-batteur, choix des grilles, puissance du ventilateur...) doit être particulièrement soigné de manière à éliminer encore plus de grains échaudés et autres impuretés. De plus, le matériel de récolte doit être nettoyé après utilisation.

Nettoyage du grain

Il est fortement recommandé de nettoyer les grains avant ou après séchage. Ce nettoyage consiste à faire passer les grains entre des grilles qui éliminent les corps étrangers, les graines étrangères et les impuretés... Ces impuretés peuvent contenir des mycotoxines si le lot de départ était fusarié.

Traitements des grains stockés

Les grains stockés sont à refroidir. Effectivement, lors du stockage des grains, leur qualité sera d'autant mieux préservée qu'ils seront correctement séchés. L'humidité doit s'approcher de 15% dans le cas du maïs et dans le cas des céréales à paille, elle doit plus être faible (< 13%). Si la teneur en humidité est trop élevée, les grains doivent subir un séchage. Ils peuvent alors subir une ventilation séchante, c'est-à-dire avec de l'air réchauffé de quelques degrés la nuit. Une ventilation de refroidissement avec l'air ambiant est envisageable si le taux d'humidité est légèrement supérieur à la consigne, par exemple pour un blé comprenant des taux entre 14% et 16%. Outre son caractère séchant, la ventilation de refroidissement réduit le rôle préjudiciable des cadavres d'insectes qui peuvent constituer des points d'humidité favorables au développement fongique. Par ailleurs, le refroidissement permet aussi d'abaisser la température qui est un facteur favorable au développement des champignons.

Conjointement, une diminution des taux d'oxygène, d'azote et une augmentation du taux de dioxyde de carbone permettent de ralentir la croissance fongique.

De même, des traitements chimiques antifongiques comme les acides propioniques ou acétique (quand le taux d'humidité est trop élevé à l'entrée du silo) peuvent être utilisés ainsi que des conservateurs au cours du stockage. Les acides ne diminuent pas la quantité de toxines déjà présentes dans le grain, mais ils empêchent la croissance des moisissures.

3.3. Gestion des résidus de récolte

La préconisation la plus importante contre la fusariose des épis concerne la gestion des résidus de récolte.

Le travail du sol peut se réaliser, d'une manière générale, de plusieurs façons :

- **le labour**, pour lequel 10 à 30 cm du sol sont retournés,
- **les techniques culturales simplifiées (TCS)** dans lesquelles les débris de cultures sont mixés avec 10 à 20 cm de terre,
- **le semi-direct** où la graine est directement semée sur le champ où persistent les chaumes de la culture précédente (avec par conséquent un minimum de modifications de la structure du sol), (Edwards, 2004).

Le travail superficiel comme le semi-direct laissent en surface tous les résidus de culture et sont largement déconseillés. Obst *et al.* (1997) ont évalué que l'utilisation de techniques culturales simplifiées à la place du labour augmentait d'un facteur 10 les teneurs en DON d'une culture de blé succédant d'une culture de maïs. Le semi-direct après un maïs ou un blé augmente également significativement les teneurs en DON de la culture de blé suivante par rapport au labour. Cependant, le semi-direct n'a pas d'effet lorsque le précédent cultural est du soja.

Par contre, l'enfouissement des résidus est préférable. En effet, si les résidus portent des structures fongiques, leur enfouissement impliquera leur décomposition avant la culture suivante diminuant ainsi la pression sanitaire. De plus, il est conseillé de broyer finement les résidus avant incorporation dans le but de détruire les spores du ou des champignon(s). La technique sera d'autant plus efficace du point de vue agronomique, sanitaire et environnemental que l'enfouissement sera réalisé rapidement.

Le tableau 15 montre bien que le labour est préférable au semi-direct ou au TCS (techniques culturales simplifiées) avec des teneurs en DON quasiment diminuées de moitié pour le labour.

Tableau 15 : Effet du travail du sol par rapport à la quantité de DON dosé à la récolte sur 938 parcelles de blé. La moyenne des dosages est de 663 ppb, (d'après le Cahier de Recherche du CERAAP n°2, 2002).

EFFET DU TRAVAIL DU SOL	
Labour :	550 ppb
Semi-direct :	941 ppb
Techniques culturales simplifiées :	955 ppb

L'utilisation de pièges à spores permet d'affiner l'évaluation du risque de contamination. Dans la pratique, un aspirateur à spores détecte les périodes au cours desquelles la dispersion des ascospores est la plus dense. Utilisé pour la première fois à Boigneville en 2003, l'appareil a révélé que, la nuit, les vols de spores sont plus abondants. Les résultats, partiellement présentés sur la figure (figure 22), confirment l'importance de l'enfouissement des résidus.

Suite à une pluie, les projections d'ascospores sont systématiquement plus denses dans le cas d'un blé cultivé après maïs sans labour que dans le cas d'une terre labourée. Les observations visuelles et les dosages des mycotoxines alors réalisés confirment que les symptômes observés sont aussi moins nombreux et que les teneurs en DON sont plus faibles après enfouissement. Quant à l'effet du broyage en l'absence de labour, il peut avoir un effet considérable. Les teneurs en DON détectées sont plus de deux fois inférieures lorsque les résidus ont été broyés que dans le cas d'un travail du sol simplifié sans broyage. Le broyage des résidus est donc une technique à favoriser et à mettre en œuvre avec soin dans les systèmes sans labour (Gatel *et al.*, 2004).

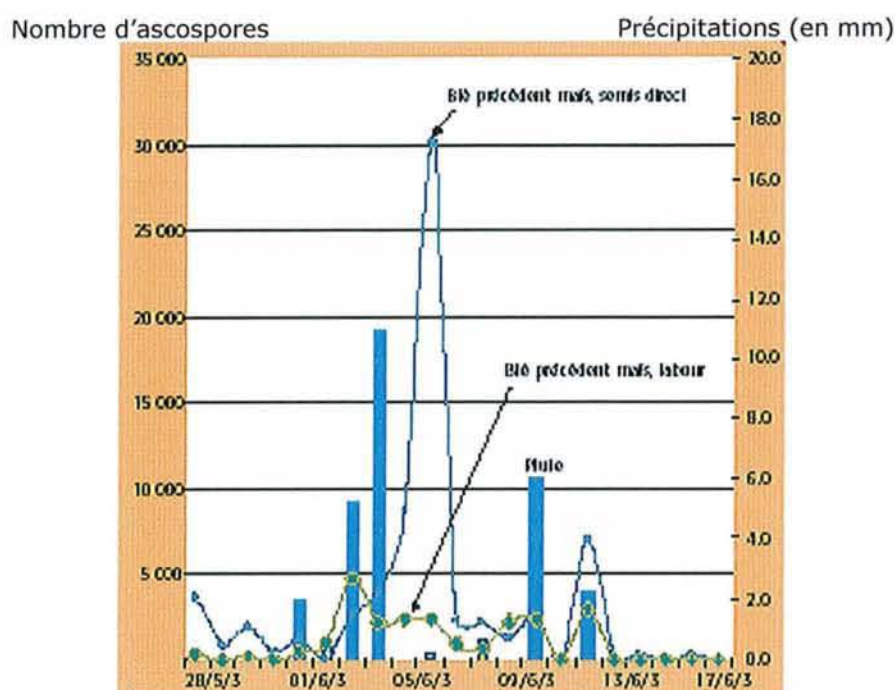


Figure 22 : Le travail du sol : un facteur déterminant (Gatel *et al.*, 2004).

3.4. Les techniques en développement

Actuellement, plusieurs techniques sont en phase de développement et/ou à l'étude afin de limiter d'une part les contaminations par *Fusarium*, mais aussi la production de fusariotoxines.

Des efforts sont réalisés en sélection génétique afin de renforcer la résistance des plantes à la contamination fongique (particulièrement à la fusariose) et de limiter la production de toxines. Cette sélection comporte des limites du fait que les symptômes et les teneurs en fusariotoxines ne sont pas forcément corrélés. Elle implique également que les variétés soient riches en composés inhibiteurs de la toxicogénèse.

D'autres travaux portent sur la conception et la production de plants transgéniques capables de résister à l'infection fongique, de limiter celle-ci ou de limiter la production de toxines.

La mise au point des semences contenant des bactéries endophytes susceptibles d'exclure les champignons toxinogènes et la préinfection des plants par des souches de moisissures non toxinogènes s'avèrent constituer des pistes intéressantes. Dans les deux cas, la présence de ces souches constitue une concurrence pour les souches toxinogènes du fait de l'occupation de l'espace sur les céréales.

Par ailleurs, les stratégies de lutte contre la pyrale, qui de manière indirecte favorise l'installation de *Fusarium*, sont en développement.

Enfin, des recherches sont effectuées sur des composés naturellement présents dans les céréales et susceptibles de moduler la croissance et/ou la toxino-génèse de *Fusarium* au champ, notamment les composés phénoliques.

4. Méthodes de lutte utilisées par les industriels

Actuellement, l'ensemble des recherches est principalement basé sur la sélection des matières premières les moins contaminées et sur les possibilités de diminuer les contaminations des différents aliments. La surveillance, la détection et la lutte contre les mycotoxines sur les produits transformés prêt à la consommation constituent également un enjeu important.

4.1. La prévention

La prévention passe obligatoirement par la surveillance de l'ensemble des maillons de la chaîne alimentaire, c'est-à-dire aussi bien au niveau de la transformation que de la distribution des denrées alimentaires. Afin de réaliser cette surveillance, des réseaux de laboratoires nationaux, d'experts se sont mis en place afin de réaliser divers tests à tous les niveaux possibles. Leur travail a été basé à l'origine sur la réalisation d'enquêtes auprès de diverses industries agroalimentaires, magasins,... afin de mettre en place des tableaux récapitulant la fréquence d'apparition des différentes mycotoxines et leurs taux. Actuellement, ces réseaux de laboratoires se sont tournés vers une demande plus appliquée avec par exemple, l'utilisation de biocapteurs. Ces derniers sont en fait la combinaison entre un composant biologique (micro-organisme, anticorps,...) et un transducteur (cellule électrochimique,...) permettant la détection et le dosage direct des mycotoxines (Site Internet n°10).

Une deuxième action de prévention consiste en des tests directement réalisés par les industries agroalimentaires qui vont contrôler les matières premières qu'elles utilisent, mais également réaliser de l'autocontrôle sur les produits finis.

Ces tests analytiques sont divers et variés et vont de simples tests rapides réalisés sur le terrain à des tests basés sur des analyses en laboratoire par des méthodes dites de références, certifiées par des laboratoires experts.

La prévention passe également par la mise en place d'une réglementation, avec par exemple des plans de surveillance mis en place au niveau de l'Union Européenne, mais aussi le vote de lois et le calcul de seuils de tolérance directement au niveau des autorités publiques de différents pays. Tout ceci sera détaillé dans la partie V consacrée à la réglementation.

Ces tests préventifs ne suffisent pas et c'est pourquoi des services spécialisés mais également les services internes aux industries agroalimentaires ont mis en place diverses méthodes de lutte contre les mycotoxines.

4.2. Moyens de lutte

De par l'hétérogénéité des structures des différentes mycotoxines, la décontamination reste une action difficile à réaliser. Ceci est renforcé par deux points. D'une part, le très bas poids moléculaire des mycotoxines (< 1000 d) augmente les difficultés de dégradation et d'autre

part, les méthodes d'élimination des micro-organismes, tel que le chauffage ou la stérilisation peuvent altérer les qualités nutritives des denrées alimentaires.

Malgré ces points négatifs, des méthodes ont tout de même été étudiées et mise en place afin de lutter contre ces contaminations qui constituent un danger pour l'homme et les animaux. Ces traitements visent à limiter les effets des mycotoxines. Trois sortes de méthodes sont utilisées à savoir des méthodes physiques, chimiques et microbiologiques.

4.2.1. Les méthodes physiques

Ces méthodes sont essentiellement destinées à limiter la présence des mycotoxines dans les matières premières. Ceci a déjà été abordé dans la partie "moyens de lutte aux champs et au cours du stockage". Malgré tout, quelques-unes s'appliquent aux produits transformés. Par exemple, les industriels peuvent ajouter des adsorbants capables de fixer les mycotoxines et ainsi réduire leur biodisponibilité. Cette méthode est souvent réalisée au niveau des rations des animaux destinés à la consommation et limitera les risques dus à la présence de résidus dans les produits animaux. Par exemple, l'ajout de Zéolites, qui sont des aluminosilicates hydrates, de cations alcalins peuvent fixer l'aflatoxine B1 et la zéaralénone.

En général, les adsorbant se lient avec les mycotoxines présentes dans les aliments et forment des complexes qui ne sont pas absorbés lors de la digestion. Mais, selon les adsorbants utilisés, des variations d'efficacité ont été constatées.

Une autre méthode physique est l'emploi de charbon actif. Il est obtenu par pyrolyse et activation de composés organiques. En fait, de par sa structure poreuse hétérogène, il va se lier aux mycotoxines.

L'utilisation de résines telles que le cholestyramine permet également de fixer les mycotoxines. Par contre, ces résines sont inorganiques et en plus de fixer des mycotoxines, elles pourront retenir d'autres composés tels que certains minéraux et vitamines indispensables (site Internet n° 10).

Enfin, la dernière technique physique est l'éradication des mycotoxines par les rayons gamma ou par traitement aux micro-ondes. Mais certaines mycotoxines comme les aflatoxines résistent à de tels traitements (Site Internet n° 10).

4.2.2. Les méthodes chimiques

Beaucoup d'agents chimiques tels que les acides, les bases (ammoniac, soude...), des agents réducteurs ou oxydants (bisulfites ou peroxydes d'hydrogène,...) ou encore des agents chlorés sont capables de dégrader ou de biotransformer les mycotoxines. Ces traitements chimiques restent tout de même axés sur le domaine de l'alimentation animal. Par exemple, l'ammoniac peut être utilisé sur les tourteaux afin de les détoxifier. Ce traitement est même considéré comme le traitement le plus sûr sur le plan international concernant la destruction des aflatoxines essentiellement (Site Internet n°10).

4.2.3. Les méthodes microbiologiques

Ces méthodes restent encore au plan expérimental en ce qui concerne la détoxification des aliments. Des recherches sont actuellement réalisées pour développer de nouveaux ligands naturels pour les mycotoxines. C'est le cas des glucamannanes qui sont issues de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces molécules semblent en fait capables de pouvoir fixer certaines mycotoxines du fait de leur grande surface d'échange. Ces

molécules possèdent donc une très forte capacité de liaison. Ainsi de tels ligands pourraient être utilisés dans l'alimentation animale et entraîneraient une réduction du taux de mycotoxines dans les produits finaux tel que par exemple le lait (Site Internet n°10).

4.2.4. Une méthode indirecte : le rôle positif des ruminants

Enfin, un dernier moyen de lutte contre la contamination des aliments est l'utilisation de produits issus de ruminants, qui en fait constituent un filtre contre les mycotoxines et ceci grâce au rumen et à la population microbienne qu'il contient.

Toutefois, cette barrière se limite au produit viande et laisse présent les dangers de contamination de produits tel que le lait (Site Internet n°10).

5. Conclusion

Les moyens de lutte utilisables par les agriculteurs et les organismes de collectes sont des méthodes relativement simples à mettre en oeuvre et n'engageant pas des coûts importants.

En ce qui concerne les denrées alimentaires, des moyens de décontamination et de réduction des taux en mycotoxines existent également. Malgré tout, ces processus restent onéreux et leur efficacité fait encore l'objet de débats.

Quoiqu'il en soit toutes ces méthodes n'aboutissent pas à l'éradication totale des toxines mais simplement à la réduction de leur taux. Cependant, il faut souligner que les recherches sur ces méthodes n'en sont qu'à leur début et ne cesseront d'évoluer ce qui laisse présager une amélioration de leur efficacité.

PARTIE IV :

La détection des mycotoxines

Dans un cadre de contrôle réglementaire, il est important de connaître les niveaux de mycotoxines dans les matières premières et notamment les céréales.

Ainsi, pour déterminer la contamination ou non d'un lot, il est nécessaire de déterminer la dose en mycotoxines qu'il contient. Pour ce faire, les échantillons doivent être analysés en laboratoire. Les différentes opérations nécessaires ne sont pas si évidentes. Ainsi, le résultat diffère souvent d'un laboratoire à un autre selon le type de mycotoxines. En plus du respect des critères habituels de linéarité et de sensibilité, ces méthodes de détection doivent présenter un degré de fiabilité élevé qui peut se mesurer par des paramètres de fidélité (tels la répétabilité et la reproductibilité). De même, il est nécessaire de vérifier l'adéquation entre le seuil de détection d'une méthode et les teneurs maximales tolérées. Il est également important de rappeler que tout résultat ne s'interprète qu'avec des informations sur l'état de l'échantillon analysé. Ainsi, un résultat sur grains provenant d'épis prélevés au champ n'a pas la même valeur que celui obtenu sur un échantillon de grains nettoyés après récolte.

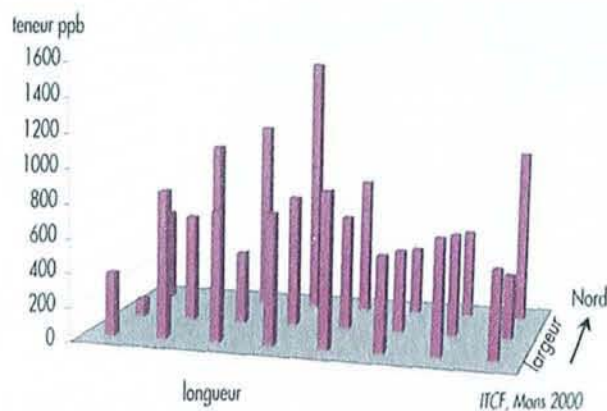
Certaines méthodes de détection peuvent être simplifiées pour une utilisation sur le terrain ou bien pour une analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons. Cependant, dans le cas d'obtention d'un résultat positif supposant une contamination de l'échantillon, il conviendra de confirmer les résultats obtenus par une méthode dite de référence, préconisée par un organisme officiel ou interprofessionnel. Certaines méthodes analytiques sont validées par essais interlaboratoires sur des échantillons contaminés naturellement ou par supplémentation à plusieurs taux. Lorsqu'une méthode est validée, elle peut être reconnue et normalisée par divers organismes officiels comme l'AFNOR (Association française de normalisation, Site Internet n°4). Le protocole analytique des méthodes normalisées est soigneusement rédigé dans un document type appelé norme.

Quelques techniques d'analyses relatives aux mycotoxines sont ainsi validées et normalisées ou en cours de l'être.

De plus, il est conseillé aux laboratoires effectuant des contrôles analytiques dans un cadre réglementaire d'être sous «assurance-qualité» suivant le référentiel EN 45001. En France, l'accréditation COFRAC (Comité Français d'Accréditation) peut également être obtenue par les laboratoires pour l'analyse de mycotoxines dont les méthodes sont inscrites dans le programme 99.1 : «Analyse de contaminants chimiques chez les animaux, dans leurs produits et les denrées alimentaires destinées à l'Homme ou aux animaux : Mycotoxines».

1. Les difficultés d'échantillonnage

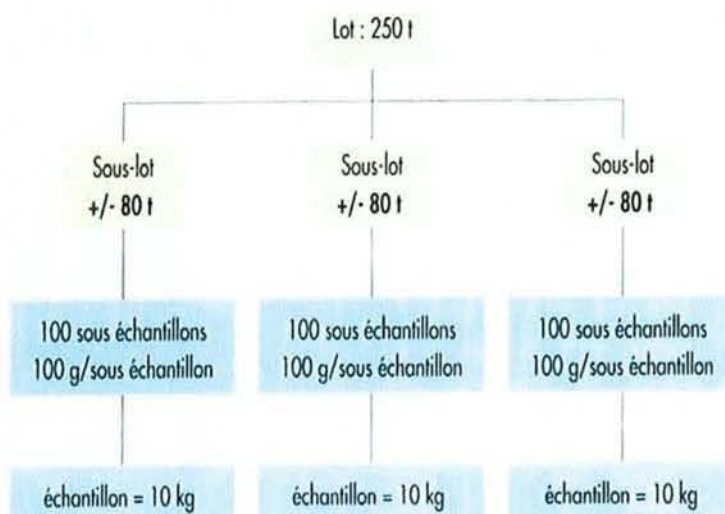
Etant donnée la grande variabilité des teneurs en mycotoxines au champ ou dans un lot (figure 23), la première difficulté consiste à obtenir un échantillon le plus représentatif possible. En effet, la majorité des erreurs de quantification des mycotoxines sont généralement dues à un mauvais échantillonnage (Grosjean *et al.*, 2002).



La teneur en DON d'une parcelle de 10 ha contaminée par les *Fusarium* peut varier de 100 à 1500 ppb selon les endroits.

Figure 23 : Variabilité de la teneur en DON au sein d'un champ de blé de 10 ha (Grosjean *et al.*, 2002)

Pour palier à cela, il est donc important d'établir des plans d'échantillonnage en constituant des sous-échantillons (figure 24).



Lot : quantité identifiable d'une denrée alimentaire livrée en un tout et caractérisée par des données telles que l'origine, la variété, le type d'emballage.

Sous-lot : part d'un grand lot en vue de lui appliquer une méthode d'échantillonnage. Chaque sous-lot doit être physiquement séparé et identifiable.

Sous-échantillon : quantité de matière prélevée à un endroit précis du lot ou du sous-lot.

Echantillon : ensemble des sous-échantillons, il est destiné à être analysé en laboratoire, il sera broyé dans sa totalité. La taille des échantillons est sans commune mesure (par exemple) avec la taille des échantillons destinés au dosage des protéines.

Figure 24 : Exemple de plan d'échantillonnage pour un lot de 250 t (Grosjean *et al.*, 2002)

Ainsi, un échantillon destinés à l'analyse doit impérativement être constitué de plusieurs prélèvements qui sont les sous-échantillons. Ces prélèvements peuvent se faire par un échantillonneur automatique ou manuellement mais sont variables selon les situations :

- lorsque le produit est en mouvement sur l'échantillonneur automatique, les prélèvements se font à des intervalles de temps dépendant du flux du produit,
- inversement, lorsque le produit n'est pas en agitation, les prélèvements sont effectués à différents points du contenant.

Par exemple, dans une trémie, une vis sans fin ou un échantillonneur automatique seront utilisées pour effectuer les sous-échantillons. Dans une remorque, un bateau ou un wagon, les prélèvements sont réalisés en "carotte" (c'est-à-dire depuis la surface jusqu'au fond de la couche de grains) par un échantillonneur cylindrique en plusieurs points.

L'échantillon est alors constitué par le mélange des sous-échantillons. Il est ensuite finement broyé et divisé. Le dosage portera sur la quantité recueillie à la suite de ces deux étapes (Grosjean *et al.*, 2002).

2. Les méthodes d'analyse et de quantification

Lorsque les mycotoxines sont présentes dans un lot, elles sont souvent à des teneurs très faibles. Ainsi, il est indispensable d'utiliser des méthodes de dosage extrêmement performantes. Ces méthodes peuvent donner des résultats quantitatifs (à quelle dose la mycotoxine X est-elle présente ?), des résultats qualitatifs (quelles sont les mycotoxines présentes dans ce lot ?) ou des résultats semi-quantitatifs (quelles sont les mycotoxines présentes et à quelle dose ?).

Les premiers paramètres d'analyse des mycotoxines sont la nature chimique de la mycotoxine, son poids moléculaire et ses groupes fonctionnels. Tous ces facteurs déterminent la volatilité et la solubilité de la mycotoxine ce qui permet une approche analytique de la toxine. Ensuite, plusieurs méthodes sont possibles. Elles diffèrent essentiellement par leur spécificité, leur sensibilité et leur rapidité.

Pour analyser des mycotoxines, habituellement présentes à l'état de traces dans les aliments et matrices complexes, il existe toute une panoplie de méthodes fondées essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules, puis de leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Les méthodes physico-chimiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie gazeuse (CPG) ou la chromatographie liquide haute performance (CLHP) permettent toujours la quantification des molécules. D'autres méthodes, de développement récent, utilisent le principe de l'immunoanalyse. Ainsi, les techniques immunochimiques de type ELISA autorisent suivant leur configuration, soit une détection de type présence ou absence (résultat qualitatif), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine. Toutes ces techniques nécessitent plusieurs étapes qui sont présentées sur la figure 25.

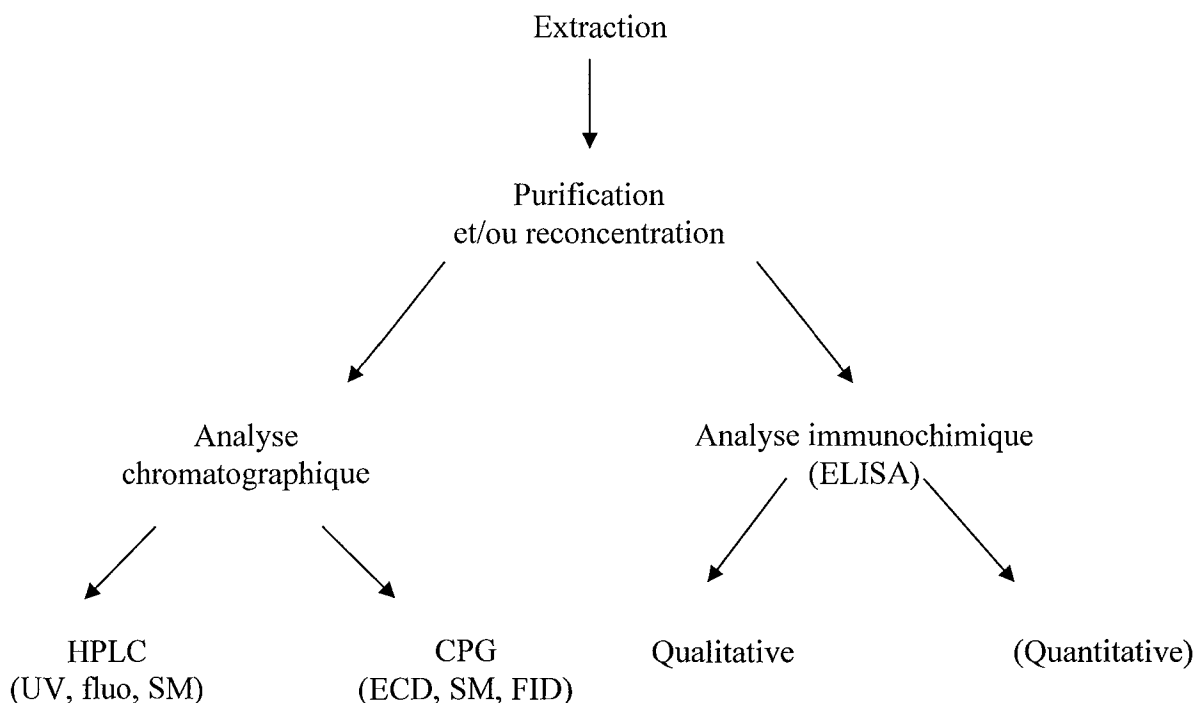


Figure 25 : Etapes du dosage d'une mycotoxine

(ECD) = Détecteur à capteur d'électrons
 (FID) = Détecteur à ionisation de flamme
 (SM) = Spectromètre de masse

Les techniques immunochimiques sont souvent qualifiées de rapides, car de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément, ou bien dites de terrain si leur utilisation est possible hors d'un laboratoire sans appareil de mesure particulier ou sophistiqué (lecture visuelle de certains tests). Enfin, quel que soit le type de méthodes utilisées, il est bon de pouvoir confirmer la nature de la mycotoxine décelée, surtout lorsque des contaminations d'échantillons au-delà de la limite maximale tolérée sont mises en évidence. Pour cela, il existe des méthodes physico-chimiques dites de confirmations permettant de donner rapidement la preuve de la nature de la mycotoxine.

2.1. Techniques physico-chimiques

L'emploi des méthodes physico-chimiques s'est largement répandu pour la recherche des mycotoxines. Ces méthodes ont fait l'objet au cours des deux dernières décennies d'un réel développement et existent en de nombreuses variantes. La chromatographie sur couche mince (CCM) permet le dosage de nombreuses mycotoxines (Betina, 1993), parfois simultanément, mais elle tend à disparaître progressivement au profit de méthodes plus complexes comme la chromatographie liquide haute performance (CLHP), (Frisvad et Thrane, 1993). Cette dernière a comme avantage principal un gain appréciable en détectabilité, sensibilité, spécificité et en automaticité. Il existe de nombreux protocoles de CLHP destinés à la recherche des mycotoxines les plus préoccupantes et applicables aux matrices (denrées) les plus surveillées. La CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse), ne connaît quant à elle qu'un développement limité, car elle nécessite de volatiliser la molécule. En revanche, la CPG peut facilement être couplée avec la spectrométrie de masse, ce qui permet d'accéder, sans

ambiguïté, à l'identification de la mycotoxine ou d'un de ses dérivés. La CPG est surtout utilisée pour la détermination des trichothécènes, en particulier la vomitoxine (Scott, 1993).

2.1.1. Principe des techniques de séparation chromatographique

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

- broyage et homogénéisation de l'échantillon
- extraction des mycotoxines du substrat par un solvant organique approprié à la molécule
- purification et concentration de la solution par extraction en phase solide ou par sélection de la toxine grâce à une colonne "d'immunoaffinité" dont la principale caractéristique est de contenir l'anticorps spécifique de la mycotoxine
- séparation des molécules recherchées par chromatographie liquide ou gazeuse
- détermination quantitative : il y a deux cas dans cette étape :
 - si la mycotoxine n'a pas de spectre caractéristique dans l'ultraviolet et/ou n'est pas fluorescente, alors il faut effectuer une dérivation (procédé rendant une molécule détectable) pour la quantifier :
 - la Chromatographie en phase Gazeuse (CPG) est couplée à 3 types de détecteurs :
 - ✓ Détecteur à capteur d'électrons (ECD) : cas des mycotoxines DON et Nivalénone
 - ✓ Détecteur à ionisation de flamme (FID)
 - ✓ Spectromètre de masse (SM) : permet une bonne analyse discriminatoire des toxines
 - ou la Chromatographie Liquide à Haute Pression (CLHP) : Zéaralénone, Fumonisine B1, DON, Aflatoxines...
 - inversement, si la mycotoxine présente un spectre caractéristique dans l'UV ou est fluorescente dans certaines conditions de pH, de polarité..., la quantification peut s'effectuer directement en CLHP (Patuline et Citrinine, Aflatoxine M, Ochratoxine A).

Le couplage d'une extraction adaptée, d'une purification par les anticorps de l'extrait, d'une séparation chromatographique, d'une dérivation ciblée ou une détection sélective permettent d'atteindre un niveau de spécificité optimal pour une quantification fiable (Maupetit, 1999).

2.1.2. Avantages

Les méthodes chromatographiques permettent de détecter spécifiquement de faibles quantités de mycotoxines, et ce, sans trop de limitations sur le type d'échantillon. En effet, leurs champs d'application sont très larges, ce qui fait que n'importe quelle matrice peut être analysée, depuis les productions agricoles jusqu'aux produits finis, que ce soit dans l'alimentation humaine ou animale.

La chromatographie est très intéressante pour valider des résultats obtenus par d'autres méthodes. Elle est plus spécifique et les interférences sont moindres. Il n'y a aucun risque de faux positifs (résultat positif alors que la molécule est absente) ni de faux négatifs (molécule présente mais non détectée) contrairement à la méthode ELISA.

Lors d'une analyse en CPG par spectromètre de masse (SM), il est possible de détecter et de quantifier jusqu'à neuf mycotoxines grâce à l'analyse dite "multitrichothécènes" (détection de plusieurs mycotoxines de la famille des trichothécènes comme le DON).

2.1.3. Limites

Les coûts sont élevés car l'appareillage de haute technicité représente un investissement très coûteux. De plus, les manipulations demandent une maintenance qualifiée.

La durée des analyses et le volume important de solvant nécessaire sont autant de facteurs contraignants qui entraînent un délai de une à deux semaines pour l'analyse de l'échantillon (Grosjean *et al.*, 2002).

2.2. Techniques immunochimiques et techniques rapides

Les techniques immunochimiques reposent sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé vers la mycotoxine recherchée (Candlish, 1991 ; Chu, 1995). Ces anticorps fixés sur un support inerte (tubes ou puits de plaque de micro-titration en polystyrène, billes de verre, membrane) auront pour fonction de capter les molécules de mycotoxine éventuellement présentes dans le milieu réactionnel où une réaction de type antigène-anticorps pourra s'effectuer. Suivant la configuration du test qui sera mis au point, l'ajout d'un système enzymatique, en général couplé à un second anticorps (conjugué) capable de catalyser la transformation d'un substrat chromogène, permettra de colorer le milieu réactionnel. La densité de la coloration mesurée par photométrie ou appréciée par lecture visuelle sera proportionnelle ou bien inversement proportionnelle (suivant la configuration du test) à la quantité de mycotoxines contenues dans l'échantillon. Les techniques immunochimiques de dosage ou de dépistage s'utilisent en général selon des protocoles d'analyse d'exécution simple sur un grand nombre d'échantillons à la fois.

2.2.1. Principe des analyses par tests immunoenzymatiques : Méthode ELISA

Les différentes étapes indispensables pour une quantification par la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno-Adsorbent Assay) sont les suivantes :

- séparation de l'échantillon : broyage et homogénéisation,
- extraction de la molécule par un solvant approprié (souvent du méthanol). Cette étape est indispensable mais pénalisante en temps car elle nécessite souvent des dilutions pour ramener la concentration en solvant à des teneurs tolérables par les systèmes enzymatiques mis en jeu,
- grâce aux anticorps, les toxines présentes seront fixées à une membrane. Comme les mycotoxines ne sont pas de nature protéique, elles devront être couplées à une protéine pour être antigéniques,
- ensuite, un réactif se fixant sur les anticorps restants libres de la membrane est ajouté. Après une étape de lavage permettant d'éliminer les molécules non fixées, un dernier réactif est ajouté : le substrat. En présence du conjugué, il est transformé en produit coloré.

La coloration signifie que la toxine recherchée dans l'échantillon est non détectée et inversement : l'absence de coloration signifie la détection. La quantification de la mycotoxine par la réaction anticorps-antigène se fait en fonction de la concentration en colorant.

Pour une bonne quantification du dosage, les laboratoires d'analyses ont construit à partir de molécules pures des courbes d'étalonnage donnant la densité optique (couleur) en fonction de la concentration de la mycotoxine.

L'élaboration des courbes de référence se fait comme pour n'importe quelle courbe : elle se tracera au moyen de trois points de référence. Le point zéro correspond au témoin qui est à concentration nulle, le second point représente une concentration faible et le dernier point une concentration forte en mycotoxines.

Ces deux derniers points permettent de délimiter la plage effective des dosages. Ainsi, lorsque la couleur obtenue pour un échantillon est en dehors des limites, cet échantillon devra être dilué s'il est trop concentré ou il indiquera seulement la présence à l'état de trace des mycotoxines si celui-ci est trop coloré.

2.2.2. Tests rapides de détection immunoenzymatiques

Les trousseaux ou kits de dosage immunoenzymatiques constituent aujourd'hui la pierre d'angle des tests rapides de détection immunoenzymatiques du déoxynivalénol et d'autres mycotoxines dans les matières premières.

Les trousseaux de dosage permettent une détermination de la teneur en mycotoxines par test ELISA de type direct ou indirect. Elles permettent, selon les kits, d'effectuer une analyse qualitative (comparaison de la couleur de l'échantillon avec celle d'un standard), semi-quantitative (comparaison de la couleur de l'échantillon par rapport à une gamme de standards), ou quantitative (mesure de la densité optique et comparaison à une courbe d'étalonnage donnant la concentration correspondante).

En général, elles se composent d'une plaque de micro-titration en polystyrène, sécable ou non, de 96-puits au fond desquels sont fixés de façon covalente les anticorps ou les conjugués mycotoxine-polypeptide. Ces trousseaux de dosage permettent l'établissement d'une gamme étalon (photographie 10).



Photographie 10 : Présentation d'un kit (Raimbault et Zin, 2005)

Malgré la nécessité d'effectuer une extraction et une purification de la mycotoxine à partir des échantillons, ces tests se réalisent en 3-4 h avec une limite de dosage en général inférieure au ppm. Il en est ainsi des trousse *Ridascreen* pour l'aflatoxine, l'ochratoxine A, la zéaralénone, la toxine T-2, la vomitoxine ou encore les fumonisines garantissant des limites de détection de 0,62 ppm ; 0,10 ppm ; 100 ppm ; 5 ppm ; 1,25 ppm ; 2,25 ppm respectivement (Trucksess *et al.*, 1989).

De type intermédiaire, certaines trousse de diagnostic utilisant des puits de micro-titration ou des tubes sont dites semi-quantitatives car elles donnent une évaluation de la teneur par comparaison à une carte de «standards» (étalons) fournie avec la trousse. De ce fait, une estimation de la teneur se fait en considérant la fourchette des teneurs entre lesquelles semble se situer l'intensité de coloration due à la présence de la mycotoxine dans l'échantillon analysé.

Des résultats très irréguliers entre les différents kits et entre différents niveaux de concentrations testés avec ces kits, ont été observés. De plus, les valeurs de la contamination en DON sont surévaluées par tous les kits, notamment aux valeurs proches de 1000 ppb.

La raison principale de cette surévaluation provient de la non-spécificité des kits de dosage pour le DON. Les anticorps utilisés ne sont pas assez spécifiques et fixent le DON et ses dérivés (coexistants à l'état naturel et de structures moléculaires très proches) sans les différencier.

En dosant une solution synthétique d'une concentration de 1000 ppb en DON, 3-DON, 15-DON et NIV, la concentration en DON évaluée est au moins 6 fois supérieure à sa valeur réelle, prouvant ainsi les réactions croisées des dérivés.

Les kits ELISA pour le dosage du DON sont donc non spécifiques. Cela entraîne une surévaluation des concentrations. Ils semblent donc totalement inappropriés au dosage quantitatif. Cependant, ils peuvent néanmoins être utilisables en tant que méthode de screening. En exploitant cette tendance à surévaluer, les échantillons estimés en dessous de la valeur maximale admissible de concentration peuvent être acceptés tandis que les échantillons au-dessus devront être retestés par une méthode plus précise (CLHP, CPG).

2.2.3. Avantages

Les tests ELISA sont des analyses qui demandent un délai court de 3 à 24 heures pour doser les mycotoxines grâce à la préparation rapide des échantillons.

La méthode ELISA est un bon compromis entre le coût, la vitesse et la sensibilité. Toutefois l'utilisation de cette technique est surtout limitée à des produits relativement homogènes.

2.2.4. Limites

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

Les tests ELISA sont relativement fiables en ce qui concerne la détection mais ils doivent être appliqués dans des mesures très précises car il peut exister des faux positifs. Une notion importante est celle de réaction croisée : les anticorps mis au point par les fabricants garantissent rarement une spécificité totale pour une mycotoxine donnée.

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

La limite de détection est variable selon la toxine recherchée : elle est de l'ordre du µg/kg pour les tests les plus sensibles. L'expression ppm ou ppb est utilisée.

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

2.2.5. Comparaison entre les techniques immunoenzymatiques et les techniques de séparation chromatographique

Une différence de prix non négligeable entre les deux méthodes est à noter. La méthode ELISA se caractérise par un faible coût. En intégrant le prix des plaques, des réactifs, du détecteur, et de la main d'œuvre, le coût d'une analyse ELISA varie de 12 à 30 € selon que l'on souhaite une réponse du type présence-absence ou une réponse quantitative. A titre indicatif, une analyse par chromatographie varie entre 90 et 230 €.

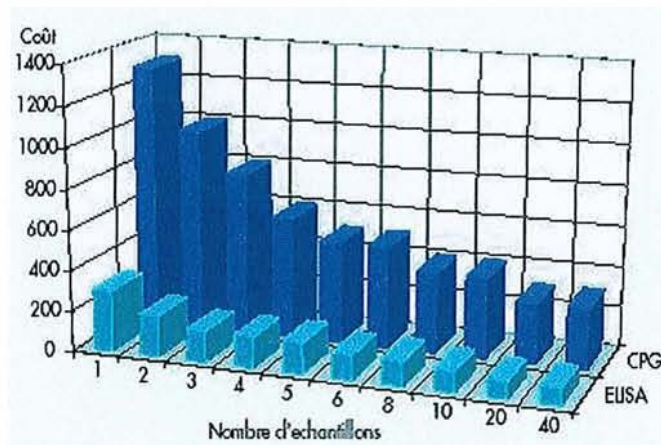


Figure 26 : Comparaison des coûts ELISA – CPG, (Maupetit, 1999)

Néanmoins sur cette figure, nous remarquons que la différence de prix entre les deux méthodes s'atténue avec l'augmentation du nombre d'échantillons soumis à analyse (figure 24).

Les méthodes immunoenzymatiques de type ELISA sont des méthodes alternatives aux méthodes conventionnelles. Une méthode ELISA peut être validée par un organisme certificateur et ainsi reconnue, si certains points indispensables sont satisfaits. Ces points de qualité sont par exemple, la spécificité du test, l'exactitude de la valeur trouvée, la sensibilité du test, le seuil de détection, le seuil de quantification...

Les tests ELISA ont tendance à surestimer les résultats par rapport aux tests chromatographiques. La cause principale de cette surestimation est due au manque de spécificité du test immunoenzymatique du fait d'une réactivité avec des produits apparentés ou non à la molécule dosée.

2.3. Technique de biologie moléculaire : le test Tri 5

Un test destiné à évaluer le potentiel toxigène d'un lot de blé est actuellement en cours de mise au point. Il est appelé *Tri5* du nom du gène qu'il détecte.

2.3.1. Principe général

La voie de biosynthèse des trichothécènes est actuellement en grande partie connue.

Le gène *Tri 5* qui code pour la synthèse de la trichodiène synthase a pu être identifié et séquencé. Il intervient en amont de la biosynthèse des trichothécènes. Sa présence indique que la souche dans laquelle il a été détecté est potentiellement productrice de mycotoxine (Barchietto *et al.*, 2002).

Cependant, une souche peut être « *Tri 5* + » et « mycotoxine – » au moment de l'analyse. Par anticipation, la connaissance du potentiel toxigène de la souche peut permettre une meilleure gestion et orientation des lots de blé notamment.

2.3.2. Principe de la méthode

Tout d'abord, l'ADN fongique est extrait à partir de grains de blé. L'amplification génique de *Tri 5* est ensuite réalisée. La détection de ce gène se fait alors par électrophorèse. Il apparaît des bandes d'amplification d'intensités différentes repérables sur plusieurs analyses d'un même échantillon.

- Si *Tri 5* n'est pas détecté, c'est que la trichodiène synthase est absente. Il n'y aura donc pas de production de trichothécènes.

- Si *Tri 5* est détecté. Il y aura un risque de production de trichothécènes (Barchietto *et al.*, 2002).

La méthode *Tri 5* est une méthode d'évaluation du risque trichothécènes lors de la récolte. Elle n'est pas concurrente des autres méthodes mais complémentaire car elle mesure un potentiel (test prédictif) alors que les autres techniques mesurent l'expression même de ce potentiel.

Ce test est plus rapide que les tests microbiologiques. Il ne détecte que les souches potentiellement productrices de trichothécènes. Il évalue un risque de production de trichothécènes et non la présence des mycotoxines, ces dernières pouvant être présentes au moment de l'analyse, synthétisées plus tard au cours du stockage ou jamais produites.

3. Les techniques de dosage des fusariotoxines

3.1. Dosage de la zéaralénone

3.1.1. Méthodes de dosage

Le dosage de la zéaralénone peut se faire par CCM. La zéaralénone se prête également bien au dosage par CPG (Scott, 1993 ; Schwadorf et Müller, 1992), mais aussi au dosage par CLHP. La détection peut s'effectuer par UV ou mieux par fluorescence (Frémy *et al.*, 1985 ; Langseth *et al.*, 1989).

Des méthodes normalisées existent (norme NF V18-201 de mars 1986, intitulée : Aliments des animaux - Dosage de la zéaralénone (Indice de classement : V18-201)).

Il existe également la norme ISO 6870 : 2002 d'avril 2002 (Aliments des animaux - Dosage qualitatif de la zéaralénone).

3.1.2. Analyse de la zéaralénone dans les produits d'origine végétale

La méthode de Frémy *et al.* (1985) est une méthode simplifiée de dosage de la zéaralénone des céréales (orge, avoine, aliments composés pour animaux) et du maïs. Cette méthode a

l'avantage de comporter une étape d'extraction qui convient pour un dosage ultérieur par CCM ou bien par CLHP. La limite de détection est d'environ 20 µg/kg par CCM et 10 µg/kg par CLHP.

3.2. Dosage des trichothécènes

Les trichothécènes représentent une grande famille de mycotoxines et la présence concomitante de plusieurs de ces composés dans les céréales ou le maïs est courante. La tendance est donc de privilégier la multidétection analytique, ce qui est plus difficile à obtenir en CLHP qu'en CCM. Par ailleurs, comme signalé plus haut, cette famille de mycotoxines peut facilement être détectée par CPG et de nombreuses études ont été menées grâce à cette technique (Scott, 1993 ; Furlong et Valente-Soares, 1995 ; Porcher *et al.*, 1987).

Pour une détection très sensible des trichothécènes par CLHP, il est indispensable de les dériver en composés fluorescents. Lauren et Agnew, (1991) proposent une technique qui implique une hydrolyse des trichothécènes en leurs dérivés alcooliques, ce qui rend ainsi possible la quantification simultanée du DON et du nivalénol. Cohen et Boutin-Muma, (1992) ont décrit une autre technique de dosage des toxines T-2, HT-2, T-3 et T-4, qui comprend une dérivation pré-colonne par le chlorure de coumarine 3-carbonyl, dont la synthèse est à effectuer en laboratoire, suivie d'une séparation isocratique par CLHP et d'une détection par fluorescence. Cependant, cette méthode appliquée au dosage d'échantillons de céréales n'a pas encore été publiée.

L'analyse de la vomitoxine peut également s'effectuer par CCM (Trucksess *et al.*, 1991) mais une technique simple pour la recherche de la vomitoxine par CLHP a été décrite par Trucksess *et al.* (1996). Elle s'applique à des matrices comme la farine et le son de blé.

En ce qui concerne le dosage de la T2-Toxine, de nombreuses méthodes sont utilisables : par exemple des méthodes chimiques (CCM, CPG-SM) ou encore des méthodes biologiques basées sur les très importantes propriétés dermo-nécrosantes de la T2-Toxine (bio-essai sur souris ou rat). Ces méthodes souffrent cependant d'une insuffisance de spécificité ou de sensibilité (bio-essai, CCM) ou de leur difficulté de mise en oeuvre (CPG-SM).

3.3. Dosage des fumonisines

3.3.1. Méthodes de dosage

Parmi les techniques conventionnelles de dosage des fumonisines la chromatographie, après purification sur cartouche échangeuse d'ions et dérivatisation à l'o-phthaldialdéhyde et détection en fluorescence, occupe une place de choix.

3.3.2. Analyse des fumonisines dans les produits d'origine végétale

Les fumonisines ne sont détectables ni en UV-visible, ni par fluorescence. Pour les identifier, il faut les dériver avec des groupements chromophores ou fluorescents ; ces derniers sont les plus utiles pour abaisser la limite de détection. La fluorescamine (Sydenham *et al.*, 1990), le 1-fluoro 7-nitrobenzofurazane (Scott et Lawrence, 1992) et l'ortho-phthaldialdéhyde (OPA) (Shephard *et al.*, 1990) ont été expérimentés avec succès. La méthode à l'OPA est très utilisée et a été modifiée afin de pouvoir co-analyser les trois fumonisines (B1, B2 et B3) (Sydenham *et al.*, 1992).

3.3.3. Statut de la méthode et champ d'application

La méthode de Sydenham *et al.*, (1992) a été reprise par les mêmes auteurs (Sydenham *et al.*, 1996) et moyennant des modifications mineures a subi un nouvel exercice de validation interlaboratoires. Il en résulte que cette méthode est recommandée pour la détermination des fumonisines B1, B2 et B3 dans le maïs pour des teneurs respectives de 0,5-8 mg FB1/kg, 0,2-3,2 mg FB2/kg et 0,8-12,8 mg FB3/kg.

4. Conclusion

Les différences principales entre les techniques immunoenzymatiques et les techniques chromatographiques sont donc le coût, la sensibilité et le temps nécessaire aux analyses. Les caractéristiques des différentes techniques analytiques de dosage des mycotoxines sont résumées et comparées dans le tableau 13.

Tableau 13 : Comparaison des techniques analytiques

	Sensibilité	Spécificité	Avantage	Inconvénient
CLHP/FLUO	****	**	Sensibilité	Dérivation Purification
CLHP/UV	**	**	Pas de dérivation	Peu spécifique Purification
ELISA	***	*	Coût	Peu spécifique
CCM	*	*	Simple	Peu sensible Peu spécifique
CPG/SM	**	***	Sensibilité	Dérivation Purification
CLHP/SM/SM	****	****	Sensible Spécifique	Coût appareil

Les méthodes d'analyse utilisées au CERA AF pour doser différentes mycotoxines dont les fusariotoxines, ainsi que les matrices sur lesquelles peuvent se réaliser les différentes analyses, sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Dosage des mycotoxines au CERA AF,
d 'après le Cahier de Recherche du CERA AF n°2,
2002.

MYCOTOXINES	MÉTHODE D'ANALYSE		MATRICE
	Préparation de l'échantillon	Dosage	
Aflatoxines B1,B2,G1,G2	Protocoles normalisés spécifiques (extraction, purification, concentration...)	HPLC: -colonne: C18, phase inverse -détection: fluorimétrie (de la molécule dérivée)	Céréales, fruits à coque et produits dérivés (arachide, maïs, sorgho)
Fumonisine		HPLC: -colonne: C18, phase inverse -détection: fluorimétrie	Céréales et produits dérivés (maïs, orge, blé, avoine)
Ochratoxine A		HPLC: -colonne: C18, phase inverse -détection: fluorimétrie	Céréales et produits dérivés (maïs, orge, blé)
Patuline		HPLC: -colonne: C18, phase inverse -détection: UV/Visible	Jus de pomme et pro- duits dérivés
Vomitoxine (DON=déoxynivalénol) famille des Trichothécènes		HPLC: -colonne: C18, phase inverse -détection: UV/Visible	Céréales et produits dérivés (maïs, orge, blé tendre, blé dur, avoine)
Zéaralénone		HPLC: -colonne: C18, phase inverse -détection: fluorimétrie	Céréales et produits dérivés (maïs, blé, sor- gho)

Actuellement, dans le domaine des contrôles de la qualité sanitaire des matières premières ou des produits finis, les méthodes immunoenzymatiques sont largement utilisées pour repérer les lots suspects c'est-à-dire susceptibles de dépasser les limites maximales admissibles. Les résultats des échantillons "positifs" seront confirmés par des méthodes chromatographiques. Toutes ces analyses nécessitent du temps mais sont également très onéreuses. Avec les exigences de plus en plus grandes des consommateurs et de la réglementation, les besoins en analyses rapides vont aller grandissant pour répondre aux cahiers des charges et à la nécessité de suivre la marchandise au cours du temps.

Demain, la recherche mettra peut-être aux service des professionnels de l'agroalimentaire des outils performants et fiables dérivés des méthodes immunoenzymatiques. Des "biocapteurs" seront créés et auront l'avantage d'être portables, d'un usage simple et rapide.

Par ailleurs, l'avènement des techniques de biologie moléculaire permettra certainement de développer les tests "prédictifs" tel le test *Tri 5*. Ce test *Tri 5* permet de détecter un gène nécessaire à la production de mycotoxines. Cependant, la présence de ce gène ne permet pas d'affirmer si la moisissure produira ou non des toxines car l'expression de ce gène n'est ni détectée, ni quantifiée. L'avenir sera donc de développer des tests détectant et quantifiant les ARN messagers issus de la transcription de gènes nécessaires à la production de toxines et ainsi détecter les souches de moisissures risquant de produire de grande quantité de mycotoxines.

PARTIE V :

La réglementation des Fusariotoxines

1. Les Fusariotoxines présentes dans les céréales destinées à l'alimentation

1.1. Le DON

Compte tenu de la très forte hétérogénéité des teneurs en DON des grains au niveau des parcelles de céréales, il est illusoire de penser caractériser globalement la récolte d'un pays producteur à partir de quelques analyses et encore moins d'obtenir "la" valeur moyenne nationale de l'année.

Cependant, en considérant de grands ensembles géographiques, une moindre contamination en Europe occidentale est observée par rapport à la contamination en Amérique du Nord ou en Amérique du Sud.

Pour notre pays, il existe une grande disparité suivant les années. Il y a une moindre contamination les années à faible attaque fusarienne par rapport aux années à fusariose de l'épi plus généralisée (Leuillet, 2002).

En se reportant à des analyses réalisées sur des échantillons de grains de blé tendre représentant des mélanges de lots de la même région et de la même variété (enquêtes annuelles ONIC, Office National Interprofessionnel des Céréales / Arvalis, Institut du végétal), les contrastes annuels sont assez bien identifiés : en 2000, année "avec fusariose", et sur un total de 81 échantillons issus de plus de 1 200 parcelles, 16% des échantillons sont dépourvus de DON et 97,5 % ont des teneurs inférieures à 1000 µg/kg ; en 2001, année "sans fusariose", sur un total de 72 échantillons issus de 1230 parcelles, 67 % sont indemnes de DON (valeur inférieure à la limite de détection de la méthode) et tous montrent des teneurs inférieures à 750 µg/kg. Concernant l'orge brassicole, la situation se caractérise respectivement en 2000 et en 2001 par 64,1% et 97,5 % des échantillons sans DON.

1.2. La zéaralénone dans les aliments à base de céréales

Aux États-Unis, une enquête a montré un assez faible taux de contamination du maïs de l'ordre de 3 % de la récolte à des concentrations comprises entre 0,2 et 0,5 µg/kg (Eppley *et al.*, 1974). En revanche, une étude réalisée au Canada entre 1978 et 1980 sur du maïs destiné à la consommation humaine a permis de constater que 28 % des 81 échantillons contenaient de la ZEA à des concentrations comprises entre 0,01-0,5 µg/kg (IARC, 1993). Il n'est donc pas surprenant que la ZEA soit retrouvée, même à faible concentration, dans les produits alimentaires dérivés. Ainsi, elle a été mise en évidence dans la nourriture à base de céréales destinées à l'homme à des concentrations pouvant atteindre 289 µg/g (Kim *et al.*, 1993 ; Yuwai *et al.*, 1994). Le laboratoire interrégional de Rennes a également analysé le taux de contamination de quelques denrées à base de maïs telles que des produits céréaliers pour petits déjeuners (pétale de maïs, maïs soufflé. ..), céréales infantiles à base de maïs, semoule de maïs et amidon de maïs (Herry, 1995 ; Herry et Lemétayer, 1996). En 1995, dix-neuf échantillons ont été analysés par CLHP avec détection en fluorimétrie (tableau 15). En 1996, le dosage de la zéaralénone a été effectué par technique d'immunoaffinité sur 115 produits (tableau 16).

Tableau 15 : Taux de zéaralénone dans des denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine d'après Herry, (1995).

Type d'échantillons	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Limite de détection en $\mu\text{g/kg}$	Résultats en $\mu\text{g/kg}$
Petits-déjeuner	9	1	3	4
Céréales infantiles	2	1	3	4
Semoule de maïs	2	2	3	3 et 16
Amidon de maïs	2	0	3	-
Gâteau apéritif	4	0	20	-

Tableau 16 : Taux de zéaralénone dans des denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine d'après Herry et Lemétayer, 1996

Type d'échantillons	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Limite de détection en $\mu\text{g/kg}$	Résultats en $\mu\text{g/kg}$
Petits-déjeuner	75	2	5	14
Farine, semoules et amidon	18	10	5	16.3
Céréales infantiles	14	0	5	-
Divers	8	1	5	66

Onze pour-cent des échantillons analysés sont positifs. La catégorie constituée par des farines de maïs, fleur de maïs, polenta est contaminée par la ZEA dans 56 % des cas. Deux échantillons de corn flakes et un échantillon de maïs grillé salé, destiné à l'apéritif, renfermaient 66 $\mu\text{g/kg}$ de ZEA. Quatre échantillons sur 19 sont positifs. Cependant la méthode d'extraction n'est pas assez performante pour analyser les produits sucrés, épicés ou à teneur en matière grasse élevée.

1.3. Les fumonisines dans les aliments à base de céréales

Les niveaux de contamination des aliments à base de céréales en Europe sont similaires, voire légèrement plus faibles qu'aux États-Unis, exception faite de l'Italie pour laquelle la contamination est plus importante (Bullerman, 1996).

Le plus fort taux revient (outre les graines) aux farines et aux gruaux. A moindre degré (de 0,01 à 0,08 $\mu\text{g/g}$), le pop-corn, le maïs doux et le maïs concassé ou bouilli sont contaminés de manière sporadique. En revanche, les tortilla chips, les corn flakes et les chips de maïs ne contiennent pas de quantité de FBs décelable. En fait, les plus fortes quantités se trouvent

dans les grains et les produits ayant subi des transformations douces, comme les grains soufflés (Bullerman, 1996).

Bullerman (1996) indique également quels sont les aliments les plus touchés dans différents pays :

- en Suisse, les plus forts taux se trouvent dans les aliments à base de maïs et les gruaux de maïs ;
- en Italie, les plus fortes concentrations concernent le maïs soufflé, la polenta, les farines et les gruaux de maïs ;
- en Allemagne, la semoule de maïs importée d'Italie est la plus contaminée ;
- en Espagne les contaminations sont très faibles.

Shephard *et al.* (1996) ont pu évaluer l'exposition des populations de trois pays aux fumonisines présentes dans les récoltes de maïs (tableau 17) :

Tableau 17 : Exposition de l'homme à la FBI dans différents pays
d'après Shephard *et al.*, (1996).

Région	Apports journaliers de maïs	Contamination moyenne du maïs	Apport journalier probable (PDI : Probable Daily Intake)
Transkei	460g	1.7 µg/g	11,2 µg/kg PV / jour
Suisse	4g	0.5 µg/g	0.03 µg/kg PV /jour
Allemagne	7g	0.5 µg/g	0.05 µg/kg PV / jour

L'apport journalier probable est calculé en prenant une moyenne de 70 kg pour le poids d'un adulte. PV = Poids Vif

Les populations de la région Transkei sont très exposées. Celles de Suisse et d'Allemagne ne le sont presque pas.

1.4. Plan de surveillance de la contamination des produits céréaliers par certaines mycotoxines

En France, concernant les Pouvoirs Publics, les résultats d'un "plan de surveillance de la contamination des produits céréaliers par certaines mycotoxines" conduit du 2^{ème} trimestre 2000 au 1^{er} trimestre 2001, sont présentés sur le tableau 18 et sont consultables sur le site Internet de la DGCCRF (Direction Générale de la Consommation, du Commerce et de la Répression des Fraudes, Site Internet n°11). L'enquête avait pour objectif de recueillir des informations sur les fréquences et les niveaux de contamination par certaines mycotoxines de divers produits céréaliers destinés à la consommation humaine. Quatre cent trente prélèvements de sondage de 1kg de produits issus de diverses céréales (blé, maïs, sarrasin, riz, seigle, orge) ont été réalisés au stade de la distribution, de la transformation ou de la production. Douze directions départementales ont participé à cette enquête qui s'est déroulée sur quatre trimestres.

L'origine des échantillons n'est toutefois pas précisée (produits importés ou non, par exemple). Pour le DON, aucun des 41 échantillons analysés ne dépassait la valeur cible de 1000 µg/kg qui était retenue à la date de la réalisation de l'enquête.

Tableau 18 : Résultats du plan de surveillance de la contamination des produits céréaliers par certaines mycotoxines. Du 2ème trimestre 2000 au 1er trimestre 2001 (site Internet de la DGCCRF)

La zéaralénone	119 échantillons ont été analysés (49 produits à base de blé, 10 à base de sarrasin, 4 à base de seigle, 25 à base de maïs, 12 à base de riz et 19 autres produits (céréales infantiles, orge)). 16% des échantillons étaient légèrement contaminés. Aucune teneur ne dépassait la valeur cible de 50 µg/kg .
La fumonisine B1	116 échantillons ont été analysés (49 produits dérivés du blé, 7 dérivés du sarrasin, 4 dérivés du seigle, 24 dérivés du maïs, 13 dérivés du riz et 19 produits divers (orge, céréales infantiles)). 10% des échantillons étaient contaminés (essentiellement des produits à base de maïs et de seigle). Aucun ne dépassait la valeur cible de 1000 µg/kg .
Le déoxynivalénol	41 échantillons ont été analysés (29 produits à base de blé, 6 à base de sarrasin, 2 à base de seigle, 1 à base de maïs, 1 de riz et de 2 produits divers (céréales infantiles, orge)). Aucun échantillon ne dépassait la valeur cible de 1000 µg/kg qui avait été retenue à la date de l'établissement de l'enquête (date antérieure au projet de recommandation de la Commission). Un seul produit présentait une teneur légèrement supérieure à celle fixée par ce projet de recommandation. Il s'agissait d'une farine pour feuilletage destinée à un usage professionnel qui contenait 800 µg/kg de déoxynivalénol (la limite d'action fixée par le projet de recommandation pour ce type de produit était de 750 µg/kg).

Du coté des producteurs et des entreprises de la filière céréalière, la mise en commun de données privées sur les résidus et contaminants des céréales s'opère à travers le plan de surveillance de l'IRTAC (Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales), ce qui permet de constituer une base d'informations robuste portant sur près de 3000 résultats concernant les mycotoxines.

Il s'avère que la maîtrise des pratiques de production et de stockage des blés ainsi que la vigilance de tous les professionnels de la filière porte ses fruits pour garantir aux consommateurs des produits finis de haute qualité sanitaire. Cela ne signifie pas pour autant qu'aucune voie de progrès ne soit encore possible, ni que les pratiques ne puissent encore être améliorées. C'est ce à quoi les professionnels s'engagent en multipliant les échanges d'informations et en partageant les efforts de recherche appliquée au sein de la filière.

2. La gestion du risque

2.1. Détermination des normes

Pour une mycotoxine donnée, plusieurs critères sont établis pour déterminer les normes. D'abord, il y a la DSE : dose sans effet, chez un animal donné, réputé le plus sensible des animaux. Ce critère (parfois appelé DSEO : dose sans effet observé) est issu d'une expérimentation animale et s'exprime par kilo de poids vif.

Ensuite, il y a la DJT: dose journalière tolérée par l'homme (équivalent de la dose journalière admissible pour un additif). La DJT est le produit de la DSE par un coefficient de sécurité. Ce coefficient de sécurité est le produit de trois coefficients élémentaires de sécurité.

Le premier coefficient élémentaire de sécurité est considéré pour tenir compte de la variabilité entre individus à l'intérieur de l'espèce animale expérimentée.

Le deuxième coefficient élémentaire de sécurité couvre la différence de réponse entre l'espèce animale expérimentée et l'homme (pour lequel il n'y a pas d'expérimentation).

Le troisième coefficient élémentaire de sécurité n'est pris que dans le cas de mycotoxines cancérogènes ou mutagènes provoquant des effets irréversibles. Ainsi, le coefficient de sécurité, pour calculer la DJT, est pour les mycotoxines non cancérogènes de 100 et de 1000 à 5000 pour celles révélées cancérogènes ou mutagènes ou suspectées de l'être.

Cette DJT chez l'homme est confrontée à la quantité ingérée de la mycotoxine considérée (l'exposition par voie respiratoire n'est pas prise en compte). Cette quantité est estimée à partir des teneurs en mycotoxine considérées dans chacun des aliments susceptibles d'être consommés, pondérées par les proportions de chacun des aliments constituant le régime alimentaire d'une population.

Afin d'assurer la sécurité maximale à une population, les quantités d'apports alimentaires prises en considération correspondent à la moyenne de consommation des 5 % d'individus les plus gros mangeurs. Quand la DJT est supérieure à la quantité d'une mycotoxine consommée par les individus les plus gros consommateurs, il n'y a pas problème. A l'inverse, lorsque la DJT est inférieure à cette quantité consommée, il y a lieu de revoir cette quantité ingérée en fixant des limites de teneur en cette mycotoxine dans chaque aliment faisant partie du régime alimentaire. Ces limites peuvent prendre un caractère légal (par exemple dans le cas des aflatoxines). Elles peuvent également prendre un caractère incitatif. Dans ce cas, le terme de limite d'action est utilisé. C'est un seuil à partir duquel les acteurs concernés par la production de l'aliment contaminé en la mycotoxine concernée s'engagent à revoir leur processus de production pour produire avec une teneur moindre en cette mycotoxine (Grosjean, 2002).

2.2. Caractérisation des dangers chez l'homme

- le DON : les données manquent concernant la DES (Dose Sans Effet) et la DVS (Dose Virtuellement Sûre).
- la Zéaralénone : les résultats de cancérogenèse chez la souris permettent de calculer une limite toxicologique de 800 ng/kg/j (DSE 4 mg/kg/j) et une DVS (de 50 ng/kg/j). Cependant ce composé étant connu pour avoir un effet oestrogénique, il paraît plus pertinent de tenir compte des effets sur la reproduction chez le singe (DSE 50 µg/kg/j). Dans ce cas, une DJT de 100 ng/kg/j est obtenue.
- les Fumonisines : la DJT est extrapolée à 5 µg/kg/j à partir des données relatives à l'apparition d'œdème pulmonaire chez le porc (5 mg/kg/j). Une valeur limite pour l'homme de 800 ng/kg/j peut être calculée à partir de l'effet cancérogène chez le rat (DSE de 4 mg/kg/j), (Pfohl-Leskowicz, 1999).

2.3. Evaluation du risque

- La Zéaralénone

Les données disponibles pour évaluer l'exposition en France sont très fragmentaires. En utilisant les quelques résultats publiés par la DGCCRF (tableau 61), l'exposition à la zéaralénone est estimée à 20 µg/kg/j pour la moyenne des adultes et à 90 µg/kg/j pour 95% des enfants. Pour les adultes, la valeur est donc en dessous de la DVS calculée pour le risque de cancérogenèse (exposition sur l'ensemble de la vie). Pour les enfants, le chiffre obtenu est inférieur à la DJT calculée à partir des effets sur la reproduction chez le singe.

- Les Fumonisines

Dans le cas des fumonisines, il est impossible d'obtenir une distribution statistique des concentrations dans les céréales. Seules quelques données disparates permettent d'estimer l'ordre de grandeur des concentrations. Si les valeurs les plus élevées disponibles sont rapportées aux niveaux de consommations des produits céréaliers, l'exposition en France se situe aux alentours de 300 µg par jour et par individu. Ceci donne une dose de 5 µg/kg/j pour un adulte, valeur qui se situe donc au niveau de la DJT calculée à partir de l'effet chez le porc (œdème pulmonaire), mais au-dessus de la limite toxicologique estimée à partir de l'effet hépatocancérogène chez le rat (Pfohl-Leskowicz, 1999).

3. La Réglementation européenne

3.1. Introduction

La sécurité alimentaire et la santé des consommateurs tiennent une place de choix au cœur de la politique alimentaire menée par l'Union européenne.

La mise en place de cette politique alimentaire communautaire s'effectue sur la base des propositions faites par la Commission Européenne, propositions qui s'appuient sur l'expertise communautaire, et en particulier sur celle du Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH), constitué d'experts indépendants communicant leurs avis à la Commission Européenne. Ces propositions sont ensuite soumises par la Commission à l'approbation des États-membres au travers du Comité Permanent des Denrées Alimentaires (CPDA), lorsque

les mesures prises dans le domaine des denrées alimentaires le stipulent de façon explicite, ou à l'initiative du CPDA lui-même. Garant d'une coopération étroite entre les Etats-membres et la Commission, ce CPDA est constitué de représentants de chaque Etat-membre et il est présidé par un membre de la Commission.

La volonté d'harmoniser les législations des différents pays européens dans le domaine des contaminants de l'alimentation humaine remonte au début des années 90. La présence de contaminants dans les denrées alimentaires est en effet non seulement une source potentielle de préoccupations d'ordre sanitaire, mais également une source d'entraves à la libre circulation des marchandises entre pays de l'Union Européenne.

3.2. La réglementation dans l'alimentation humaine

Un règlement européen se profile à l'heure actuelle en ce qui concerne les fusariotoxines car si les teneurs en mycotoxines de stockage sont soumises à une réglementation européenne depuis quelques années, le texte pour les mycotoxines résultant des attaques de fusarioses des épis n'est pas encore finalisé. La situation pourrait changer à brève échéance et les propositions sur les teneurs limites acceptables en fusariotoxines sont actuellement en discussion.

Depuis 2000, il existe différents projets réglementaires non encore finalisés qui ne portent que sur l'alimentation humaine. Les dernières propositions datent de mars 2004 et concernent les trois familles de mycotoxines : le DON, la zéaralénone principalement sur maïs et les fumonisines, qui touchent exclusivement le maïs sous climat méditerranéen.

Dans ce texte, les seuils proposés pour le DON sur les produits transformés seraient de 200 ppb pour le babyfood et les céréales du petit-déjeuner et de 500 ppb pour l'ensemble des produits consommés à l'exception des pâtes (750 ppb).

Les chiffres sont actuellement plus incertains en ce qui concerne les produits intermédiaires et les grains. Les valeurs pourraient atteindre pour les grains bruts 1000 ppb pour le blé tendre et 1 500 ppb pour le blé dur et le maïs (tableau 19).

Tableau 19 : Mycotoxines concernées par des limites légales européennes en préparations d'après Decoin, 2004.

Famille	Molécule	Denrées	Limites maximales en ppb
Trichothécènes	DON	Blé dur, avoine (grains bruts) Autres céréales (grains bruts) Maïs (grains bruts) Prêts à cuire (1) Prêts à manger (2) Alimentation infantile (babyfood)	1 500 à 1 750 (discuté) 1 000 à 1500 (discuté) 1 500 à 1 750 (discuté) 750 (proposé) 500 (proposé) 150 à 200 (discuté)
	NIV ; T2 et HT2 Trichothécènes totales		? ?
Zéaralénone		Maïs (grains et produits dérivés) Céréales (grains bruts) Farines de céréales Prêts à manger (3) Alimentation infantile	200 (proposé) 100 (proposé) 75 (proposé) 50 (proposé) 20 (proposé)
Fumonisines		Maïs (grains bruts) Gruau et farine de maïs Maïs doux(3) Alimentation infantile	? (discuté) 1 000 (proposé) 400 (proposé) 150 (proposé)
<p>N.B. 1 ppb = « une partie pour milliard » = 1 microgramme (= 1 µg) par kg ou par litre. DON = déoxynivalénol ou vomitoxine. NIV = nivalénol. Céréales = céréales à paille (blé, orge, avoine, seigle, triticale) ; le maïs est classé à part. (1) Prêt à cuire: farine, semoule, gruaux (de céréales à paille comme de maïs), pâtes. (2) Prêt à manger: pain, biscuits, snacks, « céréales » pour le petit-déjeuner. (3) Maïs destiné à l'alimentation humaine.</p>			

Les limites proposées ou en discussion sur ce tableau sont différentes des valeurs cibles du plan de surveillance de la DGCCRF (tableau 18). Les limites légales discutées sont plus élevées en ce qui concerne les denrées non transformées car les différents procédés de fabrication de produits alimentaires directement consommables réduisent les teneurs en mycotoxines dans les aliments (nettoyage des grains,...). Les teneurs maximales autorisées sont donc différentes selon les aliments.

En France, les discussions entre les partenaires de la filière céréale sont lieu au sein d'Intercéréales, l'interprofession céréalière, qui a élaboré une position commune face aux propositions de la Commission Européenne. Cette position est relayée auprès de la Commission par les représentants français des ministères de l'Agriculture et des Finances, et par les organisations professionnelles représentatives au niveau européen.

3.3. Echéance du règlement

Le calendrier d'application de ce règlement n'est pas encore finalisé. Il a longuement été question d'une entrée en application dès la récolte 2004, mais cela ne s'est pas réalisé et l'application de ce règlement pourrait s'effectuer à partir d'octobre 2005.

Un délai supplémentaire d'un an pourrait être accordé pour le maïs sous forme de grains bruts. Ces nouvelles échéances permettent aux producteurs de mieux se préparer, mais il se peut aussi que certains pays adoptent, par anticipation, des seuils nationaux qui pourraient être plus stricts que les projets réglementaires européens.

3.4. La réglementation dans l'alimentation animale

La parution de textes sur l'alimentation animale devrait se faire dans un délai d'environ deux ans suivant le règlement sur l'alimentation humaine. Certaines filières de l'alimentation animale s'orientent aujourd'hui vers des niveaux d'exigences proches de ceux de l'alimentation humaine. Cette attente paraît excessive au regard des coefficients importants de sécurité selon les mycotoxines retenus pour la sécurité alimentaire de l'homme. En outre, l'animal n'est en aucun cas un accumulateur de fusariotoxines mais joue, au contraire, un rôle de filtre pour l'homme. Les productions non conformes pour l'alimentation humaine restent un débouché important à ne pas éliminer car utilisable pour l'alimentation animale.

3.5. Seuils et méthodes en question

Les débats ne sont pas clos sur les seuils à fixer. Le seuil de DON pour les grains de blé tendre, d'orge et de triticale sera t'il de 1 500 ppb, 1,5 ppm, 1,5 mg/kg ou 1 250 voire 1 000 ppb ? La même question se pose pour le maïs avec une limite discutée de 1 750 ppb pour le DON et 200 ppb pour la zéaralénone. La question se pose également pour les fumonisines.

De plus, tout règlement ne vaut qu'accompagné de sa directive sur les méthodes d'échantillonnage et d'analyse car comment justifier le déclassement d'un lot non conforme si l'analyse qui l'a déclaré ainsi n'est pas reconnue du fait d'un échantillonnage non représentatif ou d'une méthode analytique contestée. Or les discussions sur le mode d'échantillonnage ont du mal à aboutir. Pour les méthodes analytiques, un groupe de travail créé à l'initiative de l'IRTAC / Arvalis travaille sur les deux étapes que sont l'extraction-purification et le dosage proprement dit (Site Internet n°12). Pour la première il y a deux tendances évoquées : une extraction à l'eau et une purification sur colonne d'immuno-affinité, ou une extraction eau/acétonitrile et une purification sur phase solide. Pour le dosage, le groupe s'oriente vers des protocoles normalisés donnant le choix entre HPLC (chromatographie en phase liquide haute-performance) et la CPG (chromatographie en phase gazeuse), toutes deux pouvant être couplées à la spectrométrie de masse ou à la fluorimétrie. Ces méthodes exigent des laboratoires très bien équipés.

4. Conclusion

La réglementation concernant les teneurs limites en fusariotoxines n'est à la date de ce travail qu'en phase de préparation pour les céréales et aliments à base de céréales.

La situation en France n'est pas préoccupante. Les techniques agricoles et les méthodes de stockage assurent aux céréales françaises une teneur en fusariotoxines suffisamment faible pour ne pas dépasser les doses journalières tolérables.

Cependant les années où les facteurs de risques de la toxinogénèse sont réunis nécessitent une surveillance attentive de la part des agriculteurs pour limiter le risque de mycotoxicoses.

CONCLUSION

Le vaste genre *Fusarium* n'a pas encore dévoilé tous ses secrets, notamment en ce qui concerne sa taxonomie qui reste en évolution. Les études réalisées sur le génome de ces champignons grâce aux techniques modernes de biologie moléculaire révèlent des phylogénies entre les espèces encore non découvertes jusque là.

Les dangers que représentent les mycotoxines, produites par les *Fusarium*, pour la santé publique n'ont sans doute jamais été si bien perçus qu'aujourd'hui. Les fusariotoxines : trichothécènes, zéaralénone, fumonisines sont parfois dangereuses dans le cas de consommation de céréales mal conservées notamment pour la toxine T2. Mais cela reste réellement exceptionnel. Le problème se pose lors de la consommation régulière d'aliments faiblement contaminés, notamment pour les mycotoxines cancérogènes tels les fumonisines. Quels sont alors les effets à long terme sur la santé humaine ?

Les agriculteurs disposent maintenant d'outils développés pour diminuer de façon significative les attaques fusariennes et les teneurs en fusariotoxines. La modernisation des techniques agricoles et l'utilisation de produits phytosanitaires performants ne font cependant pas oublier qu'une agriculture biologique peut parfois être aussi compétitive en ce qui concerne les teneurs en fusariotoxines détectées dans les récoltes qu'une agriculture classique, notamment grâce à une rotation des cultures judicieuse. Les agriculteurs doivent donc d'abord veiller à respecter des règles culturales simples pour ne pas avoir obligatoirement recours aux fongicides notamment.

Les industriels de l'agroalimentaire développent également des procédés de décontamination intéressants, mais les techniques utilisées restent onéreuses. La prévention reste la solution la plus intéressante par rapport à des traitements qui pourraient diminuer la qualité nutritionnelle des aliments.

Les techniques de détection des fusariotoxines s'affinent également de plus en plus. Des méthodes rapides de terrain permettent une première estimation de la qualité sanitaire des récoltes. Mais ces tests peuvent et doivent être confirmés par des techniques plus précises telles la CLHP ou la CPG. Ces méthodes d'analyses chromatographiques sont longues et coûteuses. Ainsi, en parallèle se développent des techniques de biologie moléculaire qui devraient permettre la mise au point de tests prédictifs. Ces derniers serviront aux agriculteurs à lutter contre le développement des souches de *Fusarium* les plus toxigènes sur les récoltes.

La situation en France concernant le risque fusariotoxine n'est pas préoccupante. Les consommateurs français peuvent donc être rassurés, d'autant qu'une réglementation européenne va bientôt être mise en place. Les teneurs limites proposées ou en discussions pour les trichothécènes, la zéaralénone ou les fumonisines semblent en adéquation avec les doses journalières tolérables. Il reste à savoir comment cette réglementation sera appliquée au niveau européen. Les techniques de prélèvements et d'échantillonnages devront avoir des protocoles strictement définis et les méthodes d'analyses utilisées devront également être parfaitement normalisées.



BIBLIOGRAPHIE



- Abramson D., Smith H. et Albert R.H., (2002). Food Additives and Contaminants 8, pp 765-769.
- Abramson D., (1991). Development of molds, mycotoxins and odors in moist cereals during storage. In : Chelkowski J., ed. Cereal grain-Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Elsevier, Amsterdam pp 119-147.
- Abramson D., Mills J.T. et Sinha R.N., (1990 a). Mycotoxin production in *amber durum* wheat stored at 15 and 19% moisture content. Food Addit. Contam., 7,617-627.
- Abramson D., Sinha R.N. et Mills J.T., (1990 b). Mycotoxin formation in HY-320 wheat during granary storage at 15 and 19% moisture content. Mycopathologia, 111, 181-189.
- Alexander M., Scott D. et Miller R.D., (1997). Fifth European *Fusarium* seminar, abstract, pp315-320 35.
- Andersen A.L., (1948). The development of *Gibberella zeae* headblight of wheat. Phytopathology 38, 595- 611.
- Anderson J.A., Babitt, J.D. et Meredith W.O.S., (1943). The effect of temperature differential on moisture content of stored wheat. Can. J. Res., Sect. C : Bot. Sci., 21, 297-306.
- Andrews S. et Pitt J.I., (1986). Selective medium for isolation of *Fusarium* species and Dematiaceous Hyphomycetes from cereals. Appl. Environ. Microbiol., 51, 1235-1238.
- Arthur J.C., (1891). Wheat scab. Indiana Agricultural Experimental Station Bulletin 36, 129-32.
- Atanasoff D., (1920). *Fusarium* Blight (scab) of wheat and other cereals. Journal of Agricultural Research 20, I- 32.
- Barchietto T., Calaoora V., Petat J.M. et Seng J.M., (2002). Sécurité des aliments : l'exemple du blé. Recherche et mise au point d'une méthodologie innovante : le test Tri 5. Phytoma, la défense des Végétaux - N°554 nov. 2002.
- Benetrix F. et Barbier-Guillot B., (2003). Organiser les moyens de la prévention, Perspectives Agricoles n° 295 - novembre 2003, page 16.
- Bergstrom G.C. et Shields E.J., (2002). Atmospheric spore dispersal and regional epidemiology of the *Fusarium* head blight fungus. Phytopathology pp 92-93.
- Berisford Y.C. et Ayres J.C., (1976). Effect of insecticides on growth and zearalenone production by the fungus *Fusarium graminearum*. J. Econ. Entomol., 69,645-650.
- Betina Y., (1993). Thin-layer chromatography of mycotoxins. In : Chromatography of Mycotoxins : techniques and applications. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 141-233.
- Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman C.P., Horak R.M., Marasas W.F.O., Spiteller G. et Vleggaar R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *F. moniliforme*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 11, 743-745.
- Birzele B., Prange A. et Krämer J., (2000). Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. Food Additives and Contaminants 17, 1027-1035.

- Blackwell B.A., Miller J.D. et Savard M.E., (1994). Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. I. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 77, 506-511.
- Booth C., (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UR, 237 pp.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Guy PH., Larpent J.P. et Veau P., (1985). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Biotechnologies. Masson, p139 à 145.
- Bouchet P., Guignard J.L. et Villard J., (2000). Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés. Edition Masson p77.
- Braly JP., (2003). Mycotoxines : corps et négoces mobilisés, Agrodistribution juin 2003 p32-41.
- Bramham B.E. et Plattner R.D., (1993). Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1, by *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 124, 99-104.
- Bullerman L.B., (1996). Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In : Jackson L.S., De Vries J.W. et Bullerman L.B. eds, Fumonisins in food, Plenum Press, New York, pp 27-38.
- Cahagnier B., (1993). Conditions écophysiological de la toxicogénèse. Colloque fusariose des céréales, 16 nov 1993. Bayer, ITCF, AGPM, INRA Nantes.
- Cahagnier B., (1997). Les mycotoxines dans les céréales. Journée d'information « céréales et sécurité alimentaire », dossier participant, IFBM, Nancy p19-25.
- Cahier de Recherche du CERA AF n°2 (2002). Mycotoxines : un prochain enjeu de sécurité alimentaire ? CERA AF p 26-31.
- Candlish A.A.G., (1991). Immunological methods in food microbiology. Food Microbiol. 8, 1-14.
- Champion R., (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et Pratiques. INRA Editions p166 à 197.
- Charmley L.L. et Trenholm H.L., (2002). Les mycotoxines. Fiche technique. Agence canadienne d'inspection des aliments.
- Christensen C.M. et Kaufmann H.H., (1974). Microflora. In : Storage of cereal grains and their products. American Association of cereal Chemists, St. Paul, MN pp 158-192.
- Christensen C.M., (1965). Fungi in cereal grains and their products. In : Wogan G.N., ed. Mycotoxins in foodstuffs MIT press, Cambridge, MA pp 9-14.
- Chu F.S., (1995). Mycotoxin analysis. In : Analysing food for nutrition labeling and hazardous contaminants. Marcel Dekker Inc, New York, pp 283-331.
- Cohen H. et Boutin-Muma B., (1992). Fluorescence detection of trichothecene mycotoxins as coumarin-3-carbonyl chloride derivatives by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 595, 143-148.
- Cundliffe E. et Davies J.E., (1977). Inhibition of initiation, elongation and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. Antimicrob. Agents Chemother. 11, 491-499.
- D'Mello J.P.F., Porter J.K., MacDonald A.M.C. et Placinta C.M., (1997). *Fusarium* mycotoxins. In : D'Mello, J.P.F., ed. Handbook of plant and fungal toxicants, CRC Press, Boca Raton, FL pp 287-301.

- Davis R.M., Kegel F.R., Sills W.M. et Farrar J.J., (1989). *Fusarium* ear rot of corn. Calif. Agri., 43, 4-5.
- Decoin M., (2004). Blé, maïs, vin, à l'affût des mycotoxines. Phytoma, la Défense des Végétaux – N°574 septembre 2004. p26-27.
- Desjardins A.E. et Hahn T.M., (1997). Molec. Plant Microbe Interact. 10 : 147-152.
- Dickson J.G., Johann H. et Wineland G., (1921). Second progress report on the *Fusarium* blight (scab) of wheat. Phytopathology 11, 35.
- Draughton F.A. et Ayres J.C., (1978). Effect of selected pesticides on growth and citrinin production by *Penicillium citrinum*. J. Food Sci., 43, 576-580.
- Draughton F.A. et Ayres J.C., (1979). Insecticide inhibition of growth and patulin production by *Penicillium urticae*. J. Food Sci., 44, 1232-1236.
- Draughton F.A. et Ayres J.C., (1982). Inhibition of aflatoxin production of selected insecticides. Appl. Environ. Microbiol., 41, 972-977.
- Edel V., Steinberg C., Gautheron N. et Alabouvette C., (1996). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycological Research, 101 (2), 179-187.
- Edwards S.G., (2004). Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contaminations of grain by trichothecene mycotoxins. Elsevier. Toxicology Letters 153 (2004) 29-35.
- Eppley R.M., Stoloff L., Truckness M.W. et Chung C.W., (1974). Survey of corn for *Fusarium* toxins. I. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, 632-635.
- Farrar L.L. et Davis R.M., (1991). Relationship among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. Phytopathology, 81, 661-666.
- Fernandez M., Stolhandeske-Dale S., Zentner R.P. et Pearse P., (2001). Progress in management of *Fusarium* head blight. In : Proceedings of the Second Canadian Workshop on *Fusarium* Head Blight. pp.110-113.
- Fracl L., Shaner G., Bergstrom G., Gilbert J., Pedersen W., Dill-Macky R., Corwin B., Gallenberg D. et Wiersma J., (1999). Daily inoculum levels of *Gibberella zeae* on wheat spikes. Plant Disease 83 : 662-666.
- Frémy J.M., Carriou T., Terrier C. et Guironnet A., (1985). Méthode rapide de dosage de la zéaralénone avec séparation en CCM et HPLC. Bull. Lab. Vét., 18,61-66.
- Frisvad J.C. et Thrane U., (1993). Liquid column chromatography of mycotoxins. In : Chromatography of mycotoxins : techniques and applications. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp 253-356.
- Furlong E.B. et Valente-Soares L.M., (1995). Gas chromatographic method for quantitation and confirmation of trichothecenes in wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 78, 386-390.
- Gareis M. et Ceynowa J., (1994). Effect of the fungicide matador (tebuconazole/triadimenol on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 198, 244-248.
- Gatel F., Hébrard J.P. et Ruch O., (2004). Mycotoxines : Avancées des connaissances et réglementation en vue. Perspectives Agricoles - N°300 avril 2004 p23-35.

- Gledhill L., Hesketh A.R., Bycroft B.W., Dewick P.M. et Gilbert J., (1991). Biosynthesis of trichothecene mycotoxins. *FEMS Microbiology Letters* 81, 241-246.
- Greenhalgh R., Neish G.A. et Miller J.D., (1983). Deoxynivalenol, acetyldeoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 625-632.
- Griffiths D.A., Hodson A.C. et Christensen G.M., (1959). Grain storage fungi associated with mites. *J. Econ. Entomol.*, 52, 514-518.
- Grosjean F., (2002). Toxicité des mycotoxines des céréales. Pas d'amalgames. *Perspectives Agricoles* n°278 avril 2002 p28-30.
- Grosjean F., Leuillet M., Berhaut P., Niquet G. et Orlando D., (2002). Dossier Mycotoxines, *Perspectives Agricoles* - N° 278, pages 31-42.
- Hennequin C., Abachin E., Symoens F., Lavarde V., Reboux G., Nolard N. et Berche P., (1999). Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing, *I. Clin. Microbiol.*, 37, 3586-3589.
- Herry M.P. et Lemétayer N., (1996). Dosage de la zéaralénone par technique d'immunoaffinité dans des denrées destinées à l'alimentation humaine. DGCCRF, Laboratoire Interrégional de Rennes, rapport d'activité, pp 80-81.
- Herry M.P., (1995). Dosage de la zéaralénone dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, DGCCRF, Laboratoire interrégional de Rennes, rapport d'activité, pp 78-113.
- Hesseltine C.W., (1976). Condition leading to mycotoxin contamination of food and feeds. In : Rodericks J.V., ed. *Mycotoxins and other fungal related food problems*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 1-22.
- Homdork S., Fehnnann H. et Beck R., (2000). Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium* infected wheat grain. *Journal of Phytopathology* 148, 7-15.
- Horberg H.M., (2002). Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* et *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108 : 73-80.
- 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, pp 397-444, Lyon, France.
- IARC, (1987). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Supplement No. 7 : Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, IARC, Lyon, 1987.
- IARC, (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 56 : Some naturally occurring substances : some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC, Lyon, 1993.
- IARC, (2002). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 82 : Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC, Lyon, 2002.
- Ikeda T., Higashi S. et Ono S., (1955). Studies on the resistance of wheat and barley varieties to ear scab disease (*Gibberella zeae*). III. Studies on varietal difference in relation to the enlargement of scab spots. *Bulletin of Division of Plant Breeding, Tokai-Kinki Agricultural Station* 2, 69-75.

Ioos Renaud, (2001). Le *Fusarium* et *Microdochium* sur grains de céréales en France. Phytoma, la défense des végétaux- N°539 p52-56.

Keller S.E., Sullivan T.M. et Chirtel S., (1997). Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1 : oxygen and pH. J. Indus. Microbiol. Biotechnology, 19, 305-309.

Kim J.C., Kang H.J., Lee D.H., Lee Y.W. et Yoshizawa T., (1993). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3798-3802.

Krska R., Baungartner J.S. et Joseph R., (2001). The state of the art in the analysis of type A and B trichothecene mycotoxins in cereals. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 371, 285-299.

Kuiper-Goodman T., Scott P.M. et Watanabe H., (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 7, 253-306.

Lacey J., (1989). Prevention of mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In : Natori S., Hashimoto K. et Ueno Y., eds. Mycotoxins and phycotoxins'88. Elsevier, Amsterdam, pp 161-168.

Langseth W., Ellingsen Y., Nymoen U. et Okland E.M., (1989). High-performance liquid chromatographic determination of zearalenone and ochratoxin A in cereals and feed. J. Chromatogr. 478, 269-274.

Lauren D.R. et Agnew M.P., (1991). Multitoxin screening method for *Fusarium* mycotoxins in grain. J. Agric. Food Chem., 39, 502-507.

Le Bars J. et Le Bars P., (1996). Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. Annales de recherche vétérinaires 27, 383-394.

Le Bars J., (1982). Toxigenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms systems. In : Multon J.L., ed. Preservation and Storage of grains. Seeds and their by- products. Lavoisier Publishing. New York pp 347-366.

Le Bars J., Dupuy M., Boudra K., (1994). Biotic and abiotic factors in fumonisins B1 production and stability. Journal of AOAC International. 77(2), 517-521.

Le Blou'ch V., Bedsore S., Poyet V., Barchietto T., Pfohl-Leskowicz A. et Seng J.M., (2000). Evaluation de la qualité phytosanitaire du blé. A propos des mycotoxines et des moyens de les détecter. Phytoma, la défense des végétaux - N°528 50-56.

Leslie J.F., Zeller K.A. et Summerell B.A., (2001). Icebergs and species in populations of *Fusarium*. Physiological and Molecular Plant Pathology (2001) 59. 107-117.

Leuillet M., (2002). Mycotoxines : Prévenir plutôt que guérir. Perspectives Agricoles - N°278 avril 2002 p24-26.

Li F.Q., Li Y.W. et Yoshizawa T., (2002). *Fusarium* toxins in wheat from an areas in Hena Province, PRE China, with a previous human mould intoxication episode. Food Addi. Contam., 19. 163-166.

Lillehoj E.B. et Elling F., (1983). Environnemental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. Acta Agric. Scand., 33, 113-128.

Link H.F., (1809). Observationes in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin 3 : 3-42.

- Mackay R. et Loughnane J.B., (1945). Observations on *Gibberella saubineti* (Mont.) Sacc. On cereals in Ireland in 1943 and 1944. Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society 24, 9-18.
- Madhyastha S.M., Marquadt R.R., Frohlich A.A., Platford G. et Abramson, D., (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. J. Agric. Food Chem., 38, 1506-1510.
- Magan N. et Lacey J., (1984 a). The effect of temperature and pH on the water relations of field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 82, 71-81.
- Magan N. et Lacey J., (1984 b). Effect of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 82, 305-314.
- Marin S., Sanchis V., Vinas I., Canela R., Magan N., (1995). Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. Lett. Appl. Microbiol. 21, 298-301.
- Martin RA., MacLeod J.A., Caldwell C., (1991). Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium species* on cereal seed. Plant Dis. 75, 784-788.
- Massé J., David S. et Michel P., (2002). Mycotoxines : Recommandations et pistes de réflexion. Perspectives Agricoles - N°278 avril 2002 p23.
- Maupetit Pierre, (1999). Pour doser les résidus de produits phytosanitaires ou les mycotoxines, Perspectives Agricoles - N° 248, pages 14-17.
- Mentré E., Montgermont A., (2003). Détection et Identification des *Fusarium species*. Ecole supérieure de microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest (ESMISAB).Rapport de méthodologie. Université de Bretagne Occidentale p1.
- Messiaen C.M et Cassini R., (1968). Recherche sur les Fusarioses. IV La systématique des *Fusarium*. Ann. Epiphyties 19 : 387-454.
- Moss M.O. et Frank M., (1985). Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichoides*. Trans. Br. Mycol. Soc., 84, 585-582.
- Moss M.O. et Frank M., (1987). Prevention, effects of biocides and other agents on mycotoxin production. In : Watson D.H., ed, Natural Toxicants in foods, Ellis Horwood, Chichester pp 231-251.
- Nelson P. E., (1991). History of *Fusarium* systematic. The American Phytopathological Society, 81 (9), 1045-1048.
- Nelson P.E., Toussoun T.A. et Marasas W.F.O., (1983). *Fusarium species*. An illustrated manuel for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pa, 193pp.
- Nicholson P., Lees A.K., Maurin N., ParryD.W. et Rezanoor H.N., (1996). Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *malus* in wheat, Physiological and Molecular Plant Pathology, 48, 257-271.
- Niessen, L. et Vogel R.F., (1997). Cereal Research Communications 25 : 245-248.
- Northolt M.D., van Egmond H.P. et Paulsch W.E., (1979). Penicillic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. J. Food Prot., 42, 476- 484.
- Obst A., Lepschy-von Gleissenthall J. et Beck R., (1997). On the etiology of *Fusarium* head blight of wheat in South Germany. Preceding crops, weather conditions for inoculum

production and head infection, proneness of the crop to infection and mycotoxin production. Cereal Res. Commun. 25, 699- 703.

Parry D.W. et Nicholson P., (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat, Plant Pathology, 45,383-391.

Parry D.W., Pettitt T.R., Jenkinson P. et Lees A.K., (1994). The cereal *Fusarium* complex. In : Blakeman P., Williamson B., eds. Ecology of Plants Pathogens Wallingford, UK : CAB International, 301-20.

Paster N. et Bullerman L.B., (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grain as controlled by physical means. Int. J. Food Microbiol., 7, 257-265.

Pearce R.B., Strange R.N. et Smith H., (1976). Glycine, betaine and choline in wheat : distribution and relation to infection by *Fusarium graminearum*. Phytochemistry 15, 953-4.

Perkowski J., Kiecana I., Schumacher U., Müller H.M., Chelkowski J. et Golinski P., (1997). Head infection and accumulation of *Fusarium* toxins in kernels of 12 barley genotypes inoculated with *Fusarium graminearum* isolates of two chemotypes. European Journal of Plant Pathology 103, 85-90.

Pfohl-Leskowicz A., (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Section de l'alimentation et de la nutrition. Conclusion et recommandations XVIII p453-454.

Pitt J.I. et Hocking A.D., (1985). Fungi and food spoilage. Academic Press, Sydney, Australia.

Pittet A., (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an updated review, Revue Médicale Vétérinaire, 149, 479-492.

Porcher J.M., Lafarge-Frayssinet C., Frayssinet Ch., Urie A., Melcion D. et Richard-Molard D., (1987). Determination of cytotoxic trichothecenes in corn by cell culture toxicity assay. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 844-849.

Pugh G.W., Johann H. et Dickson J.G, (1933). Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. Journal of Agricultural research. 46, 771-97.

Quillien J.F., (2000). Les Mycotoxines, INRA France, 34 pages.

Raimbault J.M. et Zin G., (2005). DON et mycotoxines. Kit de dosage : des performances variables sur céréales. Perspectives Agricoles - N°310 p22-24.

Sauer D.B., (1978). Contamination by mycotoxins : when it occurs and how to prevent it. In : Wyllie T.D. et Morehouse I.D., eds. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, mycotoxicoses of man and plants-an. Encyclopedic Handbook, vol 3 mycotoxin control and regulatory practices, Marcel Dekker, New York, pp 147-158.

Savard M.E. et Sinha R.C., (1989). Proceedings of the International Conference on Plant Disease Management, New Delhi, India.

Schilling A.G., Müller E.M. et Geiger H.H., (1996). Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. Molecular Plant Pathology, 86 (5),515-522.

Schnerr H., Niessen L. et Yogel R.F., (2001). Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR® Green for continuous fluorescence monitoring. International Journal of Food Microbiology, 71,53-61.

- Schwadorf K. et Müller H.M., (1992). Determination of α - and β -zearalenol and zearalenone in cereals by gas chromatography with ion-trap detection. *J. Chromatogr.*, 595, 259-267.
- Scott P.M. et Lawrence O.A., (1992). Liquid chromatographic determination of fumonisins with 1-fluoro 7-nitrobenzofurazan. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75, 829-834.
- Scott P.M., (1993). Gas chromatography of mycotoxins. In : *Chromatography of mycotoxins : techniques and applications*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 373-414.
- Shephard G.S., Sydenham E.W., Thiel P.G. et Gelderblom W.C.A., (1990). Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chromatogr.*, 13, 2077-2087.
- Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S. et Sydenham E.W., (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 79, 671-687.
- Sinha R.N., (1961). Insects and mites associated with hot spots in farm-stored grain. *Can. Entomol.*, 93, 609-621.
- Sinha R.N., (1992). The fungal community in the stored grain ecosystem. In : *The fungal community: its organisation and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, pp 797-815.
- Sinha R.N., Abramson D. et Mills J.T., (1986). Interrelations among ecological variables in stored cereals and associations with mycotoxin production in the climatic zones of western Canada. *J. Food Prot.*, 49, 608-614.
- Sinha R.N., Wallace H.A.H. et Chebib F.S., (1969). Principal-component analysis of interrelations among fungi, mites, and insects in grain bulk ecosystems. *Ecology*, 50, 536-547.
- Smith I.M., Dunez J., Lelliot R.A., Phillips D.H. et Archer S.A., (1988). *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell, Oxford.
- Snyder W.C. et Hansen H.N., (1940). The *species* concept in *Fusarium*. *Ame. J. Bot.* 27 : 64-67.
- Sobek E.A., (1996). Associations between corn insects and symptomatic and asymptomatic corn kernel infection by *Fusarium moniliforme*, M.S. Thesis, Iowa State University, Amer.
- Strange R.N. et Smith H., (1978). Effects of choline, betaine and wheat germ extract on growth of cereal pathogens. *Transactions of the British Mycological Society* 70, 193-9.
- Strange R.N., Deramo A. et Smith H., (1978). Virulence enhancement of *Fusarium graminearum* by choline and betaine and of *Botrytis cinerea* (grey mould) by other constituents of wheat germ. *Transactions of the British Mycological Society* 70, 1104-6.
- Strange R.N. et Smith H., (1971). A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology* I, 141-50.
- Sudakin D.L., (2003). Trichothecenes in the environment : relevance to human health. *Toxicology Letters* 143, 97-107.
- Sweeney M.I. et Dobson A.D.W., (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food microbiology*, 43, 141-158, 1998.
- Sydenham E. W., Marasas, W.F.O., Thiel P.G., Shephard G.S. et Nieuwenhuis, J.J., (1991). Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. crookwellense* isolates. *Food Additives and Contaminants* 8, 31-41.

- Sydenham E.W., Gelderblom W.C.A., Thiel P.G. et Marasas W.F.O., (1990). Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. J. Agric. Food Chem., 38,285-290.
- Sydenham E.W., Shephard G.S. et Thiel P.G., (1992). Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75,313-318.
- Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S. et Snijman P.W., (1996). Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn : AOAC-IUPAC collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 79, 688-696.
- Teich A.H. et Hamilton J.R., (1985). Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1429-1435.
- Teich A.H., (1989). Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum*, L.) scab caused by *Fusarium*. In : Chelkowski, J (Ed.), *Fusarium : Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pp. 269-282.
- Trucksess M.W., Ready D.E., Pender M., Ligmond C.A., Wood G.E. et Page S.W., (1996). Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 79, 883-887.
- Trucksess M.W., Stack M.E., Nesheim S., Page S.W. et Albert R.H., (1991). Immunoaffinity column coupled with solution fluorimetry or liquid chromatography post-column derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter : collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74, 81-88.
- Tu C., (1930). Physiologic Specialisation in *Fusarium species* Causing Head Blight of Small Grains. Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 74, 27pp.
- Van Wyck P.S., Scholtz D.J. et Marasas W.F.O., (1988). Protection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* against infection by *Fusarium graminearum* in the soil. Plant Soil, 107, 251-257.
- Vesonder R.F., Labeda D.P. et Peterson R.E., (1992). Phytotoxic Activity of selected watersoluble metabolites of *Fusarium* against *Lemma minor* (L. Duckweed). Mycopathologia, 118 185-189.
- Wheeler K.A, Hurdman B.F. et Pitts J.I., (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Int. J. Food Microbiol. 12, 141-150.
- Wicklow D.T., Horn B.T., Shotwell O.L., Hesseltine C.W. et Caldwell R.W., (1988). Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. Phytopathology, 78, 68-74.
- Widstrom N.W., (1992). Aflatoxin in developing maize : interaction among involved biota and pertinent econiche factors. Handbook of Appl. Mycology : mycotoxins in ecological systems, 5, 23-58.
- Wollenweber H.W. et Reiking O.A., (1935). Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey. Berlin 335p.
- Yannikouris A. et Jouany J.P. (2002). INRA. prod. Anim 15, pp3-16.
- Yuwai K.E., Rao K.L., Singh K., Tanaka T. et Ueno Y. (1994). Occurence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea. Nat. Toxins, 2, 19-21.

Zummo N. et Scott G.E., (1992). Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. Plant Dis., 76, 771-773.

BIBLIOGRAPHIE INTERNET



Site Internet n°1

<http://pro.wanadoo.fr/lnpv.fusa.htm>

Site Internet n°2

<http://www.grainscanada.gc.ca/Pubs/Fusarium>

Site Internet n°3

<http://www.is.agr.gc.ca/brd/Fusarium/intro-f.html>

Site Internet n°4

<http://www.afnor.fr>

Site Internet n°5

www.universcereales.com/dossier/mycotoxines/data/quelles_sont_elles.asp

Site Internet n°6

<http://www.efsa.eu.int>

The EFSA Journal

Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed.

Question N° EFSA-q-2003-037

Adopted on 28 July 2004

Site Internet n°7

http://www.coopfed.qc.ca/Coopateur/contenu/Archives/Avril_2001/p42_mycotoxines

Site Internet n°8

Agence canadienne d'inspection des aliments. Fiche Technique : les Mycotoxines.

<http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebet/quelnew/mycof.shtml>

Site Internet n°9

<http://www.swissgranum.ch/>

Site Internet n°10

<http://aret.asso.fr>

<http://aret.asso.fr/resumchoumet.htm>

<http://aret.asso.fr/resumchoumet.htm>

<http://www.aret.asso.fr/arbulletinjuin91.htm>

Site Internet n°11

<http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF>

Site Internet n°12

<http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/fr>

GLOSSAIRE

Adsorbant : Se dit d'un corps qui absorbe, à savoir fixation d'un gaz ou d'un liquide par pénétration superficielle dans un solide, dans un autre liquide.

Anamorphe : se dit du stade asexué d'une moisissure, c'est-à-dire du cycle dans lequel seules des conidies ou des spores sont obtenues, par multiplication végétative.

Anticorps : Substance engendrée par l'organisme à la suite de l'introduction dans celui-ci d'un antigène, et concourant au mécanisme de l'immunité.

Antigène : Substance (microbe, cellule d'une espèce différente, substance organique ou chimique, *etc.*) qui, introduite dans l'organisme, provoque la formation d'un anticorps par l'organisme.

Ascospore : spore de champignons Ascomycètes produite à l'intérieur d'un asque.

Asque : cellule en forme de sac, libre ou contenue dans une fructification (périthèce, apothécie) à l'intérieur de laquelle se forment les ascospores.

Cancérogène : qui peut provoquer des cancers.

Chlamydospore : spore de multiplication végétative, à paroi épaisse, ne se détachant pas du mycélium et assurant la conservation du champignon.

Composés phénoliques : qui provient d'un dérivé oxygéné du benzène présent dans le goudron de houille, de formule C_6H_5OH

Conidie : spore de multiplication asexuée produite en général par bourgeonnement à l'extrémité de filaments mycéliens appelés conidiophores.

Conidiophore : filament différencié d'un champignon, spécialisé dans la production des conidies.

Contamination : terme utilisé pour désigner la phase d'installation d'un parasite.

Cryptogames : se dit des végétaux (champignons, fougères, mousses...) dont les organes de reproduction sont peu visibles, par opposition aux phanérogames qui portent des fleurs.

Cryptogamique : qui se rapporte aux cryptogames. Se dit des maladies causées par des cryptogames.

Disruption : Interruption de la séquence codante d'un gène par introduction d'une autre séquence d'ADN.

Echaudage : Arrêt, chez les céréales, de développement du grain à un stade précoce, lié à des facteurs d'ordre climatique ou parasitaire. L'échaudage des céréales est un accident de croissance des grains qui est dû soit à un coup de chaleur, soit à une attaque parasitaire (piétin-échaudage).

Forme imparfaite : forme de reproduction asexuée des champignons.

Forme parfaite : forme de reproduction sexuée des champignons.

Fusifforme : en forme de fuseau.

Gibbérelline : substance extraite d'un champignon qui accélère la croissance et la germination de nombreuses espèces de plantes.

Glumes : Une des deux bractées située à la base d'un épillet. Bractée qui enveloppe extérieurement un épillet de graminée (il y a généralement deux glumes par épillet).

Gruaux : Partie la plus dure et la plus riche en gluten du grain, séparée des farines.

Hyaline: se dit d'une structure (spores surtout) transparente et non colorée sous le microscope. Des colonies hyalines se colorent en bleu sous l'effet du bleu coton ou du bleu de lactophénol.

Hyphe : filament mycélien qui constitue l'appareil végétatif des champignons.

Immunotoxique : toxique pour les réactions immunitaires de l'organisme

In vitro: en milieu artificiel.

In vivo: en milieu naturel.

Incubation: période pendant laquelle une infection reste invisible. Elle débute avec la contamination et prend fin avec l'apparition des premiers symptômes.

Infection: pénétration et développement dans un organisme de germes pathogènes dits infectieux.

Infestation: pollution superficielle des téguments des graines, par les spores d'un champignon.

Inoculum : champignon ou partie de celui-ci (mycélium, conidie...) pouvant provoquer une contamination.

Isolat: culture pure obtenue à partir d'un isolement.

Isolement : obtention au laboratoire d'une culture d'un champignon sur milieu nutritif artificiel à partir d'un fragment de mycélium ou de plantule malade repiqué sur le milieu, afin de déterminer cet organisme pathogène.

Lésion : modification de la structure d'un organe, d'un tissu vivant, sous l'influence d'une cause mécanique, physiologique ou parasitaire.

Milieu nutritif : substance nutritive fabriquée artificiellement pour faire pousser des agents pathogènes en vue de leur détermination.

Mycélium : appareil végétatif du champignon constitué d'un ensemble de filaments appelés hyphes.

Mycotoxicooses : intoxications provoquées par les mycotoxines

Mycotoxines : métabolites synthétisés par les champignons eux-mêmes.

Oestrogénique : effets sur les hormones stimulant les organes sexuels féminins : utérus et glandes mammaires essentiellement

Périthèce : organe de reproduction de certains champignons Ascomycètes, généralement globuleux ou en forme de poire et renfermant des asques et des ascospores.

Phialide : cellule située à l'extrémité d'un conidiophore, en forme de bouteille très allongée, produisant des spores.

Pyrale : Lépidoptère nocturne, de petite taille, à ailes triangulaires étroites. Plusieurs espèces sont nuisibles aux cultures, ex. : maïs; ou aux produits, ex. : graines, farine, cire, fruits secs.

Reproduction végétative : type de reproduction ne faisant pas intervenir la fécondation.

Saprophyte : organisme se nourrissant aux dépens de débris organiques ou végétaux. Les champignons saprophytes présents sur les semences ne perturbent généralement pas le développement des jeunes plantes.

Screening : Action de passer au crible, moyen de trier, de distinguer en particulier le vrai du faux.

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

Spore : organe de conservation ou de propagation des champignons issu de la multiplication asexuée (conidie..) ou sexuée (ascospore, basidiospore...).

Sporocyste : cellule de la reproduction asexuée dont le contenu se transforme en spores qui s'échappent par une ouverture ou une rupture de la paroi du sporocyste.

Sporodochie : structure visible sous la loupe et constituée de conidiophores agrégés en coussinet chez certains *Fusarium* et sous certaines conditions de cultures.

Sporulation : émission de spores.

Stroma : masse de filaments mycéliens, comportant ou non des éléments de la plante parasitée ou du substrat sur lesquels se développe le champignon.

Symptôme : phénomène qui apparaît chez un être vivant et qui révèle un trouble fonctionnel, une lésion, une pourriture... après une période d'incubation d'un parasite.

Systémique : qui est véhiculé à l'intérieur d'une plante. Se dit d'un pathogène ou d'un produit chimique.

Tourteau : résidu solide obtenu lors du traitement des grains et des fruits oléagineux en vue de l'extraction de l'huile.

INDEX DES ABREVIATIONS UTILISEES

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFNOR : Association française de normalisation

ARN : Acide Ribonucléique

ATA : Aleucie Toxique Alimentaire

Aw : Disponibilité en eau

CIRC : Centre International de la Recherche sur le Cancer

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CPDA : Comité Permanent des Denrées Alimentaires

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CSAH : Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DJT : Dose Journalière Tolérée par l'homme

DON : Déoxynivalénol

DSE : Dose Sans Effet

DSEO : Dose Sans Effet Observé

DVS : Dose Virtuellement Sûre

ECD : Détecteur à capteur d'électrons

ELISA : Enzyme Linked Immuno-Adsorbent Assay

FB1 : Fumonisine B1

FBs : Fumonisines

FID : Détecteur à ionisation de flamme

FLUO : Fluorimétrie

IARC : Agence International de Recherche sur le Cancer

IRTAC : Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales

ITCF : Institut Technique des Céréales et des Fourrages

LEM : Leucoencéphalomalacie

MON : Moniliformine

ng/Kg/j : Nanogramme par kilogramme et par jour

NIV : Nivalénol

ONIC : Office National Interprofessionnel des Céréales

PCNB : Pentachloronitrobenzène

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar ou milieu gélosé à base de pomme de terre

ppb : Partie Par Billion

PV : Poids Vif

RAPD-PCR : Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction

SM : Spectromètre de masse

SNA : Synthetischer Nährstoffärmer Agar

ZEN ou ZEA : zéaralénone

µg/kg : Microgrammes par kilogrammes



DEMANDE D'IMPRIMATUR

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**présenté par **Benoît JEUNOT**Sujet :**Les Fusariotoxines sur céréales : détection, risque
et nouvelle réglementation.**Jury :

Président : Mme Françoise HINZELIN, Maître de Conférences

Juges : M. Emile BENIZRI, Professeur
Mme Laurence MUNERET, ProfesseurVu,
Nancy, le 12 mai 2005

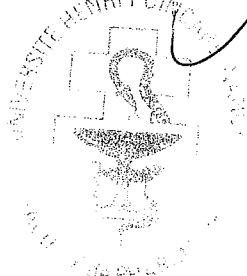
Président du Jury et Directeur de Thèse

**Mme Françoise HINZELIN,**
Maître de Conférences

N° 2221

Vu et approuvé,

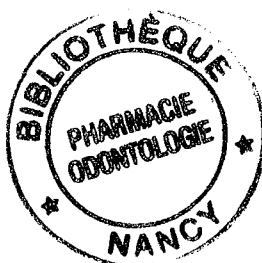
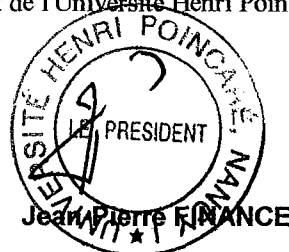
Nancy, le 20 mai 2005

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,
Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 25 mai 2005

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,



N° d'identification PH Nanterre 05 n°43

TITRE

LES MYCOTOXINES DE *FUSARIUM* SUR CEREALES : RISQUE, DETECTION ET NOUVELLE REGLEMENTATION

Thèse soutenue le 16 juin 2005

Par Benoît JEUNOT

RESUME

Les mycotoxines de champ lié à la présence à l'épiaison de certains champignons du genre *Fusarium* sont un problème qui préoccupe le monde agricole depuis plusieurs années.

En effet, certaines fusariotoxines très toxiques, sont rarement rencontrées, alors que d'autres peu toxiques, sont relativement fréquentes sur cultures céréalières.

La perspective d'une future réglementation européenne portant sur les teneurs maximales en fusariotoxines nécessite que ce problème soit pris au sérieux.

Même si la France se trouve dans une situation favorable, beaucoup reste encore à faire dans le domaine de la lutte contre les *Fusarium* au champ ainsi que dans la prévention et le contrôle des denrées alimentaires pouvant contenir des mycotoxines.

MOTS-CLES : Mycotoxines – Fusarium – Céréales

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme Françoise HINZELIN	Laboratoire de Mycologie et Botanique	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème 4

Thèmes :

1 - Sciences fondamentales
3 - Médicament
5 - Biologie

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