

# LES MYCOTOXINES

Connaissances actuelles  
et futurs enjeux

Isabelle Oswald, Florence Forget, Olivier Puel, coord.





# Les mycotoxines

## Connaissances actuelles et futurs enjeux

Isabelle Oswald, Florence Forget et Olivier Puel, coordinateurs

Éditions Quæ  
RD 10, 78026 Versailles Cedex

## Collection Synthèses

*L'antibiorésistance : un fait social total*

Harpet C., coord.

2022, 168 p.

*Durabilité des systèmes pour la sécurité alimentaire*

*Combiner les approches locales et globales*

Thomas A., Alpha A., Barczak A., Zakhia-Rozis N., coord.

2024, 246 p.

*Infrastructures de transport créatives*

*Mieux les intégrer aux écosystèmes, paysages et territoires*

Bonin S., coord.

2024, 252 p.

*De l'arbre en ville à la forêt urbaine*

Castagneyrol B., Muller S., Paquette A., coord.

2024, 188 p.

*Épigénétique*

*Mécanismes moléculaires, biologie du développement et réponses à l'environnement*

Jammes H., Boudry P., Maury S., coord.

2024, 194 p.

### **Pour citer cet ouvrage :**

Oswald I., Forget F., Puel O., coord., 2024. *Les Mycotoxines. Connaissances actuelles et futurs enjeux*, Versailles, éditions Quæ, 272 p.

DOI : 10.35690/978-2-7592-3976-4

© Éditions Quæ, 2024

ISBN (papier) : 978-2-7592-3975-7

ISBN (Num) : 978-2-7592-3976-4

ISBN (ePub) : 978-2-7592-3977-1

ISSN : 1777-4624

Les versions numériques de cet ouvrage sont diffusées sous licence CC-by-NC-ND 4.0.

Il a bénéficié du soutien financier d'INRAE

(départements Santé animale, Alimentation humaine et DipSo).



Éditions Quæ

RD 10

78026 Versailles Cedex

[www.quae.com](http://www.quae.com) / [www.quae-open.com](http://www.quae-open.com)

# Table des matières

---

<b>Introduction</b> .....	9
---------------------------	---

## PARTIE I LES MYCOTOXINES DANS TOUTE LEUR DIVERSITÉ

<b>Chapitre 1. Les aflatoxines</b> .....	15
Introduction .....	15
Structure des aflatoxines.....	15
Biosynthèse des aflatoxines .....	16
Espèces productrices d'aflatoxines .....	17
Contamination des aliments par les aflatoxines .....	19
Toxicité des aflatoxines.....	19
Conclusion.....	24
Références.....	25
<b>Chapitre 2. Les ochratoxines</b> .....	26
Introduction .....	26
Structure chimique des ochratoxines.....	26
Biosynthèse de l'OTA.....	27
Espèces productrices d'OTA.....	29
Types d'aliments contaminés et occurrence .....	30
Métabolisme et genèse de formes modifiées de l'OTA .....	31
Toxicité de l'OTA.....	33
Conclusion.....	36
Références.....	36
<b>Chapitre 3. La patuline</b> .....	38
Introduction .....	38
Caractéristiques physicochimiques .....	39
Espèces productrices.....	39
Biosynthèse .....	39
Rôles .....	41
Occurrence et contamination des denrées alimentaires.....	42
Biotransformation .....	42
Toxicité.....	43
Conclusion.....	46
Références.....	47

<b>Chapitre 4. La zéaralénone</b> .....	49
Introduction .....	49
Structure chimique, espèces productrices, voies de biosynthèse .....	50
Types d'aliments contaminés et occurrence .....	51
Toxicocinétique de la zéaralénone : absorption, métabolisme, excrétion .....	53
Toxicité de la zéaralénone.....	54
Conclusion.....	56
Références.....	57
<b>Chapitre 5. Les trichothécènes A et B</b> .....	58
Introduction .....	58
Structure chimique, espèces productrices, voies de biosynthèse .....	58
Régulation de la biosynthèse des TCT .....	62
Types d'aliments contaminés et occurrence .....	63
Métabolisation des TCT .....	65
Toxicité des TCT .....	66
Conclusion.....	69
Références.....	69
<b>Chapitre 6. Les fumonisines</b> .....	71
Introduction .....	71
Structure chimique, espèces productrices, voies de biosynthèse .....	72
Types d'aliments contaminés et occurrence .....	76
Toxicocinétique : absorption, métabolisme, excrétion .....	76
Toxicité.....	77
Mécanismes d'action : notion de biomarqueur .....	79
Conclusion.....	81
Références.....	81
<b>Chapitre 7. Principales toxines émergentes de <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	83
Introduction .....	83
Enniatines et beauvéricines.....	83
La moniliformine.....	91
La fusaproliférine .....	92
L'acide fusarique .....	92
La culmorine.....	93
Le buténolide.....	93
L'apicidine.....	93
Conclusion.....	93
Références.....	94
<b>Chapitre 8. Les alcaloïdes de l'ergot</b> .....	96
Introduction .....	96
Structures chimiques .....	97

Espèces productrices.....	98
Biosynthèse .....	99
Principaux aliments contaminés et occurrence.....	99
Devenir des alcaloïdes et métabolisme .....	102
Toxicité.....	102
Conclusion.....	107
Références.....	107
<b>Chapitre 9. Les toxines d'<i>Alternaria</i> spp.</b> .....	109
Introduction .....	109
Structure chimique des toxines d' <i>Alternaria</i> spp. ....	109
Les espèces du genre <i>Alternaria</i> productrices de mycotoxines .....	111
Biosynthèse de toxines d' <i>Alternaria</i> spp. ....	112
Occurrence des toxines d' <i>Alternaria</i> spp. et principaux aliments contaminés. ....	113
Toxicité des principales toxines d' <i>Alternaria</i> spp. ....	114
Conclusion.....	117
Références.....	117
<b>Chapitre 10. Autres toxines d'<i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp.</b> .....	119
Introduction .....	119
La citrinine .....	126
L'acide 3-nitropropionique.....	127
La terréine.....	127
La gliotoxine .....	128
L'acide cyclopiazonique.....	128
Les mycotoxines trémorgènes .....	129
L'acide mycophénolique.....	130
La toxine PR .....	131
La stérigmatocystine .....	132
Conclusion.....	132
Références.....	133
<b>Chapitre 11. Principales mycotoxines produites par les champignons endophytes de graminées</b> .....	135
Introduction .....	135
Les champignons endophytes de graminées.....	136
Les mycotoxines produites par le genre <i>Neotyphodium</i> .....	137
Variations des concentrations en mycotoxines dans la plante.....	139
Principales mycotoxicoses.....	140
Toxicocinétique et mécanismes d'action.....	141
Conclusion.....	143
Références.....	143

<b>Chapitre 12. Toxines de <i>Stachybotrys</i> spp.</b> .....	145
Introduction .....	145
Structures des métabolites élaborés par <i>Stachybotrys</i> .....	145
Biosynthèses .....	146
Espèces productrices .....	149
Milieux contaminés .....	149
Métabolisme et genèse de forme modifiée .....	150
Toxicité .....	151
Autres activités .....	152
Conclusion .....	152
Références .....	152

## PARTIE II

### LA PROBLÉMATIQUE MYCOTOXINES ET LES ENJEUX À VENIR

<b>Chapitre 13. Effet des conditions environnementales sur la croissance fongique et la production de mycotoxines</b> .....	157
Introduction .....	157
Écophysiologie des principales espèces fongiques toxigènes .....	158
Écophysiologie et interaction des champignons mycotoxinogènes : impact sur la production de toxines .....	163
Conclusion .....	164
Références .....	165
<b>Chapitre 14. Facteurs et mécanismes de régulation de la biosynthèse des mycotoxines</b> .....	167
Introduction .....	167
Voie de biosynthèse et <i>clusters</i> de gènes .....	167
Stimuli environnementaux et régulateurs globaux associés .....	169
Régulation épigénétique .....	172
Conclusion .....	176
Références .....	176
<b>Chapitre 15. Quelles pratiques agronomiques pour limiter la contamination par des mycotoxines en pré récolte ?</b> .....	178
Introduction .....	178
Une gestion multifactorielle qui s'adapte pour chaque couple toxine/culture ...	178
Maîtriser le potentiel infectieux dans l'environnement de la parcelle : un enjeu majeur .....	179
Prévention à l'implantation de la culture .....	181
Actions curatives en cours de culture .....	183
Outils d'accompagnement à disposition des agriculteurs et collecteurs .....	186
La prévention en périrécolte .....	188

Conclusion.....	188
Références.....	189
<b>Chapitre 16. Conditions d'apparition et gestion préventive des contaminations par des mycotoxines en post-récolte.....</b>	<b>191</b>
Introduction .....	191
Écophysiologie des moisissures des grains stockés .....	192
Interaction entre la dynamique des espèces fongiques et les conditions de conservation .....	193
Gestion préventive des risques de contamination des grains stockés par les mycotoxines.....	195
Conclusion.....	199
Références.....	200
<b>Chapitre 17. Devenir des toxines au cours des procédés de transformation des produits alimentaires.....</b>	<b>202</b>
Introduction .....	202
Devenir des mycotoxines dans les produits végétaux.....	202
Devenir des mycotoxines dans les produits d'origine animale.....	206
Effets des traitements thermiques .....	208
Conclusion.....	210
Références.....	210
<b>Chapitre 18. Limiter les contaminations par les mycotoxines à l'aide de solutions de biocontrôle .....</b>	<b>212</b>
Introduction .....	212
Le biocontrôle.....	213
La détoxification par voie microbiologique.....	219
Conclusion.....	220
Références.....	220
<b>Chapitre 19. Méthodes de quantification des mycotoxines .....</b>	<b>223</b>
Introduction .....	223
Importance de l'échantillonnage.....	224
L'étape de broyage : importance de la granulométrie .....	224
Extraction des mycotoxines .....	225
Méthodes rapides de dosage des mycotoxines.....	226
Méthodes conventionnelles de dosage des mycotoxines .....	229
Conclusion.....	233
Références.....	233
<b>Chapitre 20. Évaluation des risques sanitaires liés aux mycotoxines et réglementation .....</b>	<b>235</b>
Introduction .....	235
La caractérisation du danger.....	235

L'estimation de l'exposition alimentaire .....	238
La caractérisation du risque .....	239
La réglementation .....	243
La surveillance .....	245
Conclusion.....	246
Références.....	247
<b>Chapitre 21. Problématiques des mélanges .....</b>	<b>249</b>
Introduction .....	249
Multi-expositions impliquant des mycotoxines.....	250
Interactions toxicodynamiques des mycotoxines : comment les évaluer ?.....	250
Effets des mycotoxines sur l'amplitude de la réponse toxicologique.....	251
Effets des mycotoxines sur le devenir des xénobiotiques dans l'organisme.....	253
Conclusion.....	255
Références.....	256
<b>Chapitre 22. L'exposition aux mycotoxines dans un contexte de changements climatiques et de pratiques.....</b>	<b>258</b>
Introduction .....	258
Conséquences probables des changements climatiques sur le risque « mycotoxine » en céréaliculture.....	258
Conséquences probables des évolutions des pratiques de production céréalières sur le risque « mycotoxine » .....	261
Changements d'habitudes alimentaires et de consommation, et risque « mycotoxine ».....	264
Conclusion.....	266
Références.....	266
<b>Liste des auteurs .....</b>	<b>268</b>

# Introduction

---

La qualité sanitaire des produits alimentaires peut être menacée par toute sorte de contaminants et notamment des toxines d'origine naturelle. Parmi celles-ci figurent les mycotoxines. Leur nom trouve son origine dans les racines grecque *mycos* (champignon) et latine *toxicum* (poison). Il désigne les métabolites spécialisés produits par des champignons filamenteux (ou moisissures) et présentant un risque pour la santé de l'humain et des animaux. Remarquable lorsqu'il donne des molécules médicamenteuses comme la pénicilline ou les statines, le potentiel des champignons filamenteux à produire des métabolites spécialisés devient alors un danger.

Produites majoritairement par des moisissures des genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*, les mycotoxines représentent les contaminants naturels les plus fréquemment retrouvés dans nos assiettes. Les intoxications alimentaires qui leur sont liées sont désignées sous le terme de mycotoxicose. Les différentes enquêtes et études, dont celle de Mari Eskola *et al.*, parue en 2020 dans *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, montrent que 70 % de la production alimentaire mondiale sont contaminés par les mycotoxines. Ces toxines peuvent contaminer diverses matières premières et résulter de contaminations au champ ou de développement de moisissures en post-récolte, lorsque les conditions de conservation sont mauvaises. Les produits végétaux, en particulier les céréales et fruits secs, sont les substrats privilégiés des champignons toxigènes. Plusieurs milliers de métabolites fongiques ont déjà été décrits, et une trentaine sont actuellement considérés comme d'importance mondiale du fait de leurs effets sur la santé humaine et animale et des pertes économiques considérables que leur présence engendre sur la productivité animale, les rendements et la qualité des récoltes, ainsi que sur les échanges commerciaux. Pour ces raisons, ces derniers métabolites ont acquis sans conteste le statut de « mycotoxines ».

La présence de mycotoxines dans des aliments a été mise en évidence pour la première fois en 1960, lors de la « maladie X du dindon », où une mortalité très élevée a été observée dans un élevage de dindes en Grande-Bretagne. Il s'agissait d'aflatoxines produites par des souches d'*Aspergillus flavus* qui s'étaient développées sur les tourteaux d'arachide distribués aux volailles. Beaucoup plus récemment, en 2004, une intoxication aigüe par cette même mycotoxine présente dans le maïs a été responsable du décès de 125 personnes au Kenya. La découverte des mycotoxines a été, par ailleurs, l'occasion d'élucider certains événements historiques d'intoxication. La mycotoxicose la plus anciennement connue est l'ergotisme, aussi connu sous le nom de feu de Saint-Antoine ou mal des ardents, qui provoqua de véritables hécatombes en Europe, au Moyen Âge. En France, son dernier épisode s'est produit en 1951 à Pont-Saint-Esprit, dans le Gard. La consommation de farines de seigle

contaminées par des alcaloïdes d'ergot, produits par les champignons *Claviceps purpurea*, en était à l'origine. La consommation de céréales moisies, stockées durant l'hiver et très fortement contaminées en mycotoxines, est également à l'origine de l'aleucie toxique alimentaire. Sa première manifestation est survenue en 1891 dans le comté d'Oussouri, en Sibérie orientale ; mais c'est dans les années 1940 que les cas d'intoxication les plus graves ont été rapportés, avec le décès de 10 % de la population du comté d'Orenburg en Russie. Les derniers cas d'aleucie toxique alimentaire ont été décrits en 1982, au Cambodge. Aujourd'hui, grâce notamment aux mesures publiques de contrôle sanitaire, on ne constate plus, ni en France ni en Europe, de décès directement attribuables à la consommation d'aliments fortement contaminés par des mycotoxines. En revanche, on craint toujours les effets à long terme liés aux expositions à de faibles doses pour lesquelles la relation de causalité entre exposition et symptômes est difficile à établir.

La toxicité chronique des mycotoxines est très variable, certaines exerçant un pouvoir hépatotoxique, voire cancérigène, comme les aflatoxines, d'autres révélant un potentiel œstrogénique, immunotoxique, néphrotoxique ou neurotoxique. Si le danger commence à être assez bien caractérisé pour certaines mycotoxines dites « majeures », il n'en est pas de même pour celles dites « émergentes », pour lesquelles les données sont rares. La toxicité des mélanges de mycotoxines est un autre défi à relever, car elle ne peut être déduite des toxicités individuelles et peut conduire à des effets synergiques préoccupants pour le consommateur.

La principale voie d'exposition aux mycotoxines est alimentaire. Les données de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) et de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa) montrent qu'au niveau français et européen l'exposition de certaines populations, en particulier les enfants, peut dépasser les valeurs toxicologiques de référence. Ces études montrent aussi que les aliments et produits d'origine végétale, et en particulier les céréales, représentent la source d'exposition la plus préoccupante. En effet, les céréales constituant une des composantes majeures de l'alimentation de l'être humain sont des substrats privilégiés pour le développement des champignons producteurs de mycotoxines. Par ailleurs, les mycotoxines ne sont que partiellement détruites par les procédés technologiques et se retrouvent dans les produits transformés. Les autres produits d'origine végétale susceptibles d'être contaminés par des mycotoxines sont les fruits et légumes secs, les épices, le café, le cacao, les jus de fruits et leurs produits de fermentation. Il ne faut pas non plus négliger le risque de contamination de certains produits d'origine animale, et en particulier le lait, les viandes et les abats. Dans ces denrées, la présence de mycotoxines ou de leurs métabolites résulte principalement de la consommation d'aliments contaminés par les animaux d'élevage à l'origine de ces produits.

L'exposition par voie respiratoire découle de l'inhalation de particules contenant des mycotoxines (poussières de substrats contaminés, spores fongiques ou fragments de mycélium). Le maniement de produits contaminés devient alors une source d'exposition. Des spores fongiques de moisissures toxigènes peuvent aussi se retrouver dans l'environnement intérieur d'habitations humides, propice au développement de moisissures toxigènes.

Si la contamination d'une denrée alimentaire par une mycotoxine est évidemment étroitement liée à la contamination par une moisissure toxigène, la relation entre contamination fongique et contamination en mycotoxines est loin d'être simple. En effet, une même espèce fongique peut produire différentes familles de mycotoxines et une même mycotoxine peut être produite par différentes espèces. La complexité s'accroît également du fait qu'au sein d'une espèce donnée, toutes les souches possèdent des capacités différentes à produire des toxines, d'un point de vue quantitatif, mais aussi qualitatif. De plus, la production de mycotoxines par le champignon dépend fortement des stress environnementaux auquel il est soumis. Ainsi, il n'existe pas une association systématique moisissure-mycotoxine et la contamination fongique ne signifie pas obligatoirement présence de mycotoxines. *A contrario*, les mycotoxines sont très rémanentes et peuvent subsister à la disparition du champignon.

La stratégie de lutte contre les mycotoxines repose sur la prévention de la contamination fongique. Celle-ci passe par la mise en place de stratégies agronomiques et par l'amélioration des conditions de récolte et de stockage, ainsi que celle du suivi tout au long de la chaîne agri/agroalimentaire.

Cette courte introduction suffit à démontrer l'importance de la problématique des mycotoxines et la nécessité de les faire connaître à un large public. Le présent ouvrage a cette prétention. Il s'inscrit dans une longue tradition d'écriture d'ouvrages en langue française consacrés aux mycotoxines, depuis le livre fondateur de Claude Moreau *Moisissures toxiques dans l'alimentation*, paru quelques années après la découverte des aflatoxines, jusqu'à *Danger dans l'assiette* du collectif Sylviane Dragacci, Nadine Zakhia-Rozis et Pierre Galtier. Quand nous qualifions cette tradition de longue, il faut l'entendre comme longue dans le temps et non en nombre de livres parus, puisqu'ils se comptent sur les doigts d'une seule main. Depuis une douzaine d'années, plus aucun ouvrage traitant de cette problématique n'a été édité en France. Or, en une décennie, de nouvelles connaissances ont été acquises. De même, la nature du risque a fortement évolué avec l'émergence de nouvelles toxines, des changements de pratiques de production, conservation et transformation, des changements dans nos habitudes de consommation entre autres, sans oublier les changements climatiques.

La première partie du livre, constituée de douze chapitres, est consacrée à la description de chacune des principales mycotoxines ou familles de mycotoxines, tandis que la seconde partie regroupe dix chapitres consacrés à des thématiques plus transversales.



## Partie I

---

# Les mycotoxines dans toute leur diversité

Le nom même de mycotoxine est un terme générique pour qualifier un composé chimique d'origine fongique présentant des effets délétères sur l'humain et les animaux lors d'une exposition digestive, aérienne ou cutanée, et non l'appellation d'une famille particulière de composés chimiques. En effet, les mycotoxines sont issues de voies de biosynthèse très différentes et variées du métabolisme secondaire de certaines espèces fongiques. Qualifiées de métabolites secondaires, par opposition aux métabolites primaires indispensables à la vie cellulaire, elles ne sont pas requises pour une croissance normale du champignon dans des conditions maîtrisées de laboratoire où celui-ci se développe seul, sans interaction avec d'autres micro-organismes et/ou les plantes colonisées. Cependant, dans la nature, ces métabolites jouent des rôles importants en permettant au champignon de faire face à une large gamme de stress abiotiques ou biotiques. Leur rôle exact reste encore à déterminer pour la plupart d'entre eux, mais le nombre croissant de travaux ayant caractérisé le rôle physiologique ou écologique de certains a conduit la communauté scientifique à adopter l'adjectif « spécialisé » en lieu et place du terme « secondaire ». Aussi, dans cet ouvrage, nous qualifierons les mycotoxines comme des métabolites spécialisés.

Évaluer le nombre de métabolites fongiques spécialisés, même grossièrement, reste une gageure. Mais tentons quand même l'expérience ! L'analyse des nombreux génomes fongiques séquencés à ce jour nous indique qu'en moyenne chaque espèce fongique a la capacité de synthétiser environ 30 à 60 familles de métabolites selon les genres. Les dernières estimations du nombre d'espèces fongiques vivantes sur la planète oscillent entre 3 à 5 millions. Un rapide calcul nous amène à un nombre

titanesque et nous conduit au constat que le règne fongique constitue une source inépuisable de métabolites spécialisés. Les deux centaines de pages de cet ouvrage ne nous permettant pas de prétendre à une certaine exhaustivité, nous nous contenterons de présenter les principales mycotoxines. Dans cette première partie du livre seront ainsi traitées par chapitre les mycotoxines dont les teneurs dans les denrées alimentaires sont soumises à une réglementation, mais également certaines qui sont considérées comme émergentes et ne font aujourd'hui l'objet d'aucune réglementation. On a coutume de dire que les mycotoxines sont principalement produites par des espèces des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ce n'est cependant que partiellement vrai et c'est pour cette raison que plusieurs chapitres seront consacrés aux toxines produites par les genres *Alternaria*, *Claviceps* et également *Stachybotrys*. Pour chaque mycotoxine ou groupe de toxines, des auteurs spécialistes ont eu à cœur de dresser l'état actuel des connaissances, en abordant différents aspects de la problématique : structure, chimie, biosynthèse, occurrence, toxicité, risques et réglementation...

## Chapitre 1

---

# Les aflatoxines

Jean-Denis Bailly et Sylviane Bailly

### ►► Introduction

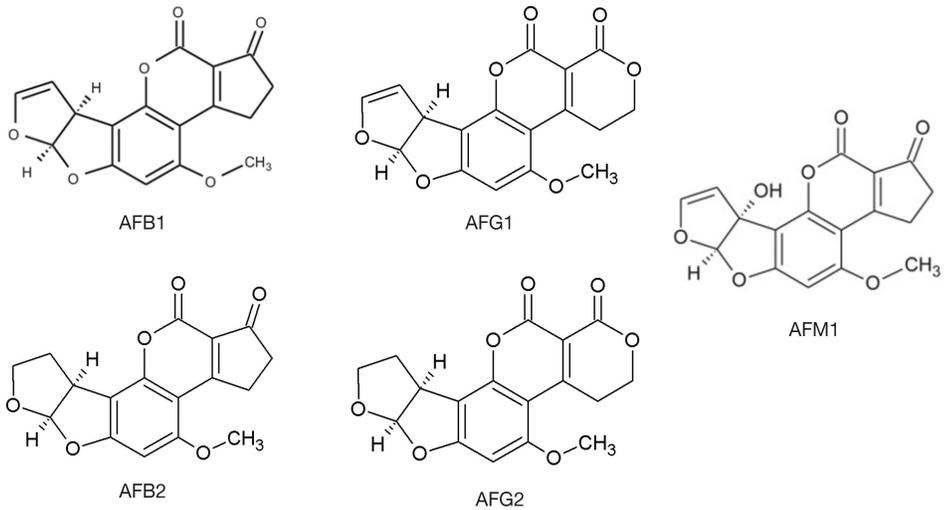
Les aflatoxines (AFs) ont été découvertes au début des années 1960, suite à une intoxication aigüe chez des dindonneaux (Benkerroum, 2019). Elles ont été nommées en référence à l'espèce fongique historiquement identifiée comme productrice : *Aspergillus flavus*. Rapidement, il a été démontré qu'elles étaient toxiques pour de nombreuses espèces animales et cancérigènes chez les rongeurs de laboratoire (Barnes et Butler, 1964). Il a été prouvé par la suite que ce pouvoir cancérigène s'exerçait aussi chez l'humain, les aflatoxines étant, à l'heure actuelle, les seules mycotoxines classées comme cancérigènes avérés chez l'Homme par le Centre international de recherche sur le cancer (IARC, 2002). Cette toxicité a justifié une grande quantité de recherches et, depuis leur découverte, les aflatoxines restent les mycotoxines les plus étudiées dans le monde. De nombreux travaux visent notamment à lutter contre la contamination des aliments et/ou à en limiter la toxicité. L'impact des changements climatiques sur la distribution géographique de ces toxines est aussi un sujet de préoccupation majeur. Ces mycotoxines sont les plus réglementées à l'échelle mondiale puisque plus de 100 pays en ont fixé des teneurs maximales tolérables dans les aliments destinés à l'humain et, parfois, aux animaux (FAO, 2004). La toxicité de ces composés explique que ces seuils réglementaires sont extrêmement faibles (quelques microgrammes à quelques dizaines de microgrammes par kilogramme en fonction des aliments ; Union européenne, 2023).

### ►► Structure des aflatoxines

Il existe quatre molécules produites par les moisissures aflatoxinogènes : les aflatoxines B1 (AFB1), B2, G1 et G2. La lettre suivant le nom est liée à la fluorescence de ces molécules sous lumière ultraviolette : bleue pour les aflatoxines B (*Blue*) et

verte pour les aflatoxines G (*Green*). Cette fluorescence est mise à profit pour les détecter dans les aliments (voir chapitre 19).

Les aflatoxines appartiennent à la famille des difuranocoumarines (figure 1.1). Ce sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques. Ces propriétés physicochimiques conditionnent en partie leur devenir au cours des transformations alimentaires (voir chapitre 17).



**Figure 1.1.** Structure des principales molécules d'aflatoxines.

Au-delà des quatre molécules synthétisées par les moisissures, il existe d'autres aflatoxines qui sont des métabolites produits dans l'organisme après ingestion des molécules d'origine fongique. Parmi ces métabolites, l'aflatoxine M1 (AFM1) présente un intérêt particulier, car ce dérivé hydroxylé de l'AFB1 est excrété dans le lait des mammifères. Cette molécule conserve une partie de la toxicité de l'AFB1 et peut constituer une source d'exposition pour les nouveau-nés (Benkerroum et Ismail, 2022). L'AFM1, comme les autres aflatoxines, est très stable et résiste aux traitements thermiques pouvant être appliqués aux denrées alimentaires (voir chapitre 17).

## ► Biosynthèse des aflatoxines

Comme toutes les mycotoxines, les aflatoxines sont des métabolites secondaires produits par une cascade de réactions enzymatiques permettant de passer d'un précurseur (ici l'acétyl-coenzyme A et le malonyl-coenzyme A) aux molécules finales (les aflatoxines B et G). Cela nécessite l'expression de 30 gènes différents, regroupés au sein d'un *cluster* situé sur le chromosome 3 chez les espèces productrices (figure 1.2). L'expression de ce *cluster* est régulée par deux gènes : *aflR* et *aflS*. Le produit du gène *aflR* stimule la transcription des autres gènes du *cluster*.

Le produit du gène *aflS* interagit avec *aflR*, mais pas directement avec les autres gènes du *cluster*. Il a été proposé que les deux protéines AflR et AflS forment un complexe permettant la fixation d'AflR sur les zones promotrices des gènes du *cluster*. Cela permet d'expliquer pourquoi un changement d'expression, même limité, d'*aflR* ou d'*aflS* entraîne souvent une diminution importante de la synthèse des aflatoxines (Caceres *et al.*, 2020).

Le *cluster* peut être légèrement différent en fonction de l'espèce fongique. Par exemple, chez *A. flavus*, qui ne produit que des aflatoxines B, les gènes *aflU*, *aflF* et *nadA* ne sont pas présents. Par contre, ces gènes sont retrouvés chez *A. parasiticus*, produisant à la fois des aflatoxines de type B et G.

La voie de biosynthèse des aflatoxines se caractérise par un grand nombre de réarrangements oxydatifs, les aflatoxines étant des molécules très oxygénées. Il existe d'ailleurs un lien direct entre biosynthèse des aflatoxines et stress oxydant. La toxino-génèse est stimulée par une augmentation de celui-ci. La production d'aflatoxines pourrait d'ailleurs être un moyen de protection des moisissures contre la toxicité des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Inversement, la présence d'antioxydants dans l'environnement du champignon peut limiter voire inhiber la production des toxines. Cette approche est désormais étudiée pour prévenir la contamination des aliments (Cadenillas *et al.*, 2023).

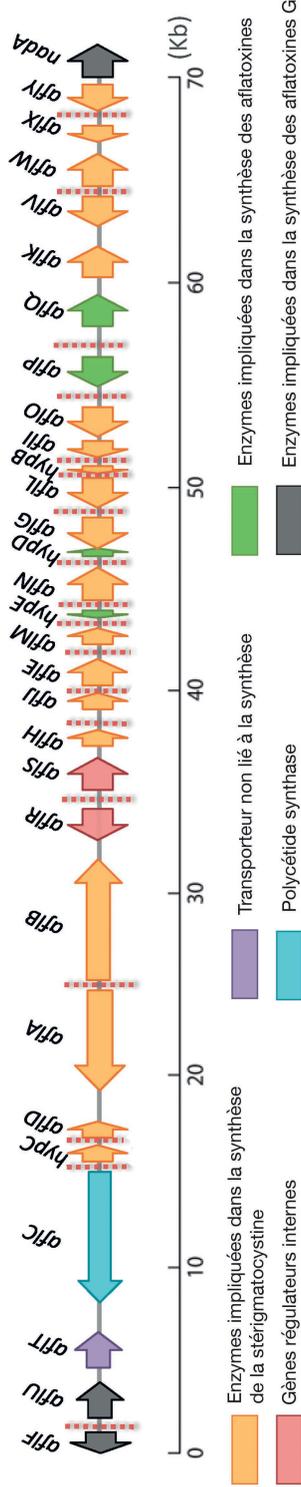
De nombreux autres paramètres environnementaux comme la température, l'activité de l'eau, la nature des nutriments présents, le pH, la lumière... peuvent aussi influencer positivement ou négativement la synthèse des aflatoxines.

## » Espèces productrices d'aflatoxines

À l'heure actuelle, 22 espèces sont connues comme aflatoxinogènes. Elles appartiennent au genre *Aspergillus* et la grande majorité est groupée dans la section *Flavi* (19 sur 22) (Frisvad *et al.*, 2019). Elles se caractérisent par leur capacité à produire des aflatoxines de type B et/ou G. *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sont les espèces les plus souvent identifiées dans les aliments contaminés. Il faut souligner que, au sein d'une espèce identifiée comme aflatoxinogène, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité à produire les toxines. Ainsi, dans la plupart des études, la proportion des souches d'*A. flavus* productrices d'AFB1 varie entre 40 et 60 %.

Les espèces aflatoxinogènes sont des espèces thermo-préférantes. *Aspergillus flavus* se développe rapidement à partir de 27 °C et jusqu'à 37 °C. Cette caractéristique explique que ce sont des contaminants majeurs des régions chaudes, en particulier entre les latitudes 26 à 35° nord et sud. Elles sont beaucoup plus rares sous les latitudes supérieures à 45° (Klich, 2007). Cependant, les changements climatiques en cours étendent les zones d'implantation de ces espèces, qui sont désormais des contaminants possibles des productions agricoles européennes (Bailly *et al.*, 2018).

Ces espèces sont aussi relativement xérophiles. Par conséquent, la contamination des aliments, et en particulier des céréales, pourra avoir lieu au champ, avant la récolte, ou bien plus tard, pendant le stockage, si le séchage a été insuffisant ou trop lent ou en cas de réhumidification (infiltration ou migration d'eau dans les silos).



**Figure 1.2.** Cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines. D'après Caceres *et al.*, 2020.

## ► Contamination des aliments par les aflatoxines

Les *Aspergillus* aflatoxinogènes sont des espèces saprophytes, présentes dans le monde entier et capables de coloniser une large variété de substrats, même si *A. parasiticus* présente une affinité pour les arachides (Jallow *et al.*, 2021). Ainsi, de nombreuses matières premières agricoles peuvent être contaminées par les aflatoxines. De plus, la distribution d'aliments contaminés à du bétail laitier peut entraîner l'excrétion lactée de l'AFM1.

Il est très difficile d'estimer la prévalence globale des aflatoxines. En effet, la contamination dépend étroitement de la nature du substrat et des conditions environnementales (température et humidité en particulier). Elle est donc susceptible de fluctuer assez fortement en fonction des régions, mais aussi d'une année sur l'autre. De plus, les résultats obtenus peuvent également varier en fonction de la méthode analytique utilisée (sensibilité et spécificité) et de l'échantillonnage (voir chapitre 19).

La contamination des aliments par les aflatoxines est cependant fréquente, en particulier dans les régions où le climat est favorable à la production de ces mycotoxines. Ainsi, les enquêtes réalisées dans le monde (Eskola *et al.*, 2020) révèlent des fréquences de contamination pouvant atteindre 20 % pour les noix et 40 % pour les pistaches, 45 % pour les figues séchées, 63 % pour les céréales (en Asie)...

Les productions les plus sensibles à la contamination par les aflatoxines sont le maïs et les arachides. Aliments de base dans certaines régions, ils sont responsables pour une grande part de l'exposition humaine et animale. D'autres aliments sont fréquemment contaminés, comme le riz, le sorgho, certaines épices (piments), les oléagineux, le café et le lait (Jallow *et al.*, 2021).

La contamination des aliments produits dans les régions où le climat est favorable à l'aflatoxinogénèse fait l'objet d'une surveillance particulière lors de leur importation en Europe. Ainsi, sur les 400 à 500 alertes annuelles concernant une contamination anormalement élevée en mycotoxines générées par le RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), 80 % sont liées à la présence d'aflatoxines (Cazals, 2021).

Dans un rapport de 2020, l'Efsa a conclu que la contamination des aliments par les aflatoxines et l'exposition qui en résultait pour les consommateurs européens étaient susceptibles de poser un problème sanitaire, en particulier chez les enfants.

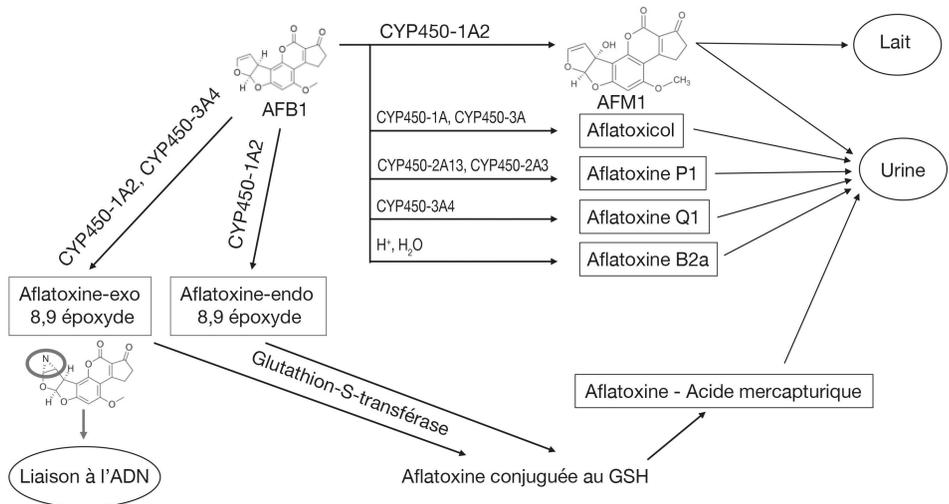
## ► Toxicité des aflatoxines

Comme évoqué en introduction, les aflatoxines sont des cancérogènes chez l'humain. Cependant, elles sont aussi responsables d'autres effets délétères qui peuvent varier en fonction de la dose ingérée et de la durée d'exposition. Compte tenu de la nature des aliments pouvant être contaminés et de la densité de population des zones où le climat est favorable à l'aflatoxinogénèse, on estime que c'est presque 4,5 milliards de personnes qui sont exposées régulièrement à ces contaminants par leur alimentation. Dans le monde, les aflatoxines sont les contaminants naturels responsables du plus grand nombre d'années en pleine santé perdues en raison de la

maladie, du handicap ou d'une mort prématurée (ou Daly pour *Death and Disability Adjusted Life Years*) (Gibb *et al.*, 2015).

## Métabolisme des aflatoxines

La toxicité des aflatoxines est directement liée à leur métabolisme après ingestion. Après l'absorption de 50 à 80 % de la dose d'AFB1 par diffusion passive au niveau du duodénum, celle-ci fixée aux protéines plasmatiques est conduite au foie par la veine porte. C'est là qu'elle va être métabolisée par différents cytochromes P450. Ces enzymes vont modifier la structure de l'AFB1 par hydroxylation, dé-alkylation, cétoréduction et époxydation. La plupart des composés formés sont beaucoup moins toxiques que l'AFB1 et sont ensuite éliminés par voie urinaire. Cependant, deux métabolites présentent un intérêt majeur : l'AFM1, toujours toxique, et l'AFB1 8,9-époxyde (AFBO) qui est largement responsable de la cancérogénèse liée à l'AFB1, mais aussi d'autres effets toxiques (figure 1.3).

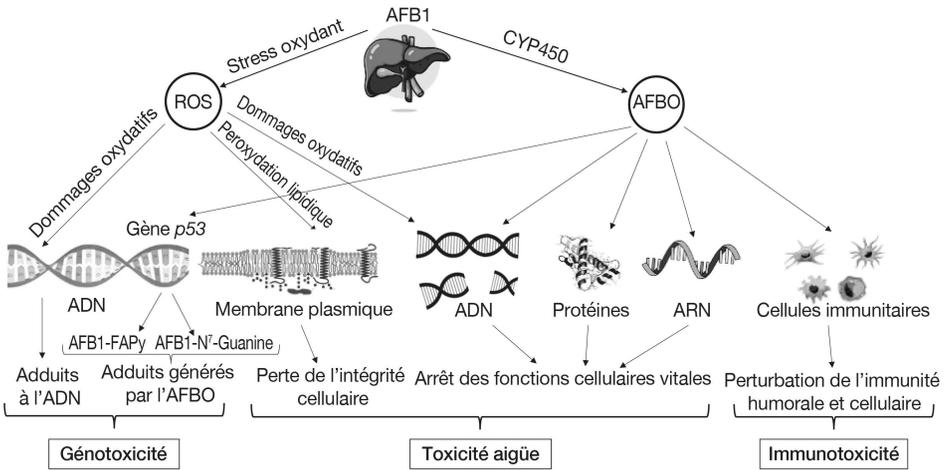


**Figure 1.3.** Métabolisation hépatique de l'AFB1 et devenir des métabolites formés. D'après Javecic *et al.*, 2023.

## Mécanismes d'action toxique

La toxicité de l'AFB1 est donc en grande partie liée à l'apparition de dérivés époxydes et, en particulier, de l'AFB1-exo-8,9-époxyde (AFBO) (1 000 fois plus toxique que le dérivé -endo). Ces dérivés peuvent être conjugués au glutathion (GSH) par des glutathion-S-transférases (GST), puis éliminés par voie urinaire et fécale (figure 1.3). La capacité des différentes espèces animales à conjuguer les dérivés époxydes de l'AFB1 conditionne leur sensibilité à cette toxine. En effet, ces métabolites sont très instables et, s'ils ne sont pas conjugués, ils vont réagir avec les macromolécules (acides nucléiques, protéines, phospholipides), entraînant des dommages cellulaires

et l'apparition de mutations à l'origine de la cancérogénèse. La métabolisation de l'AFB1 ayant essentiellement lieu dans le foie, cela explique pourquoi cet organe est le plus sensible (figure 1.4). Par ailleurs, de plus en plus de données montrent que la toxicité de l'AFB1 est aussi liée à la génération d'un stress oxydant important au cours de sa métabolisation cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais) produites peuvent, elles aussi, oxyder les macromolécules et perturber le bon fonctionnement cellulaire (figure 1.4).



**Figure 1.4.** Principaux mécanismes d'action toxiques de l'AFB1. D'après Benkerroum, 2020.

## Génotoxicité et cancers

L'AFB1 est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes primaires du foie chez l'humain. Ce cancer est l'un des plus fréquents (5<sup>e</sup>) et des plus mortels (1<sup>er</sup>) au monde, et il existe une très forte corrélation entre cette maladie et l'exposition à l'AFB1. L'Afrique et l'Asie sont les zones les plus touchées, regroupant près de 80 % des cas mondiaux. Il a été démontré une synergie entre l'AFB1 et d'autres facteurs de risque, en particulier le virus de l'hépatite B qui augmente de 60 fois la toxicité de l'AFB1.

L'AFBO (époxyde de l'AFB1) est en grande partie responsable du pouvoir cancérogène de l'AFB1. Lorsqu'il est formé, il s'intercale dans l'ADN et se lie de façon covalente à l'atome N<sub>7</sub> de la guanine, formant un adduit ; 60 à 80 % de ces adduits se forment au niveau du codon 249 du gène *p-53* (appelé gène « suppresseur de tumeur »). À cause de sa charge positive, cet adduit n'est pas stable et peut être éliminé, laissant alors un site apurinique sur l'ADN. Mais le cycle imidazole peut aussi s'ouvrir et former des adduits stables : les adduits *cis* et *trans*-AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPy). Ces derniers sont considérés comme responsables des lésions les plus mutagènes, car elles sont difficilement prises en charge par les systèmes cellulaires de réparation.

Si l'ADN portant ces adduits n'est pas réparé, cela peut aboutir à des mutations, en particulier une transition G → T sur le codon 249 du gène *p-53*. La protéine devient

alors non fonctionnelle, car elle ne peut plus se fixer à l'ADN. Elle perd ainsi sa capacité à réguler la transcription de nombreux gènes, dont les gènes *CDKN1A* (*cyclin-dependant kinase inhibitor 1A*) et *PUMA* (*p-53 upregulated modulatory apoptosis*), qui régulent à leur tour la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. L'inhibition de ces gènes favorise la multiplication des cellules portant des mutations et donc le développement de tumeurs.

Le stress oxydant semble aussi jouer un rôle important dans le pouvoir cancérigène de l'AFB1 (Benkerroum, 2020). En effet, le métabolisme hépatique de l'AFB1 génère un stress oxydant pouvant, à son tour, entraîner l'apparition de différents adduits à l'ADN. Les ROS produits peuvent également oxyder des constituants cellulaires comme les phospholipides membranaires, ce qui produit, là aussi, des composés mutagènes (aldéhydes). Ce rôle important du stress oxydant dans la cancérogénèse liée à l'AFB1 est démontré indirectement par l'effet protecteur de certains antioxydants (sélénium par exemple).

L'AFM1 présente dans le lait peut représenter une autre source d'exposition aux aflatoxines. La métabolisation de ce composé dans l'organisme ressemble beaucoup à celle de l'AFB1, mais l'AFM1 est moins facilement époxydée que l'AFB1, ce qui explique un potentiel génotoxique plus limité. À l'heure actuelle, l'AFM1 est classée dans le groupe 2B des molécules potentiellement cancérigènes chez l'humain par le CIRC (IARC, 2002).

Si les mycotoxines sont généralement considérées comme des dangers liés à l'alimentation, on peut de plus noter que l'exposition peut se faire également par inhalation dans les silos stockant des céréales contaminées par des aflatoxines. Il existe encore peu de données sur les conséquences d'une telle exposition, mais il est possible qu'elle entraîne des tumeurs des voies aériennes (Wangia *et al.*, 2019).

## Immunotoxicité

L'impact de l'AFB1 sur le système immunitaire est aussi lié à l'AFBO, qui va interférer avec la prolifération ou la production des cellules immunitaires ou de leurs médiateurs.

### Impact sur l'immunité innée

L'immunité innée est représentée par les systèmes limitant ou empêchant la pénétration des agents infectieux dans l'organisme. Il a été montré que le contact entre l'AFB1 (ou un mélange d'aflatoxines) et la peau peut entraîner des ulcérations. L'AFB1 perturbe aussi l'intégrité et le fonctionnement de la barrière intestinale (cytotoxicité et destruction des jonctions serrées intracellulaires). Ces modifications peuvent alors favoriser la pénétration d'agents pathogènes dans l'organisme.

L'impact délétère de la mycotoxine sur certaines cellules (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) et sur la production de cytokines a aussi été démontré, limitant les capacités de réaction de l'hôte à la présence d'un pathogène.

## Impact sur l'immunité adaptative

L'AFB1 est responsable d'échecs vaccinaux chez les animaux. Elle entraîne une réduction de la prolifération, de l'activation et/ou du fonctionnement des lymphocytes chez l'humain et l'animal. L'impact de la toxine est plus marqué sur l'immunité cellulaire que sur l'immunité humorale, ce qui peut réduire la résistance aux infections.

## Tératogénicité

Le passage de la barrière placentaire par les aflatoxines a été démontré chez des femmes enceintes. En effet, les toxines ou leurs biomarqueurs (métabolites, adduits à l'ADN, adduits à l'albumine) ont été retrouvés dans le sang de cordon foetal. Cette exposition peut avoir différents effets néfastes : retard de croissance, mort foetale, naissance prématurée...

Par ailleurs, la présence d'aflatoxines dans l'alimentation d'une femme enceinte va aussi avoir des effets indirects sur le fœtus, liés à l'impact des toxines sur la santé de la mère. Par exemple, la stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et la réduction des cytokines anti-inflammatoires vont avoir un impact sur la croissance placentaire et celle du fœtus. L'interférence avec l'assimilation de certains nutriments (voir plus loin) aura aussi des répercussions sur la croissance du fœtus.

## Retards de croissance et malnutrition

Cet effet est très important à considérer, en particulier dans les zones où la contamination est fréquente et où les enfants sont souvent confrontés à des pénuries alimentaires.

L'AFB1 interfère avec l'absorption de différentes vitamines (A, C et E) et minéraux (sélénium). Outre un impact nutritionnel direct, cela limite aussi les capacités de détoxification liées au potentiel antioxydant de ces nutriments.

L'exposition aux aflatoxines peut entraîner des retards de croissance chez les enfants, mais avoir également un impact sur le développement cérébral. Ainsi, en Afrique, un ralentissement de la croissance des enfants de moins de 5 ans a été corrélé à l'exposition chronique à de fortes concentrations d'AFB1.

Par ailleurs, l'exposition chronique à des concentrations élevées d'aflatoxines a été corrélée à l'apparition de syndromes de malnutrition sévères comme le kwashiorkor (syndrome de malnutrition par carence en protéines). Cependant, ce lien doit encore être précisé.

## Maladies neurodégénératives

Certains éléments semblent suggérer que les aflatoxines pourraient être impliquées dans l'apparition de troubles neurodégénératifs. En effet, l'AFBO et les ROS générés lors de la métabolisation de l'AFB1 par les cytochromes p450 interagissent avec les macromolécules des cellules cérébrales dont elles induisent la dégénérescence. La détection des toxines dans le tissu cérébral d'enfants décédés de kwashiorkor et leur

association possible avec le syndrome de Reye (encéphalopathie aigüe associée à un dysfonctionnement hépatique observé presque exclusivement chez les enfants) suggèrent que ces toxines peuvent franchir la barrière méningée et avoir une incidence sur le système nerveux central.

### Toxicité aigüe

La toxicité aigüe des aflatoxines peut être observée lors d'expositions à des concentrations très élevées en toxines. Un cas spectaculaire d'aflatoxicose humaine aigüe est survenu au Kenya en 2004. Il a concerné plus de 300 personnes, dont 125 sont mortes d'une insuffisance hépatique aigüe. Ces personnes avaient consommé du maïs contaminé par l'AFB1 à une concentration dépassant plusieurs centaines de microgrammes par kilogramme.

La toxicité aigüe de l'AFB1 est liée aux mêmes mécanismes que ceux entraînant les troubles évoqués précédemment. De fortes concentrations en toxique peuvent submerger les systèmes cellulaires de défense et entraîner des insuffisances tissulaires aigües. En particulier, l'apparition d'adduits sur les protéines est souvent associée à la forme aigüe de l'intoxication, car cela entraîne un arrêt de la synthèse des protéines impliquées dans des voies métaboliques vitales pour la cellule. De plus, les adduits aux phospholipides membranaires et la peroxydation lipidique liée au stress oxydant entraînent une perte d'intégrité des membranes cellulaires, des mitochondries et du réticulum endoplasmique. De fortes doses d'aflatoxines peuvent aussi entraîner l'apparition de cassures sur l'ADN (figure 1.4).

Il convient de souligner que les changements climatiques en cours et les pénuries alimentaires qu'ils vont entraîner dans les régions où le climat est favorable à la synthèse des aflatoxines risquent d'augmenter les cas de mycotoxicoses aigües, en limitant les possibilités de tri des matières premières et en entraînant la consommation d'aliments altérés qui auraient été écartés en temps normal.

### ► Conclusion

La découverte des aflatoxines dans les années 1960 a été le point de départ de l'ère moderne de la mycotoxicologie. Ces mycotoxines ont fait l'objet de très nombreux travaux et, désormais, leur voie de biosynthèse et leurs effets toxiques semblent bien documentés. Il reste néanmoins encore des zones d'ombre, en particulier sur les stimuli environnementaux pouvant interférer avec la synthèse de ces mycotoxines.

Les aflatoxines demeurent des mycotoxines particulièrement importantes en santé publique à l'échelle mondiale, car les changements climatiques risquent d'étendre largement leur zone de distribution et d'augmenter la fréquence et les niveaux de contamination des aliments dans les zones déjà sensibles. Il est donc important d'identifier les déterminants favorisant l'implantation et le développement des souches fongiques aflatoxinogènes et de développer des moyens de prévention de la contamination des aliments, respectueux de l'environnement et compatibles avec des pratiques agricoles durables.

## ► Références

- Bailly S., El Mahgubi A., Carvajal-Campos A. *et al.*, 2018. Occurrence and identification of *Aspergillus* section *Flavi* in the context of the emergence of aflatoxins in French maize. *Toxins*, 10, 525, <https://doi.org/10.3390/toxins10120525>.
- Barnes J.M., Butler W.H., 1964. Carcinogenic activity of aflatoxin to rats, *Nature*, 202, 1016, <https://doi.org/10.1038/2021016a0>.
- Benkerroum N., 2019. Retrospective and prospective look at aflatoxin research and development from a practical standpoint. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 3633, <https://doi.org/10.3390/ijerph16193633>.
- Benkerroum N., 2020. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: mechanisms of action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 423, <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>.
- Benkerroum N., Ismail A., 2022. Human breast milk contamination with aflatoxins, impact on children's health and possible control means: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 16792, <https://doi.org/10.3390/ijerph192416792>.
- Caceres I., Al Khoury A., El Khoury R. *et al.*, 2020. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: a review. *Toxins*, 12, 150, <https://doi.org/10.3390/toxins12030150>.
- Cadenillas L., Hernandez C., Bailly S. *et al.*, 2023. Role of polyphenols from the aqueous extract of *Aloisia citrodora* in the inhibition of Aflatoxin B1 synthesis in *Aspergillus flavus*. *Molecules*, 28, 5123, <https://doi.org/10.3390/molecules28135123>.
- Cazals M., 2022. Le RASFF : bilan de 11 années de notifications : nature des dangers, origine et évolution, thèse de doctorat vétérinaire, Université de Toulouse.
- Efsa, 2020. Risk assessment of aflatoxins in food. *Efsa Journal*, 18, 6040, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>.
- Eskola M., Kos G., Elliott C.T. *et al.*, 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 60, 2773, <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>.
- FAO, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, FAO food and nutrition papers, <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm#Contents> (consulté le 23/08/2023).
- Frisvad J.C., Hubka V., Ezekiel C.N. *et al.*, 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1-63, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>.
- Gibb H., Devleeschauwer B., Bolger B.M. *et al.*, 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of four foodborne chemical toxins, 2010: A data synthesis. *PLoS Research*, 4, 1393, <https://doi.org/10.12688/f1000research.7340.1>.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2002. *Aflatoxins*, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, IARC Press, 82, 171-300.
- Jallow A., Xie H., Tang X. *et al.*, 2021. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: from occurrence to control. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 20, 2332, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12734>.
- Javecic V., Dumanovic J., Alomar S.Y. *et al.*, 2023. Research update on aflatoxins toxicity, metabolism, distribution and detection: a concise overview. *Toxicology*, 492, 153549, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153549>.
- Klich M.A., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8, 713, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>.
- Union européenne, 2023. Règlement 2023/915 de la commission concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. *J. Off. Un. Europ.*, L119, 103.
- Wangia R.N., Tang L., Wang J.S., 2019. Occupational exposure to aflatoxins and health outcomes: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C.*, 37, 215, <https://doi.org/10.1080/10590501.2019.1664836>.

## Chapitre 2

---

# Les ochratoxines

Selma Snini et Florence Mathieu

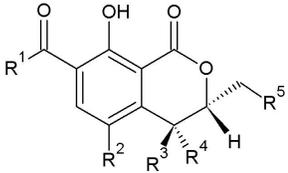
### ►► Introduction

Les ochratoxines (OT) sont des polycétides dérivés de la famille des dihydroisocoumarines. Parmi elles, l'ochratoxine A (OTA), produite par des champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, peut contaminer de nombreuses matières premières. L'OTA présente divers effets toxiques pour l'humain et l'animal. Elle est donc soumise à une réglementation européenne pour garantir la sécurité sanitaire des denrées (voir chapitre 20).

### ►► Structure chimique des ochratoxines

La famille des OT est composée de l'OTA et de huit métabolites issus de sa transformation, différents les uns des autres de par la nature chimique de leurs radicaux (figure 2.1).

Le nom chimique de l'OTA sous la nomenclature IUPAC est N-[(3R)-(5-Chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-7-isochromanyl)carbonyl]-L-phénylalanine. L'OTA, de formule brute  $C_{20}H_{18}ClNO_6$ , est caractérisée par la fixation de la L- $\beta$ -phénylalanine (R1), *via* une liaison amide, sur le noyau isocoumarine. C'est un acide organique faible, de pKa 7,1, de masse molaire 403,8 g . mol<sup>-1</sup>, avec un point de fusion de 90 °C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. L'OTA est une molécule naturellement fluorescente à la longueur d'onde d'excitation de 340 nm et présente un maximum d'émission à 428 nm sous forme non ionisée et à 467 nm sous forme ionisée. En milieu acide et à pH neutre, l'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires tels que les alcools, les cétones et le chloroforme. À l'exception des conditions alcalines, elle est très peu soluble dans l'eau et insoluble dans les éthers de pétrole et les hydrocarbures saturés. Comme la plupart des mycotoxines, l'OTA est une molécule



Nom	Abréviation	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Ochratoxine A	OTA	Phénylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	OTB	Phénylalanyl	H	H	H	H
Ochratoxine C	OTC	Phénylalanyl, éthyl ester	Cl	H	H	H
Ochratoxine α	OTα	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OTβ	OH	H	H	H	H
4R-Hydroxyochratoxine A	4R-OH-OTA	Phénylalanyl	Cl	H	OH	H
4S-Hydroxyochratoxine A	4S-OH-OTA	Phénylalanyl	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxine A	10-OH-OTA	Phénylalanyl	Cl	H	H	OH
Ochratoxine A ouverte	OP-OTA	Phénylalanyl	Cl	-	-	-

**Figure 2.1.** Structure chimique des différentes ochratoxines et de leurs métabolites.

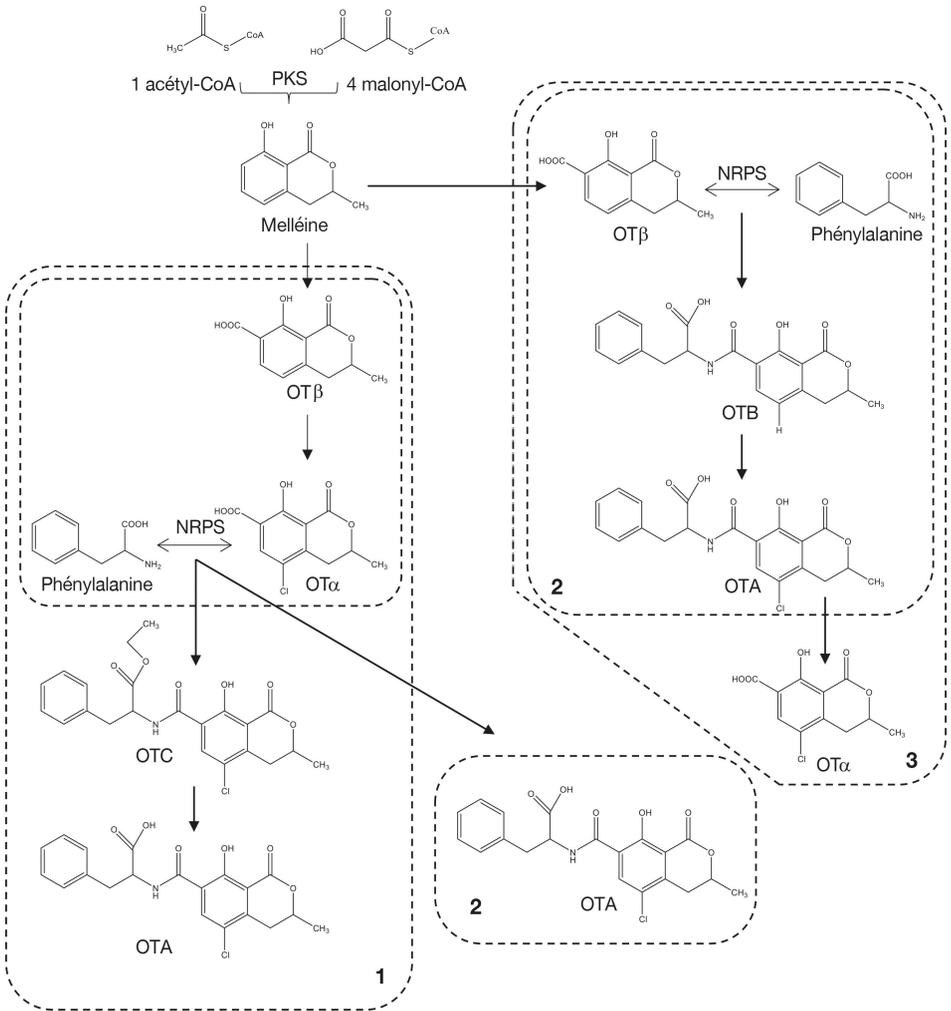
très stable chimiquement et thermiquement. Ainsi, une fois les denrées alimentaires contaminées, il est très difficile d'éliminer totalement cette molécule. Même à 250 °C, sa destruction n'est pas assurée.

## ► Biosynthèse de l'OTA

Bien que l'OTA soit une mycotoxine pouvant mettre en danger la sécurité sanitaire des aliments et la santé humaine, sa voie de biosynthèse est moins décrite que pour d'autres mycotoxines comme les aflatoxines, les trichothécènes ou les fumonisines. La voie de biosynthèse de l'OTA a d'abord été étudiée au niveau biochimique. Compte tenu de sa structure chimique, trois étapes cruciales de sa biosynthèse ont été identifiées : la biosynthèse du groupe polycétide-isocoumarine, qui est assurée par une polycétide (*polyketide* en anglais) synthase (PKS) ; la liaison à la phénylalanine, qui est réalisée par une peptide synthétase non ribosomique (NRPS) ; et l'étape de chloration, qui est réalisée par une halogénase.

Un premier schéma de la voie de biosynthèse de l'OTA a été proposé en 1979, par Huff et Hamilton. La melléine est le premier intermédiaire, de nature polycétide, issu de la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA et de quatre molécules de malonyl-CoA, sous l'action d'une PKS. La melléine est ensuite oxydée en ochratoxine β (OTβ) qui, après ajout d'un atome de chlore, est transformée en ochratoxine α (OTα). Cette dernière est ensuite transformée en ochratoxine C (OTC), par liaison avec l'ester éthylique de la phénylalanine, sous l'action d'une NRPS. Enfin, l'OTC est hydrolysée pour former l'OTA. En 2001, Harris et Mantle ont proposé une autre voie de biosynthèse de l'OTA, en se basant sur des expériences de radiomarquage au carbone 14 de plusieurs précurseurs. Ils ont alors proposé la biotransformation de l'OTβ en OTα puis en OTA par liaison directe avec la phénylalanine. Dans cette voie de biosynthèse, l'OTC n'était pas un précurseur de la biosynthèse de l'OTA. Dans une voie alternative, l'OTβ serait liée à la phénylalanine et ensuite transformée en ochratoxine B (OTB), avec une étape finale de chloration pour produire de l'OTA. Finalement, en 2012, Gallo *et al.* ont suggéré une troisième potentielle voie de biosynthèse, dans laquelle l'OTβ et la phénylalanine sont

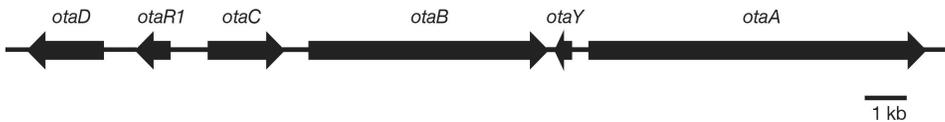
transformées en OTB sous l'action d'une NRPS et l'OTB est ensuite transformée en OTA après une étape de chloration. Dans cette dernière version, l'OTA est ensuite métabolisée en OT $\alpha$  et en d'autres métabolites. Ces différentes hypothèses sont présentées dans la figure 2.2.



**Figure 2.2.** Hypothèses sur la voie de biosynthèse de l'OTA par (1) Huff et Hamilton (1979), (2) Harris et Mantle (2001), et (3) Gallo *et al.* (2012).

L'évolution des techniques de biologie moléculaire, telles que le séquençage nouvelle génération, a grandement augmenté le nombre de génomes séquencés de souches fongiques productrices d'OTA. En conséquence, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires conduisant à la production d'OTA chez ces souches et ont permis d'identifier les gènes impliqués. C'est le séquençage complet du génome d'*Aspergillus carbonarius* ITEM 5010 et son analyse *in silico* qui ont permis l'identification du *cluster* de gènes de la voie de biosynthèse de l'OTA par Gallo

*et al.* (2012). Ils ont démontré par mutation génique le rôle de la PKS (*AcOTApks* ou *otaA*) dans la condensation des unités malonyl et acétyl-CoA, le rôle de la NRPS (*AcOTAnrps* ou *otaB*) dans la fixation de la phénylalanine à l'OT $\beta$  pour former de l'OTB, et l'implication d'une halogénase (*AcOTAhal* ou *otaD*) responsable de la fixation d'un atome de chlore sur la molécule d'OTB pour former l'OTA. L'analyse *in silico* de la région génomique portant ces trois gènes et l'étude de l'expression des gènes localisés autour ont révélé la présence de gènes dont l'expression était corrélée à la production d'OTA chez *A. carbonarius*. Il s'agit d'un gène codant pour une enzyme de type cytochrome P450 (*AcOTAp450* ou *otaC*) et d'un gène codant pour un facteur de transcription de type *basic-leucine-zipper* (*AcOTAbZIP* ou *otaR1*). L'implication de ces 5 gènes a été mise en évidence chez 6 espèces fongiques productrices d'OTA et l'analyse comparative du *cluster* de l'OTA chez les champignons *Aspergillus steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *A. carbonarius* et *Penicillium nordicum* a démontré une très forte conservation dans l'organisation du *cluster* (Gil-Serna *et al.*, 2020). Dernièrement, une analyse comparative des génomes de 19 espèces fongiques du genre *Aspergillus* et de 2 espèces fongiques du genre *Penicillium*, toutes productrices d'OTA, a révélé la présence d'un sixième gène (*otaY*) localisé entre les gènes *otaA* et *otaB*. L'analyse de la séquence de ce gène indique qu'il coderait pour une protéine avec un domaine de type Snoals, indiquant ainsi son appartenance à la famille des polycétides cyclases. Son implication dans la voie de biosynthèse de l'OTA a été démontrée par sa complète délétion chez *A. carbonarius*, qui a conduit à l'absence de production d'OTA chez la souche mutante (Ferrara *et al.*, 2021). Enfin, cette analyse comparative menée sur 21 génomes d'espèces fongiques productrices d'OTA permet aujourd'hui de proposer une structure commune du *cluster* de gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA (figure 2.3).



**Figure 2.3.** Cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'OTA chez *Aspergillus carbonarius*, avec *otaA* : PKS ; *otaB* : NRPS ; *otaC* : P450 ; *otaD* : halogénase ; *otaY* : polycétide cyclase ; *otaR1* : facteur de transcription.

## » Espèces productrices d'OTA

L'OTA a été isolée pour la première fois en 1965, à partir d'une culture d'*A. ochraceus* (*Aspergillus* de la section *Circumdati*). Mais cette mycotoxine peut être produite par d'autres espèces d'*Aspergillus* ainsi que par certaines espèces du genre *Penicillium* qui colonisent les différentes denrées alimentaires en fonction du climat : les premières sont présentes dans les régions relativement chaudes voire tropicales, tandis que les secondes se rencontrent plutôt dans les régions plus froides (Wang *et al.*, 2016).

Concernant la production d'OTA par les champignons du genre *Aspergillus*, ceux-ci appartiennent aux sections *Circumdati* (groupe *A. ochraceus*) et *Nigri* (*A. carbonarius*

et *A. niger*). Dans la section *Circumdati*, les espèces *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* sont les plus souvent rencontrées. Elles sont caractérisées par des spores de couleur ocre, sont très proches sur le plan phénotypique et génomique, et difficiles, mais pas impossibles à dissocier (Durand *et al.*, 2019). Cependant, leurs niveaux de production d'OTA sont très différents. *A. ochraceus* est considéré comme un faible producteur, tandis que *A. westerdijkiae* comme l'un des plus grands (Visagie *et al.*, 2014). Des études démontrent qu'il existe d'autres espèces de la section *Circumdati* productrices d'OTA : *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. wentii*, *A. steynii*, *A. roseoglobulosus*, *A. pseudoelegans*, *A. flocculosus*, *A. cretensis* et *A. affinis* (Wang *et al.*, 2016). Ce n'est qu'en 1996 que l'OTA a été isolée pour la première fois à partir d'une culture d'*A. carbonarius*, qui fait partie de la section *Nigri* ou *Aspergilli* noirs, des champignons d'altération d'aliments autres que céréales et produits céréaliers, répandus dans le monde entier et caractérisés par des spores de couleur noire. Par rapport à la production d'OTA, seules 5 espèces de cette section sont considérées comme productrices : on trouve d'une part *A. carbonarius* et *A. sclerotioniger*, très proches sur le plan phylogénétique, et d'autre part, *A. lacticoffeatus*, *A. niger* et *A. welwitschiae*, regroupés sous la dénomination « *Niger* agrégats », qui désigne des groupes d'espèces morphospécifiques étroitement apparentées, que l'on ne peut distinguer que difficilement (Cabañes et Bragulat, 2018).

Pour le genre *Penicillium*, depuis quelques années, *P. verrucosum* et *P. nordicum* sont les deux espèces productrices d'OTA connues et acceptées, malgré quelques rapports sur la production d'OTA par d'autres espèces. Ces deux espèces à croissance lente présentent des caractéristiques morphologiques communes, rendant difficile l'identification à l'aide des techniques morphologiques traditionnelles. Frisvad *et al.* (2004) ont souligné qu'une approche polyphasique, comprenant une combinaison de séquences d'ADN, une analyse de la production de métabolites spécialisés et d'autres caractères phénotypiques, est nécessaire pour classer et identifier les espèces de *Penicillium* du sous-genre *Penicillium*. Dans ce sous-genre, les espèces productrices d'OTA appartiennent à la série *Verrucosa* de la section *Viridicata*, dont l'un des deux sous-clades regroupe des souches de *P. verrucosum* et de *P. nordicum* (Frisvad *et al.*, 2004). *P. verrucosum* est une espèce ochratoxinogène importante, car elle est le principal producteur d'OTA dans les céréales dans les zones à climats tempérés et froids, telles que le Danemark, la Suède, le Canada ou encore les États-Unis. *P. nordicum* est généralement isolé dans des aliments riches en sel (NaCl) et en protéines, à la surface des jambons dans les usines de fabrication de jambons secs en Italie.

## ►► Types d'aliments contaminés et occurrence

L'OTA contamine des denrées alimentaires à destination de l'alimentation humaine ou animale suite à la colonisation de la matrice par le ou les champignons filamenteux producteurs qui se retrouvent dans des conditions environnementales favorables à leur croissance et à la production d'OTA. Le niveau de contamination varie considérablement d'une denrée alimentaire à l'autre et dépend d'autres facteurs qui sont notamment la nature des espèces fongiques productrices, le climat et les conditions de stockage (Li *et al.*, 2021). L'OTA a été mise en évidence pour la première

fois en 1965 dans les céréales en Afrique de Sud et il a fallu attendre 1996 pour qu'elle soit mise en évidence dans les raisins. La présence naturelle de l'OTA a été signalée sous des climats tempérés à tropicaux, principalement sur les céréales et leurs produits dérivés. On la trouve également dans une variété d'aliments d'origine végétale, notamment le pain, la bière, le chocolat, le café, les fruits secs, le raisin et le jus de raisin, les herbes médicinales et les épices. La contamination de ces produits agricoles peut se produire avant et après la récolte. En outre, une présence d'OTA a également été constatée dans des denrées alimentaires d'origine animale, telles que le fromage, le lait, la viande (porc, volaille), à la suite d'une contamination indirecte par des animaux nourris avec des aliments contaminés par l'OTA (Vlachou *et al.*, 2022). Cependant, la contamination par l'OTA des fromages et des produits à base de viande peut aussi se produire de manière directe, lorsque des moisissures produisant de l'OTA se développent au cours de leur maturation ou de leur transformation.

La présence d'OTA dans les denrées alimentaires a été signalée dans le monde entier, et il est presque impossible d'éviter totalement sa consommation. Il existe un consensus sur le fait que ces aliments contaminés par l'OTA constituent une source de risque grave pour la santé publique. En 2020, l'Efsa a publié un rapport montrant l'occurrence de l'OTA sur près de 74 000 échantillons analysés provenant de 29 pays européens, entre 2009 et 2018. Les plus fortes concentrations ont été obtenues dans des compléments alimentaires à base d'extraits de plantes (35 ppb), du piment (11 ppb), des bonbons à la réglisse (10 ppb), du paprika en poudre (9 ppb), du jambon de porc (3 ppb) ou encore du fromage (2,5 ppb). Les principaux aliments contribuant à l'exposition des enfants à l'OTA sont les aliments à base de blé, suivis de l'avoine, du riz et des raisins secs. Quant à la bière, au café et au vin, ils contribuent à l'exposition des consommateurs européens plus âgés (Efsa, 2020).

Pour protéger la santé de tous les consommateurs et limiter leur exposition aux mycotoxines, l'Europe établit des règlements qui fixent les teneurs maximales autorisées dans les denrées alimentaires. Ainsi, le règlement européen (UE) 2023/915 vient récemment d'être publié et abroge l'ancien règlement (CE) 1881/2006 quant aux teneurs maximales autorisées en OTA, dans certaines denrées alimentaires (voir chapitre 20). Un point crucial dont il faudra tenir compte dans les années à venir est l'impact du changement climatique sur cette contamination en OTA. Des travaux récents étudient l'impact de différents scénarios sur le devenir des flores fongiques productrices de mycotoxines (Paterson *et al.*, 2017) ou d'OTA sur diverses matrices : *A. westerdijkiae* sur le café (Akbar *et al.*, 2020), *A. carbonarius* sur le raisin (Cervini *et al.*, 2021) ou encore *P. verrucosum* sur les matrices à base de blé (Abdelmohsen *et al.*, 2021).

## ► Métabolisme et genèse de formes modifiées de l'OTA

L'OTA peut être métabolisée par les animaux, les humains et les plantes, mais aussi par les champignons, les levures et les bactéries (Wu *et al.*, 2011). Sa biotransformation *in vivo* chez l'animal et l'humain est faible et l'élimination de ses métabolites est particulièrement lente, jouant ainsi un rôle important dans sa toxicité. La plupart des métabolites de l'OTA, comme l'OT $\alpha$  et l'OT $\beta$ , sont moins toxiques que la molécule mère. Cependant, d'autres présentent une toxicité plus élevée. La

compréhension des voies métaboliques de l'OTA chez les animaux et les humains est nécessaire pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments. L'OTA pouvant être métabolisée par les plantes, elle peut également poser des problèmes de santé après ingestion par les animaux et les humains. Sa métabolisation a été largement étudiée chez les rongeurs et cela a permis d'identifier de nombreux métabolites et de fournir une riche base d'étude du métabolisme de l'OTA chez d'autres organismes.

Comme d'autres xénobiotiques, l'OTA peut subir des réactions de biotransformation catalysées par des enzymes de phases I et II. Les enzymes de phase I sont impliquées dans les réactions d'hydrolyse et d'hydroxylation. Le principal métabolite de l'OTA est l'OT $\alpha$ , issue de l'hydrolyse de la liaison amide entre la phénylalanine et l'acide dihydroisocoumarique. Chez le rat, l'OT $\alpha$  a été détectée dans le cæcum et le gros intestin, puis principalement excrétée dans les fèces. Il est admis que l'OT $\alpha$  est majoritairement générée par les écosystèmes microbiens présents dans l'intestin chez les non-ruminants, y compris les humains, et par ceux du rumen chez les vaches, les moutons et d'autres ruminants. La dégradation de l'OTA en OT $\alpha$  peut être catalysée par de nombreuses hydrolases, mais parmi elles, les carboxypeptidases sont les plus actives. L'OT $\alpha$  est partiellement absorbée dans l'intestin, elle ne s'accumule pas dans les reins et est excrétée dans l'urine principalement sous forme d'OT $\alpha$ -glucuronide, métabolite urinaire majeur chez l'humain.

L'hydroxylation de la molécule d'OTA concerne principalement la partie isocoumarine par l'action de cytochromes P450 (CYP450), enzymes de phase I, conduisant à la formation de 4-hydroxyochratoxine A (4-OH-OTA) sous forme de deux stéréoisomères (4R-OH-OTA et 4S-OH-OTA), lors d'expérimentations menées *in vitro* ou *in vivo* chez le rat et le porc. Un métabolite supplémentaire, le 10-hydroxyochratoxine A (10-OH-OTA), est détecté lorsque des microsomes de foie de lapin sont incubés en présence d'OTA. Les études de toxicité s'accordent à dire que ces métabolites présentent une toxicité plus faible que l'OTA. Par ailleurs, l'hydroxylation de la partie phénylalanine par des CYP450 pourrait conduire à la formation de trois autres métabolites, provisoirement identifiés comme le 9'-hydroxy-OTA, le 7'-hydroxy-OTA et le 5'-hydroxy-OTA. Cependant, l'absence de composés de référence (standards commerciaux) pour confirmer la structure chimique de ces composés ne permet pas à ce jour de confirmer l'existence de cette réaction d'hydroxylation. Enfin, la déchloration de l'OTA par une enzyme de type halogénase conduit à la formation d'OTB, un métabolite moins toxique qui peut ensuite être converti en 4-OH-OTB et ochratoxine  $\beta$  (OT $\beta$ ). Cependant, l'hydroxylation de l'OTA par des CYP450 peut conduire à la formation d'ochratoxine quinone (OTQ) et d'ochratoxine hydroquinone (OTHQ), deux métabolites qui présentent une toxicité plus forte que l'OTA. Chez le rat, un métabolite avec la fonction lactone ouverte (OP-OTA) a été détecté dans l'urine et la bile. Les analyses d'évaluation de la toxicité de ce métabolite lui accordent une toxicité au moins équivalente, voire plus élevée que l'OTA.

Les enzymes de phase II sont des enzymes de conjugaison qui ajoutent à la molécule un radical hydrosoluble comme l'acide glucuronique, le sulfate, le glutathion ou un dérivé de sucres (pentose, hexose). Concernant la métabolisation de l'OTA par ce type d'enzymes, il s'agit principalement de réactions de conjugaison avec l'acide glucuronique par l'action d'enzymes de la famille des glucuronyl-transférases (UGT), conduisant à la formation d'ochratoxine A glucuronide. D'autres formes conjuguées avec

du sulfate ou des dérivés de sucres ont été observées *in vitro* et *in vivo*, mais en faibles quantités. Enfin, la détection récente dans les urines humaines d'un nouveau métabolite issu de la biotransformation de l'OTA, l'ochratoxine-N-acétyl-L-cystéine (OTB-NAC), confirme que l'OTA peut également être biotransformée sous forme conjuguée avec du glutathion, par l'action de glutathion-S-transférases (GSTs). L'ensemble de ces réactions de biotransformation de l'OTA chez l'animal ou l'humain, ainsi que les métabolites issus de ces dernières, sont présentés dans la figure 2.4.

De nombreux micro-organismes (bactéries, levures et champignons filamenteux) sont capables de métaboliser l'OTA. Les bactéries concernées appartiennent aux genres *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Lactobacillus*, *Sphingomonas*, *Lysobacter*, *Stenotrophomonas* et *Phenylobacterium*. Divers produits de dégradation ont pu être identifiés par chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). Plusieurs genres de levures (*Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* et *Cryptococcus*) sont également capables de métaboliser l'OTA, principalement en OT $\alpha$ , par l'action d'enzymes de la famille des carboxypeptidases.

Enfin, certaines espèces de champignons filamenteux peuvent métaboliser l'OTA en produisant des métabolites identiques à ceux obtenus chez les animaux. Plusieurs études s'accordent sur la capacité des champignons du genre *Aspergillus* de la section *Nigri* à dégrader l'OTA en produisant tous les mêmes métabolites, notamment de l'OT $\alpha$ . D'autres champignons filamenteux du genre *Aspergillus* ont également démontré leur capacité à dégrader l'OTA. Il s'agit notamment d'*A. clavatus*, *A. versicolor*, *A. wentii* et *A. ochraceus*.

La métabolisation des mycotoxines peut aussi se produire chez les plantes. En effet, elles ont la capacité de se défendre contre les composés toxiques en les dégradant ou les transformant. Cependant, cette métabolisation végétale de l'OTA est peu décrite, certainement car les champignons producteurs d'OTA sont des champignons dits opportunistes. Néanmoins, une étude a démontré *in vitro* que des suspensions cellulaires de maïs et de blé pouvaient produire les métabolites 4R-OH-OTA et 4S-OH-OTA, qui sont ensuite glycosylés ou estérifiés pour former respectivement du 4R-OH-OTA-4-O- $\beta$ -D-glucoside ou du 4S-OH-OTA-4-O- $\beta$ -D-glucoside, et du 4R-OH-OTA méthyl ester ou du 4S-OH-OTA méthyl ester.

## ► Toxicité de l'OTA

La toxicité de l'OTA a été largement étudiée lors des décennies précédentes et de nombreuses revues à ce sujet ont été publiées. L'OTA est une molécule néphrotoxique, hépatotoxique, embryotoxique, tératogène, neurotoxique, immunotoxique, génotoxique et cancérigène chez de nombreuses espèces, avec des différences liées à l'espèce et au sexe.

Historiquement, l'exposition à l'OTA a été associée au développement d'une maladie rénale chronique, la néphropathie endémique des Balkans (NEB), caractérisée par une atteinte lente et progressive du système rénal conduisant à l'apparition de tumeurs dans le système urinaire dans 40 % des cas. L'étiologie de la NEB est

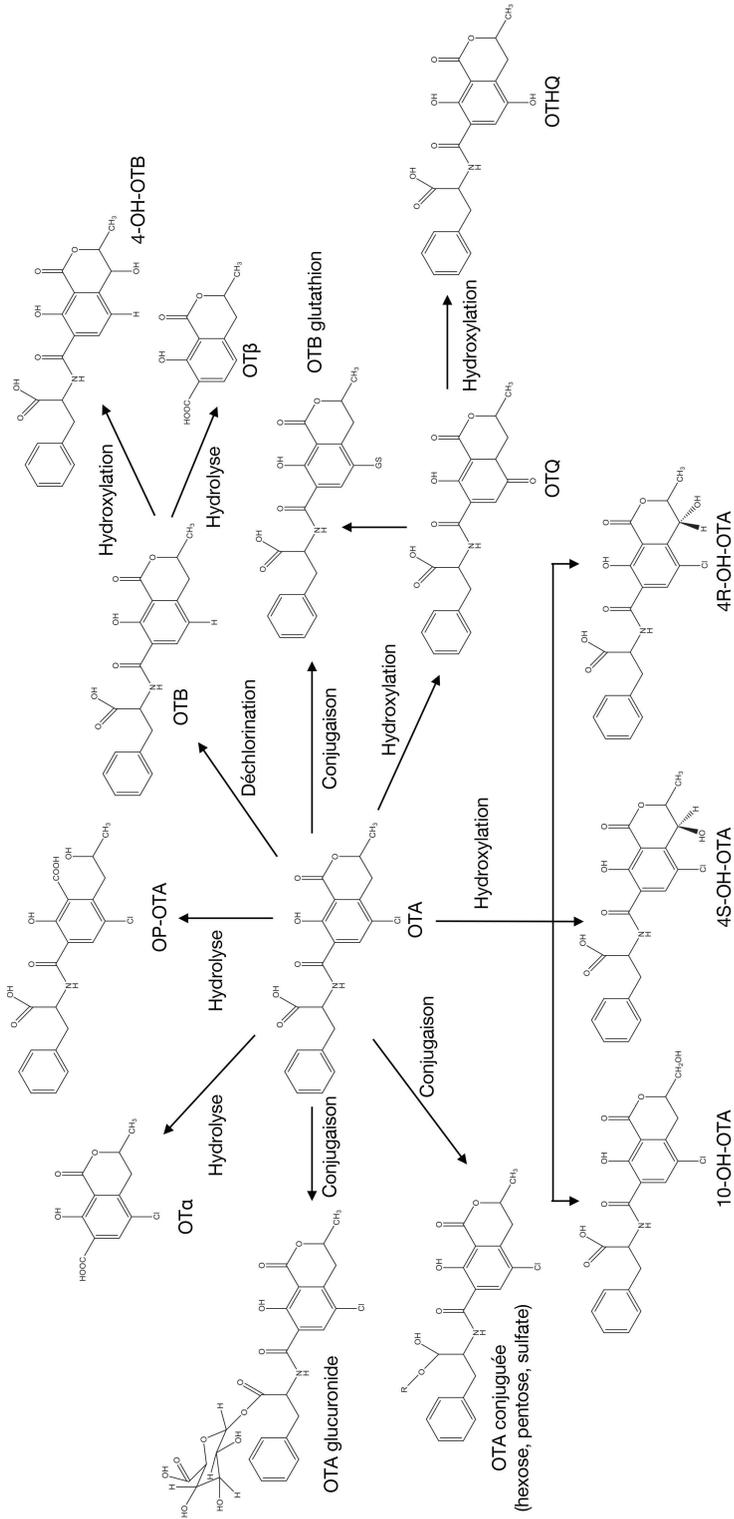


Figure 2.4. Biotransformation de l'OTA et métabolites associés.

encore inconnue. Les deux principales hypothèses se concentrent sur le rôle potentiel de l'acide aristolochique issu de l'aristoloche clématite (plante) et des mycotoxines telles que l'OTA ou la citrinine.

L'OTA est rapidement absorbée et distribuée dans l'organisme, mais son élimination et son excrétion sont lentes, conduisant à une accumulation dans l'organisme certainement due à sa fixation aux protéines plasmatiques. Sa toxicité varie considérablement en fonction de l'espèce animale, du sexe et de la voie d'administration. Le Comité mixte FAO-OMS d'experts des additifs alimentaires a rapporté des valeurs de DL<sub>50</sub> pour l'OTA chez diverses espèces, en se basant sur des compilations bibliographiques<sup>1</sup>. Les valeurs de DL<sub>50</sub> par voie orale varient de 46 à 58,3 mg/kg p.c. (kilogramme de poids corporel) chez la souris et de 20 à 30,3 mg/kg p.c. chez le rat mâle (les rats femelles étant plus sensibles). Les valeurs de DL<sub>50</sub> chez le chien, le porc et le poulet sont respectivement de 0,2, 1 et 3,3 mg/kg p.c. L'administration de doses répétées d'OTA chez le rat et le porc a permis de fixer respectivement une dose minimale ayant un effet de 15 µg/kg p.c et de 8 µg/kg p.c.

L'OTA est une molécule hautement néphrotoxique dont les reins sont la principale cible. En raison de son accumulation dans les cellules épithéliales du tube proximal, elle provoque l'apparition de lésions cellulaires par le biais du stress oxydant, de lésions de l'ADN, de l'apoptose cellulaire et une augmentation de la réponse inflammatoire (Özcan *et al.*, 2015). Elle provoque des cas d'ochratoxicose chez les volailles et peut provoquer une néphropathie mycotoxique chez les porcs. D'autres effets toxiques peuvent être causés en fonction de la dose administrée et de l'espèce animale considérée. Ils comprennent des anomalies histologiques cardiaques et hépatiques, une aberration des facteurs de coagulation chez le rat, accompagnée d'hémorragies et de thromboses dans la rate, le cerveau, le foie, les reins et le cœur, des lésions du tractus gastro-intestinal et des tissus lymphoïdes chez le hamster, une myélotoxicité chez la souris, ou encore une fragilité intestinale et des lésions rénales chez les poulets. Des effets tératogènes et immunosuppresseurs ont également été démontrés après une exposition à l'OTA, mais à des doses plus élevées que celles provoquant des néphropathies (> 200 - 4 000 µg/kg d'aliments ; Pfohl-Leskowicz et Manderville, 2007). Enfin, l'OTA est décrite comme une molécule potentiellement cancérigène et a donc été classée dans le groupe 2B, par le Centre international de recherche sur le cancer.

La néphrocarcinogénicité est l'effet cancérigène le plus important de l'OTA. Il a été démontré que l'OTA augmentait l'apparition de tumeurs rénales chez les rats et les souris, notamment chez les rats mâles. Cependant, son mode d'action conduisant au développement de tumeurs n'est pas clair et suscite des avis divergents chez les chercheurs. Le potentiel génotoxique de l'OTA a été largement étudié *in vitro* par le test des comètes, méthode utilisée pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes. Des résultats positifs ont été rapportés sur plusieurs lignées cellulaires de différentes espèces (rongeurs, porcs, chiens, bovins, singes verts et humains), ainsi que sur des cultures primaires issues de plusieurs tissus et corrélées à l'augmentation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules. L'exposition de ces cellules à l'OTA a induit également des mitoses aberrantes, une

1. La DL<sub>50</sub> ou dose létale 50 est la dose qui conduit à 50 % de mortalité des animaux exposés (généralement des souris).

hypercondensation des chromosomes avec des chromatides anormalement séparées, des fuseaux mitotiques asymétriques/multipolaires, ainsi que des endoréduPLICATIONS (réPLICATION de l'ADN sans mitose) conduisant à des cellules polyploïdes. Les études menées *in vivo* chez le rat et la souris ont démontré que l'OTA induisait des cassures simple brin de l'ADN, en conséquence de l'augmentation des niveaux de ROS dans les cellules. La capacité de l'OTA à induire des mutations a été étudiée au niveau des reins chez le rat et la souris. Après des expositions de 4 ou 13 semaines, aucune mutation n'a pu être identifiée au niveau du cortex, mais des mutations ont été observées dans des cellules localisées au niveau du site cible, la zone médullaire des reins. Enfin, la formation éventuelle d'adduits spécifiques à l'ADN qui seraient induits par l'OTA reste très controversée. Une seule étude propose la formation d'adduits à l'ADN *via* la biotransformation de l'OTA en ochratoxine quinone, mais sans préciser la structure chimique des adduits et les niveaux d'adduits à l'ADN rapportés étaient de l'ordre de 20 à 70 pour  $10^9$  nucléotides. D'après le dernier rapport du groupe de travail de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa) portant sur l'évaluation des risques liés à la présence d'ochratoxine A dans les aliments, ces niveaux d'adduits, qualifiés de faibles, sont difficiles à concilier avec les effets génotoxiques de l'OTA et sont, au mieux, des contributeurs mineurs, très probablement attribuables à des dommages oxydatifs cellulaires. Néanmoins, les mutations induites par l'OTA dans les reins de rats et de souris ne seraient manifestement pas une simple conséquence des lésions oxydatives de l'ADN (Efsa, 2020).

### ►► Conclusion

La famille des ochratoxines est composée de l'ochratoxine A (OTA) et de huit métabolites issus de sa transformation. L'OTA est produite par des champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui colonisent, en fonction du climat, différentes denrées alimentaires. La présence d'OTA a été signalée sous des climats tempérés à tropicaux, principalement sur les céréales et leurs produits dérivés. On la trouve également dans une variété d'aliments d'origine végétale tels que le chocolat, le café, les fruits secs, le raisin ou encore les épices. En outre, la contamination par l'OTA a également été constatée dans des denrées alimentaires d'origine animale, telles que le fromage, le lait ou la viande. De par son fort caractère néphrotoxique, elle est classée dans le groupe 2B comme cancérigène possible pour l'humain. De fait, sa présence dans les denrées alimentaires est strictement réglementée en France et en Europe. À ce jour, la voie de biosynthèse de l'OTA et le *cluster* de gènes associé ne sont pas complètement élucidés et nécessitent d'être mieux caractérisés afin de proposer des méthodes de lutte efficaces contre cette contamination.

### ►► Références

Abdelmohsen S., Verheecke-Vaessen C., Garcia-Cela E. *et al.*, 2021. Dynamics of solute/matrix stress interactions with climate change abiotic factors on growth, gene expression and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* on a wheat-based matrix. *Fungal Biology*, 125, 62-68, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.10.005>.

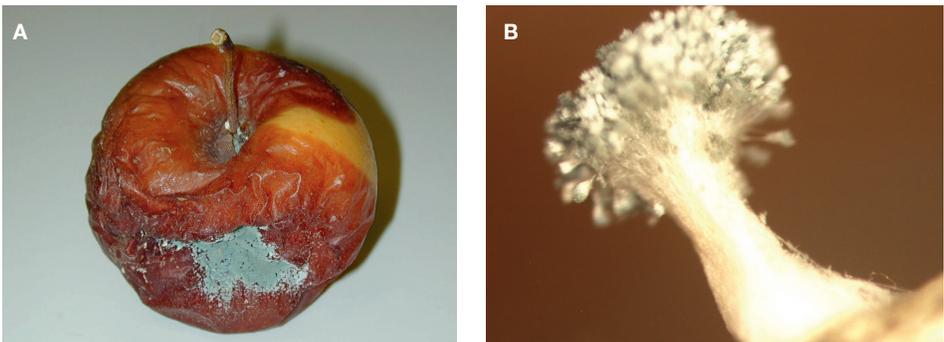
- Akbar A., Medina A., Magan N., 2020. Resilience of *Aspergillus westerdijkiae* strains to interacting climate-related abiotic factors: Effects on growth and ochratoxin A production on coffee-based medium and in stored coffee. *Microorganisms*, 8, 1268, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091268>.
- Cabañes F.J., Bragulat M.R., 2018. Black *Aspergilli* and ochratoxin A-producing species in foods. *Current Opinion in Food Science*, 23, 1-10, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.006>.
- Cervini C., Verheecke-Vaessen C., Ferrara M. *et al.*, 2021. Interacting climate change factors (CO<sub>2</sub> and temperature cycles) effects on growth, secondary metabolite gene expression and phenotypic ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains on a grape-based matrix. *Fungal Biology*, 125, 115-122, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.001>.
- Durand N., Fontana A., Meile J.C. *et al.*, 2019. Differentiation and quantification of the ochratoxin A producers *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* using PCR-DGGE. *Journal of Basic Microbiology*, 59, 158-165, <https://doi.org/10.1002/jobm.201800172>.
- Efsa, 2020. Risk assessment of ochratoxin A in food. *Efsa Journal*, 18, 6113, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>.
- Ferrara M., Gallo A., Cervini C. *et al.*, 2021. Evidence of the involvement of a cyclase gene in the biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. *Toxins*, 13, 892, <https://doi.org/10.3390/toxins13120892>.
- Frisvad J.C., Frank J.M., Houbraken J. *et al.*, 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50, 23-43.
- Gallo A., Bruno K.S., Solfrizzo M. *et al.*, 2012. New Insight into the Ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8208-8218, <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-12>.
- Gil-Serna J., Vázquez C., Patiño B., 2020. The Genomic regions that contain ochratoxin A biosynthetic genes widely differ in *Aspergillus* section *Circumdati* species. *Toxins*, 12, 754, <https://doi.org/10.3390/toxins12120754>.
- Harris J.P., Mantle P.G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58, 709-716, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00316-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00316-8).
- Huff W.E., Hamilton P.B., 1979. Mycotoxins — Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins — Metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, 42, 815-820, <https://doi.org/10.4315/0362-028x-42.10.815>.
- Li X., Ma W., Ma Z. *et al.*, 2021. The occurrence and contamination level of ochratoxin A in plant and animal-derived food commodities. *Molecules*, 26, 6928, <https://doi.org/10.3390/molecules26226928>.
- Özcan Z., Gül G., Yaman I., 2015. Ochratoxin A activates opposing c-MET/PI3K/Akt and MAPK/ERK 1-2 pathways in human proximal tubule HK-2 cells. *Archives of Toxicology*, 89, 1313-1327, <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1311-x>.
- Paterson R.R.M., Venâncio A., Lima N. *et al.*, 2017. Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food Research International*, 103, 478-491, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.080>.
- Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 61-99, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>.
- Visagie C.M., Varga J., Houbraken J. *et al.*, 2014. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78, 1-61, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>.
- Vlachou M., Pexara A., Solomakos N. *et al.*, 2022. Ochratoxin A in slaughtered pigs and pork products. *Toxins*, 14, 67, <https://doi.org/10.3390/toxins14020067>.
- Wang Y., Wang L., Liu F. *et al.*, 2016. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8, 83, <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>.
- Wu Q., Dohnal V., Huang L. *et al.*, 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12, 1-10, <https://doi.org/10.2174/138920011794520026>.

## La patuline

Sophie Lorber, Chrystian Zetina-Serrano,  
Sabine Schorr-Galindo, Thierry Gauthier et Olivier Puel

### ►► Introduction

*Penicillium expansum*, responsable de la pourriture bleue des pommes lors du stockage, est le principal producteur de patuline (PAT) (figure 3.1A). La PAT a été découverte au début des années 1940 par plusieurs laboratoires britanniques dans les filtrats de culture de champignons des genres *Penicillium* et *Aspergillus* (Glister, 1941), sur la lancée de la découverte de la pénicilline par Fleming. En raison de ses propriétés antibiotiques et antivirales, la PAT a fait l'objet d'essais cliniques pour le traitement des rhumes en 1944. Cependant, elle a été rapidement classée dans les mycotoxines en raison de ses effets toxiques vis-à-vis de l'humain et de l'animal. L'intoxication aiguë à la PAT entraîne des convulsions, des ulcérations, des inflammations intestinales, des vomissements, des œdèmes et des dommages à l'ADN au niveau du cerveau, du foie et des reins, alors qu'une exposition chronique conduit à des effets neurotoxiques, immunotoxiques et tératogéniques.



**Figure 3.1.** Moisissure bleue causée par *Penicillium expansum* sur une pomme 'Golden Delicious'. (A) Aspect de la pomme contaminée par *P. expansum*. © INRAE, 2009. (B) Corémie observée à la surface de la zone pourrie par un stéréomicroscope binoculaire (grossissement  $\times 50$ ). © INRAE, 2012.

## ►► Caractéristiques physicochimiques

La PAT (figure 3.2) est une lactone polycétide insaturée (4-hydroxy-4H-furo [3,2-c] pyrane-2[6H]-one), de formule chimique  $C_7H_6O_4$ , avec une masse moléculaire faible de 154,12 g/mol. Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche soluble dans l'eau et dans divers solvants organiques de forte polarité, tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone ou l'acétate d'éthyle. Elle est stable dans des conditions acides et résiste aux traitements thermiques, mais devient instable en milieu alcalin. Le point de fusion de la PAT est de 111 °C et son maximum d'absorbance ( $\lambda$  max) se situe à une longueur d'onde de 275 nm.

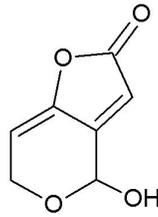


Figure 3.2. Structure chimique de la patuline.

## ►► Espèces productrices

La PAT est une mycotoxine produite par plusieurs espèces de champignons filamenteux appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Paecilomyces*. On dénombre 21 espèces parmi le genre *Penicillium* : *P. antarcticum*, *P. carneum*, *P. compactum*, *P. dipodomycicola*, *P. doidgeae*, *P. expansum*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. novae-zeelandiae*, *P. paneum*, *P. pole-evansii*, *P. psychrosexuale*, *P. samsonianum*, *P. sclerotigenum*, ainsi que *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. formosanum*, *P. glandicola* et *P. vulpinum* (Frisvad, 2018). Les six dernières espèces sont des champignons coprophiles, c'est-à-dire se développant sur les excréments, substrats considérés comme sujet à une extrême compétition entre micro-organismes. On trouve aussi trois espèces du clade *Clavati* parmi le genre *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. giganteus* et *A. longivesica*) et deux pour le genre *Paecilomyces* (*P. niveus* [anciennement *Byssochlamys nivea*] et *P. saturatus*).

## ►► Biosynthèse

La voie de biosynthèse de la PAT a été étudiée depuis les années 1950, mais il reste des zones d'ombre (figure 3.3A). Elle consiste au minimum en 10 étapes enzymatiques (Tannous *et al.*, 2018) :

1. Un acétyl-CoA et trois malonyl-CoA sont condensés grâce à l'action d'une polycétide synthase, enzyme multifonctionnelle appelée 6-méthylsalicylique synthase (MSAS), pour former l'acide 6-méthylsalicylique. Cette enzyme est codée par le gène *patK* ;



**Figure 3.3.** (A) Voie de biosynthèse de la patuline (adaptée de Puel *et al.*, 2010). (B) Représentation schématique du cluster de la patuline (15 gènes, 40 kb) chez *Penicillium expansum*. Le sens de la transcription est indiqué par les pointes des flèches. En noir, les enzymes/gènes au rôle identifié ; en blanc, ceux dont le rôle reste inconnu ; en gris clair, le gène codant pour le facteur de transcription et en gris foncé, les gènes codant pour les transporteurs.

2. L'acide 6-méthylsalicylique subit une décarboxylation par la 6-méthylsalicylique décarboxylase codée par le gène *patG* pour former le *m*-crésol (Snini *et al.*, 2014) ;
3. Le groupement méthyle du *m*-crésol est oxydé par PatH, une monooxygénase à cytochrome P-450, pour donner l'alcool *m*-hydroxybenzylique (Artigot *et al.*, 2009) ;

4. Cette étape est suivie par une réaction d'hydroxylation catalysée par un autre cytochrome P450, PatI, qui engendre la formation de l'alcool gentsylique (Artigot *et al.*, 2009) ;
5. L'alcool gentsylique pourrait ensuite être converti en aldéhyde gentsylique ;
6. L'étape suivante conduit à la formation de l'isoépoxydon ;
7. Le gène *patN* code pour une enzyme, l'isoépoxydon déshydrogénase, qui est responsable de la conversion de l'isoépoxydon en phyllostine ;
8. La phyllostine est transformée en néoPAT par la néoPAT synthase, PatF ;
9. La néoPAT est convertie en *E*-ascladiol grâce à une réduction nécessitant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme co-enzyme ;
10. Le *E*-ascladiol est finalement transformé en PAT par la PAT synthase, une glucose-méthanol-choline oxydoréductase (PatE), ou en son isomère, le *Z*-ascladiol, de façon non enzymatique (Tannous *et al.*, 2017).

Comme pour la majorité des métabolites spécialisés d'origine fongique, les gènes impliqués dans la biosynthèse de la PAT sont regroupés au sein d'un même *cluster*. Le *cluster* de la PAT est composé de 15 gènes (*patA-patO*) (figure 3.3B), qui sont répartis en trois catégories : les transporteurs (PatA, PatC et PatM), les enzymes biosynthétiques et un facteur de transcription (PatL). Ce dernier régule le *cluster* de biosynthèse de la PAT. Onze gènes codent pour des enzymes biosynthétiques, PatB, PatD, PatF, PatG, PatK et PatN, localisées dans le cytoplasme, PatH et PatI, localisées dans le réticulum endoplasmique (RE), PatJ et PatO, localisées dans la vacuole, et PatE, localisée au niveau de la paroi cellulaire voire à l'extérieur de la cellule fongique (Li *et al.*, 2020). La fonction des quatre gènes *patB*, *patD*, *patO* et *patJ* reste peu claire.

## ► Rôles

*P. expansum* pénètre dans le fruit par des blessures ou par des ouvertures naturelles. Une fois présent dans la plaie, il utilise un vaste arsenal de facteurs de virulence et des facteurs d'agressivité pour manipuler l'hôte en vue d'un gain nutritionnel et au profit de sa reproduction. Parmi ces facteurs figurent de nombreux métabolites spécialisés, y compris des mycotoxines bien caractérisées telles que la citrinine et la PAT. L'implication de la PAT dans le mécanisme d'infection de *P. expansum* et sa classification en tant que facteur d'agressivité plutôt que facteur de virulence sont maintenant bien illustrées (Snini *et al.*, 2016 ; Luciano-Rosario *et al.*, 2020). De plus, la PAT n'agit pas uniquement sur l'hôte, mais également sur différents champignons phytopathogènes post-récolte concurrents, tels que *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fioriniae* et *Monilinia fructicola*, ce qui suggère que la toxine est importante pour permettre à *P. expansum* de dominer la niche post-récolte (Bartholomew *et al.*, 2022). Il est cependant intéressant de mentionner que la PAT n'est produite qu'au niveau du mycélium. Zetina-Serrano *et al.* (2020) ont montré que la production de PAT cesse lors de la formation des conidiophores (appareils reproducteurs asexuels). Ainsi, du point de vue de son écophysiologie, le champignon ne produit la PAT que durant la colonisation du fruit. Dès lors que celle-ci est terminée et que le champignon perce l'épicarpe pour initier sa reproduction asexuée (figure 3.1B), la production s'arrête.

## ► Occurrence et contamination des denrées alimentaires

Les pommes et leurs produits dérivés constituent la source de contamination prédominante par la PAT. Ainsi, entre 2020 et 2023, 12 produits à bases de pommes (jus et compote) ont fait l'objet d'une alerte RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), liée à la teneur en PAT. On retrouve aussi occasionnellement celle-ci dans de nombreux fruits tels que les poires, les pêches, les prunes, les abricots, les fruits rouges, le raisin, les figues, les noisettes, les longanes, les bananes, les oranges, l'ananas, les kiwis, les tomates et les poivrons. En plus des fruits, la PAT a été isolée de céréales comme l'orge, le maïs, le riz, le blé, et de produits céréaliers comme le pain, mais aussi de fromage (cheddar) ainsi que de produits de la mer (mollusques et crustacés) contaminés par *Penicillium antarcticum*. La PAT a été systématiquement retrouvée à la plus forte concentration dans les lésions des fruits, mais elle est encore quantifiée jusqu'à un centimètre à côté de la lésion. Pour les lésions inférieures ou égales à 3 cm de diamètre, les consommateurs ont donc tout intérêt à couper au moins 1 cm autour et en dessous de la tache de moisissure pour réduire l'exposition à la PAT. Les pommes doivent également être conservées à des températures fraîches, inférieures à 8 °C, afin de retarder le développement des lésions (Coton *et al.*, 2020). Par contre, le risque est diminué dans les boissons alcoolisées, en raison de la transformation de la PAT lors de la fermentation alcoolique en composés dénués de toxicité tels que l'ascladiol (Tannous *et al.*, 2017).

De très nombreuses données concernant la concentration en PAT dans les denrées alimentaires à travers le monde sont disponibles dans la littérature. Dans l'ensemble, les valeurs rapportées ne présentent aucun danger, et cela de plus en plus, en particulier depuis la fixation de teneurs maximales par les institutions de nombreux pays : la Commission européenne, la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, le ministère de la Santé de la République populaire de Chine et le ministère de la Santé du Canada. Toutefois, certaines analyses montrent encore des valeurs excédant largement les concentrations réglementaires allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de microgrammes.

## ► Biotransformation

Les réactions entre la PAT et les protéines, le glutathion (GSH) et la *N*-acétyl-L-cystéine (le produit de dégradation de ce dernier) sont considérées comme la forme la plus probable de la biotransformation chez l'humain ou l'animal après la consommation de pommes contaminées, en raison de la réactivité électrophile multiple de la PAT vis-à-vis d'un groupe nucléophile comme le thiol. En outre, il existe deux voies principales de transformation de la PAT la rendant moins toxique par l'ouverture du cycle furane ou pyrane :

– une oxydoréduction conduisant aux deux isomères de l'ascladiol (*E*- et *Z*-ascladiol), sous l'action de *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique ou sous l'action d'autres micro-organismes tels que des bactéries, des ascomycètes ou des basidiomycètes (Moss et Long, 2002) ;

– des transformations en plusieurs étapes, hydrolyse du cycle  $\gamma$ -lactone suivie de réactions de réduction et de déshydratation, permettant la conversion de la PAT en acide désoxypatulinique par des levures ou des champignons (Coarer *et al.*, 2021).

## ► Toxicité

Les effets toxiques de la PAT ont été largement explorés *in vivo* sur des rongeurs, mais également sur d'autres espèces animales telles que le singe et le poulet, et *in vitro* sur des cellules humaines et animales. Elle est considérée comme majoritairement absorbée. Sa toxicité a en outre été démontrée sur les fonctions de la barrière intestinale et elle est susceptible d'altérer le microbiote, dans sa diversité, sa richesse et son profil (Saleh et Goktepe, 2019).

### Toxicité aiguë et subchronique

Des travaux anciens sur rongeurs ont décrit les symptômes d'une intoxication aiguë à la PAT et permis de déterminer la  $DL_{50}$  lors d'une administration orale. Celle-ci se situe entre 29 et 55 mg/kg p.c. Les signes de toxicité sont l'agitation, des convulsions, la dyspnée, la congestion pulmonaire, l'œdème et l'ulcération, des nausées voire des vomissements, la distension du tractus gastro-intestinal, des lésions du duodénum, des ulcères gastriques, des hémorragies intestinales. Ces derniers symptômes trouvent leur origine dans le fait que la PAT est capable de réduire l'expression de la phosphatase DEP-1 et du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , entraînant la destruction des jonctions serrées dans les tissus gastro-intestinaux (Vidal *et al.*, 2019). Des lésions rénales peuvent également survenir. La volaille semble moins sensible, avec une  $DL_{50}$  orale de 170 mg/kg p.c.

Principalement étudiée chez le rat, l'administration orale chronique de PAT provoque une perte de poids, des lésions gastriques et intestinales, des altérations de la fonction rénale et des signes de neurotoxicité (tremblements, convulsions). Du point de vue biochimique, l'exposition chronique expérimentale entraîne une inhibition de plusieurs enzymes (ATPase) dans l'intestin notamment, avec des conséquences en termes de métabolisme des lipides (diminution du niveau total, des phospholipides et des triglycérides). En outre, l'injection intrapéritonéale de 1 mg/kg p.c. de PAT à des souris pendant huit semaines provoque des dommages oxydatifs dans le cerveau. De plus, il est observé une élévation significative d'enzymes plasmatiques telles que l'alanine ou l'aspartate aminotransférase (Saleh et Goktepe, 2019), soulignant une atteinte hépatique constatée également chez la souris.

Une attention particulière a été portée sur deux fonctions physiologiques : la fonction thyroïdienne et la fonction reproductive chez le mâle. Les hormones thyroïdiennes et testiculaires chez des rats recevant de la PAT par voie orale ont été mesurées pendant 60 ou 90 jours. Une exposition de 60 jours (0,1 mg/kg p.c. de PAT) a augmenté le niveau plasmatique de testostérone et a diminué celui de l'hormone  $T_4$ , alors qu'aucun changement n'a été observé pour la  $T_3$ , la TSH, la LH et la GH. Cependant, après 90 jours d'exposition, le niveau de la testostérone et de la LH a

augmenté (Selmanoğlu et Koçkaya, 2004). L'examen histologique de la thyroïde a montré une infiltration de cellules lymphoïdes et un élargissement du tissu interstitiel. Les examens histologiques de testicules des rats traités ont montré une désorganisation de l'épithélium des tubes séminifères, mais également des signes d'œdème et de fibrose. Ces phénomènes s'accompagnent d'une diminution du nombre de spermatozoïdes et d'anomalies au niveau de leurs flagelles (Selmanoğlu, 2006). Il est à noter que les expérimentations sur primates n'ont révélé aucun signe de toxicité quand ceux-ci sont traités quotidiennement durant quatre semaines avec des doses de 5 à 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c. de PAT (Puel *et al.*, 2010).

## Cancérogénicité

Quelques études de toxicité à long terme de la PAT ont été menées à la fin des années 1970 (Osswald *et al.*, 1978) et au début des années 1980 (Puel *et al.*, 2010). Celles-ci ont montré l'absence de tumeurs chez des rats exposés. Le manque de preuves suffisantes de cancérogénicité a donc incité le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, 2018) à classer la PAT dans le groupe 3 (données insuffisantes pour conclure).

## Génotoxicité

L'évaluation du caractère potentiellement génotoxique de la PAT a fait l'objet de plusieurs études menant à des résultats contrastés. La PAT a été rapportée comme mutagène chez *S. cerevisiae* et chez *Bacillus subtilis*, mais pas chez *Salmonella Typhimurium* (test d'Ames). Chez les mammifères, elle induit *in vitro* l'apparition d'anomalies nucléaires comme des micronoyaux et des ponts nucléoplasmiques, témoins d'une certaine instabilité chromosomique dans diverses lignées cellulaires de rongeurs telles que les lignées V79 (fibroblastes pulmonaires), FM3A (carcinome mammaire) et L5178Y (lymphome) (Glaser et Stopper, 2012). Des preuves de lésions oxydatives de l'ADN ont été obtenues dans des cellules rénales embryonnaires humaines et des signes d'aberrations chromosomiques ont été mis en évidence dans les cellules V79. Ces effets génotoxiques pourraient être liés à sa capacité à réagir avec les groupes sulfhydriles et à induire des dommages oxydatifs (Ülger *et al.*, 2020). En conclusion, bien que les résultats des études sur la génotoxicité de la PAT soient variables, l'OMS a conclu que celle-ci est génotoxique sur la base des données disponibles.

## Embryotoxicité et tératogénicité

Des études visant à évaluer les caractères embryotoxique et tératogène de la PAT ont été menées sur rongeurs et sur poulet. Chez ce dernier, injectée dans la chambre à air de l'œuf, la PAT est létale à des concentrations de 2,4-68,7  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  en fonction de l'âge de l'embryon. Les embryons survivants montraient des malformations dès 1 à 2  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  (Ciegler *et al.*, 1976). Chez la souris, une dose de 2 mg/kg p.c./jour administrée par voie intrapéritonéale (J6 à J17 de la gestation) a provoqué l'avortement de

tous les embryons. Toujours sur souris, une autre étude a montré qu'une dose identique orale administrée biquotidiennement (J14 à J19 de la gestation) a provoqué la mort de 20 % de la progéniture, avec des hémorragies cérébrales, pulmonaires et cutanées au bout de 6 jours. En revanche, l'injection intrapéritonéale a augmenté la fréquence d'apparition de fentes labio-palatines ainsi que des malformations rénales pour des doses supérieures à 3,75 mg/kg p.c. (J 12 et 13 de la gestation) (Puel *et al.*, 2010). Chez le rat, une étude sur deux générations montre que la PAT a induit un nombre accru de résorption foetale pour la génération F<sub>1</sub>, effet qui ne s'observait pas à la génération suivante (Dailey *et al.*, 1977).

## Immunotoxicité

La PAT peut altérer la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant l'activité des macrophages. Ce dysfonctionnement se traduit, chez des macrophages de rongeurs exposés à la PAT, par une diminution de la production d'anion superoxyde et de la synthèse protéique, mais également par une altération des fonctions membranaires entraînant une diminution de la phagocytose. Plus récemment, on a également constaté que la PAT réduisait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des macrophages, des cellules mononucléaires du sang périphérique et des cellules T humaines. Lors d'expérimentations sur des macrophages de souris, la PAT a bloqué la production de cytokines dépendant des récepteurs Toll et du RIGI/MAVS par le biais d'une déplétion en GSH, d'un dysfonctionnement mitochondrial et d'une activation de la mitophagie (Saleh et Goktepe, 2019). *In vivo*, l'exposition de souris à la PAT a entraîné une augmentation du nombre de lymphocytes T spléniques et du nombre de neutrophiles, mais une diminution des concentrations sériques d'immunoglobulines (Ig). À des doses réalistes équivalentes aux niveaux d'exposition estimés chez l'humain, la fonction immunitaire des souris exposées demeurait inchangée. Toutefois, il a été observé que le nombre de lymphocytes et de leucocytes dans le sang périphérique a diminué lorsque ces souris ont été traitées avec des doses de 1,28 et 2,56 mg/kg p.c. de PAT (Llewellyn *et al.*, 1998).

## Mécanismes de la toxicité

De nombreuses études se sont concentrées sur la voie des dommages oxydatifs en tant que mécanisme principal de la toxicité de la PAT. Dans les cellules HepG2 exposées à la PAT, la vitamine E, un agent antioxydant, prévient la cytotoxicité et la génotoxicité, montrant l'implication du stress oxydant comme le processus majeur par lequel la PAT exerce ses effets toxiques (Wei *et al.*, 2020). La PAT forme des liaisons covalentes avec des composés comportant des groupements sulfhydriles, tels que la cystéine, la lysine, l'histidine ou le GSH, ce qui entraîne l'inhibition de nombreuses enzymes (ATPase, enzymes lysosomales, ARN polymérase, aminoacyl-ARNt synthétase). La diminution de la forme réduite du GSH intracellulaire est en faveur d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, l'exposition à la PAT (2 mg/kg p.c.) a conduit à une réduction des activités des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la GSH peroxydase (GPx) et la GSH réductase (GR). En

outre, le traitement par la PAT (3,75 mg/kg p.c., par voie intra-péritonéale [ip], 3 h) a entraîné une augmentation des niveaux de ROS et une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes, telles que la CAT et la SOD, dans les reins de souris (Wei *et al.*, 2020). La génération de ROS induite par la PAT est médiée par la protéine p53, protéine pivot qui régule de nombreuses fonctions cellulaires comme le cycle cellulaire, l'autophagie et l'apoptose. La surexpression de marqueurs de l'autophagie, tels que LC3-II et LC3-I après exposition à la PAT, et l'inhibition de la toxicité par un inhibiteur de la formation d'autophagosomes suggèrent que la toxicité de la PAT pourrait impliquer l'autophagie induite par le stress oxydant (Saleh et Goktepe, 2019).

En outre, la PAT provoque l'apoptose des cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 et des cellules humaines coliques HCT116, due à un stress du RE. En effet, chez ces deux types cellulaires, des éléments tels qu'une accumulation de protéines non ou mal repliées, une augmentation de l'expression de GADD34 (protéine *Growth Arrest and DNA Damage*), mais également de celle de la protéine chaperon GRP78, en plus de la surexpression du facteur pro-apoptotique CHOP vont dans le sens d'un stress du RE. Ce processus s'accompagne également d'une augmentation du niveau de la caspase-3 active et d'une chute du potentiel membranaire mitochondrial. Ces résultats suggèrent que la PAT induit un stress du RE important qui conduit à la mort des cellules par la voie mitochondriale de l'apoptose. De surcroît, l'implication de cette voie a été confirmée par la démonstration du rôle des facteurs pro-apoptotiques BAK et BAX dans le processus d'apoptose induit par la PAT (Saleh et Goktepe, 2019).

## ►► Conclusion

La patuline est une mycotoxine contaminant les productions de pommes, essentiellement lors de leur stockage. Elle résulte d'une cascade de réactions enzymatiques grâce au regroupement en *cluster* des gènes correspondants au niveau d'une même région chromosomique et sous l'influence d'un facteur de régulation spécifique. Elle est produite majoritairement par le genre *Penicillium*, en particulier *P. expansum*, et strictement contrôlée dans l'industrie agroalimentaire. Même si elle n'est pas considérée comme une toxine très puissante, elle présente un spectre large de toxicité aigüe et chronique. Cependant, des études manquent sur sa toxicité *in vivo* pour établir clairement son potentiel carcinogène. L'élucidation de sa voie de biosynthèse et de sa régulation reste également l'objet de nombreuses études, afin de proposer des moyens de prévention pour obtenir des productions de fruits et dérivés sûres et durables.

## ► Références

- Artigot M.P., Loiseau N., Laffitte J. *et al.*, 2009. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology*, 155, 1738-1747, <https://doi.org/10.1099/mic.0.024836-0>.
- Bartholomew H.P., Bradshaw M.J., Macarasin O. *et al.*, 2022. More than a virulence factor: patulin is a non-host-specific toxin that inhibits postharvest phytopathogens and requires efflux for *Penicillium* tolerance. *Phytopathology*, 112, 1165-1174, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-21-0371-R>.
- CIRC, 2018. Agents classés par le Centre international de recherche sur le cancer : Monographies, [https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List\\_of\\_Classifications.pdf](https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List_of_Classifications.pdf).
- Ciegler A., Beckwith A.C., Jackson L.K., 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 664-667, <https://doi.org/10.1128/aem.31.5.664-667.1976>.
- Coarer M., Puel O., Lorber S. *et al.*, 2021. Mycotoxines majeures et émergentes dans les filières cidre et vin : observatoire, lutte biologique au champ et devenir au cours des procédés. *Innovations agronomiques*, 82, 246-261, <https://doi.org/10.15454/6z4f-7s10>.
- Coton M., Bregier T., Poirier E. *et al.*, 2020. Production and migration of patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage. *International Journal of Food Microbiology*, 313, 108377, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108377>.
- Dailey R.E., Brouwer E., Blaschka A.M. *et al.*, 1977. Intermediate-duration toxicity study of patulin in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2, 713-725, <https://doi.org/10.1080/15287397709529471>.
- Frisvad J.C., 2018. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11, 73-100, <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294>.
- Glister G.A., 1941. A new antibacterial agent produced by a mould. *Nature*, 148, 470, <https://doi.org/10.1038/148470b0>.
- Glaser N., Stopper H., 2012. Patulin: Mechanism of genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1796-1801, <https://doi.org/10.1016/j.ft.2012.02.096>.
- Li B., Chen Y., Zong Y. *et al.*, 2020. Molecular basis and regulation of pathogenicity and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 19, 3416-3438, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12612>.
- LLewellyn G.C., McCay J.A., Brown R.D. *et al.*, 1998. Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 1107-1115, [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(98\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00084-2).
- Luciano-Rosario D., Keller N.P., Jurick II W.M., 2020. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Molecular Plant Pathology*, 21, 1391-1404, <https://doi.org/10.1111/mpp.12990>.
- Moss M.O., Long M.T., 2002. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants*, 19, 387-399, <https://doi.org/10.1080/02652030110091163>.
- Osswald H., Frank H.K., Komitowski D. *et al.*, 1978. Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16, 243-247, [https://doi.org/10.1016/s0015-6264\(76\)80520-2](https://doi.org/10.1016/s0015-6264(76)80520-2).
- Puel O., Galtier P., Oswald I.P., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, 2, 613-631, <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>.
- Saleh I., Goktepe I., 2019. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 301-311, <https://doi.org/10.1016/j.ft.2019.04.036>.
- Selmanoğlu G., 2006. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 2019-2024, <https://doi.org/10.1016/j.ft.2006.06.022>.
- Selmanoğlu G., Koçkaya E.A., 2004. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 721-727, <https://doi.org/10.1016/j.ft.2003.12.007>.

- Snini S.P., Tadriss S., Laffitte J. *et al.*, 2014. The gene *patG* involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 77-83, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.020>.
- Snini S.P., Tannous J., Heuillard P. *et al.*, 2016. Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Molecular Plant Pathology*, 17, 920-930, <https://doi.org/10.1111/mpp.12338>.
- Tannous J., Keller N.P., Atoui A. *et al.*, 2018. Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 58, 2082-2098, <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1305945>.
- Tannous J., Snini S.P., El Khoury R. *et al.*, 2017. Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, *E*- and *Z*-ascladiol, are not toxic to human cells. *Archives of Toxicology*, 91, 2455-2477, <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1900-y>.
- Ülger T.G., Uçar A., Çakiroğlu F.P. *et al.*, 2020. Genotoxic effects of mycotoxins. *Toxicon*, 185, 104-113, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.004>.
- Vidal A., Ouhibi S., Ghali R. *et al.*, 2019. The mycotoxin patulin: An updated review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 249-256, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>.
- Wei C., Yu L., Qiao N., Zhao J. *et al.*, 2020. Progress in the distribution, toxicity, control, and detoxification of patulin: A review. *Toxicon*, 184, 83-93, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.006>.
- Zetina-Serrano C., Rocher O., Naylies C. *et al.*, 2020. The *brlA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiation in *Penicillium expansum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 6660, <https://doi.org/10.3390/ijms21186660>.

# La zéaralénone

Laura Soler-Vasco et Florence Forget

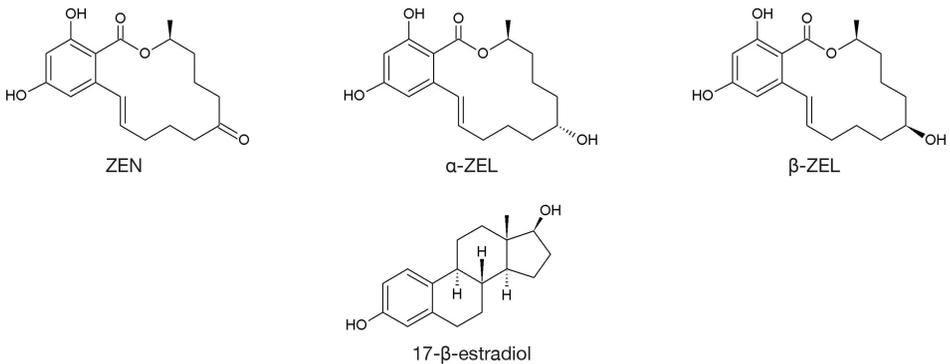
### ►► Introduction

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine principalement produite par des espèces fongiques appartenant au genre *Fusarium*. Ce métabolite toxique a été découvert et isolé dans les années 1960, dans un échantillon de maïs inoculé par une souche de *Fusarium graminearum* (Christensen *et al.*, 1965). C'est en 1966 que sa structure chimique a été caractérisée (Urry *et al.*, 1966) et que le nom de zéaralénone a été proposé. Le radical *zea* fait référence au maïs (*Zea mays*), mais aussi à *Gibberella zae*, nom autrefois utilisé pour désigner la forme téléomorphe (sexuée) de *F. graminearum*. Si cette mycotoxine se retrouve très fréquemment dans les récoltes de maïs, de nombreuses productions végétales cultivées dans les régions tempérées peuvent aussi être contaminées. La toxicité de ZEN résulte principalement de son analogie structurale avec l'œstrogène endogène 17- $\beta$ -estradiol. Du fait de son occurrence et de sa toxicité, ZEN est une des mycotoxines règlementées par la Commission européenne (CE) (règlement CE n° 2013/915). Elle est également toxique pour les animaux qui, selon les espèces, présentent des sensibilités différentes à cette mycotoxine. En effet, certaines espèces comme l'humain et le porc sont très sensibles à la ZEN, car elles convertissent cette toxine en un métabolite plus actif sur le plan œstrogénique, l' $\alpha$ -zéaralénol ( $\alpha$ -ZEL), alors que d'autres espèces comme le poulet convertissent la ZEN en un métabolite moins actif (le  $\beta$ -zéaralénol ou  $\beta$ -ZEL). La recommandation CE n° 2016/1319 détaille les concentrations maximales recommandées dans les aliments pour animaux.

## ► Structure chimique, espèces productrices, voies de biosynthèse

### Structure chimique de la zéaralénone et dérivés

La zéaralénone est une lactone macrocyclique dérivée de l'acide résorcyclique de formule brute  $C_{18}H_{22}O_5$ . Dans la nomenclature UICPA (Union internationale de chimie pure et appliquée), ZEN est le nom trivial du [S-(E)]-3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-méthyl-1H-2-benzoxacyclotétradécine-1,7(8H)-dione. Sa formule développée, celle de deux de ces métabolites principaux, ainsi que celle du 17- $\beta$ -estradiol pour comparaison sont présentées dans la figure 4.1.



**Figure 4.1.** Structure chimique de la zéaralénone (ZEN), de deux de ses principaux métabolites  $\alpha$ -zéaralénol et  $\beta$ -zéaralénol ( $\alpha$  et  $\beta$ -ZEL), et de l'hormone stéroïde 17- $\beta$ -estradiol.

ZEN possède un poids moléculaire de 318 g/mol, un point de fusion proche de 165 °C (ce qui explique sa forte résistance aux traitements thermiques) et une très faible solubilité dans l'eau. Comme toute mycotoxine, la forme native de ZEN peut subir différentes modifications biologiques (dans les tissus végétaux, après ingestion par les animaux, sous l'action du métabolisme de différents micro-organismes) ou chimiques (au cours des procédés de transformation). Des réactions d'oxydation, réduction, hydrolyse ou conjugaison conduisent à différentes formes modifiées, dont les  $\alpha$  et  $\beta$ -ZEL dans les cellules intestinales (figure 4.1) ou les formes glycosylées et sulfatées fréquemment retrouvées dans les tissus végétaux.

### Espèces productrices

Plusieurs espèces appartenant au genre *Fusarium* sont capables de produire la zéaralénone. Les deux espèces majoritairement responsables de la contamination des productions végétales par cette mycotoxine sont *F. graminearum* et *F. culmorum*. D'autres espèces telles *F. sambucinum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. heterosporum*, *F. solani* ainsi que *F. oxysporum* ont aussi été décrites comme productrices de ZEN.

## Voie de biosynthèse et régulation

ZEN appartient à la catégorie des mycotoxines polycétides dont font aussi partie les aflatoxines, les fumonisines et la patuline. Sa biosynthèse (figure 4.2) débute par la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA et de 5 molécules de malonyl-CoA conduisant à la formation d'un hexacétide ; cette réaction est catalysée par une polycétide synthase dénommée PKS4. L'étape suivante fait intervenir 3 molécules supplémentaires de malonyl-CoA et une autre polycétide synthase, PKS13. Le nonacétide ainsi formé va subir plusieurs réactions de cyclisation (cycle aromatique et cycle macrolide) et conduire au zéaralénol qui, après oxydation (catalysée par ZEB1, une alcool isoamyle oxydase), génère la molécule de ZEN.

À ce jour, quatre gènes ont été caractérisés dans le *cluster* de biosynthèse de ZEN : les trois gènes *PKS4*, *PKS13* et *ZEB1*, ainsi que *ZEB2* qui code pour un facteur de transcription. Un mécanisme original d'autorégulation de la biosynthèse de ZEN médiée par *ZEB2* a été mis en évidence (Kim *et al.*, 2018 ; Nahle *et al.*, 2021). Deux transcrits sont associés au gène *ZEB2* : *ZEB2L* qui contient un domaine bZIP de fixation à l'ADN et *ZEB2S* qui est une forme tronquée de *ZEB2L* ne contenant pas le domaine bZIP. L'activation de la production de ZEN est liée à *ZEB2L* qui régule positivement l'expression des gènes *PKS4*, *PKS13*, *ZEB1* et *ZEB2*. Quand le niveau intracellulaire de ZEN augmente, l'expression de *ZEB2S* est stimulée. La protéine *ZEB2S* forme alors un hétérodimère avec la protéine *ZEB2L*, ce qui inhibe la fonction activatrice de *ZEB2L* et conduit à une diminution progressive de la synthèse de ZEN. S'il est admis que, comme pour la majorité des mycotoxines, la production de ZEN est sous la dépendance de facteurs environnementaux tels que lumière, sources de nutriments, pH, potentiel redox, l'étude de sa régulation reste peu détaillée. Une des études les plus approfondies concerne le complexe Velvet, qui est sous la dépendance de la lumière et implique trois facteurs de transcription globaux, VelB, LaeA et VeA. Les facteurs VelB et laeA contrôleraient positivement l'expression des gènes du *cluster* de la ZEN (Nahle *et al.*, 2021).

### ► Types d'aliments contaminés et occurrence

L'étude publiée par Gruber-Dorninger *et al.* (2019), portant sur une analyse sur 10 ans des taux de contamination de différentes productions végétales, illustre la présence de ZEN dans la majeure partie des régions du monde. Les pourcentages d'échantillons positifs à ZEN les plus élevés se situent dans les régions tempérées et/ou les régions où des épisodes pluvieux se produisent au moment de la floraison des cultures. Cette période est en effet celle où les cultures sont les plus sensibles à l'infection par les espèces de *Fusarium* productrices de ZEN. Cette même étude indique que les productions végétales les plus fréquemment contaminées sont le maïs, le soja, le blé et le riz. Plus récemment, la revue de Ropejko et Twaruzek (2021) confirme la fréquente présence de ZEN dans différentes matrices, essentiellement des productions céréalières et de soja, mais aussi dans les fèves et graines de sésame. ZEN, qui résiste aux procédés de transformation de matières premières, est aussi susceptible de se retrouver dans différents produits destinés à l'alimentation

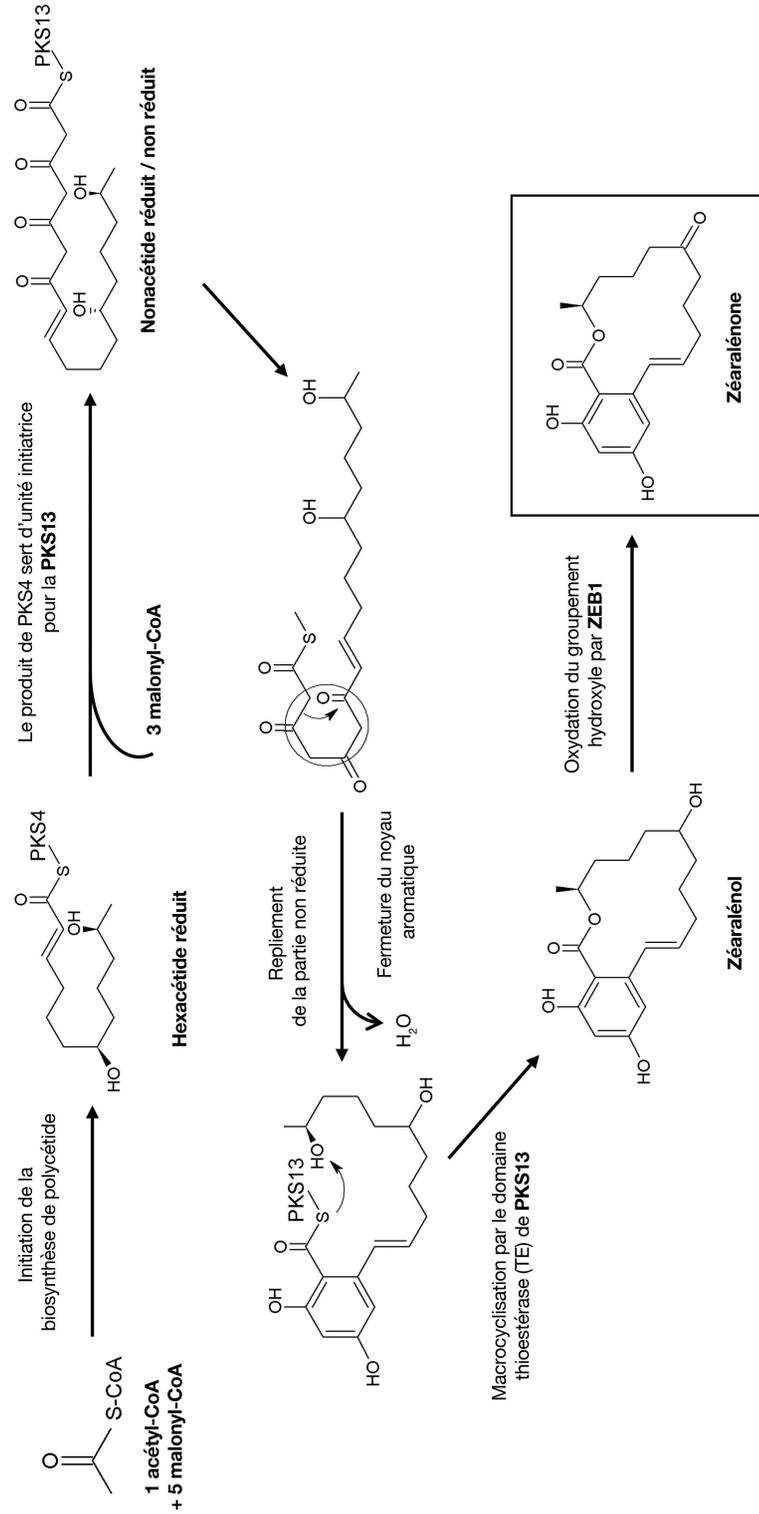


Figure 4.2. Schéma de biosynthèse de la zéaralénone. D'après l'hypothèse de Kim *et al.*, 2018.

humaine tels les pâtes, pains, céréales de petit-déjeuner, gâteaux et la bière. Enfin, dans différentes régions du monde, ZEN a aussi été quantifiée dans des produits d'origine animale issus d'élevages nourris avec des aliments contaminés. Elle a été retrouvée dans le lait de vache, les œufs, la viande de poulet. La même revue rapporte également la présence de faibles concentrations des métabolites de ZEN ( $\alpha$  et  $\beta$ -ZEL) dans du lait de vache, des cœurs et gésiers de poulet.

En ce qui concerne les aliments destinés aux animaux, l'opinion scientifique de l'Efsa publiée en 2017 décrit les données d'occurrence de ZEN et ses métabolites dans plus de 17 000 échantillons collectés entre 2011 et 2015 dans différents pays européens. Pour 56 % d'échantillons, les concentrations en ZEN étaient inférieures aux limites de détection ou de quantification et aucun échantillon ne contenait les métabolites  $\alpha$  et  $\beta$ -ZEL en concentrations quantifiables. ZEN a été quantifiée essentiellement dans du blé (entre 21 et 24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en moyenne), du maïs grain (entre 102 et 105  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en moyenne), de l'orge (entre 11 et 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en moyenne) et de l'avoine (entre 10 et 14  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en moyenne).

## ► Toxicocinétique de la zéaralénone : absorption, métabolisme, excrétion

La toxicocinétique de la zéaralénone a été rapportée chez plusieurs espèces suivant différentes voies d'administration. Après ingestion, ZEN est rapidement absorbée dans le tractus gastro-intestinal chez l'humain et autres mammifères (rat, lapin, cochon), puis largement distribuée dans divers tissus, principalement le foie, l'intestin et les reins (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). Elle est également présente dans d'autres organes dotés de récepteurs d'œstrogènes, tels que l'utérus, les follicules ovariens, le tissu adipeux et les testicules. La distribution dans les tissus est très rapide, avec une demi-vie de 16,8 h après administration orale chez le rat (Shin *et al.*, 2009). Le foie et l'intestin sont les principaux organes de métabolisation de ZEN (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). La phase I du métabolisme concerne la réduction du composé parent. ZEN est absorbée dans l'intestin grêle, mais sa biotransformation en différents métabolites se produit dans la lumière intestinale (stade préabsorptif, microbien) et la muqueuse, ainsi que dans le foie. La biotransformation de ZEN est principalement réalisée par la  $3\alpha$ - et la  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase ( $3\alpha$ -HSD et  $3\beta$ -HSD), qui produit l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -zéaralénol ( $\alpha$ - et  $\beta$ -ZEL, figure 4.1). Cette étape de métabolisation dépend de l'espèce et pourrait être liée à la biotransformation hépatique (Efsa, 2011 et 2017). Les rats et les poulets transforment ZEN principalement en  $\beta$ -ZEL, dont l'activité œstrogénique est réduite, tandis que les porcs et les humains produisent davantage de métabolite  $\alpha$ -ZEL. Il a été démontré que ce dernier a une affinité plus élevée pour les récepteurs des œstrogènes, ce qui explique en partie la sensibilité des porcs à cette mycotoxine. En outre, le cytochrome P450 peut également être impliqué dans le métabolisme de ZEN, conduisant aux stéréo-isomères zéaralanone (ZAN),  $\alpha$ - et  $\beta$ -zéaralanol ( $\alpha$ - et  $\beta$ -ZAL). Sur la base de leur activité utérotrrophique évaluée chez les rongeurs, ZEN et ses formes modifiées sont classées comme suit :  $\alpha$ -ZEL >  $\alpha$ -ZAL > ZEN  $\approx$  ZAN  $\approx$   $\beta$ -ZAL >  $\beta$ -ZEL. Les métabolites issus de la phase I sont ensuite sulfatés (ZEL ou ZALSufs)

et glucuronidés (ZEL Ou ZALGlc). Plusieurs études ont démontré que la conjugaison de ZEN et de ses métabolites réducteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -ZEL avec l'acide glucuronique représente une voie métabolique majeure chez les animaux de laboratoire et domestiques, ainsi que chez l'humain. Ces formes modifiées peuvent être entièrement converties en ZEN par le microbiote intestinal animal ou humain, constituant ainsi une source de recirculation des toxines. ZEN et ses métabolites sont éliminés dans l'urine et la bile principalement sous forme de composés glucurono-conjugués, bien que le mode d'excrétion de ces toxines soit également très variable d'une espèce à l'autre.

## ►► Toxicité de la zéaralénone

### Mode d'action de la zéaralénone

Le mode d'action de ZEN a fait l'objet de nombreuses revues dont celles de Kowalska *et al.* (2016) et Balló *et al.* (2023) ; les résultats les plus pertinents sont décrits ci-dessous. ZEN et ses métabolites présentent une forte analogie structurale avec le 17  $\beta$ -estradiol (figure 4.1), leur conférant une activité œstrogénique. De ce fait, ces composés peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens potentiels au niveau de la signalisation des récepteurs nucléaires et provoquer un changement dans la production d'hormones.

Les métabolites de ZEN sont généralement issus de transformations biologiques de ZEN (oxydation, réduction, hydrolyse ou conjugaison) qui se font au sein du champignon, de la plante ou de l'animal/Homme. L'activité œstrogénique de certaines formes modifiées peut être plus ou moins supérieure à celle de la forme native (tableau 4.1).

**Tableau 4.1.** Estimation du potentiel œstrogénique de la zéaralénone et de ses composés apparentés. D'après Payros *et al.*, 2021.

Potentiel œstrogénique						
0,2	1	1,5	2	4	8	60
$\beta$ -ZEL	Cis-ZENGlc	ZAN	$\beta$ -ZAL	$\alpha$ -ZAL	Cis- $\alpha$ -ZEL	$\alpha$ -ZEL
$\beta$ -ZELGlc	CisZENSulfs	ZANGlc	$\beta$ -ZALGlc		Cis- $\alpha$ -ZELGlc	$\alpha$ -ZELGlc
$\beta$ -ZELSulfs	Cis- $\beta$ -ZEL	ZANSulfs	$\beta$ -ZALSulfs		Cis- $\alpha$ -ZELSulfs	$\alpha$ -ZELSulfs
	Cis- $\beta$ -ZELGlc					
	Cis- $\beta$ -ZELSulfs					
	ZEN					

ZEN traverse passivement la membrane cellulaire et se lie aux récepteurs œstrogéniques (RE). Le complexe RE-ZEN est rapidement transféré dans le noyau où il se lie aux éléments sensibles aux œstrogènes (ERE), ce qui déclenche l'expressions de gènes cibles. ZEN se lie aux RE dans les tissus et cellules cibles, avec une affinité

de 1 à 10 fois plus faible par rapport au 17  $\beta$ -estradiol. Bien qu'elle soit capable d'activer les deux RE, ZEN est un agoniste partiel du ER $\beta$  et un agoniste complet du ER $\alpha$ . Par conséquent, la réponse biologique dérivée d'une exposition à ZEN varie en fonction du ratio des récepteurs d'œstrogènes ER $\alpha$  par rapport à ER $\beta$ , qui est spécifique de chaque tissu, ainsi que de la densité de ces récepteurs.

Outre sa liaison aux RE, les effets endocriniens de ZEN impliquent d'autres mécanismes. En effet, ZEN et ses métabolites réduits sont des substrats compétitifs pour les 3 $\alpha$ - et 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD), deux enzymes impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdiennes. Dans les tissus stéroïdogènes, les HSD catalysent les étapes finales de la biosynthèse des androgènes, des œstrogènes et de la progestérone. ZEN peut également agir sur l'axe hypothalamo-hypophysique, ce qui peut affecter la production de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH), qui sont des hormones vitales pour activer et contrôler la synthèse et le transport des hormones sexuelles des gonades vers le sang. En outre, ZEN peut activer le récepteur pregnane X (PXR), un récepteur humain de xéno-biotiques qui fait partie des facteurs de transcription nucléaire activés par ligand.

## Principaux effets toxiques

La toxicité de ZEN a fait l'objet d'un examen approfondi par le Jecfa (OMS, 2000) et l'Efsa (2011 et 2017) ; les résultats les plus pertinents sont décrits ci-dessous. ZEN et ses métabolites peuvent se lier de manière compétitive au récepteur des œstrogènes en raison de l'analogie structurale avec le 17 $\beta$ -estradiol (E2), et activer la transcription des gènes sensibles aux œstrogènes dans de nombreux organes, en particulier dans les gonades. Par conséquent, elle induit des effets œstrogéniques et des troubles de la reproduction, souvent signalés comme une hyperœstrogénie. Son activité œstrogénique se traduit principalement par des altérations de la fertilité et de la reproduction. Les effets hyperœstrogéniques de ZEN ont été signalés chez des espèces domestiques, des animaux de laboratoire (rats, souris, lapins et cochons d'Inde) et des porcs prépubères. En raison de la prédominance de l'ER $\alpha$ , les ovaires, la vulve et l'utérus ont été considérés comme les tissus les plus sensibles. Des études ont montré que les femmes sont plus sensibles à ZEN que les hommes.

En raison de la forte sensibilité des porcs, la plupart des effets toxiques connus de ZEN dérivent d'études de toxicologie de cette mycotoxine chez cette espèce. Chez les cochettes et les truies, la mycotoxicose à ZEN est associée à des altérations morphologiques de l'appareil reproducteur (hyperplasie, œdème, hyperémie, prolapsus, atrophie ovarienne), une puberté précoce, des altérations du cycle œstral, une diminution de la fertilité et une réduction de la taille de la portée. Chez les mâles, elle s'accompagne d'une atrophie testiculaire, une diminution de la qualité du sperme et une baisse de la libido. ZEN est également tératogène, induisant une hyperplasie utéro-vulvaire et un syndrome de l'abduction des membres chez le porcelet nouveau-né.

La toxicité de ZEN pour la reproduction humaine est beaucoup moins connue. ZEN peut être considérée comme un perturbateur endocrinien pour les humains. Des études ont suggéré que l'exposition à ZEN peut altérer la capacité de reproduction

et perturber la production et le développement des spermatozoïdes et des ovocytes chez les humains et les animaux. ZEN a été trouvée dans l'endomètre de femmes atteintes d'adénocarcinome endométrial, d'hyperplasie et d'endomètre prolifératif normal. En outre, il a également été indiqué que l'exposition à ZEN et ses métabolites pouvait induire une puberté précoce chez l'humain. Ainsi, ZEN est suspectée d'avoir été responsable d'une épidémie de modifications précoces de la puberté chez de jeunes enfants à Porto Rico, entre les années 1978 et 1981 (Afssa, 2009). Toutefois, en raison du nombre limité de données sur la toxicité humaine, d'autres recherches sont nécessaires pour examiner les effets réels sur la santé.

En plus d'être reprotoxique, ZEN est connue aussi pour d'autres effets sur d'autres systèmes, pour lesquels la signalisation aux œstrogènes joue un rôle important et peut affecter la fonction du système immunitaire, le foie ou l'intestin. En outre, l'exposition à ZEN a un impact sur différents processus métaboliques systémiques ; ses propriétés anabolisantes ont été mises en évidence chez certains animaux d'élevage. Ainsi, des dérivés de ZEN sont utilisés comme stimulateur de croissance anabolique dans certains pays, par exemple pour les bovins aux États-Unis. Ces mêmes dérivés font partie de la liste des substances interdites dans le sport.

### ►► Conclusion

La ZEN est produite par des espèces du genre *Fusarium*. Elle contamine fréquemment les céréales, principalement dans les régions tempérées du monde. Elle fait l'objet d'une métabolisation en de nombreux métabolites dérivés pouvant être biologiquement plus actifs que le composé parental. Cette transformation dépend de l'espèce, les humains et les porcs étant les plus sensibles. La toxicité de la ZEN repose sur la très forte affinité de ses métabolites avec les récepteurs d'œstrogènes, due à leur similarité moléculaire avec l'hormone féminine œstradiol. Cela explique sa reprotoxicité et l'induction de perturbations endocriniennes. Les données récentes justifient des recherches plus approfondies sur l'empreinte de l'exposition périnatale à ce contaminant alimentaire combiné ou non à d'autres xénoœstrogènes sur la fertilité à l'âge adulte. La toxicité insidieuse, mais importante de la ZEN pour la santé humaine, a conduit l'UE à réglementer sa présence dans les aliments destinés aux enfants en bas âge. En outre, son impact sur la santé et ses conséquences sur la production animale ont aussi conduit à l'élaboration de recommandations dans les aliments pour animaux.

## ► Références

- Afssa, 2007. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1456.6168>.
- Balló A., Busznyákné Székvári K., Czétány P., Márk L., Török A., Szántó Á., Máté G., 2023. Estrogenic and Non-Estrogenic Disruptor Effect of Zearalenone on Male Reproduction: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 1578, <https://doi.org/10.3390/ijms24021578>.
- CE, 2016. Recommandation (CE) n° 2016/1319 de la commission du 29 juillet 2016 modifiant la recommandation 2006/576/CE en ce qui concerne le déoxynivalénol, la zéaralénone et l'ochratoxine A dans les aliments pour animaux familiers. *Journal officiel de l'Union européenne*, L208, 56.
- CE, 2023. Règlement (CE) n° 2023/915 de la commission du 25 avril 2023 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement CE n° 1881/2006. *Journal officiel de l'Union européenne*, L119, 103-157.
- Christensen C.M., Nelson G.H., Mirocha C.J., 1965. Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. *Applied Microbiology*, 13, 653, <https://doi.org/10.1128/am.13.5.653-659.1965>.
- Efsa, 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *Efsa Journal*, 9, 2197, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>.
- Efsa, 2017. Scientific opinion on the risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *Efsa Journal*, 15, 4851, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>.
- Gruber-Dorninger C., Jenkins T., Schatzmayr G., 2019. Global Mycotoxin Occurrence in feed: a ten-year survey. *Toxins*, 11, 375, <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>.
- Kim J., Son H., Lee Y., 2018. Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, 68, 1-6, <https://doi.org/10.2520/myco.68-1-2>.
- Kowalska K., Habrowska-Górczyńska D.E., Piastowska-Ciesielska A.W., 2016. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 141-149, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>.
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7, 253-306, [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7).
- Nahle S., El Khoury A., Atoui A., 2021. Current status on the molecular biology of zearalenone: its biosynthesis and molecular detection of zearalenone producing fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 159, 247-258, <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02173-9>.
- OMS, 2000. Zearalenone. Prepared by the 53<sup>rd</sup> meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Jecfa) in *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*, WHO Food Additives Series 44, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Genève.
- Payros D., Garofalo M., Pierron A. *et al.*, 2021. Les mycotoxines en alimentation humaine : un défi pour la recherche. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 56, 170-183, <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2021.02.001>.
- Ropejko K., Twaruzek M., 2021. Zearalenone and its metabolites — General overview, occurrence, and toxicity. *Toxins*, 13, 35, <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>.
- Shin B.S., Hong S.H., Bulitta J.B., Hwang S.W., Kim H.J., Lee J.B., Yang S.D., Kim J.E., Yoon H.S., Kim D.J., Yoo S.D., 2009. Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 1406-1411, <https://doi.org/10.1080/15287390903212774>.
- Urry W.H., Wehrmeister H.L., Hodge E.B. *et al.*, 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7, 3109-3114, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)99923-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)99923-X).

# Les trichothécènes A et B

Philippe Pinton, Florence Forget et Isabelle Oswald

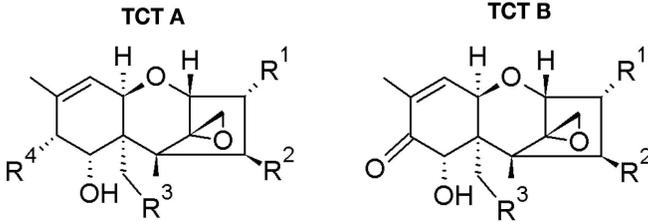
### ►► Introduction

La famille des trichothécènes (TCT) rassemble une très grande diversité de mycotoxines. Les TCT de type A et B (TCT A, TCT B), produits par des espèces fongiques du genre *Fusarium*, appartenant au complexe d'espèces *sambucinum*, sont les plus fréquemment retrouvés et les plus préoccupants pour les filières céréales. Ils seront au cœur de ce chapitre. Un des représentants majeurs des TCT de type C, la crotonine, est produite majoritairement par l'espèce *Trichothecium roseum* qui contamine certains fruits. Pour les TCT de type D, les satratoxines, qui sont produites par les espèces du genre *Stachybotrys* dans les fourrages et certains matériaux des habitations, font l'objet d'un chapitre spécifique de cet ouvrage (chapitre 12).

### ►► Structure chimique, espèces productrices, voies de biosynthèse

#### Structure chimique des trichothécènes de type A et B

Les TCT sont des sesquiterpènes caractérisés par un squelette tricyclique (figure 5.1) qui comporte un cycle A cyclohexène avec une double liaison entre les carbones C9 et C10, un cycle B tétrahydropyranyle, un cycle C cyclopentyle et un groupe époxyde entre les carbones C12 et C13. La différence structurale entre les TCT A et B vient de la fonction cétone présente au niveau du carbone C8 uniquement chez les TCT B. Selon la nature des radicaux R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>, différentes mycotoxines ont été décrites ; les plus fréquemment retrouvées sont regroupées dans la figure 5.1. Récemment, les toxines NX (famille des TCT A) ont été identifiées. Dans leur structure très proche de celle du déoxynivalénol (DON) et de ses dérivés acétylés (3 et 15ADON), une fonction hydroxyle remplace la fonction cétone en C8 (Varga *et al.*, 2015).



Mycotoxine / nom abrégé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>TCT A</b>				
Toxine HT2 / HT2	OH	OH	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Toxine T2 / T2	OH	OAc	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Monoacétoxyscirpénol / MAS	OH	OH	OAc	H
Diacétoxyscirpénol / DAS	OH	OAc	OAc	H
NX3	OH	H	OH	H
3 acétyl NX / 3ANX (ou NX2)	OAc	H	OH	H
<b>TCT B</b>				
Déoxynivalénol / DON	OH	H	OH	
3 acétyl-déoxynivalénol / 3ADON	OAc	H	OH	
15 acétyl-déoxynivalénol / 15ADON	OH	H	OAc	
Nivalénol / NIV	OH	OH	OH	
Fusarénone X (ou 4 acétyl-nivalénol) / FX	OH	OAc	OH	

**Figure 5.1.** Structure chimique des principaux trichothécènes de types A et B.

Les formes « natives » des TCT peuvent subir différentes modifications, notamment biologiques, qui se font au sein de la plante, du champignon ou de l'animal/Homme. Des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse ou de conjugaison conduisent à une grande diversité de formes modifiées. Ainsi, le DON-3-β-d-glucoside (D3G) résulte de la glycosylation du DON dans les tissus végétaux. À noter qu'il existe également des métabolites du DON produits par des bactéries isolées du sol, capables de l'épimériser en 3-épi-DON ou de le métaboliser en 3-keto-DON (Efsa *et al.*, 2017b).

## Espèces productrices

Le type de TCT produit dépend des espèces et des souches, qui appartiennent à différents chémotypes selon le profil de mycotoxines qu'elles produisent (tableau 5.1). La répartition de ces chémotypes varie selon le climat, les végétaux et les caractéristiques écophysiologiques des souches (Del Ponte *et al.*, 2022). Les souches de l'espèce *Fusarium graminearum* (principale espèce productrice de TCT) se répartissent entre quatre chémotypes : le chémotype DON+15ADON, majoritaire au niveau mondial ; le chémotype DON+3ADON ; le chémotype NIV+FX ; et le chémotype NX, surtout décrit en Amérique du Nord. En Europe, les isolats de *F. graminearum* produisent majoritairement du DON+15ADON, sauf dans les pays nordiques où le chémotype DON+3ADON prédomine (Pasquali *et al.*, 2016).

**Tableau 5.1.** Principales espèces de *Fusarium* productrices de TCT A et B. En gras, les espèces majeures.

Mycotoxines	Principales espèces productrices
TCT A	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. graminearum</i> (toxines NX seulement)
TCT B	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. crookwellense</i> (ou <i>F. cerealis</i> ), <i>F. heterosporum</i>

## Voies de biosynthèse

Le précurseur des TCT est le farnésyl-pyrophosphate, qui est aussi un précurseur de la voie de synthèse des stérols jouant un rôle de structure chez les champignons. On comprend ainsi pourquoi la synthèse de TCT intervient quand la croissance fongique ralentit et pourquoi elle peut être stimulée quand un stress est appliqué au champignon. Seize gènes (nommés *Tri*) de la voie de biosynthèse des TCT A et B sont identifiés et la fonction de la plupart d'entre eux caractérisée (tableau 5.2). Ils sont répartis dans 3 *loci* chez *F. graminearum* et 12 d'entre eux sont rassemblés au sein du *cluster Tri* (McCormick *et al.*, 2011 ; Foroud *et al.*, 2019).

**Tableau 5.2.** Gènes impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes. Les gènes appartenant au *cluster Tri* sont en gras.

Gène	Fonction	Gène	Fonction
<i>Tri1</i>	Cytochrome-P-450 monoxygénase	<b><i>Tri9</i></b>	Rôle encore à définir
<b><i>Tri3</i></b>	Acétyltransférase	<b><i>Tri10</i></b>	Facteur de transcription
<b><i>Tri4</i></b>	Cytochrome-P-450 monoxygénase	<b><i>Tri11 et Tri13</i></b>	Cytochrome-P-450 monoxygénase
<b><i>Tri5</i></b>	Sesquiterpène synthétase	<b><i>Tri12</i></b>	Transporteur membranaire de type MSF ( <i>Major Facilitator Superfamily</i> )
<b><i>Tri6</i></b>	Protéine de liaison à l'ADN à doigts de zinc	<b><i>Tri14</i></b>	Rôle dans la pathogénicité (?)
<b><i>Tri7</i></b>	Acétyltransférase	<b><i>Tri15</i></b>	Protéine de liaison à l'ADN à doigts de zinc
<b><i>Tri8</i></b>	Estérase	<b><i>Tri16 et Tri101</i></b>	Acétyltransférase

Après la cyclisation du farnésyl pyrophosphate en trichodiène catalysée par l'enzyme trichodiène synthase (protéine TRI5 encodée par le gène *tri5*), neuf étapes successives conduisent à la calonectrine, le métabolite carrefour qui, selon les différences génétiques entre espèce et/ou souche, est engagé dans les différentes voies menant aux TCT A ou B (figure 5.2). Ainsi, chez les souches de chémotype NIV+FX, les enzymes encodées par les gènes *Tri7* et *Tri13* catalysent l'oxygénation de la calonectrine, puis son acétylation en C4. Les protéines encodées par les gènes *Tri8* puis *Tri1* prennent ensuite le relai pour générer la FX puis le NIV. Chez les souches productrices de DON

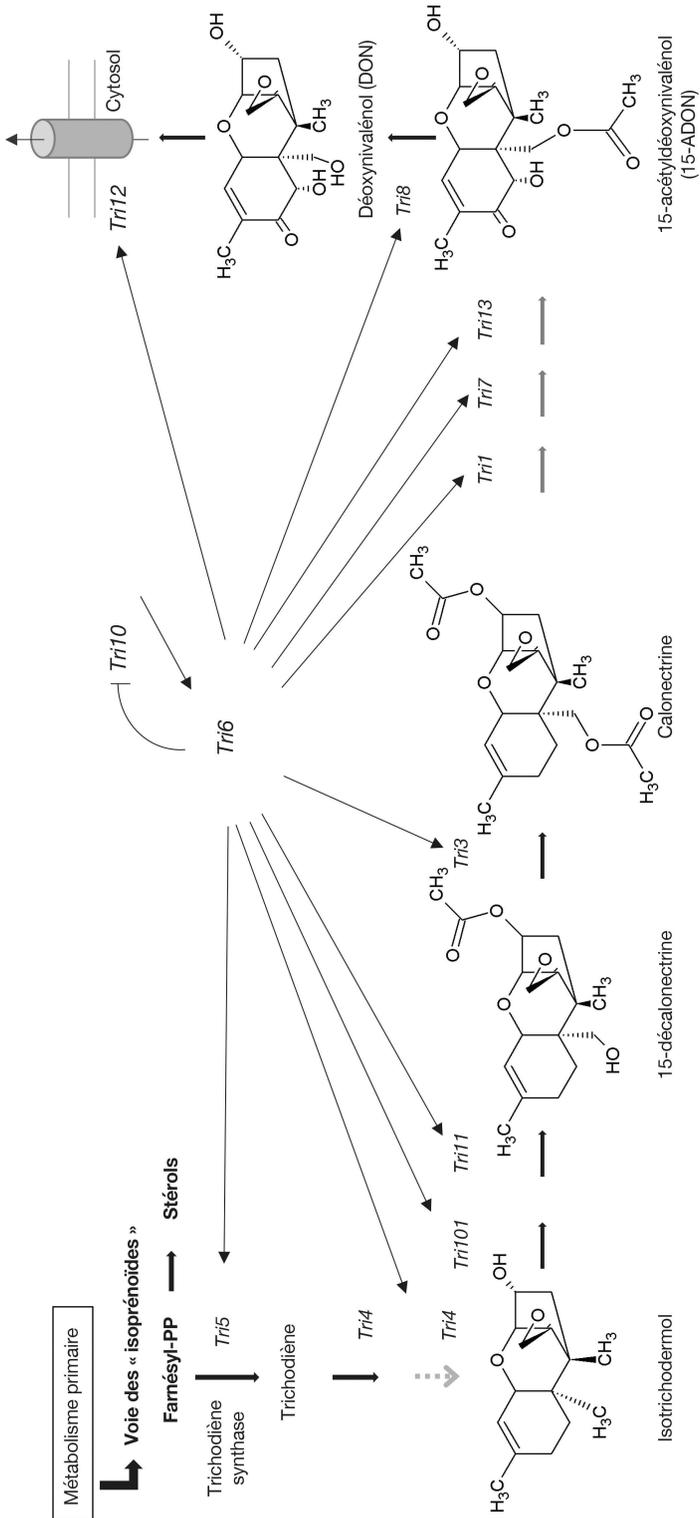


Figure 5.2. Représentation schématique de la voie de biosynthèse du déoxynivalénol.

et ADON, les gènes *Tri7* et *Tri13* ne sont pas fonctionnels. Les produits des gènes *Tri1* et *Tri8* catalysent directement la formation du 15ADON ou du 3ADON à partir de la calonectrine, puis celle du DON. Des variations dans la séquence du gène *Tri8* orientent vers le 3ADON ou le 15ADON. Le gène *Tri16*, requis pour la production des toxines T2 et HT2, n'est pas fonctionnel chez les producteurs de TCT B. Enfin, ce sont des différences de séquence nucléotidique au sein du gène *Tri1* qui conduisent à la production de toxines NX ou de TCT B chez *F. graminearum* (Foroud *et al.*, 2019).

## ► Régulation de la biosynthèse des TCT

La production de TCT est limitée et orchestrée dans le temps en fonction des stades de développement du champignon et/ou des conditions environnementales. L'existence de cette régulation fine appuie l'idée que les TCT confèrent un avantage aux champignons producteurs. L'importance du DON dans la progression de *F. graminearum* dans les végétaux après infection a été démontrée. Cependant, les hypothèses sur le rôle exact des TCT dans l'adaptation aux contraintes abiotiques ou dans les interactions entre micro-organismes doivent être validées.

La régulation de la production de TCT dépend de signaux environnementaux perçus par les souches, délivrés sous forme de signaux intracellulaires conduisant à l'activation/inactivation de facteurs de transcription qui modulent l'expression des gènes de biosynthèse. Certains facteurs sont spécifiques de la voie de biosynthèse (Chen *et al.*, 2019 ; Foroud *et al.*, 2019). C'est le cas en particulier de la protéine associée au gène *Tri6*, qui régule négativement l'expression de *Tri10* et positivement les autres gènes *Tri*. *Tri15* est un régulateur négatif chez *F. sporotrichioides*, mais sa disruption n'affecte pas la production de toxines chez *F. graminearum*.

Outre ces facteurs spécifiques, des facteurs de transcription globaux intervenant dans la réponse à des stimuli extracellulaires contrôlent la voie de biosynthèse (Chen *et al.*, 2019). Le facteur FgPac1 intervient à pH neutre ou basique en réprimant l'expression des gènes *Tri*. De même, le facteur FgAP1 augmenterait la production de DON en réponse à un stress oxydant. La lumière influence la production de métabolites secondaires chez les champignons en agissant sur le complexe velvet. Chez *F. graminearum*, sa disruption affecte la croissance et bloque totalement la production de DON. Les sources de carbone ou d'azote, par le biais des facteurs de transcription FgCreA et FgAreA, modulent les niveaux de TCT produits par *F. graminearum*. Le saccharose stimule la production de toxines par rapport au glucose. De même, les polyamines telles que l'agmatine ou la putrescine augmentent la production de toxines. Au cours des dix dernières années, plusieurs événements de modifications épigénétiques liés à la conformation de la chromatine (méthylation d'ADN, modifications post-transcriptionnelles des histones et variants d'histones) ont été identifiés comme éléments clés conduisant à l'inhibition ou à l'activation de la production des TCT (Foroud *et al.*, 2019).

La section suivante va principalement présenter les TCT pour lesquels les données de prévalence et de toxicité sont les plus abondantes. Pour les TCT A, il s'agit des toxines T2 et HT2, du diacétoxyscirpénol (DAS) et des toxines NX, et pour les TCT B, du DON et certains de ses dérivés, du NIV et de la FX.

## ► Types d'aliments contaminés et occurrence

Les toxines T2 et HT2 contaminent principalement les céréales et certains fruits et légumes (pommes, melons, pommes de terre...), généralement sous les climats tempérés. Comme le montre le tableau 5.3, l'occurrence et les concentrations des toxines T2 et HT2 restent relativement faibles. L'occurrence du DAS varie selon les régions du monde et des concentrations assez élevées sont ponctuellement mesurées. L'identification des toxines NX est récente et il existe peu de données sur leur occurrence (tableau 5.3).

**Tableau 5.3.** Données de contamination de denrées alimentaires par les TCT A (LD : limite de détection ; LQ : limite de quantification).

TCT A	Type d'aliment contaminé / pays ou région	Concentration	Référence
T2-HT2	Échantillons destinés à l'alimentation humaine ou animale / Europe	35 % > LD ou LQ	Efsa, 2017a
	Avoine et orge non transformées / Europe	Concentration moyenne : 236 µg/kg	
	Avoine, blé, orge, seigle destinés à l'alimentation humaine / Europe	128,15, 13 et 9,5 µg/kg respectivement	
	Haricots azuki / Japon Blé / Japon	48 µg/kg 85 µg/kg	Yoshinari <i>et al.</i> , 2014
DAS	2,3 % des 17 000 échantillons de céréales et produits dérivés / Monde	Concentration > LD	Jecfa, 2017
	Sorgho / Afrique	Concentration maximale : 109 µg/kg	
	Maïs / Pakistan	Concentration moyenne : 516 µg/kg	
	Blé, orge / Japon Maïs / Nouvelle-Zélande	Concentration maximale : 1 000 µg/kg	
	1 781 échantillons de produits alimentaires / Europe Pâtes / Europe	6,9 % > LD 62 µg/kg en moyenne	Efsa, 2018
	Café / Espagne	402 µg/kg	
Toxines NX	Maïs, blé / Ontario (Canada)	80 % des souches présentes capables de produire du 15ADON et NX-2	Chen <i>et al.</i> , 2022

Les données de contamination en DON illustrent sa prévalence, avec cependant une grande variabilité des niveaux de contamination selon les régions du monde. Le NIV peut contaminer les céréales et les produits dérivés en même temps que le DON. Les données sur la contamination des céréales par la FX sont rares (tableau 5.4).

**Tableau 5.4.** Données de contamination de denrées alimentaires par les TCT B (LD : limite de détection).

TCT B	Type d'aliment contaminé / pays ou région	Concentration	Référence
DON	Denrées pour alimentation humaine / Europe	43,5 % > LD 75,2 % > LD	Efsa, 2017b
	Denrées pour l'alimentation animale / Europe		
	Produits de boulangerie et minoterie pour l'alimentation humaine / Europe	Concentrations moyennes : 155 µg/kg 200 µg/kg	
	Orge et seigle pour l'alimentation humaine / Europe	480 µg/kg	
	Céréales et sous-produits et aliments pour animaux / Europe		
	77 % des 1 141 échantillons d'aliments pour porc / 75 pays européens	Concentration maximale : 34 862 µg/kg	Novak <i>et al.</i> , 2019
	Blé pour alimentation humaine / Uruguay	100 % > LD (concentration maximale : 8 800 µg/kg)	Sun <i>et al.</i> , 2022
	Blé / Brésil	86 % > LD (concentration maximale : 8 500 µg/kg)	
	Blé / Argentine	Concentration maximale : 9 480 µg/kg	
	Blé / Chine (région Shanghai) Blé / Chine (autres régions)	88 % > LD (concentration maximale : 604 µg/kg) 100 % > LD (concentration moyenne : 17,7 mg/kg)	
3ADON	Céréales et produits dérivés / Europe	Concentration moyenne : 40,9 µg/kg	Efsa, 2017b
15ADON	Fourrages et produits dérivés pour animaux / Europe	Concentration maximale : 1 116 µg/kg	
D3G	Céréales pour la consommation humaine / Europe	Concentration moyenne : 170 µg/kg	
NIV	Avoine / Finlande	4 940 µg/kg	Efsa, 2017b
	Orge / Angleterre	1 088 µg/kg	
	Farine de blé dur / Danemark	440 µg/kg	
	Maïs / France	340 µg/kg	
	Blé / Italie	106 µg/kg	
	Arachide, maïs / Nigeria	Concentration < 5 µg/kg	Kumar <i>et al.</i> , 2022
	Blé / Argentine	Concentration < 5 µg/kg	
FX	Céréales / Italie	45 % > LD (concentration maximale : 75 µg/kg)	Gab-Allah <i>et al.</i> , 2023
	Céréales / Corée du Sud	60 % > LD, jusqu'à 29 µg/kg	

## ► Métabolisation des TCT

### Métabolisation des TCT A

La toxine T2 lipophile est rapidement absorbée par le tube digestif. Elle est principalement métabolisée dans le foie, excrétée dans la bile, les fèces et l'urine, et ne s'accumule pas dans les tissus. Sa demi-vie plasmatique est courte (Janik *et al.*, 2021). Elle traverse le placenta chez le rat et se retrouve dans le fœtus, en particulier dans le thymus et la rate (Efsa *et al.*, 2017a). Elle est métabolisée après hydrolyse, hydroxylation, conjugaison ou dé-époxydation. Son principal métabolite chez l'humain est la toxine HT2. La glucuronidation des toxines T2 et HT2 est une voie prépondérante de métabolisation commune au poulet, porc, chèvre, vache, rat, porc et Homme. On retrouve également d'autres métabolites chez les animaux tels que le T2-triol, le T2-tétraol, considéré comme une voie d'activation, le néosolaniol, le 3'-hydroxy-HT-2 et le 3'-hydroxy-T-2. Dix-huit métabolites sulfonés, hydroxylés et carboxylés de la toxine T2 ont été récemment identifiés dans la bile et les fèces du poulet et/ou rat (Yang *et al.*, 2017). À noter que, chez le rat, des métabolites hydroxylés en C-7 ont été détectés uniquement chez les mâles (Efsa *et al.*, 2017a). La toxine T2 et des métabolites hydroxylés ont été retrouvés dans le lait de vaches qui avaient été exposées par voie orale (Efsa, 2011). Des essais avec de la salive artificielle humaine ont montré que des formes glycosylées de la toxine T2 restaient inchangées après digestion. Après fermentation colique avec des échantillons de selles humaines, la toxine T2 et les formes glycosylées restaient stables durant les 30 premières minutes, alors que la transformation en toxine HT2 devenait significative après 24 heures (Efsa *et al.*, 2017a).

Le DAS est métabolisé chez les animaux en 15-monoacétoxyscirpénol (15MAS) par désacétylation en C4, puis transformé en scirpentriol (SCP) par désacétylation en C15. Enfin, l'époxyde est perdu donnant le dé-époxy-SCP. Le 15MAS peut également être dé-époxydé. Le DAS est métabolisé dans le rumen chez les ruminants et dans le tractus digestif chez le porc. Chez l'humain, le principal métabolite identifié est le 15MAS, lors d'une exposition cutanée (Efsa, 2018).

Le métabolisme des toxines NX a été peu étudié. Le 3ANX, qui possède une structure similaire au 3ADON, ne présente pas le groupe céto en C8, ce qui lui permettrait d'échapper à la détoxification par la glutathion-S-transférase (Soler *et al.*, 2022).

### Métabolisation des TCT B

Le DON et ses dérivés sont rapidement absorbés et leur concentration plasmatique est maximale entre dix minutes et quatre heures après ingestion selon les espèces. La biodisponibilité du DON est comprise entre 45 et 100 % chez le porc et l'humain contre 15 à 20 % chez le poulet. Le DON et ses métabolites sont capables de traverser la barrière hématoencéphalique. La biodisponibilité du D3G, du 3ADON et du 15ADON est faible, car ils sont principalement hydrolysés en DON.

Chez le porc, les rongeurs, les poissons et l'humain, la majorité du DON est conjuguée à l'acide glucuronique. Chez le poulet, la détoxification repose notamment sur

la sulfatation en DON-3S, mais des différences existent dans les capacités de sulfatation entre les poulets de chair, les dindes et les pigeons (Efsa, 2017b).

Le DON et ses métabolites sont presque uniquement excrétés dans l'urine chez l'humain, la souris et le porc, alors que chez le poulet et le rat, ils sont principalement éliminés dans les fèces. Le DON n'est pas hydrolysé en DON chez le poulet contrairement au porc, ce qui peut expliquer la différence de sensibilité entre ces espèces (Sun *et al.*, 2022).

La transformation du DON en DOM-1 par le microbiote intestinal est une voie importante de détoxification dont l'efficacité dépend des espèces. Le DOM-1 est détecté chez le rat, pas chez la souris et rarement chez l'humain. Chez le porc, cette voie de biotransformation est controversée. Chez les poissons, le DON est transformé en DOM-1 et DON-3S (Efsa *et al.*, 2017b). Le poulet métabolise le DON en DON-3S dans l'intestin, ce qui pourrait expliquer sa moindre sensibilité. Par ailleurs, il hydrolyse le 3ADON en DON, qu'il transforme en DOM-1, alors qu'il métabolise le 15ADON en DOM-1, DON libre et dé-époxy-15ADON (Sun *et al.*, 2022). Chez le porc, le DON est rapidement absorbé et pas uniformément distribué dans les organes. Les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans le plasma, les reins, la rate et le foie. La sensibilité des différentes espèces au DON peut être due à des mécanismes de toxicocinétique et de métabolisation spécifiques.

Chez la souris, le NIV est rapidement absorbé (concentration plasmatique maximale en une heure) et principalement excrété dans les fèces, sans accumulation apparente dans les tissus. Il traverse le placenta et contamine le lait des souris allaitantes. Chez le porc, on le retrouve dans le plasma 20 minutes après ingestion. Puis il est excrété dans les fèces sous sa forme dé-époxydée, son principal métabolite. Chez les ruminants, la dé-époxydation a probablement lieu dans le rumen avant absorption. Le dé-époxy NIV est détecté dans les fèces des rats, porcs et poules pondeuses, mais pas chez la souris ou les poulets de chair. Chez l'humain, des essais *in vitro* ont montré qu'il est peu probable que le dé-époxy NIV se forme. À noter qu'aucun métabolite de phase II du NIV n'a été identifié (Efsa, 2013).

Après administration orale, la FX, liposoluble, est rapidement absorbée dans le tractus gastro-intestinal des souris, des poulets, des canards et des porcs. Chez le porc, la concentration plasmatique maximale est atteinte en cinq minutes et la FX est détectée dans le foie, les reins et la rate trois heures après ingestion (Aupanun *et al.*, 2017). Chez la souris, le porc, le poulet et le canard, le foie et les reins sont les principaux organes de conversion de FX en NIV. Chez des souris gestantes ou allaitantes exposées à FX, du NIV a été retrouvé dans les fœtus ou le lait respectivement (Aupanun *et al.*, 2017).

## ► Toxicité des TCT

Au niveau cellulaire, les TCT A et B se lient à la poche du site A de la sous-unité 60S du ribosome, bloquent la synthèse protéique, induisent un stress ribotoxique, activant ainsi la voie de signalisation des MAP kinases, impliquée dans différentes fonctions cellulaires. Cependant, malgré ce mécanisme initial commun, les effets toxiques des TCT A et B peuvent différer (Efsa, 2017b).

Les sections suivantes décrivent les effets toxiques des TCT chez l'humain ou l'animal observé, dans la grande majorité des cas, après exposition orale (ingestion d'aliments contaminés ou gavage).

## Toxicité des TCT A

Chez l'humain, la consommation de céréales contaminées par la toxine T2 est à l'origine de l'aleucie toxique alimentaire. Les premiers cas ont été décrits en 1891 en Sibérie mais, dans les années 1940, des intoxications plus graves ont été rapportées, avec le décès de 10 % de la population du comté d'Orenbourg en Russie. Les derniers cas ont été décrits au Cambodge, en 1982 (Efsa, 2011).

Les TCT A affectent surtout les cellules en prolifération active (intestin, peau, moelle osseuse...). La toxine T2 provoque un stress oxydant et des lésions de l'ADN nucléaire et mitochondrial, perturbe la signalisation cellulaire, affecte le cycle cellulaire et induit l'apoptose. La toxine HT2, son principal métabolite, présente une toxicité aigüe similaire : T2 et HT2 auraient le même mode d'action (Efsa, 2011).

La toxine T2 provoque des hémorragies de la séreuse et de l'œdème dans le foie, ainsi que l'apoptose des hépatocytes et la granulation de leur cytoplasme. Elle provoque aussi des hémorragies de l'estomac et de l'œsophage, et la dégénérescence du noyau et des mitochondries des cellules des tubules du rein. Elle affecte les réponses immunitaires selon la dose et la durée d'exposition. Elle entraîne une leucopénie, inhibe l'érythropoïèse dans la moelle osseuse et la rate, réduit la prolifération des lymphocytes et perturbe la maturation des cellules dendritiques (Janik *et al.*, 2021).

Elle traverse la barrière hématoencéphalique et provoque des lésions pathologiques dans l'hypophyse. Elle interfère avec les réseaux neuronaux centraux qui régulent le comportement alimentaire.

Chez la souris, elle affecte la fertilité des mâles (réduction des spermatozoïdes vivants, augmentation des spermatozoïdes anormaux), mais l'exposition maternelle n'aurait pas d'impact significatif sur les capacités de reproduction. Toutefois, elle altère la reproduction du porc, inhibe la libération de progestérone du lapin et de la brebis, chez qui elle retarde la maturation folliculaire et l'ovulation.

Contrairement aux autres TCT, lors d'une exposition cutanée, elle provoque une inflammation de la peau, la destruction des fibroblastes et des lésions similaires à celles d'une irradiation (Janik *et al.*, 2021).

À ce jour, aucune étude n'a mis en évidence sa génotoxicité ni sa cancérogénicité (Efsa, 2011).

Dans les années 1970, le DAS a été utilisé comme anticancéreux potentiel et a provoqué des effets indésirables chez les patients (nausées, vomissements, fièvre, hypotension, myélosuppression). Il induit en effet des vomissements comme les toxines T2 et HT2, mais à un degré moindre. À forte dose chez les rongeurs, le DAS provoque apathie, difficulté à respirer, cyanose, diarrhée, vomissements et tachycardie. Chez la souris et le cobaye à plus faible dose, les muqueuses de l'œsophage et de l'intestin grêle et la moelle osseuse sont altérées. La prise alimentaire et la fonction de reproduction sont perturbées chez les rongeurs. Chez le porc, le DAS provoque à faible dose

des lésions de l'intestin, des gencives et de la langue, et la nécrose des cellules de la moelle osseuse. Des lésions de la bouche sont aussi observées chez les volailles. Chez la souris, il provoque des anomalies chromosomiques dans les cellules somatiques et germinales. À ce jour, sa cancérogénicité n'a pas été démontrée (Efsa, 2018).

Les données sur la toxicologie des toxines NX sont limitées. Elles sont cytotoxiques pour les cellules de mammifères, inhibent la synthèse des protéines et sont pro-inflammatoires et pro-oxydantes. NX, 3ANX et DON ont un impact similaire, mais d'ampleur différente sur la viabilité des cellules intestinales Caco-2 et le transcriptome d'explants intestinaux de porc, et NX cible les mitochondries de façon privilégiée (Soler *et al.*, 2022).

## Toxicité des TCT B

La toxicité aigüe du DON chez l'humain est décrite à travers des intoxications survenues notamment en Asie et qui se sont traduites par des nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, maux de tête, vertiges et fièvre. L'implication des 3 et 15ADON a parfois été aussi rapportée. Il n'existe aucun cas décrit d'exposition humaine au D3G (Efsa, 2017b). Chez le porc, la toxicité aigüe se traduit par des vomissements, des diarrhées, le refus de s'alimenter et une perte de poids.

Les TCT B, *via* l'activation des MAP kinases, modulent les processus physiologiques comme la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaires.

Le DON augmente la production de cytokines pro-inflammatoires des cellules épithéliales intestinales et immunitaires, ainsi que celle d'espèces réactives de l'oxygène. Il induit des changements histologiques dans l'intestin et altère la fonction de barrière. Les lésions induites par les 3 et 15ADON et le NIV sont similaires. Le DON provoque des lésions du foie et du rein chez le porc, et du foie chez le rat. Il traverse rapidement la barrière hématoencéphalique et agit sur la prise alimentaire chez la souris, le rat et le porc. Il altère la fertilité (anomalies des spermatozoïdes, hormones) et le développement des fœtus (embryotoxicité, anomalies du squelette, mortalité) chez les rongeurs et le porc. Il existe peu de données sur les effets des 3 et 15ADON et D3G sur la réponse immunitaire, sur le système nerveux central et la fonction de reproduction (Efsa, 2017b). Le DON n'a pas de propriétés génotoxiques, mais il exacerbe celle de composés eux-mêmes génotoxiques comme la colibactine, produite par des bactéries intestinales, l'étoposide, le cisplatine ou la phléomycine (Garofalo *et al.*, 2022). Comme les 3 et 15ADON sont déacétylés et le D3G clivé dans l'intestin, des effets similaires à ceux du DON sont attendus dans l'intestin.

Le NIV pourrait contribuer à l'apparition de la maladie de Kashin-Beck, une ostéoarthropathie dégénérative endémique qui touche les adolescents en Chine (Kumar *et al.*, 2022). Il réduit la viabilité des cellules intestinales en culture. Ses effets sur l'épithélium d'explants intestinaux (diminution de la prolifération et augmentation de l'apoptose) sont supérieurs à ceux du DON. Il altère la maturation des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse murine.

La FX est plus toxique que la plupart des TCT B pour différentes lignées cellulaires et affecte les cellules à prolifération rapide. Chez la souris, elle induit l'apoptose des cellules hématopoïétiques de la rate, des hépatocytes et des cellules rénales, et une

immunosuppression. Chez le vison, elle provoque un refus alimentaire persistant et a un pouvoir émétique plus important que celui du DON et du NIV. Chez la souris, elle inhibe l'implantation embryonnaire et provoque des avortements. Elle affecte le fœtus après sa métabolisation en NIV absorbé par le placenta. Comme les autres TCT B, elle n'est pas considérée comme cancérogène (Aupanun *et al.*, 2017).

## ►► Conclusion

Les TCT produits par les espèces du genre *Fusarium* sont une source de contamination majeure des denrées destinées à l'alimentation humaine et animale et entraînent un large éventail d'effets néfastes pour la santé des consommateurs. Ils sont en partie réglementés au niveau européen et, pour ceux dont le mode d'action est similaire, des valeurs toxicologiques de référence groupées sont établies par l'Efsa. Les TCT les plus fréquemment rencontrés sont bien caractérisés, mais l'identification récente des toxines NX démontre l'importance de poursuivre les recherches sur le métabolisme secondaire des moisissures.

## ►► Références

- Aupanun S., Poapolathep S., Giorgi M. *et al.*, 2017. An overview of the toxicology and toxicokinetics of fusarenon-X, a type B trichothecene mycotoxin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79, 6-13, <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0008>.
- Chen Y., Kistler H.C., Ma Z., 2019. *Fusarium graminearum* Trichothecene Mycotoxins: Biosynthesis, Regulation, and Management. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 15-39, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100318>.
- Del Ponte E.M., Moreira G.M., Ward T.J. *et al.*, 2022. *Fusarium graminearum* Species Complex: A Bibliographic Analysis and Web-Accessible Database for Global Mapping of Species and Trichothecene Toxin Chemotypes. *Phytopathology*, 112, 741-751, <https://doi.org/10.1094/phyto-06-21-0277-rww>.
- Efsa, 2011. Risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *Efsa Journal*, 9, 2481, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2481>.
- Efsa, 2013. Risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *Efsa Journal*, 11, 3262, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3262>.
- Efsa, 2017a. Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *Efsa Journal*, 15, e04972, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4972>.
- Efsa, 2017b. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *Efsa Journal*, 15 (9), e04718, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>.
- Efsa, 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15-diacetoxyscirpenol in food and feed. *Efsa Journal*, 16, e05367, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5367>.
- Foroud N.A., Baines D., Gagkaeva T.Y. *et al.*, 2019. Trichothecenes in Cereal Grains — An Update. *Toxins*, 11, 634, <https://doi.org/10.3390/toxins11110634>.
- Gab-Allah M.A., Choi K., Kim B., 2023. Type B Trichothecenes in Cereal Grains and Their Products: Recent Advances on Occurrence, Toxicology, Analysis and Post-Harvest Decontamination Strategies. *Toxins*, 15, 85, <https://doi.org/10.3390/toxins15020085>.
- Garofalo M., Payros D., Oswald E. *et al.*, 2022. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. *Science of The Total Environment*, 820, 153280, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153280>.

- Janik E., Niemcewicz M., Podogrocki M. *et al.*, 2021. T-2 Toxin — The Most Toxic Trichothecene Mycotoxin: Metabolism, Toxicity, and Decontamination Strategies. *Molecules*, 26, 6868, <https://doi.org/10.3390/molecules26226868>.
- Jecfa, 2017. Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Jecfa), WHO Technical Report Series 1002.
- Kumar P., Mahato D.K., Gupta A. *et al.*, 2022. Nivalenol Mycotoxin Concerns in Foods: An Overview on Occurrence, Impact on Human and Animal Health and Its Detection and Management Strategies. *Toxins*, 14, 527, <https://doi.org/10.3390/toxins14080527>.
- McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A. *et al.*, 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802, <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>.
- Novak B., Rainer V., Sulyok M. *et al.*, 2019. Twenty-Eight Fungal Secondary Metabolites Detected in Pig Feed Samples: Their Occurrence, Relevance and Cytotoxic Effects In Vitro. *Toxins*, 11, 537, <https://doi.org/10.3390/toxins11090537>.
- Pasquali M., Beyer M., Logrieco A. *et al.*, 2016. A European Database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Trichothecene Genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 406, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00406>.
- Soler L., Miller I., Terciolo C. *et al.*, 2022. Exposure of intestinal explants to NX, but not to DON, enriches the secretome in mitochondrial proteins. *Archives of Toxicology*, 96, 2609-2619, <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03318-x>.
- Sun Y., Jiang J., Mu P. *et al.*, 2022. Toxicokinetics and metabolism of deoxynivalenol in animals and humans. *Archives of Toxicology*, 96, 2639-2654, <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03337-8>.
- Varga E., Wiesenberger G., Hametner C. *et al.*, 2015. New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. *Environmental Microbiology*, 17, 2588-2600, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12718>.
- Yang S., De Boevre M., Zhang H. *et al.*, 2017. Metabolism of T-2 Toxin in Farm Animals and Human *In Vitro* and in Chickens *In Vivo* Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Time-of-Flight Hybrid Mass Spectrometry Along with Online Hydrogen/Deuterium Exchange Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 7217-7227, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02575>.
- Yoshinari T., Takeuchi H., Aoyama K. *et al.*, 2014. Occurrence of four *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, and HT-2 toxin, in wheat, barley, and Japanese retail food. *Journal of Food Protection*, 77, 1940-1946, <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-14-185>.

## Chapitre 6

---

# Les fumonisines

Florence Forget et Philippe Guerre

### ►► Introduction

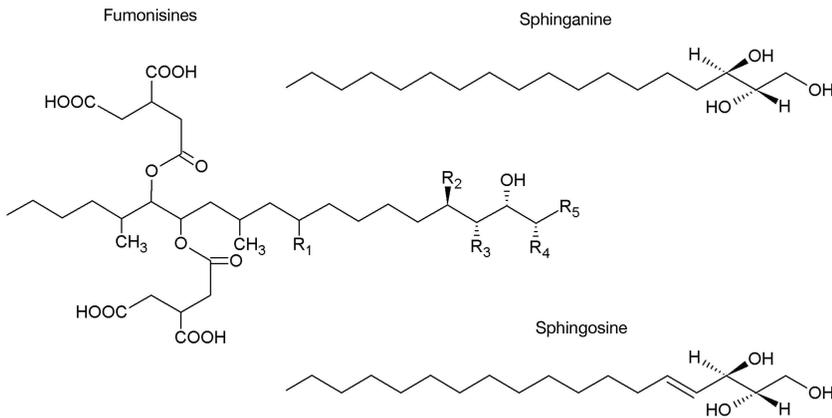
Les fumonisines sont des mycotoxines majoritairement produites par les espèces du genre *Fusarium*, mais non exclusivement. En effet, elles peuvent aussi être synthétisées par certaines espèces des genres *Aspergillus* et *Alternaria*. Au sein de cette famille de mycotoxines, les fumonisines dites de type B (FB) sont les plus fréquemment rencontrées, essentiellement dans les récoltes de maïs même si une gamme très variée de productions végétales peut être contaminée. C'est en 1988 que les FB ont été isolées, caractérisées et que des premières informations sur leurs propriétés biologiques ont été publiées (Marasas, 2001). Il est depuis clairement admis que la toxicité des FB résulte de leur analogie structurale avec la sphingosine et sphinganine, conduisant à une altération de la synthèse des sphingolipides.

Les sphingolipides sont des constituants majeurs des membranes des cellules eucaryotes. Ils assurent un rôle structural mais aussi de récepteur et de messenger. Un dysfonctionnement de leur métabolisme est à l'origine de nombreuses maladies, dont certains cancers. Les FB sont classées comme cancérogènes probables (groupe 2B) par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer). Elles sont incriminées dans la survenue de cancers de l'œsophage chez l'humain. Elles sont aussi connues comme responsables de la leucoencéphalomalacie équine et d'un œdème pulmonaire chez le porc. Les FB sont réglementées dans l'alimentation humaine par la Commission européenne et font aussi l'objet d'une recommandation pour l'alimentation animale (voir chapitre 20).

## ► Structure chimique, espèces productrices, voies de biosynthèse

### Structure chimique des fumonisines, formes libres et formes masquées

Les fumonisines appartiennent à la catégorie des mycotoxines polycétoacides. Ce sont des amines aliphatiques à longues chaînes portant des groupes méthyle et hydroxyle situés à différentes positions de la chaîne aliphatique (figure 6.1). Deux des groupes hydroxyles sont estérifiés par des acides tricarboxyliques. Plus de 60 fumonisines ont été identifiées à ce jour ; les principales sont reportées dans le tableau 6.1.



**Figure 6.1.** Structure chimique des principales fumonisines et de deux analogues structuraux (sphingosine et sphinganine).

**Tableau 6.1.** Principales classes de fumonisine (3 HP\* : 3-hydroxypyridium).

Classes de fumonisines	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Fumonisine B1 (FB1)	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine B2 (FB2)	H	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine B3 (FB3)	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine B4 (FB4)	H	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine B5 (FB5)	H	OH	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine A1 (FA1)	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine A2 (FA2)	H	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine A3 (FA3)	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine A4 (FA4)	H	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Fumonisine C1 (FC1)	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	H
Fumonisine C2 (FC2)	H	OH	H	NH <sub>2</sub>	H
Fumonisine C3 (FC3)	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	H
Fumonisine C4 (FC4)	H	H	H	NH <sub>2</sub>	H
Fumonisine P1 (FP1)	OH	OH	H	3-HP*	H
Fumonisine P2 (FP2)	H	OH	H	3-HP	H
Fumonisine P3 (FP3)	OH	H	H	3-HP	H

Les FB (en particulier FB1, FB2 et FB3) sont les plus fréquemment retrouvées dans les denrées alimentaires ; les concentrations les plus élevées sont le plus souvent associées à FB1. La formule chimique de FB1 est  $C_{34}H_{59}NO_{14}$  et le nom chimique selon la nomenclature IUPAC est l'acide (2S)-2-[2-[(5R,6R,7S,9S,11R,16R,18S,19S)-19-amino-6-[(3R)-3,4-dicarboxybutanoyl]oxy-11,16,18-trihydroxy-5,9-diméthylheptacosan-7-yl]oxy-2-oxoéthyl]butanédioïque. De masse molaire 722 g/mol, FB1 possède un point de fusion proche de 105 °C. Les fumonisines sont des composés polaires, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants apolaires. De par leur nature aliphatique, elles n'absorbent pas dans l'ultraviolet ni le visible ; une étape de dérivation est requise pour les rendre fluorescentes avant analyse par chromatographie liquide haute pression.

La présence de groupements amines et tricarboxyliques dans la structure des fumonisines est à l'origine d'interactions covalentes entre ces mycotoxines et différents composants (polysaccharides et protéines) de la matrice contaminée, conduisant à des dérivés acylés ou alkyles. Les molécules de fumonisines peuvent aussi se retrouver piégées physiquement au sein d'une matrice tel l'amidon. Les formes piégées et liées à la matrice sont regroupées sous le terme de formes cachées des fumonisines. Ces formes ne sont pas extraites par les méthodes classiquement utilisées pour quantifier les teneurs en fumonisines d'une matrice. Une étape d'hydrolyse alcaline et l'utilisation d'une détection par spectrométrie de masse sont nécessaires pour les révéler et les quantifier. Leur présence conduit ainsi à une forte sous-estimation des niveaux de contamination. Selon Dall'Asta et Battilani (2016), la quantité de formes cachées de FB1 peut, dans certains échantillons de maïs, être équivalente à celle de la forme libre. Outre ces formes cachées, des formes modifiées des fumonisines ont aussi été décrites. Ces formes modifiées résultent d'activité biologique (métabolisme des plantes ou micro-organismes) ou de réactions chimiques en lien avec les procédés de transformation. Les formes modifiées les plus documentées dans la littérature sont les formes hydrolysées des FB et en particulier celle de FB1 désignée par HFB1 (Dall'Asta et Battilani, 2016).

## Espèces productrices

Les principales espèces productrices de fumonisines appartiennent au complexe *Fusarium fujikuroi* (tableau 6.2 ; Rheeder *et al.*, 2002). *F. oxysporum* (complexe *F. oxysporum*), producteur de fumonisines de type C, est l'une des rares exceptions. Si on s'intéresse plus spécifiquement à la contamination par FB1, ce sont les espèces *F. verticillioides* et *F. proliferatum* qui en sont les principales responsables. Il est important de noter que certains isolats des espèces *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* ont aussi été rapportés comme producteurs de fumonisines.

**Tableau 6.2.** Principales espèces du genre *Fusarium* productrices de fumonisines.  
Source : Rheeder *et al.*, 2002.

Espèce fongique	Type de fumonisine	Espèce fongique	Type de fumonisine
<i>Fusarium verticillioides</i>	FB, FA, FC, FP	<i>Fusarium globosum</i>	FB
<i>Fusarium proliferatum</i>	FB, FA, FC, FP	<i>Fusarium anthophilum</i>	FB
<i>Fusarium subglutinans</i>	FB	<i>Fusarium nygamai</i>	FB, FA, FC
<i>Fusarium sacchari</i>	FB	<i>Fusarium napiforme</i>	FB
<i>Fusarium fujikuroi</i>	FB	<i>Fusarium oxysporum</i>	FC
<i>Fusarium thapsinum</i>	FB		

## Voie de biosynthèse et régulation

À ce jour, 17 gènes ont été décrits comme associés à la biosynthèse des FB (Li *et al.*, 2023). Ces gènes sont regroupés dans la *cluster* FUM (représenté sur la figure 6.2) ; la majeure partie d'entre eux ont une fonction connue. Parmi ces 17 gènes, 10 (en noir sur la figure 6.2) codent pour des enzymes directement impliquées dans la biosynthèse (FUM1, FUM6, FUM7, FUM8, FUM3, FUM10, FUM11, FUM2, FUM13 et FUM14). FUM1 est la première enzyme de la voie ; il s'agit d'une polycétide synthase catalysant la condensation de huit radicaux malonyl-CoA, un radical acétyl-CoA et de deux radicaux S-adosyl-méthionine. Cette réaction génère la chaîne aliphatique qui constitue le squelette des fumonisines. Une des autres enzymes clés est la peptide synthétase non ribosomique FUM14 qui catalyse l'estérification de la chaîne aliphatique par les deux acides tricarboxyliques.



**Figure 6.2.** Gènes liés à la biosynthèse des fumonisines B : la *cluster* FUM et la fonction des gènes FUM. D'après Li *et al.*, 2022.

**Tableau 6.3.** Fonction des gènes *FUM*. D'après Li *et al.*, 2022.

Gène	Fonction	Gène	Fonction
<i>FUM21</i>	Régulateur transcriptionnel de liaison à l'ADN de type doigt de zinc	<i>FUM20</i>	Inconnue
<i>FUM1</i>	Polycétide synthase	<i>FUM13</i>	Déshydrogénase/réductase de chaînes courtes
<i>FUM6</i>	Cytochrome P450 monooxygénase et réductase	<i>FUM14</i>	Peptide non ribosomique synthétase
<i>FUM7</i>	Alcool déshydrogénase	<i>FUM15</i>	Cytochrome P450 monooxygénase
<i>FUM8</i>	$\alpha$ -oxoamine synthase	<i>FUM16</i>	Acyl-CoA synthétase / acyl-protéine synthétase
<i>FUM3</i>	Dioxygénase	<i>FUM17</i>	Céramide synthase
<i>FUM10</i>	Acyl-CoA synthétase / acyl-protéine synthétase	<i>FUM18</i>	Céramide synthase
<i>FUM11</i>	Tricarboxylique acide transporteur	<i>FUM19</i>	Transporteur ABC
<i>FUM2</i>	Cytochrome P450 monooxygénase		

Les souches productrices de fumonisines ont mis en place une stratégie élaborée pour se protéger de la toxicité de ces métabolites secondaires. Cette stratégie repose sur :  
 – la compartimentalisation des réactions de biosynthèse dans la cellule fongique. La protéine FUM8 impliquée dans l'une des premières étapes de biosynthèse se trouve dans des vésicules associées au réticulum endoplasmique alors que la protéine FUM3, une dioxygénase intervenant en fin de voie, est présente dans le cytoplasme ;  
 – la présence du gène *FUM18*, qui code une céramide synthase résistante à la toxicité des fumonisines, et celle du gène *FUM17*, qui code une protéine qui, en formant un hétérodimère avec la céramide synthase CER3, protège son activité de la toxicité des fumonisines.

Le mécanisme de transport des fumonisines dans le milieu extracellulaire demeure encore non élucidé. La protéine FUM19, un transporteur de type ABC, contribuerait à ce transport, mais ne serait pas le seul acteur puisque la présence de fumonisines extracellulaires est observée pour des souches délétées pour le gène *FUM19*.

## Régulation de la biosynthèse

Deux gènes *FUM* ont été décrits comme codant pour des protéines régulant spécifiquement la biosynthèse des fumonisines. *FUM21* serait un facteur de transcription avec une fonction de régulateur positif de l'expression des autres gènes *FUM*. *FUM19* exercerait une fonction de régulateur négatif de l'expression de certains gènes *FUM*. De plus, un gène adjacent au *cluster* FUM, le gène *ZBD1* (ZBD pour *Zinc-Binding Dehydrogenase*), serait un répresseur des gènes *FUM* (Gao *et al.*, 2020). Outre ces trois facteurs de transcription spécifiques, des facteurs globaux interviennent aussi dans les mécanismes de régulation de la biosynthèse par différents stimuli environnementaux. Les paramètres et système de régulation les plus documentés dans la littérature (Li *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2023) sont reportés dans le tableau 6.4.

**Tableau 6.4.** Exemples de facteurs environnementaux et gènes de régulation impliqués dans la modulation de la biosynthèse des FB.

Paramètre environnemental / modulation de la biosynthèse des FB	Gènes impliqués dans la régulation
Source carbone	
Forte induction de la biosynthèse par le saccharose.	<i>CreA</i> : facteur de transcription lié à la répression catabolique du carbone. <i>Son rôle vis-à-vis de la biosynthèse de FB reste cependant controversé.</i>
L'amidon (et plus spécifiquement l'amylopectine) induit la biosynthèse.	<i>HXK1</i> (hexokinase1) / nécessaire à la production. <i>AMY1</i> ( $\alpha$ -amylase) / nécessaire à la production. <i>Art1</i> (facteur de transcription à doigt de zinc requis pour l'hydrolyse de l'amidon) / nécessaire à la production.
Source azote	
Répression de la biosynthèse quand la source d'azote est un sel d'ammonium.	<i>AREA</i> (facteur de transcription GATA) / régulateur positif de certains gènes <i>FUM</i> . <i>FUG1</i> (fonction inconnue à ce jour) / régulateur positif de <i>AREA</i> .
pH	
Production réprimée en condition alcaline.	<i>PaCl</i> (facteur de transcription à doigt de zinc) contrôle négativement l'expression de <i>FUM1</i> .
Lumière	
Production stimulée par les rayonnements lumineux de bleu à rouge.	Régulation positive de <i>FUM21</i> par le complexe formé par VeA avec les protéines Velvet, VelB et VelC.

Comme pour la majorité des métabolites secondaires fongiques, la régulation de la production de FB est sous la dépendance des mécanismes de remodelage de la chromatine. Le rôle de la méthyltransférase LAE1, régulateur global du métabolisme fongique, et de la méthyltransférase H3K4 a été particulièrement étudié (Wang *et al.*, 2023).

## ► Types d'aliments contaminés et occurrence

Entre 2020 et 2023, 12 produits alimentaires (exclusivement des produits dérivés de maïs tels que des farines, snacks et popcorn) ont fait l'objet d'une alerte RASFF pour leurs teneurs en FB1. Le maïs est en effet la culture la plus sensible à cette contamination. L'étude de Braun et Winck (2018) illustre la fréquence de contamination élevée des maïs cultivés en Amérique du Sud, Amérique centrale, Afrique du Sud et Europe du Sud, avec certaines années des concentrations pouvant dépasser les 100 mg/kg. Cette distribution s'explique en partie par les conditions climatiques ; les *Fusarium* producteurs de FB se développent de façon optimale à des températures proches de 30 °C et l'infection des plantes est favorisée par la survenue d'épisodes de sécheresse. Ces caractéristiques écophysiologiques associées au fait que l'élévation des concentrations en CO<sub>2</sub> aggraverait la sensibilité des plantes sont autant de facteurs suggérant une augmentation de la fréquence et des niveaux de contamination induite par les changements climatiques (Vaughan *et al.*, 2014). D'autres denrées végétales peuvent aussi être contaminées par des FB (Braun et Winck, 2018). On citera le blé dur, le soja, les pois, l'oignon et l'ail, l'asperge, les raisins et les figues sèches. Si les teneurs en FB restent peu élevées dans la majorité de ces matrices, il n'en est rien pour les fruits secs pour lesquels des concentrations supérieures à 3 mg/kg ont été rapportées (Braun et Winck, 2018).

En ce qui concerne les aliments destinés aux animaux, l'opinion scientifique de l'Efsa publiée en 2018 (Efsa, 2018) décrit les données d'occurrence de FB (somme FB1 + FB2 + FB3) et de leurs formes cachées et modifiées, dans plus de 18 000 échantillons collectés entre 2003 et 2016 dans différents pays européens. Pour plus de 70 % des échantillons, les niveaux de fumonisines étaient inférieurs aux limites de détection et/ou de quantification. Les aliments les plus fréquemment contaminés étaient les grains de maïs (entre 20 et 2 037 µg/kg), de blé (entre 0,4 et 2 482 µg/kg) et les aliments composés (entre 0,3 et 1 678 µg/kg). La présence de FB a aussi été signalée dans des fourrages, graines oléagineuses, légumineuses et tubercules. Les concentrations les plus élevées (supérieures à 2 mg/kg) ont été observées dans les aliments composés et aliments à base de maïs (gluten, flocons et sons).

## ► Toxicocinétique : absorption, métabolisme, excrétion

La plupart des études de toxicocinétique réalisées sur les fumonisines ont été effectuées avec la FB1, considérée comme la plus toxique. Les rares études réalisées avec la FB2 et la FB3 ne révèlent pas de différences majeures. La biodisponibilité de la FB1 est faible (3 à 6 %), son métabolisme limité (par hydrolyse partielle ou totale des acides tricarboxyliques et N-acylation) et son excrétion rapide. Les métabolites formés sont considérés comme moins toxiques que le composé parental (FB hydrolysées) ou de toxicité similaire (FB N-acylées) (Guerre, 2015). Des études récentes ont montré que la FB1, lors de son administration aux doses maximales recommandées, pouvait être retrouvée dans différents tissus de poulets et dindes, et persistait plusieurs jours après l'arrêt de l'exposition (Tardieu *et al.*, 2021 ; Guerre *et al.*, 2022).

## ► Toxicité

Les FB sont des carcinogènes potentiels chez l'humain, dont les effets toxiques chez les animaux sont multiples. Comme signalé précédemment, des teneurs maximales dans les aliments ont été définies chez l'humain et l'animal. La présentation de la toxicité des fumonisines sera envisagée par organe/tissus cible.

### Toxicité nerveuse

La leucoencéphalomalacie équine (ELEM en anglais) a été la première affection animale reproduite par administration de FB1. Connue depuis le début du xx<sup>e</sup> siècle suite à la consommation d'aliments contaminés, cette maladie se caractérise par une évolution asymptomatique de quelques jours à quelques semaines, suivie de troubles nerveux d'apparition brutale et d'évolution fatale en quelques heures/jours. Les premiers symptômes sont une agitation plus ou moins accompagnée de périodes d'ataxie, rapidement suivis d'une agitation extrême, de folie, et de convulsions ou de paralysies. Les principales lésions observées sont une nécrose avec liquéfaction de la substance blanche de l'encéphale. Différentes études expérimentales réalisées sur rongeurs, helminthes ou par administration *in ovo* de FB1 ont confirmé sa neurotoxicité. Des études récentes utilisant la chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse (UHPLC-MSMS) n'ont toutefois pas permis de révéler la présence de FB1 dans l'encéphale de poulets exposés aux teneurs maximales recommandée dans l'aliment par la Commission européenne, alors que la toxine était retrouvée dans le foie, les reins, les muscles et le poumon (Tardieu *et al.*, 2021). L'effet des fumonisines sur le système nerveux central pourrait donc ne pas être lié au passage de la barrière hémato-méningée par la toxine et résulter d'une action indirecte.

### Toxicité pulmonaire

L'œdème pulmonaire porcin (PPE en anglais) est une affection décrite chez le porc suite à la consommation d'aliments contaminés, reproduite par administration de FB1. Les principaux symptômes observés sont de la dyspnée, une cyanose des muqueuses avec prostration conduisant à la mort. L'analyse histologique révèle un œdème interstitiel d'origine non inflammatoire. Différentes études réalisées sur rongeurs ou volailles ont révélé que les FB entraînaient de nombreuses altérations pulmonaires susceptibles d'expliquer les effets observés chez les porcs. Bien que la FB1 puisse être retrouvée dans le poumon, ses concentrations sont faibles comparées à celles retrouvées dans le foie et les reins, ce qui suggère que les effets de la FB1 pourraient être indirects ou spécifiques de certains types cellulaires. Cette observation est en accord avec l'accumulation périnucléaire de matériel membranaire dans les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires, à des doses qui ne provoquent pas d'œdème pulmonaire porcin.

## Toxicité digestive

Longtemps considéré comme de faible importance, le nombre d'études mettant en évidence une toxicité intestinale des FB est de plus en plus élevé. Cette toxicité se caractérise par une altération de la longueur des villosités et/ou de la profondeur des cryptes intestinales. Ces altérations sont accompagnées de dommages oxydatifs. Observées à de très faibles niveaux d'exposition chez le porc et le poulet, ces lésions ont conduit à une réévaluation de la dose sans effet nocif observable (NOAEL en anglais pour *No Observable Adverse Effect Level*) chez le poulet (Terciolo *et al.*, 2019 ; Efsa, 2022). Des altérations du microbiote fécal, concernant principalement *Clostridium* et *Lactobacillus*, ont également été décrites ; elles pourraient contribuer à la survenue d'entérite nécrosante chez le poulet.

## Toxicité hépatique, toxicité rénale

Une toxicité hépatique et/ou rénale des FB est décrite dans la quasi-totalité des espèces animales. Cette toxicité peut être intense, lors de l'administration de fortes doses, ou ne se révéler qu'à l'occasion d'examens biochimique et histologique, lors de l'administration de faibles doses. Les altérations observées correspondent à une nécrose hépatique focale plus ou moins accompagnée de stéatose et dommages oxydatifs. L'analyse biochimique révèle une élévation des marqueurs de cytolysse hépatique tels que les activités lactate déshydrogénase (LDH), aspartate aminotransférase (AST) et alanine aminotransférase (ALT). Une hypoprotéïnémie et une hypercholestérolémie signant une altération des capacités métaboliques du foie sont aussi rapportées. Foie et reins sont les organes cibles de la FB1 chez les rongeurs, notamment lors d'une administration chronique. La FB1 est hépatocarcinogène chez la souris, et néphrocarcinogène chez le rat (Howard *et al.*, 2001). La différence de susceptibilité rénale et hépatique observée entre rats et poulets, néphrotoxicité chez le rat contre hépatotoxicité chez le poulet, pourrait avoir une origine toxicocinétique : la FB1 s'accumule davantage dans le rein chez le rat et plus dans le foie chez le poulet (Tardieu *et al.*, 2021).

## Toxicité pour les fonctions de reproduction

Les effets des FB sur les fonctions de reproduction ont été décrits souvent suite à l'administration de fortes ou très fortes doses. Les effets sur le système reproducteur mâle sont nombreux et caractérisés par une altération de la qualité du sperme chez le lapin ; s'y ajoutent des modifications histologiques testiculaires, et de la testostéronémie chez les rongeurs. Chez les femelles, l'examen histologique des ovaires révèle une diminution du nombre de follicules viables, une inhibition de la prolifération des cellules de la granulosa et une altération de la progestéronémie. Chez les poules, une diminution de l'épaisseur de la coquille des œufs a été décrite. Chez la souris, des anomalies de fermeture du tube neural ont été observées après injection intrapéritonéale. Ces observations ont également été décrites chez le poisson-zèbre et chez le canard par administration *in ovo*.

## Immunotoxicité

Les effets de la FB1 sur le système immunitaire ont été mis en évidence chez différentes espèces. De très fortes doses sont susceptibles de diminuer la réponse des anticorps après vaccination chez la volaille et le porc. Des inhibitions de la prolifération et la différenciation des lymphocytes accompagnées d'une diminution du poids de la bourse de Fabricius ont également été observées. Ces effets s'accompagnent en général d'une altération de l'expression de différentes cytokines telles que l'interleukine 1- $\beta$  et les interférons  $\alpha$  et  $\gamma$ , bien d'autres cytokines pouvant être affectées. Des effets similaires sont observés chez les porcs pour des doses plus proches des niveaux de contamination des aliments. Ainsi, les effets de la FB1 sur la réponse immune sont nombreux et conduisent à une modification des capacités de défense (effets immunomodulateurs plus qu'effets immunosuppresseurs). Ces effets confirment par ailleurs la plus grande sensibilité des porcs comparés aux poulets (Régnier *et al.*, 2017).

### ► Mécanismes d'action : notion de biomarqueur

La toxicité des FB est complexe, et de nombreuses inconnues persistent tant en termes de seuils toxiques, de débit de dose, que de mécanismes. D'un point de vue clinique, leur toxicité est en général caractérisée par une phase asymptomatique de longueur variable suivie d'une phase clinique d'évolution rapide. Des études récentes ont montré une capacité à la bioaccumulation de la FB1 chez les poulets (Tardieu *et al.*, 2021), en accord avec la toxicité cumulative de ce composé. Le caractère de toxique cumulatif attribuable aux FB pourrait également être lié à une accumulation d'effets toxiques.

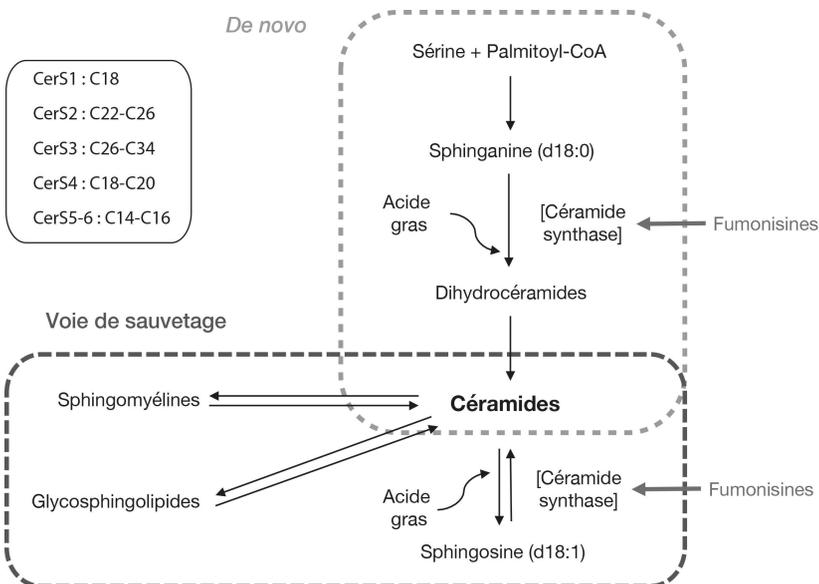


Figure 6.3. Schéma simplifié des voies de synthèse des sphingolipides.

Bien que très diversifiés, tous peuvent être directement ou indirectement reliés à une altération du métabolisme des sphingolipides (Riley et Merrill, 2019).

La FB1 est un analogue structural des bases sphingoïdes, sphinganine (Sa) et sphingosine (So) (figure 6.1), qui bloque la synthèse *de novo* des céramides (figure 6.3). Lors de l'administration de fortes doses, on constate une déplétion marquée des céramides totaux et une augmentation des teneurs cellulaires en Sa et ses métabolites (sphinganine 1-phosphate, N-acétyl-sphinganine). Le rapport Sa/So est augmenté. Ce rapport est utilisé comme biomarqueur d'exposition dans la plupart des espèces animales. Ce n'est toutefois pas un marqueur de toxicité et des travaux récents chez la volaille montrent que le dosage de la FB1 hépatique est plus sensible que le Sa/So pour révéler une exposition (Tardieu *et al.*, 2021).

L'inhibition de la synthèse *de novo* des céramides conduit à une hydrolyse des sphingolipides membranaires et à la formation de céramides par la voie dite de sauvetage. Ce processus conduit à terme à une augmentation du So intracellulaire. Ce mécanisme est considéré comme responsable de la non-linéarité de l'augmentation du Sa/So lors d'une exposition prolongée aux FB (Riley et Merrill, 2019).

Des travaux récents réalisés à des doses considérées comme sans danger chez la volaille ont montré que les effets des FB sur la synthèse *de novo* des céramides variaient en fonction de la longueur de chaîne de l'acide gras incorporé et de l'organe étudié. Ainsi, les céramides à longue chaîne (acides gras de 14 à 16 atomes de carbone) seraient plus affectés que les céramides à très longues chaînes (acides gras de 22 à 26 atomes de carbone), ces derniers pouvant même être augmentés par un processus compensatoire. Cette dualité d'effet est aussi observée sur les sphingomyélines et glycosylcéramides. Le maintien de teneurs cellulaires en céramides et la non-hydrolyse des sphingomyélines pourraient expliquer les différences de sensibilité aux FB. Une altération des sphingolipides non dépendante d'une altération de la synthèse *de novo* a également été décrite au niveau cérébral chez le poulet. Même si les mécanismes à l'origine de ces altérations demeurent méconnus, ils sont en accord avec l'absence de détection de la FB1 dans l'encéphale.

Le bouleversement du sphingolipidome qui résulte de l'inhibition de la synthèse *de novo* est considéré comme suffisant pour expliquer stress oxydant, apoptose ou prolifération cellulaire décrits lors d'administrations de FB (Riley et Merrill, 2019). À titre d'exemple, de nombreuses études font état d'une élévation de marqueurs de stress oxydant et/ou d'une diminution des moyens de lutte contre le stress oxydant. Les mécanismes impliqués suggèrent une modification de la perméabilité mitochondriale et/ou une activation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Ces effets pourraient résulter d'une action directe des céramides sur la perméabilité mitochondriale, mais aussi d'une activation de la phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique, dont sphingomyélines et glycosylcéramides sont des régulateurs. Les effets apoptotiques de la FB1 pourraient provenir d'une activation de la caspase 3, secondaire à un stress oxydant. L'apoptose pourrait également résulter d'une augmentation du rapport entre gènes *Bax* et *Bak1* pro-apoptotique et gènes *Bcl2* anti-apoptotique, ou d'une activation de la voie du TNF (*Tumoral Necrosis Factor*). Tous ces mécanismes sont directement ou indirectement connectés au métabolisme des sphingolipides ; il en va de même des processus tumoraux (Régner *et al.*, 2017 ; Riley et Merrill, 2019 ; Alizadeh *et al.*, 2023).

## ► Conclusion

Les fumonisines sont des mycotoxines de répartition mondiale dont la prévalence varie fortement. Toxiques pour l'humain et l'animal, leurs effets diffèrent fortement selon l'espèce et le niveau d'exposition. Bien que de nombreuses altérations cellulaires et moléculaires soient décrites, la quasi-totalité des effets observés semble pouvoir être attribuée à des altérations du sphingolipidome.

## ► Références

- Alizadeh J., da Silva Rosa S.C., Weng X. *et al.*, 2023. Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy. *European Journal of Cell Biology*, 102, 151337, <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151337>.
- Braun M.S., Wink M., 2018. Exposure, Occurrence, and Chemistry of Fumonisin and their Cryptic Derivatives. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 17, 769-791, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12334>.
- Dall'Asta C., Battilani P., 2016. Fumonisin and their modified forms, a matter of concern in future scenario? *World Mycotoxin Journal*, 9, 727-739, <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2058>
- Efsa, 2018. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *Efsa Journal*, 16, 5242, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5242>
- Efsa, 2022. Assessment of Information as Regards the Toxicity of Fumonisin for Pigs, Poultry and Horses. *Efsa Journal*, 20, e07534, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7534>.
- Gao M., Glenn A.E., Gu X. *et al.*, 2020. Pyrrocidine, a molecular off switch for fumonisin biosynthesis. *PLoS Pathogens*, 16, e1008595, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008595>.
- Guerre P., 2015. Fusariotoxins in Avian Species: Toxicokinetics, Metabolism and Persistence in Tissues. *Toxins*, 7, 2289-2305, <https://doi.org/10.3390/toxins7062289>.
- Guerre P., Matard-Mann M., Nyvall Collén P., 2022. Targeted sphingolipid analysis in chickens suggests different mechanisms of fumonisin toxicity in kidney, lung, and brain. *Food and Chemical Toxicology*, 170, 113467, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113467>.
- Howard P.C., Eppley R.M., Stack M.E. *et al.*, 2001. Fumonisin b1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environmental Health Perspectives*, 109, 277-282, <https://doi.org/10.1289/ehp.011109s2277>.
- Li T., Su X., Qu H., Duan X. *et al.*, 2022. Biosynthesis, regulation, and biological significance of fumonisins in fungi: current status and prospects. *Critical Review in Microbiology*, 48, 450-462, <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1979465>.
- Marasas W.F., 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109, 239-243, <https://doi.org/10.1289/ehp.011109s2239>.
- Régnier M., Gourbeyre P., Pinton P. *et al.*, 2017. Identification of Signaling Pathways Targeted by the Food Contaminant FB1: Transcriptome and Kinome Analysis of Samples from Pig Liver and Intestine. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61, 1700433, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700433>.
- Rheeder J.P., Marasas W.F., Vismer H.F., 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2101-2105, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2101-2105.2002>.
- Riley R.T., Merrill A.H., 2019. Ceramide synthase inhibition by fumonisins: a perfect storm of perturbed sphingolipid metabolism, signaling, and disease. *Journal of Lipid Research*, 60, 1183-1189, <https://doi.org/10.1194/jlr.S093815>.
- Tardieu D., Travel A., Le Bourhis C. *et al.*, 2021. Fumonisin and zearalenone fed at low levels can persist several days in the liver of turkeys and broiler chickens after exposure to the contaminated diet was stopped. *Food and Chemical Toxicology*, 148, 111968, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111968>.

## Les mycotoxines

- Terciolo C., Bracarense A.P., Souto P.C.M.C. *et al.*, 2019. Fumonisin at Doses below EU Regulatory Limits Induce Histological Alterations in Piglets. *Toxins*, 11 548, <https://doi.org/10.3390/toxins11090548>.
- Vaughan M.M., Huffaker A., Schmelz E.A. *et al.*, 2014. Effects of elevated [CO<sub>2</sub>] on maize defence against mycotoxigenic *Fusarium verticillioides*. *Plant Cell and Environment*, 37, 2691-706, <https://doi.org/10.1111/pce.12337>.
- Wang W., Liang X., Li Y. *et al.*, 2023. Genetic Regulation of Mycotoxin Biosynthesis. *Journal of Fungi*, 9, 21, <https://doi.org/10.3390/jof9010021>.

## Principales toxines émergentes de *Fusarium* spp.

Florence Forget, Philippe Pinton, Isabelle Oswald,  
El Hassan Ajandouz et Marc Maresca

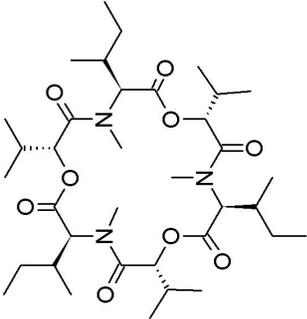
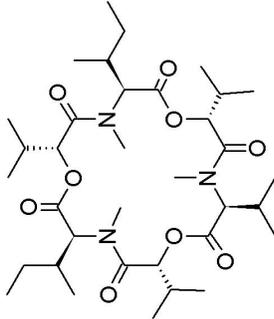
### ►► Introduction

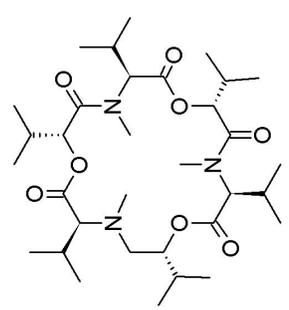
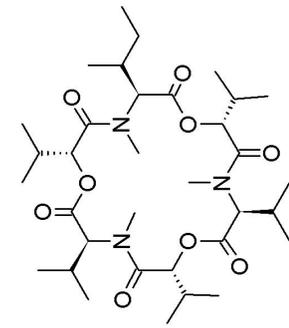
Outre la production de toxines règlementées décrites dans d'autres chapitres de cet ouvrage, les moisissures de type *Fusarium* sont capables de produire de nombreuses autres molécules dont la toxicité n'est pas toujours pleinement évaluée et dont la teneur dans les aliments n'est pas forcément connue, voire encadrée. On qualifie ces toxines d'*émergentes* même si le terme de toxines *non règlementées* peut lui être préféré.

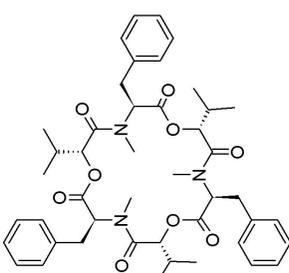
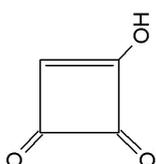
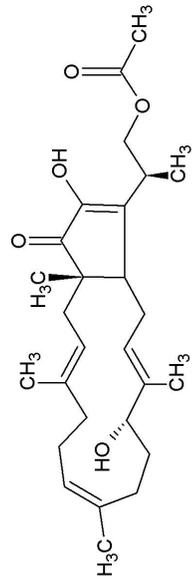
### ►► Enniatines et beauvéricines

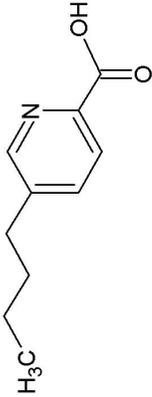
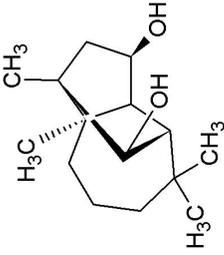
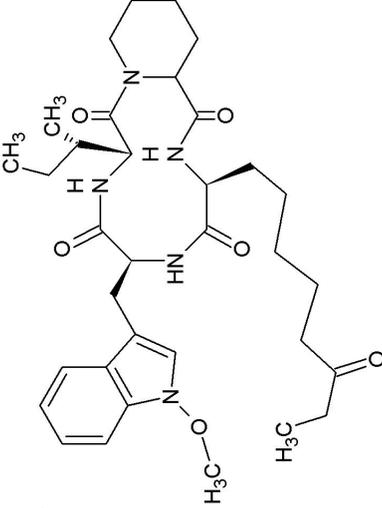
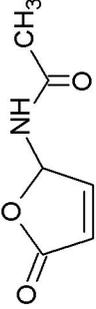
Même si les espèces fongiques du genre *Fusarium* ont la capacité de produire différentes mycotoxines émergentes (tableau 7.1), les plus étudiées et caractérisées sont les enniatines et les beauvéricines. Ce sont également les toxines émergentes de *Fusarium* les plus fréquemment quantifiées dans les denrées alimentaires. Ce sont des hexadepsipeptides cycliques qui comportent trois résidus d'acide D-2-hydroxyisovalérique en alternance avec trois résidus d'acides aminés N-méthylés. Les beauvéricines contiennent trois résidus de N-méthyl-phénylalanines alors que des résidus N-méthyl-valine alternent avec résidus de N-méthyl-isoleucine pour les enniatines (figure 7.1). Au total, 29 enniatines ont été répertoriées à ce jour, les ENN A, A1, B et B1 étant les plus fréquemment rencontrées et étudiées. De même, plusieurs formes de beauvéricines ont été identifiées (Fukuda *et al.*, 2004), la BEA A, communément appelé « BEA », étant la plus étudiée et la mieux caractérisée. La majorité des espèces fongiques productrices de ENN/BEA appartiennent au genre *Fusarium*

**Tableau 7.1.** Mycotoxines émergentes produites par *Fusarium* spp. (non réglementées).

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices (par ordre d'importance)	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées
<b>Enniatines</b>			
Enniatine A	$C_{36}H_{63}N_3O_9$ Peptide non ribosomique (NRPS) 681,9		<p><i>F. avenaceum</i>  <i>F. tricinctum</i>  <i>F. temperatum</i>  <i>F. acuminatum</i>  <i>F. sporotrichioides</i>  <i>F. poae</i></p> <p>Céréales (riz, blé, orge, épeautre, petit épeautre), sorgho, maïs, manioc, aliments pour porcs, ensilage de maïs, lait, farine, aliments pour bébé</p>
Enniatine A1	$C_{35}H_{61}N_3O_9$ Peptide non ribosomique (NRPS) 667,9		<p><i>F. venenatum</i>  <i>F. proliferatum</i>  <i>F. verticillioides</i>  <i>F. subglutinans</i>  <i>F. fujikuroi</i></p>

<p><math>C_{33}H_{57}N_3O_9</math> Peptide non ribosomique (NRPS) 639,8</p>		<p><i>F. avenaceum</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> <i>F. venenatum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. fujikuroi</i></p> <p>Céréales (riz, blé, orge, épeautre, petit épeautre), sorgho, maïs, manioc, aliments pour porcs, ensilage de maïs, lait, farine, aliments pour bébé</p>
<p>Enniatine B</p>		
<p><math>C_{34}H_{59}N_3O_9</math> Peptide non ribosomique (NRPS) 653,8</p>		
<p>Enniatine B1</p>		

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices (par ordre d'importance)	Dénrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées
Beauvericine	$C_{45}H_{57}N_3O_9$ Peptide non ribosomique (NRPS) 783,9 	<i>F. avenaceum</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> <i>F. venenatum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. verticillioïdes</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. fujikuroi</i>	Céréales (blé, orge, riz), manioc, aliments pour porcs, ensilage de maïs, lait
Moniliformine	$C_4H_2O_3$ 98,1 	<i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. verticillioïdes</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. fujikuroi</i> <i>F. nygamai</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. thapsinum</i>	Céréales (blé tendre, blé dur, seigle, avoine), maïs, sorgho, manioc, asperge, pomme, aliments pour porcs, ensilage de maïs, lait
Fusaproliférine	$C_{17}H_{17}C_6O_6$ Terpène (TC) 444,6 	<i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. konzum</i> <i>F. verticillioïdes</i>	Céréales, maïs, aliments pour bétail

Acide fusarique	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> Polycétide (PKS) 179,2		<i>F. oxysporum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. fujikuroi</i> <i>F. crookwellense</i>	Maïs, aliments pour porc
Culmorine	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> Terpène (TC) 238,4		<i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. venetatum</i> <i>F. crookwellense</i>	Céréales (blé, orge, avoine), maïs, aliments pour porcs, ensilage de maïs, lait
Apicidine	C <sub>34</sub> H <sub>49</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> Peptide non ribosomique (NRPS) 623,8		<i>F. fujikuroi</i> <i>F. semitectum</i> <i>F. poae</i>	Céréales, maïs, manioc, aliments pour porcs, ensilage de maïs, lait
Buténolide	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> 141,1		<i>F. tricinctum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. equiseti</i>	Céréales (avoine), maïs, ensilage de maïs, lait

NRPS : peptide synthétase non ribosomique ; PKS : polycétide synthase ; TC : terpène cyclase ; DMATS : diméthylallyl tryptophane synthase.

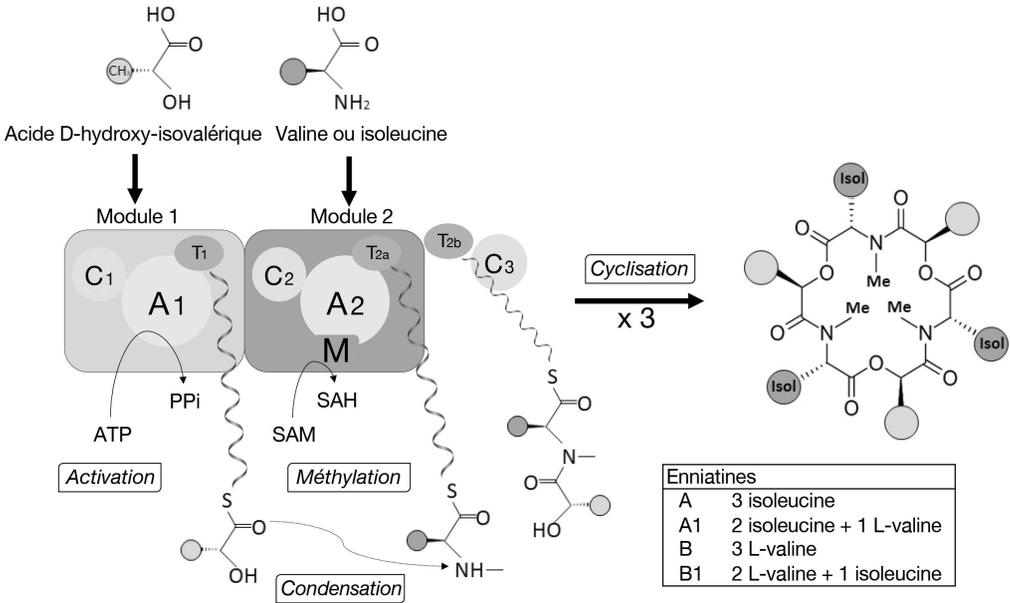
mais aussi à des espèces du genre fongique *Beauveria* (BEA) ou *Verticillium* (ENN). Si plus de 30 espèces de *Fusarium* ont été décrites comme capables de produire des ENN, la contamination des denrées végétales en Europe est principalement liée à *F. avenaceum* et *F. tricinctum* (Gautier *et al.*, 2020). Sur le maïs, un rôle non négligeable est attribué à *F. temperatum* (ENN) et *F. proliferatum* (BEA).

La synthèse des ENN/BEA implique une enzyme modulaire multifonctionnelle de type NRPS (peptide synthétase non ribosomique), appelée ESYN ou BEAS (figure 7.1). La première étape repose sur les domaines catalytiques d'adénylation ( $A_1$  et  $A_2$ ) des modules 1 et 2, et consiste en l'activation des substrats en dérivés acyladénylates. Après une étape de méthylation des résidus d'acides aminés (domaine N-méthyl transférase du module 2), les substrats activés sont liés de façon covalente aux domaines de thiolation ( $T_1$  et  $T_2$ ) de la protéine enzymatique sous forme de thioesters. L'étape suivante est la synthèse des unités intermédiaires dipeptidols (domaines de condensation  $C_1$  et  $C_2$ ) qui sont « stockées » au domaine de thiolation  $T_3$ . La cyclisation de trois unités peptidols (domaine de condensation  $C_3$ ) conduit au hexadécapeptide cyclique. Il est admis que les protéines ESYN des espèces productrices d'ENN peuvent posséder des affinités différentes pour les acides aminés (Pieper *et al.*, 1992) qui sont à l'origine de profils de mycotoxines différents.

La connaissance sur les *clusters* de gènes de biosynthèse des mycotoxines émergentes reste partielle. Pour les ENN/BEA, outre les gènes codant les NRPS, un autre gène codant une kétoisovalérate réductase (synthèse du précurseur acide D-hydroxy-valérique) a été identifié. Un transporteur de type ABC et un facteur de transcription à doigts de zinc ont aussi été décrits par Niehaus *et al.* (2016) pour le *cluster* BEA, leur rôle demandant cependant à être confirmé. La régulation de la production des mycotoxines est sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques (température, activité de l'eau, pH, stress oxydant, sources de nutriments) (Gautier *et al.*, 2020). Les résultats suggèrent que la production d'ENN est possible entre pH 4 et 8, avec de nombreuses sources d'azote et de carbone, les conditions optimales de production étant dépendantes de l'espèce, voire de la souche. Ces études sont cependant limitées à un petit nombre d'isolats et demandent à être complétées. Les mécanismes moléculaires (rôle de facteurs de transcription spécifiques et globaux, transduction des signaux et conformation de la chromatine) restent peu compris. La connaissance actuelle ne permet pas non plus de conclure au rôle physiologique de ces mycotoxines. On peut émettre l'hypothèse qu'elles aient un rôle dans l'adaptation du champignon à des environnements changeants, durant l'infection des matrices végétales, et/ou dans la compétition avec d'autres espèces de micro-organismes.

En ce qui concerne les denrées contaminées, les ENN/BEA contaminent surtout les céréales et les données sur leur occurrence ont surtout été obtenues en Europe. Le quart des 4 251 aliments pour animaux et céréales non transformées analysés en Europe entre 2000 et 2013 contenait des ENN (de 0,95 à 18,3 mg/kg) (Efsa, 2014). Des différences sont observées selon les années ou les céréales, probablement liées aux conditions climatiques.

Ainsi, au Danemark, le maïs récolté entre 2005 et 2006 contenait 2,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'ENN B alors que le seigle récolté entre 2010 et 2011 en contenait 3,9 mg/kg. Des pâtes et aliments pour bébés en Italie contenaient jusqu'à 1,1 mg/kg d'ENN B.



**Figure 7.1.** Structure chimique des ENN et représentation schématique de leur biosynthèse. A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> : domaines d'adénylation ; M : domaine N-méthyl transférase ; T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> : domaines de thiolation ; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> : domaines de condensation.

Les 116 farines et céréales pour petit-déjeuner analysées en Tchèque en 2010 étaient contaminées par au moins une ENN (Efsa, 2014). En Tunisie, le blé, l'orge, le maïs et le sorgho analysés contenaient surtout de l'ENN A1, jusqu'à 480 mg/kg pour le sorgho (Gautier *et al.*, 2020). En Égypte, Mozambique, Burkina Faso et Cameroun, le maïs contenait quelques microgrammes d'ENN par kilogramme, beaucoup moins que ce qui est couramment observé en Europe, certainement en raison de conditions météorologiques défavorables à l'infection par les espèces fongiques productrices d'ENN (Gautier *et al.*, 2020). Jusqu'à 75 % des échantillons de blé analysés en Chine contenaient des ENN (jusqu'à 190 µg/kg) (Ji *et al.*, 2023) et 12 % des herbes médicinales analysées contenaient jusqu'à 355 µg/kg d'ENN A1 (Gautier *et al.*, 2020). Au Canada, plus de 70 % des échantillons de blés contenaient jusqu'à 3,3 mg/kg d'ENN B (Gautier *et al.*, 2020). Jusqu'à 82 % des 1 100 échantillons d'aliments pour porcs provenant de 75 pays contenaient des ENN (moins de 80 µg/kg en moyenne et jusqu'à 1,8 mg/kg pour ENN B1).

Les ENN sont donc présentes partout et dans la majorité des céréales, avec une variation de concentration de plusieurs ordres de grandeur selon les échantillons. Jusqu'à 100 % des céréales analysées en Europe contenaient de la BEA, en général quelques dizaines de microgrammes par kilogramme, mais ponctuellement jusqu'à 6 mg/kg. Certains produits d'alimentation humaine des régions méditerranéennes en contenaient près de 1 mg/kg. Près de 90 % des aliments pour porcs ou poulets analysés en contenaient quelques centaines de microgrammes par kilogramme (Gautier *et al.*, 2020).

En termes de toxicocinétique, la biodisponibilité des ENN/BEA varie globalement de 30 à 80 % et est significativement réduite par la présence dans la matrice alimentaire modèle de fibres alimentaires, de prébiotiques, de probiotiques et de protéines (Manzini *et al.*, 2015). La biodisponibilité orale de l'ENN B1 est de 5 %, 47 % et 91 % respectivement chez le poulet, le rat et le porc, démontrant une forte dépendance à l'espèce étudiée (Gruber-Dorninger *et al.*, 2017). Chez la souris, aussi bien l'ENN B que la BEA sont rapidement absorbées et éliminées, et se distribuent essentiellement dans les tissus gras. Tandis que l'ENN B est transformée par les tissus, la BEA reste essentiellement inchangée.

Récemment, il a été montré que l'ENN B1 et 11 de ses métabolites sont présents dans les urines de 94,3 % des 300 sujets humains recrutés pour l'étude (Rodríguez-Carrasco *et al.*, 2020), la concentration moyenne d'ENN B1 (69 ng/L) représentant à peine 7 % de la somme des concentrations moyennes des métabolites (956 ng/L). Cela démontrerait un métabolisme très efficace chez l'humain. L'absorption intestinale des ENN/BEA semble passive et la glycoprotéine P serait impliquée dans leur reflux vers la lumière intestinale, limitant ainsi leur absorption intestinale (Gruber-Dorninger *et al.*, 2017). La biotransformation des ENN/BEA peut avoir lieu dans le tractus digestif, impliquant ou non le microbiote intestinal. Ainsi, près de 80 % sont dégradés après 4 h d'incubation avec un modèle gastro-intestinal *in vitro* (Pallarés *et al.*, 2020).

Cinq métabolites ayant des masses moléculaires allant de 315 à 655 g/mole ont été détectés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (LC-HRMS) et ils semblent être des produits de mono-oxygénation et d'ouverture du cycle avec libération de modules constitutifs des ENN, l'acide D- $\alpha$ -hydroxyisovalérique et la N-méthyl-valine dans le cas de l'ENN B. Douze métabolites de l'ENN B ont été détectés dans les microsomes provenant du chien, du rat et de l'humain (Ivanova *et al.*, 2011). Les masses moléculaires (de 611 à 669 g/mol) correspondent à des produits de déméthylation, de déshydrogénation et de mono- et dioxygénations. Aucun produit de rupture du cycle, comme dans le tractus digestif, n'a été observé. Le cytochrome P450 3A4 semble clairement impliqué dans la biotransformation de l'ENN B, et dans une moindre mesure CYP1A2 et CYP2C19 (Ivanova *et al.*, 2011).

Il a été proposé que la toxicité des ENN/BEA, de par leur caractère lipophile, repose sur leur action comme ionophore (Prosperini *et al.*, 2017 ; De Felice *et al.*, 2023). Cela conduit à une altération du gradient électrochimique et de l'osmolarité de la cellule, mais aussi à des altérations de l'homéostasie des organites de la cellule (dont les mitochondries), à un stress oxydant et, pour finir, à la lyse de la membrane et à la mort de la cellule. Il semble que les ENN/BEA causent la mort cellulaire par des mécanismes différents en fonction de leurs concentrations. Ainsi, alors qu'aux fortes concentrations les ENN/BEA causent la mort des cellules suite à la perméabilisation et à la destruction de la membrane, à plus faibles concentrations, les ENN/BEA agissent sans lyser la membrane plasmique, mais en perturbant les membranes et le fonctionnement des organites de la cellule (lysosomes, mitochondries), entraînant la mort cellulaire par apoptose.

Il en va de même concernant l'action des ENN sur les micro-organismes (Olleik *et al.*, 2019). Les ENN/BEA à fortes concentrations possèdent une action membranolytique

sur les bactéries, alors qu'à plus faibles concentrations elles agissent en dépolarisant la membrane bactérienne et en inhibant la biosynthèse des macromolécules. De plus, les ENN/BEA affectent différentes protéines cruciales pour les cellules, notamment des enzymes et des transporteurs (De Felice *et al.*, 2023). Les valeurs de doses toxiques d'ENN/BEA déterminées *in vitro* sont en général de l'ordre du micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) (De Felice *et al.*, 2023). Il en est de même pour l'action des ENN/BEA sur les micro-organismes, ce qui suggère qu'elles n'ont pas réellement de sélectivité pour tel ou tel type de cellules ou d'organismes vivants, à l'exception des bactéries Gram négatives qui sont insensibles aux ENN/BEA, du fait de la présence du lipopolysaccharide (Olleik *et al.*, 2019). D'une manière générale, les ENN A et A1 sont classiquement trouvées plus toxiques que les ENN B et B1 (Olleik *et al.*, 2019), en lien avec la présence majoritaire de groupements butyl dans les ENN A et A1 et de groupements propyl dans les ENN B et B1, les groupements butyl étant plus apolaires que les groupements propyl. Il est à noter que les études portant sur des modèles *ex vivo* confirment les données obtenues *in vitro* sur cellules isolées, notamment en termes d'action hépatotoxique des ENN/BEA (Hasuda *et al.*, 2023).

Enfin, d'après De Felice *et al.* (2023), les ENN/BEA sont capables d'action génotoxique à des doses faibles (1,5 à 25  $\mu\text{M}$ ). À ce jour, peu de données sont disponibles concernant l'action des ENN/BEA *in vivo*. L'Efsa a publié une NOAEL (*no-observed-adverse-effect level*) de 244  $\mu\text{g}$  d'ENN B1/kg/jour chez le poulet (Efsa, 2014). De la même manière, il a été montré que l'exposition de rats à un mélange d'ENN A, A1, B et B1 (respectivement 1,19 ; 2,16 ; 1,03 et 1,41 mg/kg) par voie orale n'avait pas d'effet toxique (Escrivá *et al.*, 2015). L'Efsa indique dans son rapport que la  $\text{DL}_{50}$  (dose létale pour 50 % des animaux) du mélange ENN A, A1, B et B1 est supérieure à 350 mg/kg chez la souris par voie orale. D'une manière générale, il semble donc que la faible toxicité des ENN/BEA *in vivo* ne corresponde pas aux données obtenues *in vitro* et *ex vivo*, montrant une toxicité élevée des ENN/BEA sur cellules isolées, certainement en lien avec leur forte dégradation/élimination observée *in vivo*.

## » La moniliformine

La moniliformine (MON) a été détectée principalement dans les céréales telles que le maïs, le blé, l'orge et l'avoine, ainsi que dans des produits céréaliers, mais également dans des asperges et des pommes (jusqu'à 920  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Sa présence varie selon les conditions climatiques, avec des niveaux plus élevés dans le blé de printemps que dans celui d'hiver. Elle contaminerait le maïs des régions froides d'Afrique du Sud (jusqu'à 1,5 mg/kg) et des États-Unis. En Argentine, c'est plutôt du sorgho qui était contaminé (jusqu'à 0,9 mg/kg). Jusqu'à 2 mg/kg ont été mesurés dans des aliments pour volailles et porcs (Radić *et al.*, 2021). Il a été constaté que la MON était présente en même temps que d'autres mycotoxines, en particulier les trichothécènes, les enniatines, la beauvéricine et la zéaralénone.

Les données sur la toxicocinétique de la MON chez les animaux de laboratoire sont limitées, mais elles montrent, chez le rat, une absorption et une sécrétion rapide,

sans accumulation apparente de la forme inchangée dans les tissus. Toutefois, le devenir d'au moins la moitié de la quantité ingérée reste inconnu (Efsa, 2018).

En ce qui concerne la toxicité de la moniliformine, elle est toxique à des doses de l'ordre de 4 à 400  $\mu\text{M}$  *in vitro* et de 1 à 50 mg/kg *in vivo*, selon la voie d'administration et le modèle étudié. La toxicité orale aiguë de la MON est caractérisée par des lésions ultra-structurales du myocarde, une réduction de la contractilité de l'aorte et de l'artère pulmonaire, une diminution de la force contractile du myocarde, une arythmie ventriculaire et une insuffisance cardiaque. La toxicité chronique est aussi caractérisée par une cardiotoxicité, mais également une hématotoxicité, avec une diminution des niveaux d'hématocrite et d'hémoglobine. La MON s'est révélé clastogène *in vitro*, induisant des lésions chromosomiques. Aucune donnée n'a été identifiée pour déterminer si la génotoxicité *in vitro* est causée par un mécanisme direct ou indirect. Aucune donnée n'est disponible sur sa génotoxicité *in vivo* (Efsa, 2018).

Aucune donnée épidémiologique humaine pertinente sur la MON n'a été identifiée, bien que la littérature publiée ait émis l'hypothèse que l'exposition alimentaire à la MON était impliquée dans l'incidence et la prévalence passées de la maladie de Keshan (KD), dans certaines régions de Chine (Liu, 1996).

Au niveau de son mode d'action, la MON agirait en inhibant les enzymes utilisant la thiamine comme cofacteur dans le cycle de Krebs. L'inhibition de ces enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose pourrait conduire à une privation d'énergie cellulaire et expliquer en partie le stress respiratoire, y compris les effets sur le myocarde (Efsa, 2018).

### ►► La fusaproliférine

Des concentrations de fusaproliférine jusqu'à 500 mg/kg ont été mesurées dans du maïs moisi en Italie, 8 mg/kg en Slovaquie et quelques centaines de microgrammes par kilogrammes aux États-Unis ou en Afrique du Sud. La fusaproliférine serait toxique *in vitro* et *in vivo* à des concentrations de 30-100  $\mu\text{M}$  et pourrait posséder en plus des actions tératogène et mutagène.

### ►► L'acide fusarique

Très peu de données d'occurrence existent pour l'acide fusarique. Une revue systématique de la littérature publiée en 2024 par Kolawole *et al.* indique une fréquence de contamination des denrées agricoles proche de 10 %, au niveau mondial. L'acide fusarique possède une toxicité à des doses allant de 0,3  $\mu\text{M}$  sur parasites de type *Acanthamoeba* à 500  $\mu\text{M}$  sur cellules humaines et 100 mg/kg *in vivo* chez la souris. Il serait neurotoxique et potentiellement tératogène, son mécanisme d'action reposant sur une induction du stress oxydant cellulaire.

## » La culmorine

Les niveaux de culmorine et de ses dérivés hydroxylés dans les céréales sont corrélés à ceux du déoxynivalénol (DON). Elle a été détectée dans tous les blés, orge et avoine norvégiens jusqu'à plus de 30 mg/kg. Au niveau mondial, 80 % des aliments pour porc contenaient jusqu'à 157 mg/kg. En termes de toxicité, la culmorine serait peu toxique, avec des doses toxiques *in vitro* supérieures à 80  $\mu\text{M}$  et de 250 - 1 000 mg/kg *in vivo* chez la souris suite à une administration intrapéritonéale, son mécanisme d'action restant inconnu.

## » Le buténolide

Le buténolide, dont la présence est corrélée à celle des trichothécènes (TCT), a été détecté dans des céréales en Norvège (concentration maximale de 3,3 mg/kg dans l'avoine) (Radić *et al.*, 2021). Le buténolide présente une toxicité variable, avec des doses toxiques de 1 à 250  $\mu\text{M}$  *in vitro* et de 30 à 60 mg/kg *in vivo* par voie orale provoquant la mort de bovins, en lien avec son effet pro-oxydant.

## » L'apicidine

Le cluster de gènes de l'apicidine a aussi été identifié chez *F. fujikuroi* (Niehaus *et al.*, 2014). Chez *F. poae*, ce cluster est situé sur un chromosome accessoire (Witte *et al.*, 2021). Jusqu'à 95 % des matières premières destinées aux aliments pour animaux ou des aliments finis pour porcs analysés étaient contaminés par l'apicidine à des concentrations allant jusqu'à 1,5 mg/kg (Khoshal *et al.*, 2019). Les données de toxicologie ont montré que l'apicidine était très toxique, avec des doses toxiques proches ou inférieures à celles des ENN/BEA. Ainsi, lors d'une étude *in vitro* sur des cellules d'intestin de porc, sa toxicité a été trouvée équivalente à celle de l'ENN A1 (de l'ordre de 1,5  $\mu\text{M}$ ) et supérieure à celles des ENN A, B, B1, de la BEA ou du DON (3 à 13  $\mu\text{M}$ ) (Khoshal *et al.*, 2019). L'apicidine agirait, au moins en partie, au travers de son action inhibitrice des histones désacétylases, affectant ainsi à la fois les divisions cellulaires, mais également l'expression des gènes, cette action ayant conduit par ailleurs à proposer l'apicidine dans le traitement des maladies infectieuses parasitaires et des cancers.

## » Conclusion

Il existe des données concernant les toxines émergentes de *Fusarium* même si elles sont parfois incomplètes. C'est dans le cas des ENN/BEA que le plus de données sont disponibles. Bien que les études *in vitro* et *ex vivo* montrent une forte toxicité des ENN/BEA, les tests réalisés *in vivo* n'ont, jusqu'à ce jour, pas pu montrer une telle toxicité. Davantage d'études sont nécessaires afin de s'en assurer et également d'étudier l'interaction des toxines émergentes avec les autres mycotoxines. Des données existantes démontrent déjà qu'elles peuvent interagir de manière additive,

synergique ou antagoniste avec d'autres mycotoxines comme le déoxynivalénol (Khoshal *et al.*, 2019). Il faudrait aussi identifier le risque sanitaire lié à la présence de nombreux métabolites dont le profil toxicologique est quasi inconnu, ces métabolites pouvant être plus toxiques que la molécule parentale.

## ► Références

- De Felice B., Spicer L.J., Caloni F., 2023. Enniatin B1: Emerging Mycotoxin and Emerging Issues. *Toxins*, 15, 383, <https://doi.org/10.3390/toxins15060383>.
- Escrivá L., Font G., Manyes L., 2015. Quantitation of enniatins in biological samples of Wistar rats after oral administration by LC-MS/MS. *Toxicology Mechanism and Methods*, 25, 552.
- Efsa, 2014. Risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *Efsa Journal*, 12, 3802, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3802>.
- Efsa, 2018. Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. *Efsa Journal*, 6, 5082, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5082>.
- Fukuda T., Arai M., Tomoda H., Omura S., 2004. New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, Produced by *Beauveria* sp. FKI-1366. II. Structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, 57, 117, <https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.117>.
- Gautier C., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F., 2020. *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 4788, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00411>.
- Gruber-Dorninger C., Novak B., Nagl V., Berthiller F., 2017. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 7052, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413>.
- Hasuda A.L., Person E., Khoshal A. *et al.*, 2023. Emerging mycotoxins induce hepatotoxicity in pigs' precision-cut liver slices and HepG2 cells. *Toxicol*, 231, 107195, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2023.107195>.
- Ivanova L., Faeste C.K., Uhlig S., 2011. *In vitro* phase I metabolism of the depsipeptide enniatin B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 2889, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4964-9>.
- Ji X., Jin C., Xiao Y. *et al.*, 2023. Natural Occurrence of Regulated and Emerging Mycotoxins in Wheat Grains and Assessment of the Risks from Dietary Mycotoxins Exposure in China. *Toxins*, 15, 389, <https://doi.org/10.3390/toxins15060389>.
- Khoshal A.K., Novak B., Martin P.G.P., Jenkins T., Neves M., Schatzmayr G., Oswald I.P., Pinton P., 2019. Co-occurrence of DON and emerging mycotoxins in worldwide finished pig feed and their combined toxicity in intestinal cells. *Toxins*, 11, 727, <https://doi.org/10.3390/toxins11120727>.
- Kolawole O., Siri-anusornsak W., Petchkongkaew A. *et al.*, 2024. A systematic review of global occurrence of emerging mycotoxins in crops and animal feeds, and their toxicity in livestock. *Emerging Contaminants*, 10, 100305, <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100305>.
- Liu X., 1996. Studies on Moniliformin and the etiology of Keshan disease. *Journal of Hygiene Research*, 25, 151-156.
- Manzini M., Rodriguez-Estrada M.T., Meca G., Mañes J., 2015. Reduction of beauvericin and enniatins bioaccessibility by prebiotic compounds, evaluated in static and dynamic simulated gastrointestinal digestion. *Food Control*, 47, 203, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.016>.
- Niehaus E.M., Janevska S., von Barga K.W. *et al.*, 2014. Apicidin F: characterization and genetic manipulation of a new secondary metabolite gene cluster in the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One*, 9, e103336, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103336>.
- Niehaus E., Studt L., Von Barga K. *et al.*, 2016. Sound of silence: the beauvericin cluster in *Fusarium fujikuroi* is controlled by cluster-specific and global regulators mediated by H3K27 modification. *Environmental Microbiology*, 18, 4282, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13576>.

- Olleik H., Nicoletti C., Lafond M. *et al.*, 2019. Comparative Structure-Activity Analysis of the Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of the Fungal Cyclohexadepsipeptides Enniatins and Beauvericin. *Toxins*, 11, 514, <https://doi.org/10.3390/toxins11090514>.
- Pallarés N., Righetti L., Generotti S. *et al.*, 2020. Investigating the *in vitro* catabolic fate of Enniatin B in a human gastrointestinal and colonic model. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111166, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111166>.
- Pieper R., Kleinkauf H., Zocher R., 1992. Enniatin synthetases from different fusaria exhibiting distinct amino acid specificities. *The Journal of Antibiotics*, 45, 1273, <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1273>.
- Prosperini A., Berrada H., Ruiz M.J. *et al.*, 2017. A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Frontiers in Public Health*, 5, 304, <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00304>.
- Radić B., Kos J., Janić Hajnal E. *et al.*, 2021. *Fusarium* metabolites in maize from regions of Northern Serbia in 2016-2017. *Food Additives and Contaminants, Part B, Surveill.*, 14, 295, <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1961877>.
- Rodríguez-Carrasco Y., Narváez A., Izzo L., Gaspari A., Graziani G., Ritieni A., 2020. Biomonitoring of Enniatin B1 and Its Phase I Metabolites in Human Urine: First Large-Scale Study. *Toxins*, 12, 415, <https://doi.org/10.3390/toxins12060415>.
- Witte T.E., Harris L.J., Nguyen H.D.T. *et al.*, 2021. Apicidin biosynthesis is linked to accessory chromosomes in *Fusarium poae* isolates. *BMC Genomics*, 22, 591, <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07617-y>.

## Les alcaloïdes de l'ergot

Nathalie Arnich, Béatrice Orlando et Olivier Puel

### ►► Introduction

L'ergot est une maladie des plantes causée par des champignons du genre *Claviceps*. Ces champignons s'installent au stade de la floraison sur les ovaires de la plupart des graminées et se développent sur les épis, formant, tout en remplaçant le grain, une structure de résistance, le sclérote (figure 8.1). Cette structure fongique, constituée essentiellement de mycélium, également appelée ergot, contient des alcaloïdes toxiques, dont certains sont règlementés dans les aliments en Europe depuis 2022.

Il s'agit très probablement de l'intoxication fongique la plus importante dont l'Histoire ait conservé la mémoire : elle était connue au Moyen Âge comme le mal des ardents ou le feu de Saint-Antoine, suite à l'utilisation de seigle contaminé pour préparer le pain.



**Figure 8.1.** Un épi contaminé par *Claviceps*. © Arvalis.

## ► Structures chimiques

Les alcaloïdes de l'ergot (AE) sont un groupe de métabolites fongiques toxiques (myco-toxines) produits par *Claviceps* spp. dans les sclérotés. D'un point de vue structurel, les AE sont étroitement liés aux amines biogènes telles que la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine. Les AE se caractérisent par la structure hétérocyclique de l'ergoline, base de tous les autres AE. Cette structure est composée de quatre hétérocycles fusionnés dans lesquels la position N6 porte un méthyle, avec une double liaison en C8,9 ou en C9,10. La substitution en C8 donne lieu à la gamme d'alcaloïdes naturels (figure 8.2). Les AE les plus préoccupant en termes de santé publique et retenus pour l'évaluation des risques au niveau européen (Efsa, 2012) et international (Jecfa, 2022) sont les 12 suivants : ergométrine (ergonovine), ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocryptine (mélange d'isomères  $\alpha$  et  $\beta$ ), ergocornine, et les formes (S)-inine correspondantes.

En fonction de leur structure chimique, les AE sont généralement classés en trois catégories : les alcaloïdes de type clavine (ergoclavines) qui partagent comme structure de base celle de la chanoclavine I ; les ergoamides, dont l'acide D-lysergique amide (ergine) et l'ergométrine (ergonovine) qui sont les dérivés les plus simples de l'acide D-lysergique ; les ergopeptines, dérivés peptidiques complexes de l'acide D-lysergique, qui constituent la classe la plus importante et la plus diversifiée des alcaloïdes de l'ergot (Chen *et al.*, 2017).

Les 12 alcaloïdes de l'ergot généralement retenus par les agences sanitaires ne sont donc qu'une partie des métabolites fongiques toxiques produits par les *Claviceps*.

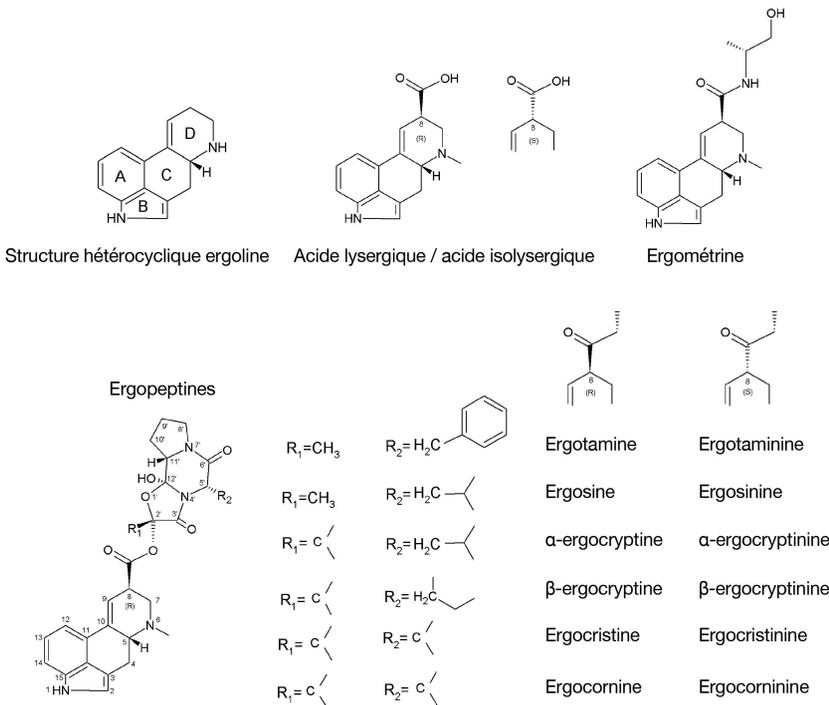


Figure 8.2. Structures chimiques de l'acide lysergique et de certains alcaloïdes de l'ergot du seigle.

## ► Espèces productrices

Les ergots ou sclérotés sont formés par des espèces du genre *Claviceps*. Toutefois, sur les 40 espèces du genre connues à ce jour, la principale source d'alcaloïdes dans l'alimentation humaine et animale est *C. purpurea*.

*C. purpurea* est ubiquiste et il est connu depuis très longtemps pour contaminer les graminées céréalières : seigle principalement, mais aussi triticale, blé, orge et avoine. Bien qu'il soit reconnu que *C. purpurea* infeste également de nombreuses espèces de graminées sauvages, fourragères et gazons cultivés en France (ray-grass, fétuque, dactyle, fléole...), son incidence sur ces végétaux a été beaucoup moins étudiée.

Les sclérotés constituent la forme de dormance du champignon ; ils sont formés d'un corps dur issu du mycélium. Leur capacité à survivre aux conditions hivernales leur permet d'initier leur cycle de reproduction au printemps suivant (figure 8.3).

L'enveloppe protectrice des sclérotés est dure et de couleur brun-noir violacé, et l'intérieur varie du blanc au gris. Les sclérotés ont souvent une forme allongée et dépassent des glumes dans les épis approchant le stade de maturité. Les épis peuvent en contenir plusieurs. La taille des sclérotés peut être jusqu'à 10 fois plus grande que celle des grains qu'ils remplacent : ils sont facilement repérables dans le grain non nettoyé (Afssa, 2008). Mais ils peuvent également mimer sans excès la taille du grain qu'ils remplacent et sont alors plus difficiles à détecter (Orlando *et al.*, 2014).

Bien que la quantité d'alcaloïdes présents varie d'un sclérote à l'autre, en moyenne il existe une corrélation positive entre la teneur en ergot sur un épi et la concentration en alcaloïdes : elle explique 75 % de la variabilité de la teneur en alcaloïdes. Cette corrélation est indépendante de l'année de récolte et de la plante hôte (Orlando *et al.*, 2017).

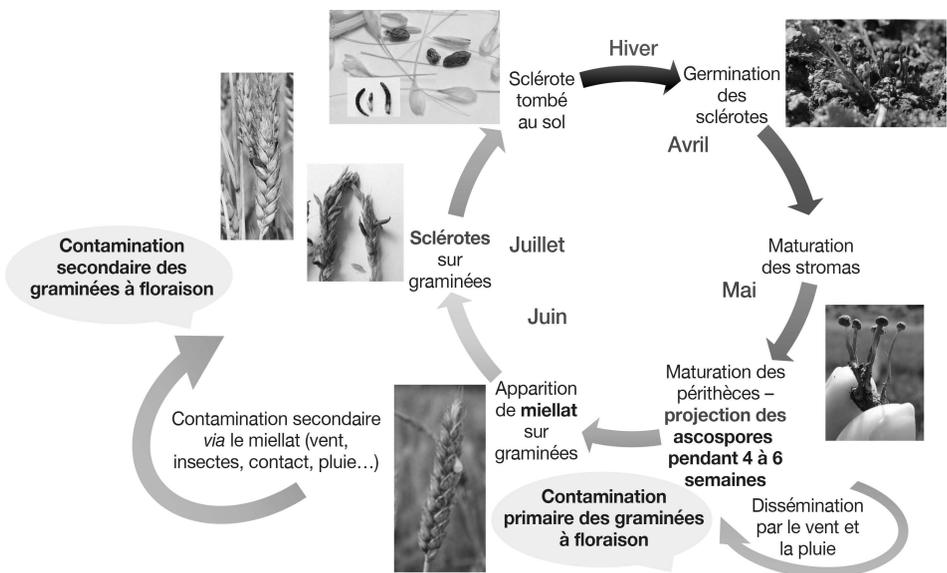


Figure 8.3. Cycle biologique de *Claviceps purpurea*. © Arvalis, 2023.

## ► Biosynthèse

Les AE dérivent soit de l'acide lysergique (ergométrine, ergotamine, ergocristine, ergocornine, alpha-ergocryptine, ergosine), soit de l'acide isolysergique (ergocristinine, ergométrinine...), ou, dans une moindre mesure, de la diméthyl-ergoline (clavines). Le LSD (diméthylamide de l'acide lysergique) est un dérivé synthétique de l'acide lysergique. La structure des ergopeptines peut être divisée en deux parties : la partie ergoline d'un côté, similaire aux autres catégories, et la partie peptidique de l'autre (l'ergopeptide) (Chen *et al.*, 2017).

Le précurseur de base de l'ergoline issu du métabolisme primaire du champignon est le tryptophane, avec comme première étape de la voie de biosynthèse le transfert d'un groupement prényle sur le carbone 4 du noyau aromatique du tryptophane sous l'action d'une diméthylallyltryptophane synthase. Ensuite, la biosynthèse de la partie ergoline est commune entre les trois catégories d'alcaloïdes, avec comme dernier précurseur pivot le chanoclavine I aldéhyde. Chez *C. purpurea*, celui-ci est converti en agroclavine, qui est oxydée en acide lysergique sous l'action d'une mono-oxygénase à cytochrome P450. La synthèse de la partie peptidique requiert l'action de deux NRPS (peptide synthétases non ribosomiques) : une qui sera responsable de la formation de l'ergopeptide et l'autre de l'activation de l'acide lysergique et du transfert de l'ergopeptide. Le peptide ainsi formé par la première NRPS sera finalement cyclisé par une autre mono-oxygénase à cytochrome P450.

Comme pour la quasi-totalité des mycotoxines, les enzymes impliquées dans la synthèse des AE sont codées par des gènes regroupés au sein d'un même *cluster*. Chez *C. purpurea*, celui-ci contient 14 gènes sur une étendue de 68,5 kilobases (Haarmann *et al.*, 2005).

## ► Principaux aliments contaminés et occurrence

*Claviceps purpurea* est un champignon qui affecte les graminées cultivées ou adventices, sans spécificité d'hôte. Toute céréale à paille peut être contaminée, mais, comme nous l'avons vu, les graminées sauvages ou fourragères sont également concernées : vulpin, ray-grass, fétuque, dactyle, fléole... (Jacquin *et al.*, 2010).

Arvalis (2023) a étudié l'occurrence de l'ergot en France à la récolte dans les céréales. Les données issues de cette étude sont le reflet de l'état sanitaire à la récolte « sortie de champ ». Elles n'intègrent donc pas le travail de nettoyage des organismes de collecte réalisé avant commercialisation et ne sont pas le reflet de la collecte française mise sur le marché en vue d'une première transformation (tableau 8.1).

Ces travaux montrent la présence de l'ergot sur l'ensemble du territoire et objectivent les différences de sensibilité entre espèces : seigle > triticale > blé dur, blé tendre, orge, avoine. Ils mettent également en évidence une variabilité interannuelle importante liée au climat. Celui-ci influe d'une part sur la biologie du champignon, et d'autre part sur la plante hôte, la rendant plus ou moins sensible aux contaminations potentielles (voir chapitre 15).

**Tableau 8.1.** Incidence pluriannuelle de l'ergot en France dans 4 901 champs à la récolte, entre 2012 et 2022. D'après les données d'Arvalis, 2023.

Culture	Nombre de parcelles	Incidence pluriannuelle	Incidence minimale	Incidence maximale
Blé dur	1 111	28 %	8 %	56 %
Blé tendre	2 557	21 %	5 %	59 %
Orge	639	25 %	8 %	38 %
Triticale	272	40 %	13 %	63 %
Avoine	68	19 %	9 %	29 %
Seigle	254	74 %	58 %	90 %

La composition en AE totaux a été étudiée en France dans 517 échantillons de céréales (Orlando *et al.*, 2017) : les principaux alcaloïdes (ou leurs épimères) exprimés en équivalent pour un gramme de sclérote sont l'ergotamine (29,2 %), suivie de l'ergosine (26,3 %), l'ergocristine (18,5 %), l'ergométrine (9,8 %), l'ergo-cryptine (8,2 %) et l'ergocornine (7,9 %). Les isomères -ine représentaient 70,5 %, les isomères -inine représentant les 29,5 % restants. La teneur totale moyenne en alcaloïdes des sclérotés de *C. purpurea* était de 3 103  $\mu\text{g/g}$ .

En France, les AE ne font pas partie des mycotoxines recherchées dans le cadre des études de l'alimentation totale réalisées par l'Anses. Il n'est donc pas possible de connaître les principaux aliments contaminés ni le niveau d'exposition alimentaire de la population française.

Au niveau européen, l'Efsa (2012) a examiné 20 558 résultats analytiques pour les AE provenant de 14 pays collectés entre 2004 et 2011, issus de 1 716 échantillons alimentaires pour l'humain, 496 échantillons d'aliments pour animaux et 67 échantillons de céréales brutes. Les résultats portaient sur un nombre d'AE variant de 1 à 12. Près de 60 % des échantillons alimentaires pour l'humain et plus de 75 % des échantillons alimentaires pour les animaux étaient inférieurs aux limites de détection et de quantification (dont les valeurs présentaient une grande variabilité).

Concernant les échantillons en alimentation humaine, la plupart correspondaient à des aliments non transformés ou peu transformés (principalement des produits de meunerie des céréales), avec seulement environ 250 échantillons d'aliments transformés. Les données relatives aux aliments pour animaux étaient très limitées, l'accent étant mis principalement sur le seigle et ses dérivés (253 échantillons), et sur le blé et les sous-produits du blé (161 échantillons).

Les données relatives à la présence d'AE dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux soumis à l'Efsa montrent que l'ergotamine, l'ergocristine, l'ergosine et l'ergocornine sont généralement plus abondantes que l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -ergocryptine et l'ergométrine.

Les concentrations les plus élevées d'AE ont été rapportées pour les grains de seigle, les produits de mouture du seigle et les sous-produits du seigle.

Au cours de la transformation, en particulier de la cuisson, la quantité totale d'AE diminue et le rapport entre les formes épimériques se déplace en général vers les

formes -inine. Les processus de broyage entraînent une redistribution des particules de sclérotés dans les différentes fractions de mouture. Pour les produits constitués principalement de grains entiers et consommés en tant que tels, les effets de distribution et de dilution dus à la mouture et à d'autres étapes de la transformation des grains ne s'appliquent pas.

Sur la base des concentrations moyennes pour la somme d'au moins 6 AE, les aliments les plus contaminés sont les grains de seigle (183  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), les produits de meunerie de seigle (155  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), les pains de seigle (45  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), les grains autres que le seigle (43  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), les produits de meunerie du blé (39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Au niveau international, dans le cadre des travaux récents du Jecfa (2022 et 2023), la base de données sur les contaminants alimentaires (*Global Environment Monitoring System [GEMS] / Food contaminants database*)<sup>2</sup> a permis d'identifier 178 184 résultats d'analyse d'AE réalisés entre 2004 et 2019 provenant de quatre régions du monde : région africaine (Bénin, Cameroun, Mali et Nigeria), région européenne, région des Amériques (Canada) et région du Pacifique occidental (Chine, Hong Kong SAR, Nouvelle-Zélande et Singapour).

La plupart des résultats analytiques ont été fournis par la région européenne (83,8 %), suivie de la région des Amériques (13,6 %), la région africaine (1,4 %) et la région du Pacifique occidental (1,2 %), et concernaient la recherche des 12 AE d'intérêt (voir plus haut, dans ce même chapitre, à « Structures chimiques »).

Pour 11 AE, les niveaux les plus élevés ont été observés dans des échantillons d'aliments provenant de la région européenne : ergocristine (9 279  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocristinine (3 538  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocornine (619  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocorninine (396  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocornine (619  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocorninine (396  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocryptine (661  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergocryptinine (1 007  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergosine (1 287  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergosinine (1 066  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergométrine (760  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ergométrinine (234  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) et ergotaminine (339  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Pour l'ergotamine (le 12<sup>e</sup> AE), le niveau le plus élevé (3 343  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a été observé dans des échantillons d'aliments de la région des Amériques.

Dans toutes les régions, une contamination (10,2 à 32,7 % d'échantillons positifs) a été observée dans les céréales et les produits à base de céréales. Le niveau de contamination (en AE totaux) était plus élevé dans la région européenne (moyenne en hypothèse haute<sup>3</sup> de 89,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) et dans la région des Amériques (moyenne en hypothèse haute de 40,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) que dans la région du Pacifique occidental (moyenne en hypothèse haute de 9,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou dans la région africaine (moyenne en hypothèse haute de 7,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Dans la région européenne et la région du Pacifique occidental, la contamination (8,6 à 10 % d'échantillons positifs) a également été observée dans les légumineuses, à des niveaux plus faibles que dans les céréales et les produits céréaliers (moyenne en hypothèse haute de 11,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  et de 2,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Les niveaux les plus élevés d'AE totaux ont été observés dans le seigle (13 783  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) et les produits à base de blé (5 649  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) provenant de la région européenne.

2. <https://www.who.int/teams/nutrition-and-food-safety/databases/global-environment-monitoring-system-food-contamination>.

3. Tous les résultats inférieurs à la limite de détection (LD) ont été remplacés par la valeur de la LD, tous les résultats inférieurs à la limite de quantification (LQ) ont été remplacés par la valeur de la LQ.

Les données très limitées sur la distribution tissulaire et les concentrations résiduelles dans les produits d'origine animale, tels que la viande de porc, le lait et les œufs, ne semblent pas indiquer de transfert des AE depuis l'alimentation animale vers les denrées alimentaires pour l'humain (Efsa, 2012).

Le Jecfa recommande d'acquérir davantage de données sur l'occurrence des AE (au moins pour les 12 AE d'intérêt) dans le blé et les produits à base de blé, ainsi que dans le seigle et les produits à base de seigle.

### ► Devenir des alcaloïdes et métabolisme

Concernant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion, très peu de données sont disponibles avec les AE naturels, la plupart des informations reposant sur l'ergotamine et l'ergométrine. Après administration orale d'ergotamine radiomarquée, l'absorption a été estimée à 40 % chez le rat et à 10 % chez le singe rhésus. L'ergotamine est ensuite excrétée principalement dans la bile (33 et 24 % respectivement chez le rat et le singe), tandis que seule une petite quantité (9 et 7 %, respectivement) est présente dans l'urine (Efsa, 2012 ; Eckert *et al.*, 1978). Après une administration expérimentale par voie intraveineuse à des rates gravides, l'ergotamine radiomarquée a pu être détectée dans l'utérus, le placenta et le sac vitellin, avec de petites quantités dans le liquide amniotique et les tissus foetaux. Le passage transplacentaire de l'ergotamine a été estimé à environ 2,8 % (Leist et Grauwiler, 1973 ; Jecfa, 2023). Chez l'humain, l'excrétion urinaire de divers AE radiomarqués, y compris certains dihydrodérivés, est faible (de 1 à 5 %). Aucune excrétion d'AE dans le lait de vache n'a été détectée après consommation d'aliments contaminés par l'ergot de seigle (Efsa, 2012).

On ne dispose que de peu d'informations sur la voie métabolique des AE, que ce soit chez l'humain ou chez les animaux de laboratoire. Le métabolisme de l'ergotamine implique le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). Les hydroxylations en position 8' et dans une moindre mesure en 9' ont été identifiées comme les principales réactions de métabolisation chez différentes espèces (Homme, singe, rat, bovin), contrairement au cheval qui hydroxyle les AE en positions 13 et 14. Dans tous les cas, des formes mono- et/ou di-hydroxylées ont été observées. Il a été montré que le métabolite 8'-OH-dihydroergotamine avait une affinité pour les récepteurs monoaminergiques et une activité vasoconstrictrice similaires à celles de son parent, la dihydroergotamine (Jecfa, 2022 et 2023).

### ► Toxicité

#### Pour l'humain

Au Moyen Âge, l'intoxication par les AE était désignée par des termes tels que mal des ardents, feu sacré, feu de Saint-André, feu de Saint-Marcel, feu de Saint-Antoine, feu d'Enfer. Les malades étaient décrits comme sentant leurs entrailles dévorées par l'ardeur du feu sacré, avec des membres noircis comme du charbon

qui, s'ils ne conduisaient pas à la mort, laissaient les survivants mutilés avec des pieds et des mains gangrenés. Beaucoup souffraient d'une contraction des membres qui les déformait. Cette description qui, avec des variantes, dura plusieurs siècles, illustre les deux formes de cette maladie : l'ergotisme gangreneux et l'ergotisme convulsif. Les malades étaient aussi victimes d'hallucinations, qui étaient à cette époque associées à de la sorcellerie ou aux démons.

En raison de leurs propriétés vasoconstrictives, certains alcaloïdes de l'ergot sont utilisés en médecine humaine. C'est le cas de l'ergotamine et de l'ergométrine, qui sont prescrites respectivement pour le traitement des migraines et des pertes de sang post-partum. Aux doses thérapeutiques (1-2 mg de tartrate d'ergotamine ; 0,2 mg de maléate d'ergométrine), les effets secondaires comprennent nausées, vomissements, faiblesse, douleurs musculaires dans les extrémités, engourdissements et picotements dans les doigts et les orteils. En cas de surdosages, des effets cardiovasculaires, de la gangrène, de la confusion et des convulsions ont été signalés (Jecfa, 2023).

## Pour les animaux de laboratoire

Les valeurs de la dose létale médiane ( $DL_{50}$ ) par voie orale sont disponibles pour certains des AE naturels, à savoir l'ergométrine, l'ergotamine et l'ergostine (Griffith *et al.*, 1978). Ces valeurs varient de 460 à 3 200 mg/kg p.c. pour les souris, les rats et les lapins, à l'exception de l'ergométrine chez les lapins (27,8 mg/kg p.c.). D'après les valeurs de  $DL_{50}$  orales disponibles, l'ergométrine est le plus toxique des AE d'origine naturelle.

Les signes cliniques d'une intoxication sublétales aiguë sont liés à la neurotoxicité et incluent l'agitation, le myosis ou la mydriase, la faiblesse musculaire, les tremblements et la rigidité. Une gangrène de la queue a été observée chez des rats 5 à 7 jours après une exposition intrapéritonéale unique à un mélange d'AE (ergocorinine,  $\alpha$ - et  $\beta$ -ergocryptine et ergocristine) à 25 mg/kg p.c.

Chez des rats ayant reçu des aliments contaminés avec des teneurs croissantes de tartrate d'ergotamine, une diminution significative du poids corporel quel que soit le genre a été observée, accompagnée d'une augmentation du poids relatif de certains organes (cœur, cerveau et foie) chez les femelles. De même, cette exposition a entraîné, chez tous les animaux testés, une rougeur de l'extrémité de la queue qui a évolué, dans certains cas, vers une nécrose de l'extrémité de la queue (Efsa, 2012 ; Speijers *et al.*, 1992).

L'exposition au maléate d'ergométrine jusqu'à 250 mg/kg n'a pas affecté l'extrémité de la queue. Les effets rapportés concernaient une baisse du taux de T4, une augmentation du poids relatif du cœur, du foie et des ovaires, une hyperplasie modérée dans les ganglions lymphatiques médiastinaux et des modifications histologiques du foie (Peters-Volleberg *et al.*, 1996).

Concernant l' $\alpha$ -ergocryptine, chez les rats recevant des concentrations supérieures à 4 mg/kg d'alimentation, des changements significatifs ont été observés pour certains paramètres hématologiques, des activités enzymatiques, de la concentration d'urée sérique, et de la filtration glomérulaire. La prolactine a diminué chez les rats des deux sexes ayant reçu 20, 100 et 500 mg/kg. Des changements ne dépendant pas de la dose

administrée (en forme de U) ont été observés pour certains paramètres, ce qui pourrait être lié à la relation dose-réponse en forme de U pour la prise alimentaire, en raison des propriétés dopaminergiques de l' $\alpha$ -ergocryptine. L'examen microscopique à l'autopsie a révélé des résultats liés au traitement au niveau des reins (néphrose), du foie (atrophie, stockage de glycogène), du thymus (atrophie), de la queue (dégénérescence musculaire), des ovaires (atrophie) et de l'utérus (atrophie). La dégénérescence musculaire de la queue pourrait être due aux propriétés vasoconstrictrices de l'ergocryptine. L'ergocryptine a influencé le métabolisme des glucides et a affecté les fonctions thyroïdiennes et hypophysaires (Janssen *et al.*, 1998, 2000a et b).

Sur la base de ces études chez le rat, le Jecfa (2022) a conclu qu'il n'y avait pas de différence majeure dans la toxicité subaiguë de l'ergotamine, de l'ergométrine et de l' $\alpha$ -ergocryptine. L'effet le plus important de l'ergotamine et de l'ergocryptine est la vasoconstriction, tandis que l'effet le plus important de l'ergométrine est la contraction des muscles lisses.

## Pour le porc

Des porcelets sevrés ont été exposés à de la nourriture contaminée par des sclérotés. L'alcaloïde le plus abondant dans les sclérotés était l'ergotamine, suivi de l'ergosine, de l'ergocristine et de leurs épimères -inines correspondants. La consommation alimentaire quotidienne d'aliments des animaux exposés à la dose la plus élevée (2,5 g de sclérotés par kilogramme d'aliments) a été réduite d'environ 18 % par rapport à celle du groupe témoin. Cette réduction de l'ingestion d'aliments a été associée à une diminution du gain de poids des animaux. L'exposition à l'ergot a entraîné des lésions légères à modérées du foie et du jéjunum des porcelets (Maruo *et al.*, 2018).

Une autre expérimentation du même type, basée sur l'ajout de sclérotés dans l'alimentation de porcelets sevrés, a aussi montré une baisse du gain de poids de 82 % (au bout d'une semaine) et 38 % (après 2 semaines) chez les animaux traités comparés aux animaux témoins, due à une réduction de la consommation quotidienne d'aliments et de l'efficacité alimentaire. L'alcaloïde le plus abondant dans les sclérotés était l'ergocristine, suivi de l'ergotamine, de l'ergosine, de l'ergocryptine et de l'ergocornine. Les AE ont entraîné une baisse significative de la prolactine sérique mesurée dans les échantillons prélevés au 28<sup>e</sup> jour chez tous les groupes traités, sans pour autant qu'une relation dose-réponse dans la réduction du taux de prolactine ait été constatée (Oresanya *et al.*, 2003).

Toujours chez le porcelet sevré, des sclérotés d'ergot d'orge ont été ajoutés à l'alimentation pendant 50 jours. Les sclérotés contenaient principalement de l'ergocristine, suivie de l'ergotamine, de l'ergocristinine, de l'ergocryptine, de l'ergométrine, de l'ergosine et de l'ergocornine. Les porcelets nourris avec la plus forte concentration d'ergot (1,8 g/kg d'aliment) étaient moins efficaces dans la conversion des aliments en gain de poids, et les animaux recevant des alcaloïdes de l'ergot se sont révélés beaucoup plus excitables et difficiles à maîtriser que les animaux témoins après 3 semaines d'alimentation contenant des sclérotés. Aucun autre signe clinique n'a été observé.

Des changements histopathologiques ont été observés dans le foie, les reins et la rate. La gravité de ces changements était liée à la concentration d'ergot dans l'alimentation (Digneau *et al.*, 1986).

Une seule étude a été réalisée avec une durée d'exposition de 13 semaines, chez des rats mâles et femelles exposés au tartrate d'ergotamine dans l'alimentation. Par rapport aux témoins, la prise de poids et la consommation d'aliments ont diminué de manière significative chez les seules femelles nourries à la concentration élevée de 80 mg/kg d'aliment. L'unique effet histopathologique lié au traitement a été une atrophie musculaire de la queue des animaux des groupes ayant reçu la concentration la plus élevée. L'atrophie consistait en une disparition partielle ou totale des fibres, en des changements tinctoriaux et de la fibrose. De plus, des changements dégénératifs des nerfs ont été observés (Speijers *et al.*, 1993).

Le Jecfa (2022) a conclu que les AE d'origine naturelle ne présentaient pas de préoccupation quant à leur potentiel génotoxique.

Chez l'animal, les AE ont des effets sur l'ovulation, l'implantation, le début de la gestation et le développement embryonnaire et fœtal, entraînant des avortements, une mortalité néonatale élevée, des malformations fœtales et des retards de croissance (Jecfa, 2022). Les effets varient en fonction de l'AE considéré. Le Jecfa a noté que les effets sur l'implantation et le maintien de la gestation chez les rongeurs sont dus à une réduction de la sécrétion de prolactine, ce qui n'est pas pertinent pour les humains à ce stade de la grossesse.

Les AE inhibent la sécrétion de prolactine et altèrent la lactation chez les rongeurs et les humains.

## Pour les autres espèces d'élevage

Les AE ont des effets négatifs sur la croissance (diminution de la consommation d'aliments et de la prise de poids) et les performances reproductives des animaux d'élevage (diminution des niveaux de prolactine, baisse de la conception et du poids à la naissance, et chez les mâles, réduction du potentiel de fécondation), notamment chez les bovins, les chevaux, les porcs et les moutons (revue par Klotz, 2015). L'ergotisme gangreneux est l'une des manifestations les plus aigües et les plus évidentes de la maladie, liée à une vasoconstriction des artères et des veines.

La consommation d'AE réduit le rendement de la production de lait chez les bovins, les chevaux et les moutons. Poole et Poole (2019) ont mené une revue des effets des AE sur la reproduction des femelles, chez les espèces d'animaux d'élevage en pâturage. Les effets rapportés comprennent la modification du cycle, la suppression de la sécrétion d'hormones, la réduction des taux de gestation, la perte embryonnaire précoce, l'agalactie et la réduction du poids à la naissance de la progéniture. Chez les bovins, la réduction des taux de gestation peut être attribuée à l'altération du développement des follicules ovariens, à un dysfonctionnement lutéal et à des concentrations réduites d'hormones stéroïdiennes circulantes.

## Mode d'action

Les mécanismes pharmacologiques associés à la toxicité des AE sont complexes et n'ont pas été entièrement élucidés à ce jour (Jecfa, 2022 et 2023). Ils comprennent la vasoconstriction périphérique, le blocage adrénérgique périphérique, la réduction de la sécrétion de prolactine et la stimulation du muscle lisse utérin, la réduction de l'appétit.

Les AE sont structurellement proches des amines biogènes telles que la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine. Cette similarité structurelle permet aux AE d'interagir avec les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG ; par exemple, les récepteurs dopaminergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques), en tant qu'agonistes et/ou antagonistes. L'affinité et la sélectivité des récepteurs, ainsi que l'activité intrinsèque (efficacité) des AE, dépendent des substitués présents en positions 1, 6, 8 et 10 de la partie de la fraction d'acide lysergique. En outre, l'interaction spécifique entre les AE et les récepteurs monoaminergiques semble spécifique de l'organe.

Les effets vasculaires des AE sont connus depuis des siècles. L'apparition de la gangrène chez diverses espèces animales est étroitement liée à leur potentiel vasoconstricteur (Griffith *et al.*, 1978).

## Caractérisation du danger

Le Jecfa (2022 et 2023) a identifié l'effet pharmacologique du maléate d'ergométrine sur l'utérus (provoquant des contractions utérines chez la femme à la fin de la grossesse et dans le post-partum) comme l'effet critique pour l'évaluation des AE dans l'alimentation.

Il a établi une dose de référence aiguë (ARfD ou *acute reference dose*) sur la base des éléments suivants :

1. La dose thérapeutique orale la plus faible de 0,2 mg de maléate d'ergométrine (équivalente à 2,5 µg/kg p.c., exprimée en ergométrine) est considérée comme un niveau d'effet pharmacologique chez les individus les plus sensibles, c'est-à-dire ceux chez qui l'absorption est la plus élevée ;
2. Parmi les AE utilisés comme médicaments, l'ergométrine est celui ayant l'activité la plus élevée sur les contractions utérines.

Un facteur d'incertitude de 2 a été appliqué pour extrapoler cette dose avec un effet pharmacologique (réversible de courte durée) vers un niveau de dose sans effet, puis un facteur de 3,16 pour la variation interindividuelle, conduisant à une ARfD de 0,4 µg d'ergométrine par kilogramme p.c. Cette valeur s'applique à la somme des AE (avec un facteur d'équivalence toxique de 1). Elle correspond également à la dose journalière tolérable (DJT) pour une exposition chronique.

Précédemment, en 2012, l'Efsa avait élaboré une ARfD de 1 µg/kg p.c. et une DJT de 0,6 µg/kg p.c., sur la base de données animales chez le rat (atrophie musculaire de la queue après une exposition alimentaire à l'ergotamine de 13 semaines ; Speijers *et al.*, 1993). Ces valeurs toxicologiques de référence s'appliquent pour la somme des 12 AE d'intérêt. Elles ont été élaborées à partir d'une limite inférieure à l'intervalle de confiance de la *benchmark dose* (BMDL10) de 0,33 mg/kg p.c./j, d'un facteur

d'incertitude de 100 pour la variabilité inter- et intra-individuelle, et d'un facteur d'inquiétude supplémentaire de 3 pour le manque d'information sur la toxicité pour la reproduction pour l'ARfD. Pour la DJT, un facteur supplémentaire de 2 a été appliqué pour l'extrapolation d'une exposition de 13 semaines chez le rat à une exposition chronique (vie entière).

## ► Conclusion

*C. purpurea* contamine les graminées cultivées, mais également de nombreuses espèces de graminées sauvages, fourragères et gazons. Les sclérotés constituent la forme de dormance du champignon ; ils sont formés d'un corps dur issu du mycélium et contenant des alcaloïdes. Bien que la quantité d'alcaloïdes présents varie d'un sclérote à l'autre, il existe, en moyenne, une corrélation positive entre la teneur en ergot sur un épi et la concentration en alcaloïdes.

## ► Références

- Afssa, 2008. Appui scientifique et technique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la contamination de céréales destinées à l'alimentation humaine par de l'ergot, 7 p., <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2008sa0047.pdf> (consulté le 30/06/2024).
- Arvalis, 2023. [http://www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche\\_accident/fiches\\_accidents.php?mode=fa&type\\_cul=1&type\\_acc=4&id\\_acc=276](http://www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche_accident/fiches_accidents.php?mode=fa&type_cul=1&type_acc=4&id_acc=276).
- Chen J.J., Han M.Y., Gong T. *et al.*, 2017. Recent progress in ergot alkaloid research. *RSC Advances*, 7, 27384, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2017/ra/c7ra03152a>.
- Digneau M.A., Schiefer H.B., Blair R., 1986. Effects of feeding ergot-contaminated grain to pregnant and nursing sows. *Journal of Veterinary Medicine, Serie A*, 33, 757-766, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1986.tb00588.x>.
- Eckert H., Kiechel J.R., Rosenthaler J. *et al.*, 1978. Biopharmaceutical aspects: Analytical methods, pharmacokinetics, metabolism, and bioavailability, in Berde B., Schild H.O. (éd.), *Ergot Alkaloids and Related Compounds*, New York, États-Unis, Springer-Verlag, 719-803.
- Efsa, 2012. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *Efsa Journal*, 10, 2798, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2798>.
- Griffith R.W., Grauwiler J., Hodel C. *et al.*, 1978. Ergot — toxicology considerations, in *Heffter-Heubner's Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 805.
- Haarmann T., Machado C., Lübke Y. *et al.*, 2005. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry*, 66, 1312-1320, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.011>.
- Jacquin D., Délos M., Reboud X., 2010. L'ergot dépasse le seigle, cet ancien compagnon de l'humain ressort les griffes. *Phytoma*, 633, 38.
- Janssen G.B., Boink A.B.T.J., Niesink R.J.M. *et al.*, 1998. The U-shaped doseresponse curve of alpha-ergocryptine. Risk assessment ergot alkaloids, rapport RIVM n° 388802015, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Pays-Bas.
- Janssen G.B., Beems R.B., Elvers L.H. *et al.*, 2000a. Subacute toxicity of alpha-ergocryptine in Sprague-Dawley rats. 2: metabolic and hormonal changes. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 689, [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00055-7).

- Janssen G.B., Beems R.B., Speijers G.J. *et al.*, 2000b. Subacute toxicity of alphaergocryptine in Sprague-Dawley rats. 1: general toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 679-695, [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00054-5).
- Jecfa, 2022. Evaluation of certain food additives and contaminants: ninety-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, n° 1036, Genève, Suisse, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jecfa, 2023. Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the ninety-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Jecfa), WHO Food Additives Series, n° 82, Genève, Suisse, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Leist K.H., Grauwiler J., 1973. Transplacental passage of 3H-ergotamine in the rat, and the determination of the intra-amniotic embryotoxicity of ergotamine. *Experientia*, 29, 764.
- Klotz J.L., 2015. Activities and effects of ergot alkaloids on livestock physiology and production. *Toxins*, 7, 2801-2821, <https://doi.org/10.3390/toxins7082801>.
- Maruo V.M., Bracarense A.P., Metayer J.P. *et al.*, 2018. Ergot alkaloids at doses close to EU regulatory limits induce alterations of the liver and intestine. *Toxins*, 10, 183, <https://doi.org/10.3390/toxins10050183>.
- Oresanya T.F., Patience J.F., Zijlstra R.T. *et al.*, 2003. Defining the tolerable level of ergot in the diet of weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Sciences*, 83, 493, <https://doi.org/10.4141/A03-008>.
- Orlando B., Crepon K., Moreau J.-Y., 2014. Ergot des céréales : des avancées dans le nettoyage des grains. *Perspectives agricoles*, 416, 22-24.
- Orlando B., Maumené C., Piroux F., 2017. Ergot and ergot alkaloids in French cereals: occurrence, pattern and agronomic practices for managing the risk. *World Mycotoxin Journal*, 10, 327-338, <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2183>.
- Poole R.K., Poole D.H., 2019. Impact of ergot alkaloids on female reproduction in domestic livestock species. *Toxins*, 11, 364, <https://doi.org/10.3390/toxins11060364>.
- Peters-Volleberg G.W., Beems R.B., Speijers G.J., 1996. Subacute toxicity of ergometrine maleate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 951-958, [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(96\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(96)00060-9).
- Speijers G.J.A., Krajnc-Franken M.A.M., Van Leeuwen F.X.R. *et al.*, 1992. Subacute toxicity experiment with rats fed a diet containing ergotamine tartrate, rapport n° 618312001, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Pays-Bas.
- Speijers G.J.A., Wester P.N., Van Leeuwen F.X.R. *et al.*, 1993. Subchronic toxicity experiment with rats fed a diet containing ergotamine tartrate, rapport n° 618312002, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Pays-Bas.

## Chapitre 9

---

# Les toxines d'*Alternaria* spp.

Léna Dole, Caroline Strub, Angélique Fontana,  
Thierry Gauthier et Sabine Schorr-Galindo

### ►► Introduction

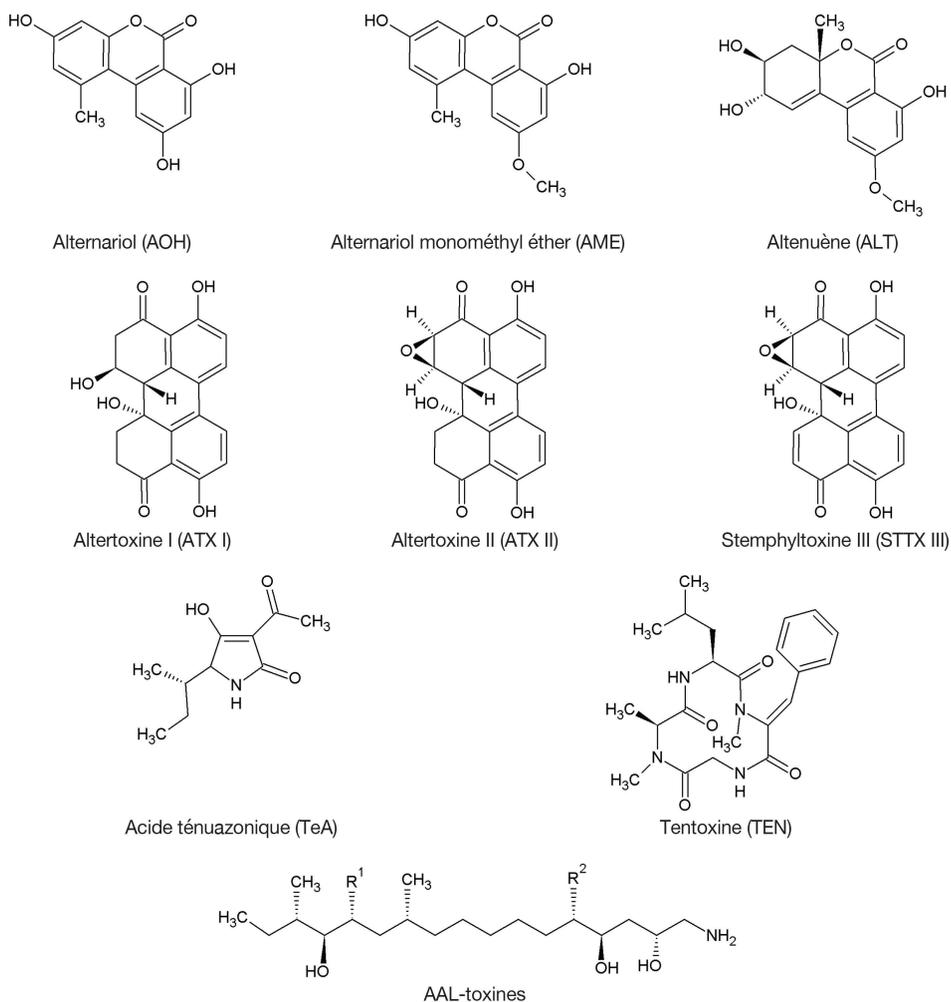
Les toxines d'*Alternaria* spp. sont des métabolites spécialisés très préoccupants pour la santé des consommateurs, produits par différentes espèces fongiques du genre *Alternaria* qui sont souvent seulement considérées comme des phytopathogènes. Elles peuvent contaminer les fruits et les légumes tels que la tomate, les céréales et les oléagineux, en se développant lors de la culture ou en post-récolte.

Connues depuis les années 1970, les toxines d'*Alternaria* spp. sont toujours considérées comme émergentes à ce jour, car elles ne font l'objet que d'une recommandation et non d'une réglementation européenne (voir chapitre 20), en raison du manque des données expérimentales qui permettraient d'établir des seuils toxicologiques de référence et du manque de données sur leur occurrence dans les produits alimentaires qui permettraient d'estimer l'exposition de la population. Cette carence est principalement liée à l'importante diversité structurale de ces toxines, associée à une grande diversité d'effets toxiques et de potentiels effets de mélange, et à l'insuffisance de méthodes de dosages adaptées à cette diversité. Les données récoltées ces dernières années indiqueraient cependant que l'exposition à l'alternariol, l'alternariol monométhyl éther et l'acide ténuazonique n'est pas négligeable, ce qui laisse présager une future réglementation.

### ►► Structure chimique des toxines d'*Alternaria* spp.

Les champignons du genre *Alternaria* produisent de très nombreux métabolites secondaires, dont plus de 70 phytotoxines qui ont été répertoriées par Wang *et al.* (2022). Certaines de ces molécules ont également démontré de potentiels effets délétères sur la santé humaine et animale et ont donc été qualifiées de myco-toxines (figure 9.1).

## Les mycotoxines



Toxines	R1	R2
Toxines AAL TA	- OC-CH <sub>2</sub> -CH(CO <sub>2</sub> H)-CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H	OH
Toxines AAL TB	- OC-CH <sub>2</sub> -CH(CO <sub>2</sub> H)-CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H	H

**Figure 9.1.** Structure chimique de membres représentatifs des 5 groupes de toxines d'*Alternaria* spp.

De nombreux métabolites secondaires produits par *Alternaria* spp. restent à caractériser quant à leur fonction et leur potentielle toxicité (Patriarca, 2016). Les principales toxines d'*Alternaria* spp., dont la présence dans l'alimentation humaine a été avérée dans différentes études, sont classifiées en fonction de leur structure chimique :

- l'alternariol (AOH), l'alternariol monométhyl éther (AME) et l'altenuène (ALT) sont des dibenzo- $\alpha$ -pyrones ;
- l'acide ténuazonique (TeA) et l'iso-TeA sont des acides tétramiques ;

- les altertoxines I, II et III (ATX I, II et III), l'alterpériglenol et la stemphylotoxine III (STTX III) présentent des structures de perylène quinones ;
- les toxines d'*Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* (*AAL-toxins* en anglais), qui sont des toxines spécifiques des tomates, structurellement proches des fumonisines ;
- les structures diverses comme la tentoxine (TEN).

Les toxines d'*Alternaria* peuvent être modifiées par des réactions chimiques ou biochimiques (par exemple dérivés AOH-3-glucoside, AOH-9-glucoside, AME-3-glucoside, AOH-3-sulfate, AME-3-sulfate), dans le cadre du métabolisme des xénobiotiques des êtres vivants, de la digestion des humains et animaux, et des processus de transformation des produits alimentaires (Chen *et al.*, 2021). Ces modifications n'entraînent pas nécessairement la formation de molécules moins toxiques et peuvent être inversées par la reformation de la forme parente. Par conséquent, la quantification des toxines dans les produits alimentaires dans leur forme parente uniquement peut constituer une sous-évaluation du risque.

## ► Les espèces du genre *Alternaria* productrices de mycotoxines

Les *Alternaria* spp. sont des ascomycètes appartenant à la famille des Pleosporaceae, majoritairement connus pour leur phytopathogénicité. Ils sont facilement identifiables par la morphologie de leurs conidies septées et plurinucléées, qui ont la forme de massues et qui sont riches en mélanine.

Le genre *Alternaria* comprend plus de 250 espèces, et sa taxonomie a fait l'objet de nombreuses actualisations. À l'heure actuelle, il est réparti en 26 sections basées sur diverses études phylogénétiques et morphologiques (Woudenberg *et al.*, 2015).

**Tableau 9.1.** Espèces d'*Alternaria* spp. productrices des principales toxines.

Mycotoxine	Espèces productrices (en gras, les plus fréquentes)
AOH	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. tangelonis</i> , <i>A. turkisafria</i> , <i>A. limonia sperae</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. solani</i>
AME	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. tangelonis</i> , <i>A. turkisafria</i> , <i>A. limonia sperae</i> , <i>A. mali</i>
ALT	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. mali</i>
TeA	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. longipe</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. tangelonis</i> , <i>A. turkisafria</i> , <i>A. limonia sperae</i> , <i>A. mali</i>
TEN	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. tangelonis</i> , <i>A. turkisafria</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. porri</i> , <i>A. solani</i>
ATX I	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. tangelonis</i> , <i>A. turkisafria</i> , <i>A. limonia sperae</i> , <i>A. mali</i>
AALs	<i>A. alternata</i> f. sp <i>Lycopersici</i>

L'identification de ses espèces se fait aujourd'hui majoritairement par du séquençage multilocus, mais est souvent corrélée à des analyses chémotypiques sur les métabolites secondaires et à l'étude morphologique des conidies. Le tableau 9.1 regroupe une liste non exhaustive des espèces productrices des principales mycotoxines (Fernandez Pinto et Patriarca, 2017).

D'autres espèces fongiques sont capables de produire des toxines d'*Alternaria* spp. comme *Bipolaris oryzae*, qui peut synthétiser le TEN, *Phoma sorghina*, *Magnaporthe oryzae* ou *Aspergillus* spp., qui peuvent synthétiser le TeA, ou *Stemphylium botryosum* qui synthétise la STTX III (Wang *et al.*, 2022).

## ► Biosynthèse de toxines d'*Alternaria* spp.

### Biosynthèse de l'AOH et ses dérivés

Le cluster de gènes de 15 kb responsable de la formation de l'AOH et de ses dérivés a été décrit chez *A. alternata* et est composé des gènes *pksI*, *omtI*, *moxI*, *sdrI* et *doxI* codant pour des enzymes telles qu'une polycétide synthase (PksI), une O-méthyl transférase (OmtI), une monooxygénase FAD-dépendante (MoxI), une déshydrogénase à chaîne courte (SdrI), et une extradiol dioxygénase putative (DoxI), ainsi que d'un gène (*aohR*) codant pour un facteur de transcription. La PksI se lie à une amorce d'acétylCoA par une liaison thiol, puis l'amorce est liée à six malonyl-CoA par des condensations de Claisen. La chaîne produite est libérée par une thioestérase et une aromatisation conduit à la formation d'AOH. L'AOH peut ensuite être converti en AME par OmtI (Wenderoth *et al.*, 2019).

### Biosynthèse du TeA

Le TeA est un métabolite secondaire hybride dont la biosynthèse fait intervenir deux précurseurs : le polycétide acétoacétyl-CoA et l'acide aminé L-isoleucine. La nature des gènes impliqués n'a pas encore été totalement élucidée, mais la réaction de biosynthèse implique la TeA synthétase 1 (TAS1), qui est une enzyme hybride entre une PKS et une peptide synthétase non ribosomique. Cette enzyme est composée de quatre domaines : adénylation (A), condensation (C), protéine porteuse d'acyle (PCP) et céto-synthase (KS). La L-isoleucine est liée au PCP et la réaction de catalyse débute au niveau de A. Le groupement amine de la L-isoleucine se lie à la fonction carbonyle de l'acétoacétyl, puis une cyclisation a lieu au niveau du domaine KS (Sun *et al.*, 2022). Dans sa forme finale, le TeA est instable, ce qui peut par exemple conduire à la formation d'isoTeA ou de Cu(TeA)<sub>2</sub>.

### Biosynthèse de la TEN

L'enzyme responsable de la formation de la TEN se lie aux acides aminés précurseurs — la glycine, la L-leucine, la L-alanine et la phénylalanine —, avant que n'ait lieu une N-méthylation de l'alanine et de la phénylalanine. Une cyclisation permet la formation de dihydrotentoxine, qui est ensuite convertie en TEN (Wang *et al.*, 2022).

## Biosynthèse des ATXs

Les perylènes quinones sont synthétisées au niveau des hyphes immergés dans le substrat. La synthèse est réalisée par la PksA, qui est également impliquée dans la biosynthèse de la DHN-mélanine au niveau des spores et des hyphes aériens. À partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, on observe une formation de T4HN (1,3,6,8-tétrahydroxynaphthalène), qui sera réduit en scytalone grâce aux enzymes BrM2 ou BrM3. La scytalone sera réduite en 1,3,8-THN (1,3,8-trihydroxynaphthalène) par l'action de la BrM1, elle-même réduite en vermelon par la BrM2. Le vermelon est réduit en 1,8-DHN (1,8-dihydroxynaphthalène), le dernier intermédiaire commun aux voies de biosynthèse de la DHN mélanine et des perylènes quinones. L'enzyme permettant la dimérisation de deux 1,8-DHN et la formation des perylènes quinone n'est pas encore connue, mais on sait que la biosynthèse des ATXs est strictement dépendante de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription CmrA (Gao *et al.*, 2022).

## Biosynthèse des toxines AAL

Les toxines AAL sont structurellement très similaires aux fumonisines, ce qui laisse présager que leurs voies de biosynthèse et les *clusters* de gènes respectifs impliqués dans leurs productions partagent de nombreuses similitudes. ALT1, une polycétide synthase homologue à FUM1 (voir chapitre 6), a été identifiée comme responsable de la première étape de la cascade enzymatique menant la biosynthèse des toxines AAL. L'intégration du gène *Alt1* dans une souche dépourvue du gène *Fum1* rétablit la production de fumonisines chez cette souche. ALT1 fait partie d'un *cluster* d'au moins 13 gènes présentant des similarités significatives avec les gènes *Fum*. La délétion de plusieurs de ces gènes a mené à une absence de production de toxines AAL, confirmant l'implication de ce *cluster* dans leurs synthèses.

## ► Occurrence des toxines d'*Alternaria* spp. et principaux aliments contaminés

Les toxines d'*Alternaria* spp. contaminent majoritairement les fruits et légumes et leurs produits dérivés comme les jus, les purées ou les concentrés. En particulier, des toxines sont très régulièrement retrouvées dans les tomates, les pommes, le raisin, les agrumes et les figues séchées et leurs dérivés transformés. Les toxines d'*Alternaria* spp. contaminent également les céréales et leurs produits dérivés. Des toxines ont été notamment retrouvées dans des farines et des produits à base de blé, de maïs, d'avoine, d'orge et de riz. Enfin, on retrouve des toxines d'*Alternaria* spp. dans les oléagineux et les huiles végétales, comme dans les graines de tournesol et l'huile de tournesol, ou les olives et l'huile d'olive (Patriarca, 2016 ; Fernandez Pinto et Patriarca, 2017 ; Chen *et al.*, 2021).

Le TèA est globalement le contaminant retrouvé en teneurs les plus élevées et le plus fréquemment (Chen *et al.*, 2021). L'AOH et l'AME sont très régulièrement détectés, mais à des teneurs généralement plus faibles. La contamination par les

autres toxines d'*Alternaria* spp. est plus rare, mais de plus en plus rapportée dans la littérature, car les méthodes de dosage de ces molécules sont en développement.

La consommation régulière de produits transformés peut augmenter l'exposition du consommateur par la présence ponctuelle, dans les lots destinés à la transformation, de produits bruts très contaminés non triés, ou par une augmentation de la teneur en toxines lors des procédés de séchage ou de concentration. Les premières études ne montrent pas ou peu de dégradation de l'AOH et de l'AME par des traitements thermiques ou haute pression.

### ► Toxicité des principales toxines d'*Alternaria* spp.

Parmi les mycotoxines produites par les espèces d'*A. alternata*, le TeA, l'AOH et l'AME sont les toxines ayant le taux de prévalence le plus élevé et étant retrouvées en plus grande quantité dans des produits alimentaires. Il faut toutefois préciser que la plupart des études toxicologiques relatives à ces toxines ont été conduites sur des modèles *in vitro*.

### Toxicité de l'alternariol et du méthyléther alternariol

Plusieurs études ont montré que des concentrations micromolaires d'AOH et d'AME produisent des effets génotoxiques sur différents types de cellules telles que des cellules coliques, hépatiques, gastriques et vulvaires humaines, ainsi que sur des fibroblastes pulmonaires de hamster et des macrophages murins (Fehr *et al.*, 2009 ; Fleck *et al.*, 2016 ; Lin *et al.*, 2023 ; Solhaug *et al.*, 2012). En effet, ces toxines induisent des cassures des brins d'ADN dès la première heure d'exposition. Néanmoins, chez HepG2 et HT29, ces dommages ne sont plus observables dans les deux à trois heures suivantes indiquant un processus de réparation efficace de l'ADN (Fleck *et al.*, 2016). Ce processus de réparation coïncide avec un ralentissement du cycle cellulaire en G2/M.

La propriété génotoxique de l'AOH et de l'AME est reliée à leur capacité à interférer avec les topo-isomérase (Fehr *et al.*, 2009). L'action des topo-isomérase provoque le relâchement de la structure enroulée de l'ADN, en générant des ruptures transitoires et réversibles des liaisons phosphodiester, afin de permettre les étapes de traduction et de transcription. La topo-isomérase I induit des cassures simple brin alors que la topo-isomérase II induit des cassures double brin. L'AOH est un inhibiteur de l'activité des topo-isomérase I et II  $\alpha$  et  $\beta$ , alors que l'AME n'inhibe que la topo-isomérase II  $\alpha$ . Contrairement à l'AME, l'AOH a aussi la propriété de stabiliser le complexe ADN-topo-isomérase I et II  $\alpha$ , avec une plus grande efficacité pour l'isoenzyme II  $\alpha$ , lui conférant la qualification de poison de topo-isomérase. Cette propriété favorise ainsi les cassures double brin sur l'ADN. Bien que ces mycotoxines induisent l'accumulation de radicaux oxygénés et l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes contrôlées par Nrf2 (Pahlke *et al.*, 2016), signature d'un stress oxydant, les études *in vitro* ne révèlent pas de dommages dus à l'oxydation de bases de l'ADN dans les cellules intestinales HT29 (Fehr *et al.*, 2009). Cependant, dans les macrophages murins RAW264.7, l'AOH est capable d'induire

un stress oxydant et l'oxydation de bases de l'ADN (Solhaug *et al.*, 2012). Par ailleurs, un effet mutagène de l'AOH et de l'AME a été démontré pour *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* ainsi que pour des cellules fibroblastiques de hamster V79 et des cellules de lymphome de souris.

Plusieurs travaux ont montré un impact comparable de l'AOH et de l'AME sur la capacité proliférative de cellules humaines *in vitro*, notamment sur des cellules intestinales, des cellules hépatiques, des cellules d'œsophage (Bensassi *et al.*, 2015 ; den Hollander *et al.*, 2022 ; Pahlke *et al.*, 2016). Les cellules hépatiques HepG2 semblent plus sensibles que les cellules intestinales à ces mycotoxines. L'effet de l'association des deux mycotoxines dans des proportions 1:1 diverge selon le modèle : il est additif dans les cellules coliques HCT116 (Bensassi *et al.*, 2015), mais synergique dans les cellules Caco-2. Dans les cellules gastriques GES-1, l'association des deux mycotoxines est antagoniste à faibles concentrations, mais additif à fortes concentrations (Lin *et al.*, 2023).

L'AOH et l'AME induisent la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules coliques HCT116, ce qui se traduit par une diminution du potentiel membranaire mitochondrial due à la formation de pores dans la membrane mitochondriale et l'activation des caspase 9 et 3 (Bensassi *et al.*, 2015). Ce processus s'accompagne de la production d'anions superoxydes au niveau mitochondrial provenant d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. L'induction d'apoptose par ces deux mycotoxines mettant en jeu l'activation de la caspase 3 a également été démontrée dans les cellules gastriques GES-1 (Lin *et al.*, 2023). Ce processus active les voies de signalisation ATR-Chk1, réponse spécifique au stress répliatif, et ATM-Chk2, réponse spécifique aux cassures d'ADN double brin, qui aboutissent à la phosphorylation de la protéine P53 et de l'histone H2AX. L'activation de cette même voie de signalisation a également été observée chez des macrophages murins exposés à l'AOH avec un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Solhaug *et al.*, 2012).

Il a été récemment montré que 10  $\mu$ M d'AOH sont capables d'activer la translocation des facteurs de transcription Nrf2 et Ahr dans les cellules coliques HCEC CT (Groestlinger *et al.*, 2022), confirmant ainsi leur capacité à induire une réponse antioxydante et l'expression d'enzymes de phase I, comme le cytochrome P450 1A1 (CYP1A1). Ainsi, l'AOH induit l'expression des CYP1A1 *via* le récepteur Ahr dans plusieurs types cellulaires MCF-7, HepG2 et KYSE (Pahlke *et al.*, 2016), tandis que pour l'AME, cet effet n'a été démontré que chez HepG2. Dans des cellules d'œsophage humain, la métabolisation de l'AOH et de l'AME en dérivés hydroxylés par des enzymes de phase I rend ces composés moins génotoxiques.

L'AOH est capable d'induire une réduction de la réponse pro-inflammatoire dans des macrophages humains, ainsi que dans cellules intestinales humaines stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) (Groestlinger *et al.*, 2022). En effet, son action réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-6 et le TNF  $\alpha$ , et accroît la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. De plus, l'AOH réduit la translocation nucléaire de Nf-kB qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire. La structure moléculaire de l'AOH lui permettrait de s'insérer dans des domaines membranaires riches en cholestérol, tels que les cavéoles, ce qui modifierait l'interaction entre le récepteur TLR-4 et la caveolin-1 dont dépend la production de cytokines pro-inflammatoires.

L'AOH possédant une structure similaire à des composés œstrogènes montre des propriétés agonistes des récepteurs œstrogéniques et ostrogéniques ER  $\alpha$  et  $\beta$  pour des cellules humaines de l'endomètre (cellules Ishikawa), avec toutefois une meilleure affinité pour l'ER  $\beta$ , mais qui reste cependant 10 000 fois inférieure à celle du 17  $\beta$  œstradiol. Elle est ainsi capable d'induire un effet œstrogénique à des concentrations micromolaires, identifiable par la mesure d'une activité phosphatase alcaline (Louro *et al.*, 2023). Par contre, cet effet n'a pas été observé avec des cellules primaires provenant d'endomètre de porc et un faible potentiel œstrogénique de l'AOH a été constaté sur des cellules mammaires humaines. Par ailleurs, des extraits d'*A. alternata* contenant un mélange de mycotoxines produisent un effet anti-œstrogénique inattendu sur les cellules de l'endomètre.

### Toxicité de l'acide ténuazonique

L'effet ribotoxique du TeA a été montré dès 1963. En effet, le TeA a la propriété d'inhiber la synthèse protéique en empêchant la libération des protéines nouvellement synthétisées du ribosome. Néanmoins, le TeA montre un pouvoir cytotoxique *in vitro* beaucoup plus faible que l'AOH et l'AME dans les cellules intestinales, hépatiques et gastriques (den Hollander *et al.*, 2022 ; Lin *et al.*, 2023). Contrairement à l'AME et l'AOH, le TeA est dépourvu d'effets génotoxiques sur des cellules en culture et n'a montré aucune propriété mutagène sur *Salmonella typhimurium*. Des études de toxicité aigüe sur des rongeurs ont montré que, lors de l'administration par voie orale de TeA, la LD<sub>50</sub> était supérieure à 160 mg/kg p.c. chez le rat et de 81 à 186 mg/kg p.c. chez la souris.

### Toxicité des altertoxines

L'altertoxine II (ATX II) et la stemphytoxine III (STTX III), molécules de la famille des pérylènes quinones possédant un groupement époxyde, produisent un effet génotoxique bien supérieur à celui de l'AOH et de l'AME ou du mélange AOH/AME/TeA. Ainsi, elles induisent un effet génotoxique vingt fois supérieur et un potentiel mutagène cinquante fois supérieur à l'AOH dans les cellules fibroblastiques pulmonaires V79 (Fleck *et al.*, 2016). De plus, une concentration de 1  $\mu$ M d'ATX II induit trois fois plus d'effet génotoxique que l'AOH dans les cellules HT29. À la différence de l'AOH et de l'AME, l'ATX II et la STTX III engendrent une oxydation des bases de l'ADN révélée par l'enzyme formamido-pyrimidine DNA glycolysale (fpg), sans qu'un stress oxydant soit observé. À l'instar de l'aflatoxine B1, la présence du groupement époxyde pourrait expliquer la formation d'adduits de type 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pyrimidine (FapydG) sensibles à l'action de la fpg. La formation d'adduits d'ATX II avec la guanine et la cytosine a été récemment confirmée (Soukup *et al.*, 2020). L'ATX II et la STTX III ne sont pas des poisons pour la topo-isomérase, contrairement à l'AOH, ce qui les rendrait moins susceptibles d'engendrer des cassures doubles brins (Fleck *et al.*, 2016). Chez HepG2, les cassures générées par STTX III sont plus persistantes que celles produites par ATX II, ce qui traduit des mécanismes de réparation différents pour chacune de ces toxines.

L'ATX II et la STTX III sont partiellement métabolisées, respectivement en ATX I et alterperylénol dans les cellules Caco-2, par transformation du groupement époxyde en radical monohydroxyle (Fleck *et al.*, 2014). Cette transformation a été également démontrée dans les cellules HepG2 et HCT116 pour l'ATX II. L'ATX I étant moins mutagène et génotoxique que l'ATX II, cette biotransformation peut être considérée comme une voie cellulaire de détoxification. En outre, l'ATX II et la STTX III ne traversant que peu (ATX II) voire pas (STTX III) une monocouche épithéliale de cellules Caco-2, leur toxicité devrait être restreinte au tractus digestif (Fleck *et al.*, 2014). Par ailleurs, lorsque l'ATX II est donnée par gavage à des rats, une augmentation de la forme phosphorylée H2AX ( $\gamma$  H2AX) est observée dans le colon, mais pas dans le foie, confirmant cette hypothèse (Aichinger *et al.*, 2022). De plus, lorsque la même dose d'ATX II est administrée dans un extrait de culture d'*A. alternata*, l'effet génotoxique est moins prononcé, ce qui suggère un effet antagoniste des autres toxines d'*A. alternata*.

## Toxicité des toxines AAL

Les toxines AAL sont des molécules structurellement proches des fumonisines (voir chapitre 6). Ainsi, à l'instar de ces dernières, elles inhibent la céramide synthase, conduisant à l'accumulation de sphinganine et bloquant la synthèse *de novo* des céramides, augmentant de ce fait, comme les fumonisines, le ratio sphinganine (Sa) / sphingosine (So) (Van der Westhuizen *et al.*, 1998). Les toxines AAL sont également cytotoxiques envers diverses lignées cellulaires comme les cellules hépatiques de rat H4TG ou les cellules rénales canines MDCK, mais égales envers des cellules primaires hépatique de rat (Mirocha *et al.*, 1992).

## ►► Conclusion

Les principales toxines d'*Alternaria* spp. contaminent un large éventail de produits alimentaires, conduisant à une exposition significative de la population. Les études concernant leur toxicité *in vitro* ne sont pas abouties, mais semblent inquiétantes, en particulier en ce qui concerne l'AOH, l'AME et les pérylènes quinones. Il est nécessaire de mieux connaître les toxines d'*Alternaria* spp. et leur toxicité *in vivo*, et de disposer d'autres solutions que les fongicides de synthèse pour limiter leur développement et leur toxinogénèse.

## ►► Références

- Aichinger G., Pahlke G., Puntischer H. *et al.*, 2022. Markers for DNA damage are induced in the rat colon by the *Alternaria* toxin altertoxin-II, but not a complex extract of cultured *Alternaria alternata*. *Frontiers in Toxicology*, 4, 977147, <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.977147>.
- Bensassi F., Gallerne C., Sharaf el dein O. *et al.*, 2015. Combined effects of alternariols mixture on human colon carcinoma cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25, 56, <https://doi.org/10.3109/15376516.2014.985354>.
- Chen A., Mao X., Sun Q. *et al.*, 2021. *Alternaria* Mycotoxins: An Overview of Toxicity, Metabolism, and Analysis in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 7817-7830, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03007>.

- Den Hollander D., Holvoet C., Demeyere K. *et al.*, 2022. Cytotoxic Effects of Alternariol, Alternariol Monomethyl-Ether, and Tenuazonic Acid and Their Relevant Combined Mixtures on Human Enterocytes and Hepatocytes. *Frontiers in Microbiology*, 13, 849243, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.849243>.
- Fehr M., Pahlke G., Fritz J. *et al.*, 2009. Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II alpha isoform. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 441, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700379>.
- Fernandez Pinto V., Patriarca A., 2017. *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology*, 1542, 13-32, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_2).
- Fleck S.C., Pfeiffer E., Metzler M., 2014. Permeation and metabolism of *Alternaria* mycotoxins with perylene quinone structure in cultured Caco-2 cells. *Mycotoxin Research*, 30, 17, <https://doi.org/10.1007/s12550-013-0180-0>.
- Fleck S.C., Sauter F., Pfeiffer E. *et al.*, 2016. DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphytoxin III in cultured cells. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 798-799, 27, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.02.001>.
- Gao J., Wenderoth M., Doppler M. *et al.*, 2022. Fungal Melanin Biosynthesis Pathway as Source for Fungal Toxins. *mBio*, 13, e00219-22, <https://doi.org/10.1128/mbio.00219-22>.
- Groestlinger J., Spindler V., Pahlke G. *et al.*, 2022. *Alternaria alternata* Mycotoxins Activate the Aryl Hydrocarbon Receptor and Nrf2-ARE Pathway to Alter the Structure and Immune Response of Colon Epithelial Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 35, 731, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00364>.
- Lin H., Jia B., Wu A., 2023. Cytotoxicities of Co-occurring alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid on human gastric epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 171, 113524, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113524>.
- Louro H., Vettorazzi A., López de Cerain A. *et al.*, 2023. Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health. *Archives of Toxicology*, 98, 425-269, <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>.
- Mirocha C.J., Gilchrist D.G., Shier W.T. *et al.*, 1992. AAL toxins, fumonisins (biology and chemistry) and host-specificity concepts. *Mycopathologia*, 117, 47-56, <https://doi.org/10.1007/BF00497278>.
- Pahlke G., Tiessen C., Domnanich K. *et al.*, 2016. Impact of *Alternaria* toxins on CYP1A1 expression in different human tumor cells and relevance for genotoxicity. *Toxicology Letters*, 240, 93, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.003>.
- Patriarca A., 2016. *Alternaria* in food products. *Current Opinion in Food Science*, 11, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.08.007>.
- Solhaug A., Vines L.L., Ivanova L. *et al.*, 2012. Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutation Research*, 738-739, 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.09.001>.
- Soukup S.T., Fleck S.C., Pfeiffer E. *et al.*, 2020. DNA reactivity of altertoxin II: Identification of two covalent guanine adducts formed under cell-free conditions. *Toxicology Letters*, 331, 75, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.018>.
- Sun F., Cao X., Yu D. *et al.*, 2022. *AaTASI* and *AaMFSI* Genes for Biosynthesis or Efflux Transport of Tenuazonic Acid and Pathogenicity of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35, 416-427, <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-21-0300-R>.
- Van der Westhuizen L., Shephard G.S., Snyman S.D. *et al.*, 1998. Inhibition of sphingolipid biosynthesis in rat primary hepatocyte cultures by fumonisin B1 and other structurally related compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 497-503, [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(98\)00012-x](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00012-x).
- Wang H., Guo Y., Luo Z. *et al.*, 2022. Recent Advances in *Alternaria* Phytotoxins: A Review of Their Occurrence, Structure, Bioactivity, and Biosynthesis. *Journal of Fungi*, 8, 168, <https://doi.org/10.3390/jof8020168>.
- Wenderoth M., Garganese F., Schmidt-Heydt M. *et al.*, 2019. Alternariol as virulence and colonization factor of *Alternaria alternata* during plant infection. *Molecular Microbiology*, 112, 131-146, <https://doi.org/10.1111/mmi.14258>.
- Woudenberg J.H.C., Seidl M.F., Groenewald J.Z. *et al.*, 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology*, 82, 1-21, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>.

## **Autres toxines d'*Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp.**

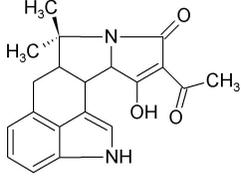
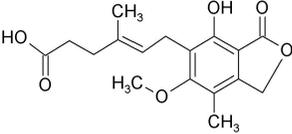
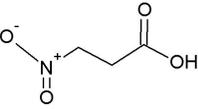
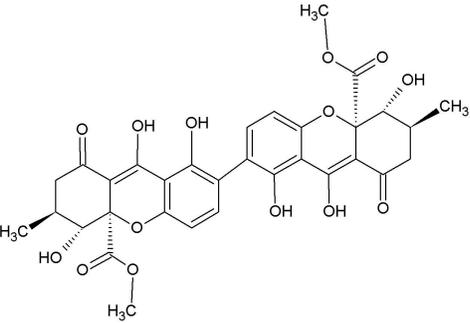
Nolwenn Hymery et Monika Coton

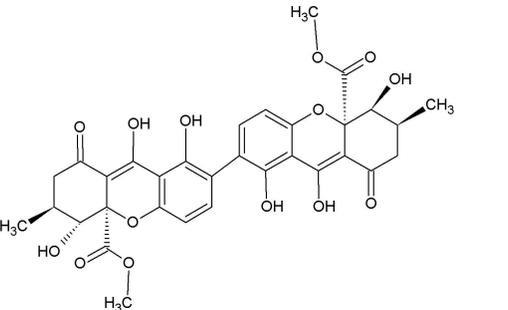
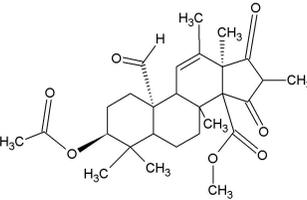
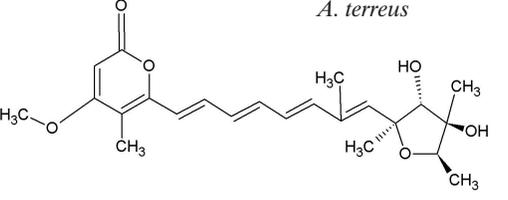
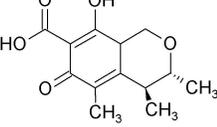
### **►► Introduction**

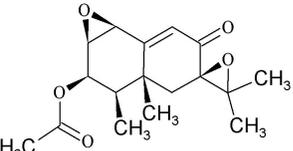
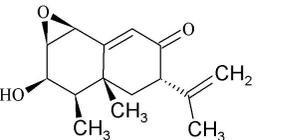
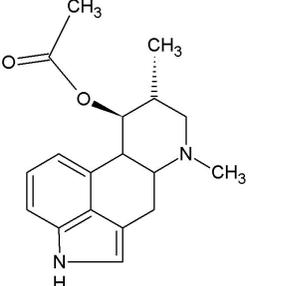
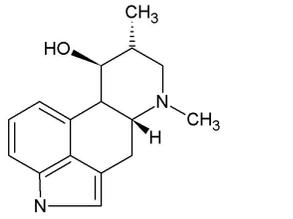
Les *Aspergillus* et *Penicillium* sont des champignons filamenteux ubiquitaires très fréquemment rencontrés sur une large diversité de substrats dans la chaîne alimentaire. De nombreuses espèces sont des saprophytes (c.-à-d. contamination des aliments surtout à partir de la récolte), d'autres sont commensales (c.-à-d. contamination des plantes au champs). Les espèces appartenant aux deux genres sont bien connues pour leur forte capacité à produire de nombreux métabolites spécialisés qui peuvent contribuer aux différents processus biologiques des champignons dont la compétition, la communication voire d'autres interactions microbiennes. Parmi eux, les mycotoxines sont toxiques pour l'humain et/ou l'animal.

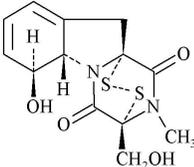
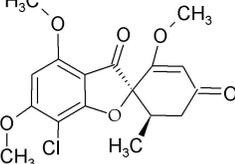
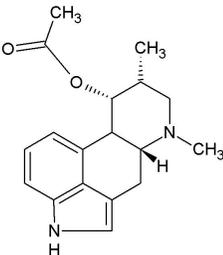
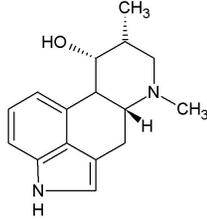
Les espèces toxigènes majeures rencontrées dans diverses matrices ou aliments ainsi que les mycotoxines produites sont détaillées dans le tableau 10.1, celles-ci présentant des structures chimiques variées. À noter que certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* produisent également des mycotoxines d'importance telles que les aflatoxines, l'ochratoxine A et la patuline, qui font l'objet de chapitres spécifiques et dont les teneurs dans les aliments sont soumises à une réglementation européenne (voir chapitre 20). Cependant, ce n'est pas le cas pour toutes les mycotoxines, telles que les roquefortines, l'acide cyclopiazonique ou la toxine PR produits essentiellement par les *Penicillium* spp., ou encore la stérigmatocystine, la terréine ou l'acide 3-nitropropionique générés par des *Aspergillus* spp.

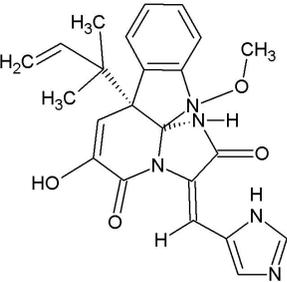
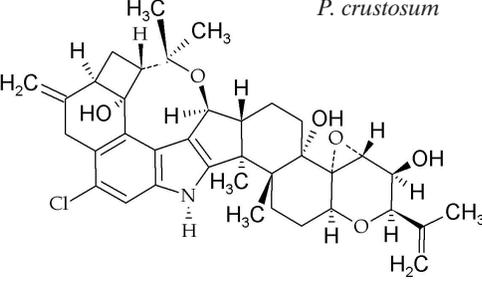
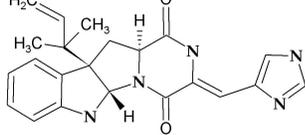
**Tableau 10.1.** Mycotoxines produites par *Penicillium* et *Aspergillus* spp.

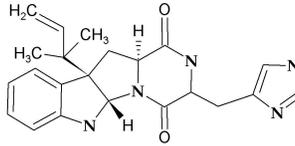
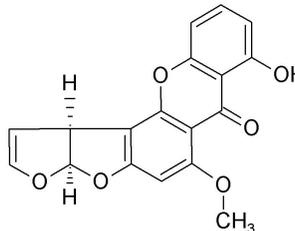
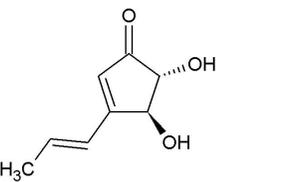
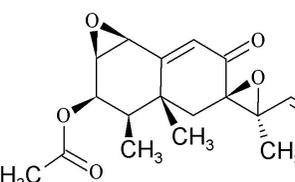
Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Acide cyclopiazonique	$C_{20}H_{20}N_2O_3$  Hybride (PKS/NRPS) 336,4	<i>A. flavus</i> <i>A. minisclerotigenes</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. tamarii</i> <i>P. bifforme</i> <i>P. camemberti</i> var. <i>camemberti</i> <i>P. fuscoglaucum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. palitans</i>	<b>Céréales</b> , cacao, épices, <b>fromages</b> , <b>fruits</b> , <b>fruits à coque/cacahuètes</b> , matières premières tropicales, <b>maïs</b> , <b>saucissons</b> , <b>sauce soja</b> , <b>riz</b> , <b>ensilage</b>
Acide mycophénolique	$C_{17}H_{20}O_6$  Hybride (PKS-TC) 320,3	<i>P. bialowiezense</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. carneum</i> <i>A. pseudoglaucus</i>	Café, champignons, eau, <b>ensilage</b> , <b>fromages</b> , <b>fruits</b> , légumes, <b>maïs</b> , <b>pain</b> , pain de seigle, <b>produits laitiers</b> , <b>saucissons/charcuteries</b>
Acide 3-nitropropionique	$C_3H_5NO_4$  119,1	<i>A. oryzae</i> <i>A. flavus</i>	<b>Cacahuètes</b> , <b>céréales</b> , fruits à coque, fruits secs, sucre de canne, maïs, graines, produits fermentés asiatiques
Acide sécalonique D	$C_{32}H_{30}O_{14}$  Polycétide (PKS) 638,6	<i>P. chrysogenum</i>	<b>Grains</b> , <b>maïs</b> , produits secs ou salés, produits riches en sucre

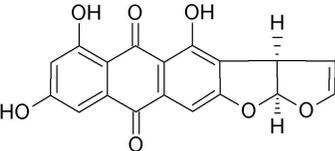
Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Acide sécalonique F	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	<i>P. chrysogenum</i> <i>A. brunneoviolaceus</i>	
			
	Polycétide (PKS) 638,6		
Andrastine A	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	<i>P. bialowiezense</i> <i>P. carneum</i> <i>P. corylophilum</i> <i>P. paneum</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. rubens</i>	Café, champignons, fruits, légumes, pain, pain de seigle, <b>produits laitiers, saucissons / charcuteries, ensilage</b>
			
	Polycétide (PKS) 486,6		
Citréoviridine	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	<i>P. citreonigrum</i> <i>A. terreus</i>	Riz
			
	402,5		
Citrinine	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	<i>P. citrinum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. verrucosum</i>	<b>Céréales, épices, fromages, fruits, fruits à coque, saucissons, viandes séchées</b>
			
	Polycétide (PKS) 250,25		

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Érémodortine A	<p>C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub></p>  <p>Terpène (TC) 306,4</p>	<i>P. roqueforti</i>	Ensilage, fromages
Érémodortine B	<p>C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub></p>  <p>Terpène (TC) 248,3</p>	<i>P. roqueforti</i>	Ensilage, fromages
Fumigaclavine A et B	<p>A : C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p>  <p>Alcaloïde (DMATS) 298,4</p> <p>B : C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O</p>  <p>Alcaloïde (DMATS) 256,3</p>	<i>P. palitans</i> <i>A. fumigatus</i>	Eau, pain de seigle, saucissons / charcuteries

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Gliotoxine	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> 	<i>A. fumigatus</i>	Céréales, fruits secs, grains, ensilage
Griséofulvine	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>6</sub> 	<i>P. griseofulvum</i> <i>P. sclerotigenum</i>	Céréales, pommes de terre, patates douces
Iso-fumigaclavine A et B	A : C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  Alcaloïde (DMATS) 298,4 B : C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O  Alcaloïde (DMATS) 256,3	<i>P. carneum</i>	Eau, fromages, pain de seigle, saucissons / charcuteries

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Méléagrine	<p data-bbox="382 342 498 365"><math>C_{23}H_{23}N_5O_4</math></p>  <p data-bbox="382 680 630 738">Hybride (DMATS NRPS) 433,5</p>	<p data-bbox="699 342 759 365"><i>P. allii</i></p> <p data-bbox="699 378 850 402"><i>P. chrysogenum</i></p> <p data-bbox="699 414 787 438"><i>P. rubens</i></p>	<p data-bbox="912 342 1084 475">Fruits à coque, légumes (oignon, ail), produits secs ou salés, produits riches en sucre</p>
Pénitrème A	<p data-bbox="382 757 510 780"><math>C_{37}H_{44}ClNO_6</math></p>  <p data-bbox="382 1095 510 1153">Terpène (TC) 634,2</p>	<p data-bbox="699 757 807 780"><i>P. carneum</i></p> <p data-bbox="699 793 819 817"><i>P. crustosum</i></p>	<p data-bbox="912 757 1066 835">Pain de seigle, saucissons, viandes séchées</p>
Roquefortine C	<p data-bbox="382 1172 498 1195"><math>C_{22}H_{23}N_5O_2</math></p>  <p data-bbox="382 1366 630 1425">Hybride (DMATS NRPS) 389,4</p>	<p data-bbox="699 1172 759 1195"><i>P. allii</i></p> <p data-bbox="699 1208 807 1232"><i>P. carneum</i></p> <p data-bbox="699 1244 850 1268"><i>P. chrysogenum</i></p> <p data-bbox="699 1281 819 1304"><i>P. crustosum</i></p> <p data-bbox="699 1317 819 1341"><i>P. expansum</i></p> <p data-bbox="699 1354 850 1377"><i>P. griseofulvum</i></p> <p data-bbox="699 1390 801 1414"><i>P. paneum</i></p> <p data-bbox="699 1426 819 1450"><i>P. roqueforti</i></p> <p data-bbox="699 1463 787 1486"><i>P. rubens</i></p> <p data-bbox="699 1499 850 1523"><i>P. sclerotigenum</i></p>	<p data-bbox="912 1172 1084 1359">Céréales, ensilages, fromages, fruits, fruits à coque, légumes, maïs, pain, pain de seigle, saucissons</p>

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Roquefortine D	$C_{22}H_{25}N_5O_2$  Hybride (DMATS NRPS) 391,5	<i>P. carneum</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. crustosum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. paneum</i> <i>P. rubens</i> <i>P. sclerotigenum</i>	Céréales, ensilage, fromages, fruits, fruits à coque, légumes, maïs, pain, pain de seigle, saucissons
Stérigmatocystine	$C_{18}H_{12}O_6$  Polycétide (PKS) 324,3	<i>A. creber</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. protuberus</i> <i>A. versicolor</i>	<b>Céréales, cacao, épices, fruits à coque / cacahuètes, fruits secs, grains, herbes, produits laitiers, riz, aliments déshydratés (herbes, épices...), salami, maïs</b>
Terréine	$C_8H_{10}O_3$  Polycétide (PKS) 154,2	<i>A. terreus</i> ** <i>A. flavipes</i> **	Écorces de riz
Toxine PR	$C_{17}H_{20}O_6$  Terpène (TC) 320,3	<i>P. roqueforti</i> <i>P. rubens</i>	<b>Céréales, ensilage, fromages (mais probablement dégradée en d'autres composés), maïs</b>

Mycotoxines	Formule chimique, structure, structure du squelette et poids moléculaire (g . mol <sup>-1</sup> )	Exemples d'espèces productrices	Denrées alimentaires et aliments pour animaux où ces espèces ont été identifiées*
Versicolorine A	$C_{18}H_{10}O_7$  Polycétide (PKS) 338,3	<i>A. versicolor</i>	Céréales, épices, fromages, fruits à coque / cacahuètes, <b>grains</b> , produits secs ou salés

NRPS : peptide synthétase non ribosomique ; PKS : polycétide synthase ; TC : terpène cyclase ; DMATS : diméthylallyle tryptophane synthase. \* **En gras** : contamination par des mycotoxines décrites. Source des structures chimiques : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Exemples de souches productrices : Samson *et al.*, 2019 (sauf indiqués par \*\*).

## ►► La citrinine

La biosynthèse de la citrinine (CIT) implique un *cluster* de plusieurs gènes, très homologues entre les espèces de *Monascus* et *Penicillium* connues comme productrices, dont un gène d'importance codant pour la citrinine synthase (Geisen *et al.*, 2018). La CIT est formée suite à la condensation d'un acétyl-CoA et de quatre molécules de malonyl-CoA, et sa biosynthèse chez certaines *Penicillium* spp. serait modulée par plusieurs facteurs, dont la température, l'activité de l'eau ou encore le pH, sauf chez *Penicillium citrinum* qui est décrite comme fortement productrice. La CIT est réglementée uniquement dans le cadre des compléments alimentaires à base de riz fermenté avec de la levure de riz rouge (*Monascus purpureus*) et se retrouve dans de nombreuses matrices telles que les céréales, les fruits ou encore les produits salés (fromages, salaisons et charcuteries).

La CIT est une molécule de faible masse molaire, constituée d'un benzopyrane phénolique. Diverses bioactivités *in vitro*, notamment des propriétés antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses et neuroprotectrices, ont été décrites. Malgré la présence de propriétés antibiotiques, la CIT n'a jamais été exploitée à des fins thérapeutiques, car elle présente des effets toxiques sur les mammifères. De nombreuses lignées cellulaires humaines et espèces animales ont été utilisées pour étudier sa toxicité. Outre ses propriétés immunotoxiques, hépatotoxiques, tératogènes et embryotoxiques, elle est surtout reconnue pour sa néphrotoxicité. Sur les cellules rénales bovines, elle induit une cytotoxicité (Coton *et al.*, 2019). Dans les tissus, des lésions rénales et des effets sur le métabolisme hépatique ont également été observés. Cette mycotoxine est souvent produite simultanément avec l'OTA. Il a été observé la formation d'un adduit ADN C-C8dG-OTA à la suite d'une exposition conjointe à la CIT et à l'ochratoxine A.

De plus, la CIT possède un mécanisme d'action impliquant le métabolisme mitochondrial. Chez le rat, il a été observé que, dans les mitochondries des cellules hépatiques et rénales, elle inhibe plusieurs enzymes, notamment la malate déshydrogénase et la glutamate déshydrogénase, ainsi que le complexe ATP synthase impliqué dans la chaîne respiratoire.

## ►► L'acide 3-nitropropionique

Identifié pour la première fois en Chine, après l'ingestion de canne à sucre moisie, l'acide nitropropionique (3-NP) a provoqué un trouble du mouvement comprenant la dystonie et la chorée. Ce composé, de faible poids moléculaire (199,08 g/mol), est produit par les espèces *Aspergillus oryzae* et *A. flavus*. Il est décrit comme un inhibiteur irréversible du complexe II mitochondrial. Le 3-NP entraîne un dysfonctionnement mitochondrial après une administration systémique en inhibant la succinate déshydrogénase du complexe mitochondrial II, entraînant ainsi des symptômes similaires à ceux de la maladie de Huntington chez les animaux et l'humain. L'inhibition aiguë et chronique de la succinate déshydrogénase par injection systématique de 3-NP a été utilisée pour produire également des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer chez le rat et le singe. En fait, les noyaux gris centraux du cerveau semblent particulièrement sensibles aux effets de cette toxine. La neurotoxicité du 3-NP implique trois processus en interaction, à savoir la déficience énergétique, l'excitotoxicité et le stress oxydant. Cependant, les mécanismes par lesquels le 3-NP produit des lésions dans le striatum ne sont pas entièrement caractérisés. Bien que l'altération du métabolisme énergétique se produise dans toutes les cellules du corps et du cerveau, c'est le striatum des noyaux gris centraux qui est le plus gravement touché, en partie à cause d'une vulnérabilité préférentielle à l'inhibition du cycle de l'acide tricarboxylique des neurones GABAergiques qui constituent la majeure partie des neurones du striatum.

## ►► La terréine

La terréine (Ter A) est une mycotoxine de faible poids moléculaire (154,16 g/mol). Sa voie de biosynthèse a été récemment décrite et élucidée chez *Aspergillus terreus* et implique un *cluster* de 11 gènes (~ 33 kpb). Elle met en jeu une enzyme de type polycétide synthase, Ter A, qui génère trois composés intermédiaires, mais un autre composé, le 6-hydroxymelléine, a été également démontré comme intermédiaire clé dans sa biosynthèse. Ter A fait partie des métabolites majeurs produits par *A. terreus* et sa biosynthèse est fortement induite sur des milieux à base de dérivés végétaux comme la pomme de terre. Ce métabolite pourrait avoir de nombreuses activités écologiques (antisouillure, inhibition de la croissance des plantes), antimicrobiennes, antioxydantes et antiprolifératives.

L'activité antiproliférative a été étudiée notamment sur les cellules cancéreuses. Des inhibitions de la prolifération des cellules cancéreuses du sein, de l'angiogenèse dans la lignée cellulaire (LNCaP-CR) du cancer de la prostate stimulée par les androgènes, de la viabilité cellulaire et de la prolifération sur des cellules épithéliales cancéreuses

pulmonaires ont été démontrées (Buachan *et al.*, 2021). Ter A agit également comme un inhibiteur du protéasome en réduisant l'activité de la chymotrypsine et favorise l'apoptose dans les lignées cellulaires tumorales du poumon humain (NCI-H292). Ter A est capable de supprimer les processus angiogéniques des cellules cancéreuses pulmonaires humaines, notamment la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), la formation de tubes capillaires et l'interaction VEGF/VEGFR2. Ces phénomènes s'accompagnent d'une réduction des niveaux des intégrines, de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et de leurs médiateurs en aval (par exemple PI3K, AKT, mTORC1 et P70S6K) (Buachan *et al.*, 2021).

### ►► La gliotoxine

La gliotoxine est un dipeptide cyclique de la classe des épipolythiodioxopipérazines. Un *cluster* de 13 gènes impliqué dans sa biosynthèse a été décrit chez *Aspergillus fumigatus* et sa biosynthèse est surtout induite et régulée par un facteur de transcription Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> finger, GliZ. D'autres facteurs tels que le pH, la température ou encore l'aération peuvent également influencer sa biosynthèse. La gliotoxine peut être rencontrée comme contaminant dans les fruits secs, le maïs, le sorgho ou encore dans les ensilages en alimentation animale.

Plusieurs propriétés potentiellement d'intérêt ont été décrites. Hormis ses propriétés fongicides et insecticides pour lutter contre les maladies des plantes, en particulier des maladies du riz comme le mildiou, la pyriculariose et le rabougrissement, la gliotoxine possède des propriétés intéressantes pour l'humain. Elle peut inhiber la prolifération des cellules tumorales et la réplication de l'ARN viral, induire l'apoptose des cellules stellaires hépatiques et entraver l'expression du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) (Scharf *et al.*, 2016). En ciblant le protéasome 20S responsable de la dégradation de la protéine IK-Bα se liant spécifiquement à NF-κB, la gliotoxine peut supprimer l'activité de NF-κB qui est étroitement associée à la fonction d'angiogenèse, à la réponse immunitaire et à la prolifération cellulaire (Ye *et al.*, 2021). Ce mécanisme explique le fait que la gliotoxine est capable de réprimer la fonction des cellules présentatrices d'antigènes et d'induire l'apoptose des monocytes, à l'origine des effets immunoévasifs sur les cellules T et les cellules présentatrices d'antigènes (Stanzani *et al.*, 2005). La gliotoxine pourrait également atténuer le développement de la fibrose hépatique et de la cirrhose dans un modèle de rat thioacétamide, par l'induction de l'apoptose des cellules stellaires hépatiques activées dans le foie (Scharf *et al.*, 2016). Enfin, en raison de son interaction avec les protéines membranaires, la gliotoxine est capable de pénétrer facilement et d'altérer la barrière hématoencéphalique (Patel *et al.*, 2018).

### ►► L'acide cyclopiazonique

L'acide cyclopiazonique (CPA), un composé de type acide indole-tétramique, est produit par plusieurs espèces de *Penicillium* et *Aspergillus*, la première espèce décrite comme productrice ayant été *Penicillium cyclopium*. Chez *P. camemberti* var. *camemberti*, un

*cluster* de 6 gènes impliqués dans la biosynthèse de CPA a été décrit, dont un gène codant pour l'enzyme clé, CpaA, une polycétide synthase-non-ribosomale peptide synthétase (PKS-NRPS) (Ropars *et al.*, 2020), alors qu'il s'agit d'un *cluster* de 7 gènes chez *Aspergillus oryzae* et *A. flavus* incluant un facteur de transcription putatif, CpaR (Shinohara *et al.*, 2011). L'espèce *P. camemberti* var. *caseifulvum* et des souches industrielles d'*A. oryzae* ne sont pas capables de produire cette mycotoxine, alors que *P. camemberti* var. *camemberti* et *A. flavus* sont productrices. Cela est dû à une mutation du gène codant pour l'enzyme clé CpaA qui la rend non fonctionnelle. Cette mutation peut être un marqueur d'adaptation de ces espèces au cours de leur domestication. En ce qui concerne l'occurrence de cette mycotoxine, elle est retrouvée dans plusieurs matrices, dont les céréales, les fruits à coque, les produits fermentés salés (fromages, salaisons, sauce soja...), les fruits, ainsi qu'en alimentation animale.

La toxicité *in vivo* du CPA a été étudiée chez de nombreuses espèces animales telles que les rongeurs, le porc et le poulet. Il s'agit d'un inhibiteur puissant, spécifique et réversible de l'ATPase activée par le calcium dans les réticulums sarcoplasmique et endoplasmique de différents tissus. Cependant, l'affinité de l'enzyme pour le CPA dépend de l'état conformationnel du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase. Chez le rat, les valeurs de  $\text{DL}_{50}$  ont été établies respectivement à 2,3 mg/kg p.c. et 36 mg/kg p.c., après administration intrapéritonéale et orale, respectivement à 13 mg/kg et 64 mg/kg chez la souris pour les mêmes voies d'administration.

Les études en toxicité chronique à moyen et long termes ont montré l'existence de plusieurs organes cibles comme les muscles, le foie et la rate. En ce qui concerne les autres mammifères, le porc est l'espèce la plus sensible. Aucun effet cancérigène ni génotoxique n'a été mis en évidence à ce jour. Parmi les autres effets toxiques décrits, le CPA a montré un potentiel immunomodulateur conduisant à des effets immunosuppresseurs. *In vitro*, le CPA inhibe la différenciation des macrophages humains (Hymery *et al.*, 2014). Les études subchroniques sur des rongeurs ont mis en évidence une lymphopénie après une administration intrapéritonéale. Des propriétés stimulantes du CPA sur la sécrétion de cytokines ont été observées *in vitro*. En effet, au niveau des macrophages murins WEHI-3, le CPA stimule la sécrétion d'IL-6 et des observations similaires ont été faites sur des macrophages péritonéaux de souris.

## ► Les mycotoxines trémorgènes

Les toxines trémorgènes forment un vaste groupe comprenant une vingtaine de composés, dont les principaux sont l'aflatrème, les fumitrimorgènes A et B, la paxilline, les pénitrèmes A et E, les roquefortines et la tryptoquivaline. Elles posent un problème préoccupant en santé humaine et animale (animaux de compagnie et d'élevage), car elles sont fréquemment identifiées dans le maïs, les fourrages et ensilages, ainsi que dans les viandes fermentées et les fromages. On peut citer l'exemple de la roquefortine C qui est retrouvée dans certains fromages bleus, en raison de l'utilisation de *Penicillium roqueforti* dans la maturation de ces fromages. Le *cluster* de gènes impliqués dans sa biosynthèse a été d'abord mis en évidence chez *P. chrysogenum* et implique des gènes corégulés dans la biosynthèse de la roquefortine C et la méléagrine (Garçia-Estrada *et al.*, 2011), alors que chez *P. roqueforti* la

voie ne contient que 4 gènes et un pseudogène permettant la biosynthèse de la seule roquefortine C (Kosalkova *et al.*, 2015).

Ces toxines sont qualifiées de trémorgènes compte tenu de leur neurotoxicité qui se manifeste par des tremblements et des crises épileptoïdes pouvant conduire à la mort. Ces symptômes neurologiques pourraient être dus à la capacité des toxines trémorgènes à stimuler la libération de neurotransmetteurs excitateurs (aspartate et glutamate) et à inhiber la sécrétion des neurotransmetteurs inhibiteurs comme l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

La roquefortine C est une mycotoxine ayant des propriétés neurotoxiques. Cette dicétopipérazine modifiée, qui présente une activité bactériostatique contre les bactéries Gram-positives, interagit par liaison au fer héminique avec le cytochrome p450 et interfère avec la synthèse de l'ARN. Elle présente également une toxicité aigüe sur les monocytes et cellules intestinales humaines, couplée à un effet synergique ou additif en coexposition avec l'acide mycophénolique (Fontaine *et al.*, 2016). Les études *in vitro* chroniques sur les cellules intestinales humaines ont montré une altération de la barrière intestinale (Hymery *et al.*, 2018).

### ►► L'acide mycophénolique

La voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique (MPA), qui implique 7 gènes regroupés au sein d'un *cluster* d'environ 24 kpb, a été mise en évidence chez *Penicillium brevicompactum* (Regueira *et al.*, 2011) et *P. roqueforti* (Del-Cid *et al.*, 2016 ; Gillot *et al.*, 2017). Chez *P. roqueforti*, le gène *mpaC*, codant pour une polycétide synthase, est une enzyme clé dans sa biosynthèse et la production de MPA est dépendante de la souche (Gillot *et al.*, 2017). De manière frappante, la structure des populations récemment décrites au sein de l'espèce *P. roqueforti* (Coton *et al.*, 2020 ; Crequer *et al.*, 2023) a démontré que toutes les souches appartenant à la population fromagère « non-Roquefort » ont perdu leur capacité à produire cette mycotoxine, ce qui peut être expliqué par une délétion de 174 pb dans le gène *mpaC* (Gillot *et al.*, 2017). Concernant l'occurrence de cette mycotoxine, elle a été le plus fréquemment décrite dans les produits laitiers (dont les fromages à pâte persillée), les produits de salaisons (saucissons, jambon séché...), les fruits et en alimentation animale, surtout dans le maïs et l'ensilage. Dans les ensilages, on retrouve souvent des contaminations fongiques par *P. roqueforti*, mais aussi par une autre espèce productrice de MPA, *Byssoschlamys nivea*.

Le MPA ou ses formes associées (mycophénolate mofétil, MMF) étant utilisés pour des applications médicales, leur mécanisme d'action est bien décrit. Il repose sur l'interférence de la synthèse des purines par l'inhibition de l'inosine-5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH). Les effets cytotoxiques du MPA ont été étudiés sur plusieurs types de cellules humaines, en particulier sur les lymphocytes et les monocytes. Dans ce cadre, il a été observé une inhibition de la prolifération des cellules monocytaires, un arrêt de la division du cycle cellulaire en phase S et une augmentation de l'apoptose sur des lignées cellulaires lymphocytaires T (MOLT-4) et monocytaires (THP-1 et U937). Il a été également rapporté que le MPA supprimait

la maturation des cellules dendritiques, induisait la différenciation de la lignée cellulaire monocyte-macrophage humaine, diminuait l'expression de l'interleukine-1 (IL-1) et augmentait l'expression de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1. Ces effets cytotoxiques du MPA présentent des propriétés pertinentes (antiprolifératives, immunosuppressives et anti-inflammatoires) pour le traitement de la transplantation et de l'arthrite rhumatoïde. La co-occurrence avec la roquefortine C a incité Fontaine et ses collaborateurs (2016) à évaluer leur toxicité aigüe *in vitro* sur cellules intestinales et immunitaires, en montrant notamment un effet synergique ou additif en fonction des concentrations.

## ►► La toxine PR

La toxine PR, un sesquiterpène bicyclique de la classe des érémodiphilanes, a été décrite pour la première fois comme métabolite secondaire de *P. roqueforti*. Elle est également produite par *Penicillium rubens* (espèce proche de *P. chrysogenum*). Cette mycotoxine est synthétisée par l'enzyme aristolochène synthase à partir du farnésyl-pyrophosphate. Grâce aux données récentes du séquençage du génome de *P. roqueforti*, la voie de biosynthèse a été décrite et inclut 11 gènes dans une région d'environ 22,4 kpb (Hidalgo *et al.*, 2017). Lors de la biosynthèse, d'autres érémodiphilanes, comme les érémodiphilanes A et B, sont également synthétisés et peuvent parfois s'accumuler lors de cultures de *P. roqueforti*. La production ou l'accumulation de ces composées est variable et dépendante de la souche chez *P. roqueforti* (Gillot *et al.*, 2017). La toxine PR se retrouve dans différentes matrices, en particulier l'ensilage ou le maïs utilisé pour l'alimentation animale, ce qui peut poser un risque sanitaire du fait de sa toxicité. Elle peut également être détectée dans d'autres denrées alimentaires telles que les céréales ou le fromage. Dans des matrices comme les fromages à pâte persillée, elle n'est pas considérée comme stable et est convertie en d'autres composés tels que la PR-imine, la PR-acide ou encore la PR-amide.

Concernant sa toxicité, la toxine PR est considérée comme la plus toxique parmi toutes les mycotoxines produites par *P. roqueforti*. De manière générale, les animaux consommant de la nourriture contaminée peuvent développer des symptômes comme l'inappétence, l'arrêt de la rumination ou bien des gastroentérites. Bien que la toxine PR soit identifiée depuis longtemps, la littérature ne contient que peu de données sur sa toxicité et les mécanismes toxicologiques impliqués. Des études antérieures réalisées il y a près de 40 ans ont montré qu'elle est mortelle pour les rats et les souris et que les valeurs de la dose létale médiane (DL<sub>50</sub>) sont respectivement de 115 et 5,8 mg/kg après administration par voie orale chez le rat et par voie intrapéritonéale chez la souris. Les dérivés de la toxine PR tels que la PR-imine se sont révélés moins toxiques chez les souris après une exposition aigüe. En ce qui concerne les études de génotoxicité, la toxine PR a induit des liaisons transversales ADN-protéine dans la chromatine de cellules cultivées et de noyaux de foie de rat isolés. Elle a été précédemment décrite en tant qu'inhibiteur, à des concentrations élevées, de l'activité succinate-cytochrome c-réductase, principalement par l'action inhibitrice sur la succinate déshydrogénase. Ce mécanisme pourrait expliquer l'induction de la nécrose cellulaire sur les cellules intestinales et immunitaires

humaines, qui est également associée à une activation transcriptionnelle des cytokines pro-inflammatoires (Hymery *et al.*, 2017).

## ►► La stérigmatocystine

La stérigmatocystine (STE) est un des précurseurs de l'aflatoxine B1. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de STE font partie de la voie de biosynthèse des aflatoxines, qui comprend 25 gènes dans une région d'environ 70 kpb (voir chapitre 1). Une autre mycotoxine, la versicolorine A, est également un intermédiaire dans cette voie de biosynthèse et peut aussi contaminer des aliments. En ce qui concerne la STE, elle contamine de nombreuses matrices au champ, mais aussi des produits alimentaires, dont les grains et céréales, le riz, le café, les épices et les produits laitiers. Elle se retrouve également dans différentes matrices utilisées en alimentation animale.

La STE est cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires et animales, et elle possède, à l'image des aflatoxines, une activité immunomodulatrice et mutagène, en induisant en outre une inhibition du cycle cellulaire (Díaz Nieto *et al.*, 2018). Les études ont montré qu'elle induit des tumeurs chez plusieurs espèces animales, telles que la souris, le rat, le singe et le poisson, après des administrations orales, intrapéritonéales, sous-cutanées et cutanées. Les tumeurs malignes comprennent des carcinomes hépatocellulaires, des hémangiosarcomes du foie et des adénomes pulmonaires (Efsa, 2013 ; Pfeiffer *et al.*, 2014). Le mécanisme de mutagénicité est lié à la formation du groupe époxy, qui est très réactif. Cette espèce réactive peut être liée de manière covalente à l'ADN en générant des adduits STE-N7-guanine. Un autre mécanisme a été toutefois proposé par Pfeiffer *et al.* (2014), qui ont suggéré que l'hydroxylation du cycle aromatique générerait un catéchol. Ce dernier peut réagir avec l'ADN. La STE est classée dans le groupe 2B du CIRC, comme agent possiblement cancérigène pour l'humain.

## ►► Conclusion

La présence dans l'alimentation humaine ou animale de nombreuses mycotoxines non réglementées produites par les espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* a été rapportée. Leur présence dans ces matrices est liée à une contamination fongique en amont, qui peut survenir à tous les stades de la chaîne alimentaire, en fonction des espèces toxigéniques et des substrats. Leur production dépend notamment des conditions environnementales (c.-à-d. température, humidité relative, CO<sub>2</sub>, lumière...). Le réchauffement climatique pourrait donc augmenter le développement d'espèces toxigènes et la production des mycotoxines. Les futurs défis concernant les mycotoxines évoquées dans ce chapitre sont, d'une part, d'acquérir une meilleure connaissance des conditions favorisant le développement fongique ainsi que des interactions entre espèces, mais également de la biosynthèse de ces mycotoxines. D'autre part, il apparaît essentiel d'évaluer leur toxicité seule ou en mélange, en exposition chronique et aiguë, afin de mieux évaluer les risques.

## ► Références

- Buachan P., Namsa-Aid M., Sung H.K. *et al.*, 2021. Inhibitory effects of terrein on lung cancer cell metastasis and angiogenesis. *Oncology Reports*, 45, 94, <https://doi.org/10.3892/or.2021.8045>.
- Coton E., Coton M., Hymery N. *et al.*, 2020. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews*, 34, 59, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>.
- Coton M., Hymery N., Piqueras J. *et al.*, 2019. *Monascus* spp. used in wheat kernel solid-state fermentations: growth, extralite production and citrinin cytotoxicity. *World Mycotoxins Journal*, 12, 223-232, <https://doi.org/10.3920/wmj2018.2425>.
- Crequer E., Ropars J., Jany J.L. *et al.*, 2023. A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, 16, 1438, <https://doi.org/10.1101/2023.01.21.524518>.
- Del-Cid A., Gil-Duran C., Vaca I. *et al.*, 2016. Identification and functional analysis of the mycophenolic acid gene cluster of *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 11, e0147047, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147047>.
- Díaz Nieto C.H., Granero A.M., Zon M.A. *et al.*, 2018. Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 460, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.057>.
- Efsa, 2013. Scientific Opinion on Risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *Efsa Journal*, 11, 3254, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3254>.
- Fontaine K., Mounier J., Coton E. *et al.*, 2016. Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin Journal*, 9, 41, <https://doi.org/10.3920/wmj2014.1861>.
- García-Estrada C., Ullán R.V., Albillos S.M. *et al.*, 2011. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chemistry & Biology*, 18, 1499-1512, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.012>.
- Geisen R., Schmidt-Heydt M., Touhami N. *et al.*, 2018. New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium*. *Current Opinion in Food Science*, 23, 23, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.001>.
- Gillot G., Jany J.L., Poirier E. *et al.*, 2017. Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 141, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001>.
- Hidalgo P.I., Poirier E., Ullán R.V. *et al.*, 2017. *Penicillium roqueforti* PR toxin gene cluster characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 2043, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7995-5>.
- Hymery N., Masson F., Barbier G. *et al.*, 2014. Cytotoxicity and immunotoxicity of cyclopiazonic acid on human cells. *Toxicology in vitro*, 28, 940, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.003>.
- Hymery N., Puel O., Tadrist S. *et al.*, 2017. Effect of PR toxin on human cells: an *in vitro* study. *World Mycotoxin Journal*, 10, 375, <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2196>.
- Hymery N., Mounier J., Coton E., 2018. Effect of *Penicillium roqueforti* mycotoxins on Caco-2 cells: acute and chronic exposure. *Toxicology in Vitro*, 48, 188, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.017>.
- Kosalkova K., Dominguez-Santos R., Coton M. *et al.*, 2015. A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrín in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7601, <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6676-0>.
- Patel R., Hossain M.A., German N. *et al.*, 2018. Gliotoxin penetrates and impairs the integrity of the human blood-brain barrier *in vitro*. *Mycotoxin Research*, 34, 257, <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0320-7>.
- Pfeiffer E., Fleck S.C., Metzler M., 2014. Catechol formation: a novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology*, 27, 2093, <https://doi.org/10.1021/tx500308k>.
- Regueira T.B., Kildegaard K.R., Hansen B.G. *et al.*, 2011. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3035, <https://doi.org/10.1128/AEM.03015-10>.

- Ropars J., Didiot E., Rodríguez De La Vega R.C. *et al.*, 2020. Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *Current Biology*, 30, 4441-4443, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>.
- Samson R.A., Houbraken J., Thrane U. *et al.*, 2019. *Food and Indoor Fungi*, 2<sup>e</sup> édition, Utrecht, Pays-Bas, CBS Laboratory manual, 390 p.
- Scharf D.H., Brakhage A.A., Mukherjee P.K., 2016. Gliotoxin-bane or boon? *Environmental Microbiology*, 18, 1096, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13080>.
- Shinohara Y., Tokuoka M., Koyama Y., 2011. Functional Analysis of the Cyclopiazonic Acid Biosynthesis Gene Cluster in *Aspergillus oryzae* RIB 40. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75, 2249, <https://doi.org/10.1271/bbb.110467>.
- Stanzani M., Orciuolo E., Lewis R. *et al.*, 2005. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*, 105, 2258, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3421>.
- Union européenne, 2023. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915>.
- Ye W., Liu T., Zhang W. *et al.*, 2021. The Toxic Mechanism of Gliotoxins and Biosynthetic Strategies for Toxicity Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 13510, <https://doi.org/10.3390/ijms222413510>.

# Principales mycotoxines produites par les champignons endophytes de graminées

Philippe Guerre

## ►► Introduction

Est qualifié d'endophyte tout micro-organisme qui se développe pour tout ou partie à l'intérieur d'un végétal. Ce mode de développement est décrit pour différentes espèces fongiques du genre *Neotyphodium*, parmi lesquelles les espèces *N. coenophialum* et *N. lolii*, respectivement rencontrées dans la fétuque élevée (*Lolium arundinaceum*) et le ray-grass anglais (*Lolium perenne*), sont les plus connues. En échange d'une protection et de nutriments, *Neotyphodium* confère à la plante divers avantages comme une meilleure tolérance aux stress et aux ravageurs, notamment due à la production de plus d'une quarantaine de mycotoxines. L'ergovaline et le lolitrem B sont les plus toxiques pour les animaux herbivores et sont à l'origine d'un nombre varié d'intoxications, dont certaines ont été observées en France. De nombreuses herbacées fourragères endophytées se sont développées au cours du temps dans différents pays, les plus récentes produisant des mycotoxines insecticides et nématocides sans danger connu pour les herbivores. Après avoir brièvement présenté les champignons endophytes des graminées, nous envisagerons les mycotoxines produites et leur toxicité dans le contexte de la production fourragère française.

## ► Les champignons endophytes de graminées

Entre 20 et 30 % des graminées de la famille des *Poaceae* seraient colonisées par différents champignons de la famille des *Clavicipitaceae*, dont *Atkinsonella*, *Balansia*, *Epichloë*, *Myriogenospora*, *Neotyphodium*, *Nigrocornus* et *Parepichloë* pour les plus connus (Cheplick et Faeth, 2009). La spécificité de l'endophyte pour une ou plusieurs espèces végétales est variable, des hybridations fongiques sont observées. L'association champignon et plante, principalement décrite pour *N. coenophialum* et *L. arundinaceum*, et *N. lolii* et *L. perenne*, est de type mutualiste : le champignon est sous une forme strictement endophyte, il croît dans l'ovule et colonise les semences, sa reproduction est asexuée. Des interactions de type antagoniste et de type pléiotropique sont également décrites (Repussard *et al.*, 2013).

Le genre *Neotyphodium*, forme anamorphe (asexuée) du genre *Epichloë* (Leuchtman *et al.*, 2014), est particulièrement étudié, car à l'origine de la production de mycotoxines (Schardl *et al.*, 2012). La spécificité du *Neotyphodium* vis-à-vis de son hôte est forte, mais la fréquence d'infestation est variable. En Amérique et en Afrique du Nord, 70 à 100 % des graminées sauvages seraient infectées, mais peu d'associations sont trouvées. En Europe centrale et du Sud et en Asie, le taux d'endophytes varie de 55 à 60 %, alors qu'en Europe du Nord et en Océanie moins de 35 % des graminées seraient endophytées.

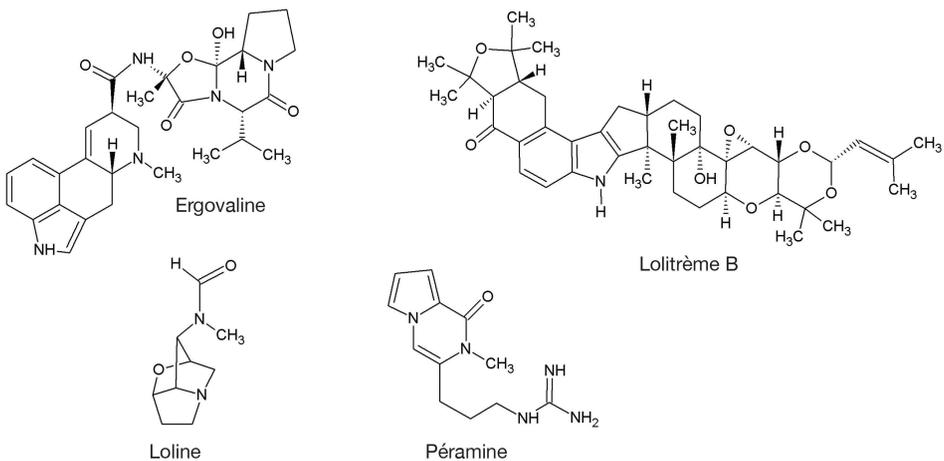
*Neotyphodium* est transmis par les semences, de la plante mère à la plante fille (Repussard *et al.*, 2013). Bien que *Neotyphodium* colonise l'espace intercellulaire de toutes les parties de la graminée, un gradient de concentration croissant de la base à l'apex a été mis en évidence. Les *Neotyphodium* produisent des hormones végétales et enzymes qui modifient la photosynthèse, la conductance stomatique et l'ajustement osmotique. En présence de stress, l'endophyte apporterait une meilleure résistance à la sécheresse, diminuerait le taux de fertilisation nécessaire à la croissance végétale et conférerait une meilleure capacité de compétition interspécifique (Schardl *et al.*, 2012). Les effets bénéfiques de l'endophyte pour la plante varient toutefois beaucoup selon l'endophyte et le génotype de l'hôte. La production de mycotoxines permettrait une meilleure résistance aux ravageurs de type insectes ou nématodes, et également aux herbivores. Ainsi, la présence de *Neotyphodium* dans différentes variétés de fétuques et ray-grass est exploitée depuis des décennies en monoculture fourragère en Amérique, Australie, Nouvelle-Zélande. Comme ces monocultures ont été aussi historiquement associées à de nombreux cas de mycotoxicoses cliniques et à des pertes économiques majeures, cela a conduit au développement et à la commercialisation de variétés fourragères endophytées productrices de mycotoxines insecticides, mais non productrices de mycotoxines toxiques pour les vertébrés herbivores (Guerre, 2015 et 2016).

À l'inverse de ce qui est observé en Amérique, Australie ou Nouvelle-Zélande, la culture de variétés fourragères endophytées n'a pas été commercialement exploitée en France et, si de telles variétés devaient être présentées à l'inscription, il est probable qu'elles correspondraient à celles ne produisant pas de mycotoxines toxiques pour le bétail. Aussi, la problématique française des mycotoxines produites par endophytes concerne les variétés sauvages ou les variétés non fourragères. Plusieurs groupes et espèces d'endophytes ont été identifiés sur les graminées sauvages françaises (Gibert

*et al.*, 2012). Le taux moyen de *Neotyphodium* sur le ray-grass anglais est de 70 %, mais il varie de 1 à 100 %. Il en va de même pour de nombreuses autres espèces de graminées (Repussard *et al.*, 2013).

## ► Les mycotoxines produites par le genre *Neotyphodium*

À la fin du XIX<sup>e</sup> et au début du XX<sup>e</sup> siècle, plusieurs cas d'intoxication d'équins, ovins et bovins ont été répertoriés en Amérique, Asie, Europe, et Océanie, suite à la consommation d'herbacées contaminées. Des appellations évocatrices, telles « herbe endormie », « herbe ivre » ou « herbe tremblante », ont alors vu le jour. Dans les années 1980-1990, ces toxicoses ont été reliées à la production d'alcaloïdes, dont la nature et la teneur varient fortement (Guerre, 2015 et 2016). Plus de la moitié des espèces de *Neotyphodium* répertoriées produirait des alcaloïdes (figure 11.1) appartenant aux groupes des alcaloïdes de l'ergot, des indole-diterpènes, des 1-aminopyrrolizidines (lollines) et des pyrrolopyrazines (péramine) (Guerre, 2015). Les alcaloïdes de l'ergot et les indoles-diterpènes sont des molécules possédant des acides aminés à cycle aromatique. Leurs effets biologiques concernent principalement les mammifères herbivores. Les lolines et la péramine sont de petites molécules hétérocycliques ou aliphatiques, surtout toxiques pour les insectes et nématodes.



**Figure 11.1.** Principales mycotoxines produites par le genre *Neotyphodium*.

Depuis les années 1980, des études ont été menées pour comprendre et dissocier le rôle des mycotoxines du rôle du *Neotyphodium* dans la symbiose ; de nombreuses variétés endophytées non productrices d'alcaloïdes de l'ergot (AE) et d'indole-diterpènes (ID) ont été développées (Forte *et al.*, 2020 ; Hudson *et al.*, 2021). Bien que difficile à démontrer, le rôle des AE et des ID serait de conférer aux plantes une résistance à la pâture par diminution de l'appétence et évitement de l'ensemble du

troupeau, qui contribuerait à expliquer le faible nombre de cas d'intoxication sur prairies permanentes. En revanche, l'effet des mycotoxines sur les ravageurs suggère une augmentation de la mortalité des adultes et une inhibition de la croissance des larves. D'autres effets bénéfiques pour les plantes, telles une meilleure résistance aux pathogènes (champignon, levures, bactéries, virus) et une meilleure tolérance au stress hydrique, sont évoqués.

## Les alcaloïdes de l'ergot

Les alcaloïdes de l'ergot (AE) regroupent trois types : les clavines, les dérivés amides (ergoamides) et les dérivés peptidiques (ergopeptines) de l'acide D-lysergique. Les ergopeptines peuvent représenter jusqu'à 50 % des AE dans la fétuque élevée. Ce sont des peptides non ribosomiques contenant de l'acide D-lysergique et trois acides aminés qui varient d'un composé à l'autre. Ils sont synthétisés par un complexe enzymatique multifonctionnel qui regroupe un très grand nombre de gènes de différents *clusters* (Repussard *et al.*, 2013). L'ergovaline est la plus abondante (Guerre, 2015).

Du fait d'une analogie structurale avec la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine, les AE présentent une forte neurotoxicité pour les vertébrés. Leurs différences physicochimiques leur confèrent des différences pharmacologiques et toxicocinétiques. Les ergopeptines seraient les principales responsables des symptômes de *fescue toxicosis* chez les animaux consommant de la fétuque élevée. D'autres alcaloïdes de ce groupe peuvent avoir des effets importants.

## Les indole-diterpènes

Les indole-diterpènes (ID) appartiennent au groupe de la paxilline dont on différencie 9 types structuraux : les pénitrèmes, les janthitrèmes, les lolitrèmes, l'affatrème, la paxilline, les paspalines/paspalinines/paspalitrèmes, les terpendoles, les shearinines et les sulpinines (Guerre, 2016). Leur synthèse, qui implique une dizaine de gènes répartis dans trois *clusters*, part d'un tryptophane (noyau indole). L'expression du gène *ltmM*, impliqué dans la synthèse de la paspaline, précurseur commun, serait fortement exprimée dans l'épillet pendant la phase préanthese, puis après la fécondation ainsi que pendant la germination (Repussard *et al.*, 2013), conduisant à des variations de concentrations en mycotoxines selon le stade de développement des plantes.

Les indoles-diterpènes sont responsables d'une modification de la perméabilité des canaux ioniques qui les rend trémorgènes chez les mammifères et toxiques chez les insectes. Les lolitrèmes A, B et F sont considérés comme les plus trémorgènes.

## Autres toxines

Les 1-aminopyrrolizidines ou lolines proviennent de l'assemblage de deux acides aminés : la proline et l'homosérine. Une dizaine de composés sont synthétisés par les *Neotyphodium* et exercent une action nématocide et insecticide comparable à

celle de la nicotine (Repussard *et al.*, 2013 ; Schramm *et al.*, 2019). La toxicité des lolines pour les vertébrés est considérée comme faible.

La péramine est l'unique mycotoxine du groupe des pyrrolopyrazines produite par *Neotyphodium*. Sa synthèse n'impliquerait qu'un complexe enzymatique. Cette molécule possède des propriétés toxiques et répulsives contre de nombreuses espèces d'insectes, mais est considérée comme peu toxique pour les vertébrés (Scharld *et al.*, 2013).

## ► Variations des concentrations en mycotoxines dans la plante

La répartition des mycotoxines dans la plante varie en fonction du tissu, du stade végétatif, du génotype de la plante et de l'endophyte, et de facteurs extrinsèques tels que l'eau, les minéraux, la température, le CO<sub>2</sub> atmosphérique, les ultraviolets, le pâturage et la fauche. En France, différentes études sur fétuque élevée et ray-grass anglais endophytés révèlent que les teneurs maximales en ergovaline et lolitrème B sont atteintes à la fin du printemps et/ou à l'automne (Repussard *et al.*, 2014a et b). Elles peuvent alors atteindre ou dépasser les seuils réputés toxiques pour ovins et bovins. Ces variations saisonnières sont similaires à celles observées pour les mêmes plantes aux États-Unis, en Nouvelle-Zélande et Australie.

Ergovaline se concentre dans la tige et la gaine foliaire des feuilles d'âge intermédiaire de la fétuque élevée et du ray-grass anglais. Le limbe des feuilles est la partie qui en contient le moins. Les teneurs les plus élevées sont mesurées dans les tiges (0,4-3 mg/kg de matière sèche, MS) et les graines (8-10 mg/kg MS). Le stade végétatif est déterminant : sur prairies non pâturées, le maximum est observé au printemps au cours de la formation des graines (Repussard *et al.*, 2014a et 2013) ; sur les prairies pâturées, il survient en été et à l'automne. Le risque d'intoxication animale varie ainsi selon la période de l'année et le type d'élevage. De nouvelles variétés fourragères présentant les avantages de l'endophytisme pour la plante, sans en présenter les inconvénients pour les herbivores, sont développées (Hudson *et al.*, 2021).

Les concentrations les plus élevées en lolitrème B se trouvent dans les tissus les plus âgés et sénescents, proches du talle (jusqu'à 6 mg de lolitrème B/kg MS) et dans les graines, où elles peuvent représenter jusqu'à 60 % de la quantité dans la plante entière (Repussard *et al.*, 2014a). Les tissus les plus jeunes ont les teneurs les plus basses (moins de 1 mg/kg MS).

La capacité de production des ID varie également selon le génotype de *Neotyphodium*. Comme pour la fétuque, des variétés endophytées de ray-grass ne produisant pas de lolitrème B sont aujourd'hui commercialisées (Forte *et al.*, 2020).

Les concentrations en lolines sont croissantes de la base à la partie apicale de la plante. Les parties végétatives contiennent moins de 40 % des quantités totales, alors que les épis ou panicules en contiennent de 60 à 80 %. Les teneurs en lolines peuvent atteindre 20 000 mg/kg MS (Repussard *et al.*, 2013).

De tous les alcaloïdes, la péramine est celui dont la répartition dans la plante hôte est la plus homogène, pouvant même se trouver dans les racines. Cette homogénéité

serait due à son hydrosolubilité, permettant sa dispersion dans toute la plante. Les variations saisonnières des concentrations en péramine seraient moins déterminantes que pour les autres mycotoxines (Repussard *et al.*, 2013). Dans le ray-grass anglais endophyté par *N. lolii*, les niveaux en péramine sont voisins de 20 mg/kg MS de la base à la pointe des feuilles.

## ► Principales mycotoxicooses

Les circonstances des intoxications par les mycotoxines produites par les champignons endophytes sont très variables. Dans les pays où la culture de fétuque ou ray-grass anglais endophytés par *Neotyphodium* non sélectionnés est réalisée, comme Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande, les intoxications sont graves et fréquentes, et occasionnent des pertes économiques importantes. La problématique est bien connue et est à l'origine de la sélection de graminées endophytées productrices de mycotoxines insecticides, peu toxiques pour les vertébrés. À l'inverse, en France, où les graminées fourragères commerciales historiques ne contiennent pas d'endophytes sauvages, les intoxications sont rares.

### Intoxications par la fétuque élevée

Des cas de boiteries associés à la consommation de fétuque, qualifiés de *fescue foot disease*, ont été rapportés sur bovins en Amérique du Nord, Australie et Nouvelle-Zélande au XIX<sup>e</sup> et début du XX<sup>e</sup> siècle, avant que leur étiologie ne soit attribuée à l'ergovaline produite par *N. coenophialum* (Zbib *et al.*, 2014a). L'affection se caractérise par des boiteries débutant habituellement au niveau des postérieurs et pouvant conduire à une nécrose du pied. Elle est principalement décrite en hiver alors que l'ergotisme, de symptomatologie proche, survient en été.

Deux cas de toxicoses liées à la consommation de fétuque élevée en culture monospécifique ont été décrits en France (Repussard *et al.*, 2013). Le premier cas sur bovins charolais en Vienne, au cours de deux étés successifs particulièrement chauds et secs, s'est manifesté par de l'hyperthermie, un amaigrissement, une boiterie des postérieurs et une nécrose de l'extrémité caudale. *N. coenophialum* était présent sur plus de 50 % des plants, aucun dosage de toxine n'a été réalisé. Le deuxième cas sur une vache laitière, dans les Landes en hiver, a entraîné une gangrène sèche des extrémités associée à de l'hyperthermie, de l'anorexie, de l'agalaxie. *N. coenophialum* était présent à hauteur de 15 % sur la prairie au printemps, aucun dosage d'alcaloïde n'a été réalisé.

Le *Summer syndrome*, le *fat necrosis syndrome*, une baisse de lactation et une altération des fonctions de reproduction sont des troubles plus rares également attribués à cette intoxication. Le *Summer Slump* ou *Summer syndrome* est caractérisé par une diminution du gain de poids, une intolérance à la chaleur, une salivation excessive, une croissance anormale des poils, une élévation de la température, de la nervosité, une diminution de la production laitière et des problèmes de fécondité. Il concernerait bovins, ovins et équins, se traduisant principalement chez

ces derniers par un épaissement du placenta conduisant à la mort du poulain peu avant la naissance, et quelquefois à la mort de la mère, ou à une agalaxie. Des températures anormalement élevées au cours d'étés particulièrement chauds sont considérées comme déterminantes dans la survenue de l'affection (Zbib *et al.*, 2014a). La nécrose lipidique est une affection rare observée chez un grand nombre d'espèces animales, dont le mécanisme physiopathologique est une modification de la composition en acides gras des masses graisseuses abdominales, au sein desquelles la vascularisation devient déficiente. Bien que différents facteurs soient suspectés d'être à l'origine de ces lésions, des reproductions expérimentales réalisées sur bovins consommant de la fétuque endophytée suggèrent son implication (Zbib *et al.*, 2014a).

## Intoxications par le ray-grass anglais

Des tremblements faisant suite à la consommation de ray-grass par les herbivores et connus sous le nom de *rye grass staggers disease* sont décrits depuis le début du xx<sup>e</sup> siècle en Nouvelle-Zélande. Observés sur ovins, bovins et équins, ces symptômes sont également observés lors de la consommation d'ergot. Ils surviennent sur ray-grass lors de la consommation de la partie basse des plantes et des hampes florales, notamment à la suite d'une période de sécheresse (Zbib *et al.*, 2014a). Différentes altérations biochimiques attribuables à la présence d'ergovaline dans les fourrages contaminés sont aussi observées (Zbib *et al.*, 2015).

Quatre cas impliquant du foin ou des pâtures de ray-grass anglais endophyté ont été répertoriés en France (Repussard *et al.*, 2013). À titre d'exemple, un premier cas survenu l'été sur un troupeau de vaches laitières dans les Côtes-d'Armor a conduit à des symptômes de type tremblements, incoordination motrice, perte de poids après deux semaines de consommation de ray-grass anglais. Une contamination de 30 % de la parcelle par *Neotyphodium* et des teneurs de 30 et 500 µg/kg MS d'ergovaline et de lolitrem B y ont été mesurées. Un autre cas, caractérisé par des tremblements de la tête et du cou, une démarche ébrieuse et des contractures des postérieurs, est apparu en été dans un centre d'insémination artificielle sur des taureaux, à la suite de la distribution de fourrage de ray-grass anglais cultivé pour la production de semences. Des teneurs de 3 000 à 5 000 µg/kg MS de lolitrem B y ont été mesurées.

## ►► Toxicocinétique et mécanismes d'action

Les mycotoxicoses liées à la consommation de fourrages endophytés sont des affections complexes dont les toxines en cause sont multiples, rendant difficile l'identification d'un agent étiologique unique. Les reproductions expérimentales, souvent réalisées par distribution de graines endophytées plutôt que de fourrages, ont permis de fixer des seuils de toxicité. Les effets des différents alcaloïdes en mélanges restent toutefois largement méconnus, et même si les lolines et la péramine ne sont pas considérées comme des causes majeures dans les cas spontanés de mycotoxicoses, aucune évaluation de leur innocuité n'a, à proprement parler, été réalisée.

## ***Fescue foot disease* et ergovaline**

Des intoxications expérimentales réalisées sur ovins et bovins ont permis d'établir des seuils toxiques de 500 à 1 000  $\mu\text{g}$  d'ergovaline par kilogramme d'aliment. Ces seuils sont des moyennes, le jeune âge et les températures extrêmes (hautes ou basses) étant des facteurs aggravants ; la production de lait serait à l'origine d'une meilleure tolérance. L'effet de la durée d'exposition est complexe, une adaptation des animaux ayant été décrite dans certaines études. Enfin, les facteurs génétiques et le microbiote intestinal sont des facteurs importants de sensibilité, conduisant à la sélection de bovins plus résistants (Koester *et al.*, 2020). La prolactinémie est le principal biomarqueur d'exposition, respectivement diminuée dès la dose de 300 et 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'aliment respectivement chez les bovins et ovins (Zbib *et al.*, 2014a).

L'ergovaline présente des analogies structurales avec la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine, à l'origine d'effets périphériques et centraux. Elle présente une forte activité vasoconstrictrice qui se manifeste plus au niveau des veines que des artères, et serait principalement liée à fixation de la toxine aux récepteurs sérotoninergiques de type 2, l'effet alpha-1 adrénergique étant moindre. Les vasoconstrictions sont longues à apparaître et longues à disparaître. Elles sont à l'origine d'une anoxie des tissus périphériques, qui, exacerbée par le froid, conduit à une gangrène sèche des extrémités, selon un mécanisme similaire à l'ergot de seigle. Des effets digestifs seraient responsables d'une inhibition des contractions du réticulo-rumen, à l'origine de baisses de gain moyen quotidien et de digestibilité. Étant un alcaloïde, l'ergovaline diffuse dans le système nerveux, où elle peut exercer une action centrale, dont l'effet le plus caractéristique est l'inhibition de la libération de prolactine.

La toxicocinétique de l'ergovaline n'est que partiellement connue. Son absorption orale est difficile à quantifier du fait d'un fort effet de premier passage conduisant à la formation d'acide lysergique, qui peut être dosé dans les urines des animaux intoxiqués. L'ergovaline n'est pas retrouvée dans le lait ou les muscles des animaux exposés (Zbib *et al.*, 2014b).

## ***Rye grass stagger disease* et lolitrème B**

Chez les ovins et bovins, des signes de tremblement ou de raideur des membres sont observés quelques jours après la consommation d'aliments contenant de 2 000 à 2 500  $\mu\text{g}$  de lolitrème B par kilogramme de matière sèche. Des doses voisines de 1 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  seraient assez bien tolérées chez les brebis en lactation, mais à l'origine d'une réduction de gain de poids chez les agneaux. Les équins seraient plus sensibles (Zbib *et al.*, 2014a). Bien que coproduite dans le ray-grass endophyté, l'ergovaline ne serait pas présente à des teneurs suffisantes pour entraîner de signes autres qu'une chute de la prolactinémie (Zbib *et al.*, 2015).

L'action trémorgène du lolitrème B serait due à une inhibition des canaux potassiques dépendant des ions calcium (*BK channels*). Ces canaux, présents au niveau des neurones et des muscles, jouent un rôle dans le contrôle de l'excitabilité. Le lolitrème B bloquerait les canaux potassiques par fixation à la sous-unité  $\beta 4$ , conduisant à une augmentation de l'excitabilité cellulaire et aux tremblements. Cet effet

pourrait être amplifié par une fixation directe du lolitrème B aux récepteurs GABA de type A, sur le site des benzodiazépines, conduisant à un blocage du récepteur et à une augmentation de l'excitabilité. Des effets centraux secondaires à une action sur les récepteurs à l'acide aspartique et au glutamate ont également été évoqués. Enfin, le lolitrème B pourrait avoir des effets cholinergiques en stimulant les récepteurs nicotiques musculaires et les récepteurs muscariniques du réseau rumen (Zbib *et al.*, 2014a).

La toxicocinétique du lolitrème B est un peu mieux connue que celle de l'ergovaline. L'absorption de la molécule est faible, mais son excrétion sous forme inchangée persiste plusieurs jours, une demi-vie d'élimination de 38 heures ayant été mesurée chez la vache en lactation. L'excrétion lactée du lolitrème B a été rapportée chez les ovins, les caprins et les bovins, de même que sa présence dans la graisse musculaire des bouvillons (Zbib *et al.*, 2015).

## ►► Conclusion

Le développement symbiotique de champignons dans les plantes est spécifique et différent de la plupart des modes de contamination fongique à l'origine de la production de mycotoxines. L'endophyte confère des avantages écologiques à la plante, qui sont exploités dans certains pays à travers des variétés commerciales. De ce fait, l'importance et les circonstances des intoxications sont excessivement variables selon les régions du monde. En France, bien qu'un taux important d'endophytisme soit rapporté sur des variétés sauvages de graminées, très peu de cas de toxicoses ont été répertoriés.

## ►► Références

- Cheplick G., Faeth S., 2009. *Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis*, New York, Etats-Unis, University Press., 256 p.
- Forte F.P., Schmid J., Dijkwel P.P. *et al.*, 2020. Fungal Endophyte Colonization Patterns Alter Over Time in the Novel Association Between *Lolium perenne* and *Epichloë* Endophyte AR37. *Frontiers in Plant Science*, 11, 570026, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.570026>.
- Gibert A., Volaire F., Barre P. *et al.*, 2012. A fungal endophyte reinforces population adaptive differentiation in its host grass species. *New Phytologist*, 194, 561, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04073.x>.
- Guerre P., 2015. Ergot alkaloids produced by endophytic fungi of the genus *Epichloë*. *Toxins*, 7, 773, <https://doi.org/10.3390/toxins7030773>.
- Guerre P., 2016. Lolitrem B and Indole Diterpene Alkaloids Produced by Endophytic Fungi of the Genus *Epichloë* and Their Toxic Effects in Livestock. *Toxins*, 8, 47, <https://doi.org/10.3390/toxins8020047>.
- Hudson D., Mace W., Popay A. *et al.*, 2021. Genetic Manipulation of the Ergot Alkaloid Pathway in *Epichloë festucae* var. *lolii* and Its Effect on Black Beetle Feeding Deterrence. *Toxins*, 13, 76, <https://doi.org/10.3390/toxins13020076>.
- Koester L.R., Poole D.H., Serão N.V.L. *et al.*, 2020. Beef cattle that respond differently to fescue toxicosis have distinct gastrointestinal tract microbiota. *PLoS One*, 15, e0229192, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229192>.

- Leuchtman A., Bacon C.W., Schardl C.L. *et al.*, 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106, 202, <https://doi.org/10.3852/13-251>.
- Repussard C., Zbib N., Tardieu D. *et al.*, 2013. Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française. *Revue de médecine vétérinaire*, 164, 583-606.
- Repussard C., Zbib N., Tardieu D. *et al.*, 2014a. Endophyte infection of tall fescue and the impact of climatic factors on ergovaline concentrations in field crops cultivated in southern France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9609, <https://doi.org/10.1021/jf503015m>.
- Repussard C., Zbib N., Tardieu D. *et al.*, 2014b. Ergovaline and lolitrem B concentrations in perennial ryegrass in field culture in southern France: distribution in the plant and impact of climatic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 12707, <https://doi.org/10.1021/jf504581y>.
- Schardl C.L., Florea S., Pan J. *et al.*, 2013. The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 480, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.012>.
- Schardl C.L., Young C.A., Faulkner J.R. *et al.*, 2012. Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology*, 5, 331, <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.04.005>.
- Schramm S., Köhler N., Rozhon W., 2019. Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules*, 24, 498, <https://doi.org/10.3390/molecules24030498>.
- Zbib N., Repussard C., Tardieu D. *et al.*, 2014a. Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Revue de médecine vétérinaire*, 165, 116-135.
- Zbib N., Repussard C., Tardieu D. *et al.*, 2014b. Ergovaline in tall fescue and its effect on health, milk quality, biochemical parameters, oxidative status, and drug metabolizing enzymes of lactating ewes. *Journal of Animal Science*, 92, 5112, <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8106>.
- Zbib N., Repussard C., Tardieu D. *et al.*, 2015. Toxicity of endophyte-infected ryegrass hay containing high ergovaline level in lactating ewes. *Journal of Animal Science*, 93, 4098, <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8848>.

## Toxines de *Stachybotrys* spp.

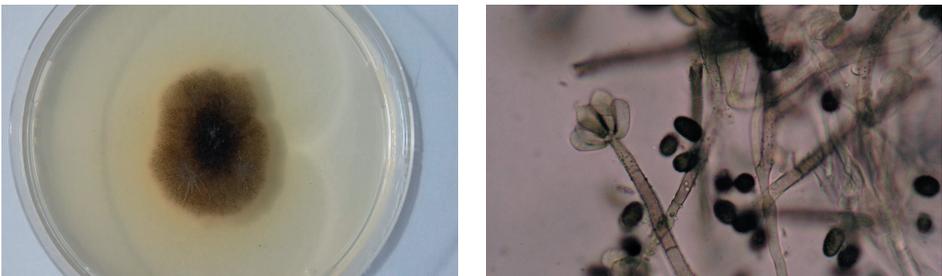
Virginie Séguin et David Garon

### ►► Introduction

Le nom *Stachybotrys* provient du grec *stachus*, qui signifie épi, et de *botrys*, qui signifie grappe, en rapport avec la morphologie de ce micromycète. Ce champignon a été isolé pour la première fois par Corda en 1837 à partir de papier peint dans une habitation de Prague et décrit comme *Stachybotrys atra*, appartenant à la famille des *Stachybotryaceae* et à l'ordre des Hypocréales, au sein des *Ascomycota*. Cette espèce, synonyme de *Stachybotrys chartarum* (figure 12.1), est souvent désignée par l'appellation « moisissure noire toxique » (*toxic black mold*).

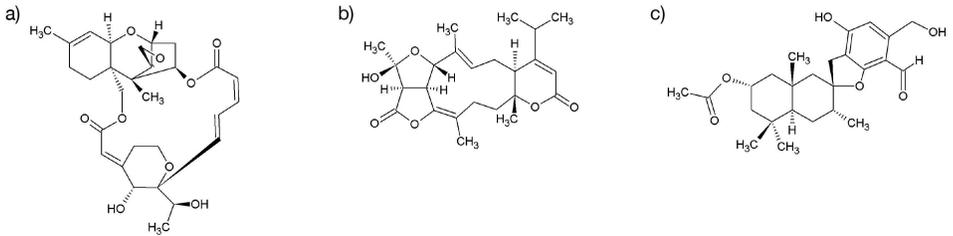
### ►► Structures des métabolites élaborés par *Stachybotrys*

*Stachybotrys chartarum* est capable de produire plus de 200 métabolites (Ibrahim *et al.*, 2022). Parmi eux, on retrouve des métabolites secondaires terpénoïdes dérivant du métabolite primaire farnésyl pyrophosphate (FPP) : les satratoxines



**Figure 12.1.** *Stachybotrys chartarum* en culture sur de la gélose à l'extrait de malt (MEA en anglais) (à gauche) et en microscopie ( $\times 1\,000$ , à droite). © D. Garon, université de Caen.

(satratoxines G et H), qui sont des trichothécènes macrocycliques, les atranones (atranones A-G), qui sont des diterpénoïdes, et les phénylspirodrimanes (PSD), caractérisés par une structure sesquiterpène (drimane) associée à un groupement phényl (figure 12.2). Ces derniers comptent plus de 80 métabolites présentant une multitude d'activités biologiques (Jagels *et al.*, 2019). D'autres composés ont été mis en évidence chez *S. chartarum* : un composé immunosuppresseur de type cyclosporine ; des composés organiques volatils tels que des alcools et des aldéhydes ; et de nombreuses enzymes cellulolytiques ainsi qu'une protéase (stachyrase A) capable d'hydrolyser des protéines pulmonaires (Ibrahim *et al.*, 2022).



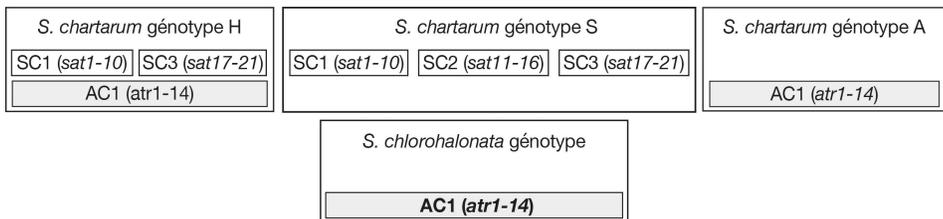
**Figure 12.2.** Structures chimiques des principaux métabolites de *Stachybotrys*.

a) Les trichothécènes macrocycliques, avec l'exemple de la satratoxine H ; b) les atranones, avec l'exemple de l'atranone A ; et c) les phénylspirodrimanes, avec l'exemple de la stachybotryisine B.

## ► Biosynthèses

Récemment, les génomes de plusieurs *Stachybotrys*, en particulier *S. chartarum* et *S. chlorohalonata*, ont été séquencés, confirmant des différences de génotypes en termes de gènes associés à la synthèse de métabolites secondaires (Ulrich *et al.*, 2020). Ainsi, plusieurs génotypes de *S. chartarum* existent, à l'origine de deux principaux chémotypes correspondant à leur capacité à produire des trichothécènes macrocycliques, tels que les satratoxines (chémo-typage S) ou les atranones (chémo-typage A). On considère qu'environ un tiers des espèces de *Stachybotrys* retrouvées en milieu intérieur appartiennent au chémotype S (Andersen *et al.*, 2003).

Ulrich *et al.* (2020) suggèrent même que *S. chartarum* peut être subdivisé en trois génotypes A, S et H, en fonction de la présence ou de l'absence de gènes *atr* et *sat* codant respectivement pour les enzymes de biosynthèse des atranones et des satratoxines (figure 12.3).



**Figure 12.3.** Représentation schématique des génotypes de *S. chartarum* et *S. chlorohalonata*. Les cadres blancs représentent les *clusters* de gènes SAT, les cadres gris les *clusters* de gènes ATR. En gras, les gènes incomplets. D'après Ulrich *et al.*, 2022.

Des *clusters* de gènes spécifiques des deux chémotypes principaux, A et S, ont été mis en évidence par Semeiks *et al.* (2014) (figure 12.4) : des *clusters* de gènes CAC ou AC1 comprenant les gènes *atr* (*atr1-14*) codant pour des enzymes qui produisent les atranones par des réactions incluant une oxydation de Baeyer-Villiger ; des *clusters* de gènes SC1-3 comprenant les gènes *sat* (*sat1-21*) qui codent des protéines incluant des polykétides synthases (PKS), des acétyltransférases et d'autres enzymes nécessaires à la modification du squelette des trichothécènes. Un autre *cluster* spécifique des atranones, AC2, a été décrit, mais sa fonction reste inconnue, trois des six gènes étant également conservés dans le génotype S (Semeiks *et al.*, 2014). Le génotype S (souches produisant des satratoxines) possède tous les gènes *sat*, mais pas le *cluster* de gènes *atr* ; le génotype A (souches ne produisant pas de satratoxines) possède les gènes *atr*, mais pas les gènes *sat* ; et parmi les souches ne produisant pas de satratoxines, le génotype hybride H possède tous les gènes *atr* et un ensemble incomplet de gènes *sat*. Le génotype de *S. chlorohalonata* ne semble contenir, quant à lui, que des gènes *atr* (Ulrich *et al.*, 2020).

D'après Ulrich (2020 et 2022), les types A et S semblent émerger d'un ancêtre ressemblant au génotype H caractérisé par la présence d'un *cluster* AC et l'absence d'un SC2, et hétérogène concernant l'exhaustivité des *clusters* SC1 et SC3. Le génotype S proviendrait de la perte de AC1 et de l'acquisition de SC2.

Les satratoxines ont été découvertes à partir des années 1973 (Jarvis, 2003) et les atranones plus tardivement (Hinkley *et al.*, 2000). La voie des atranones passe par la cyclisation du géranylgeranyl pyrophosphate pour former le dolabellane (terpène cyclase) puis les atranones. Les trichothécènes sont, quant à eux, des sesquiterpènes issus de la cyclisation du farnésyl-pyrophosphate (FPP). Le trichodermol, première molécule possédant le cycle caractéristique 12,13-époxytrichothéc-9-ène (EPT), a été mis en évidence chez d'autres producteurs de trichothécènes et provient de l'action d'enzymes caractérisées chez *Fusarium* (Tri5) ou *Trichoderma* (Tri4 et Tri11), formant successivement des précurseurs tels que le trichodiène ou le trichodiol. Chez *Stachybotrys*, le trichodermol semble à l'origine de trichoverrols (A et B) et de trichoverrines (A et B). Les trichothécènes macrocycliques (roridines, verrucarines et satratoxines) sont ensuite formés (Semeiks *et al.*, 2014).

Les phénylspirodrimanes (PSD), quant à eux, représentent les métabolites les plus abondants issus du genre *Stachybotrys* et produits par tous les chémotypes. Ils appartiennent aux méroterpénoïdes et se créent à partir du FPP et de l'acide orsellinique en un intermédiaire commun, l'illicoline B (Ibrahim *et al.*, 2022). D'après Dayras *et al.* (2023), ils peuvent ensuite être divisés en trois classes : les sesquiterpénoïdes aromatiques tétracycliques avec des fonctions alcool et/ou aldéhyde tels que le stachybotrydial ; les sesquiterpénoïdes aromatiques pentacycliques tels que le stachybotrylactame et la stachybotrylactone ; et la stachyflinone et ses dérivés, qui présentent un noyau cyclopentyl-décaldine *cis* (Dayras *et al.*, 2023).

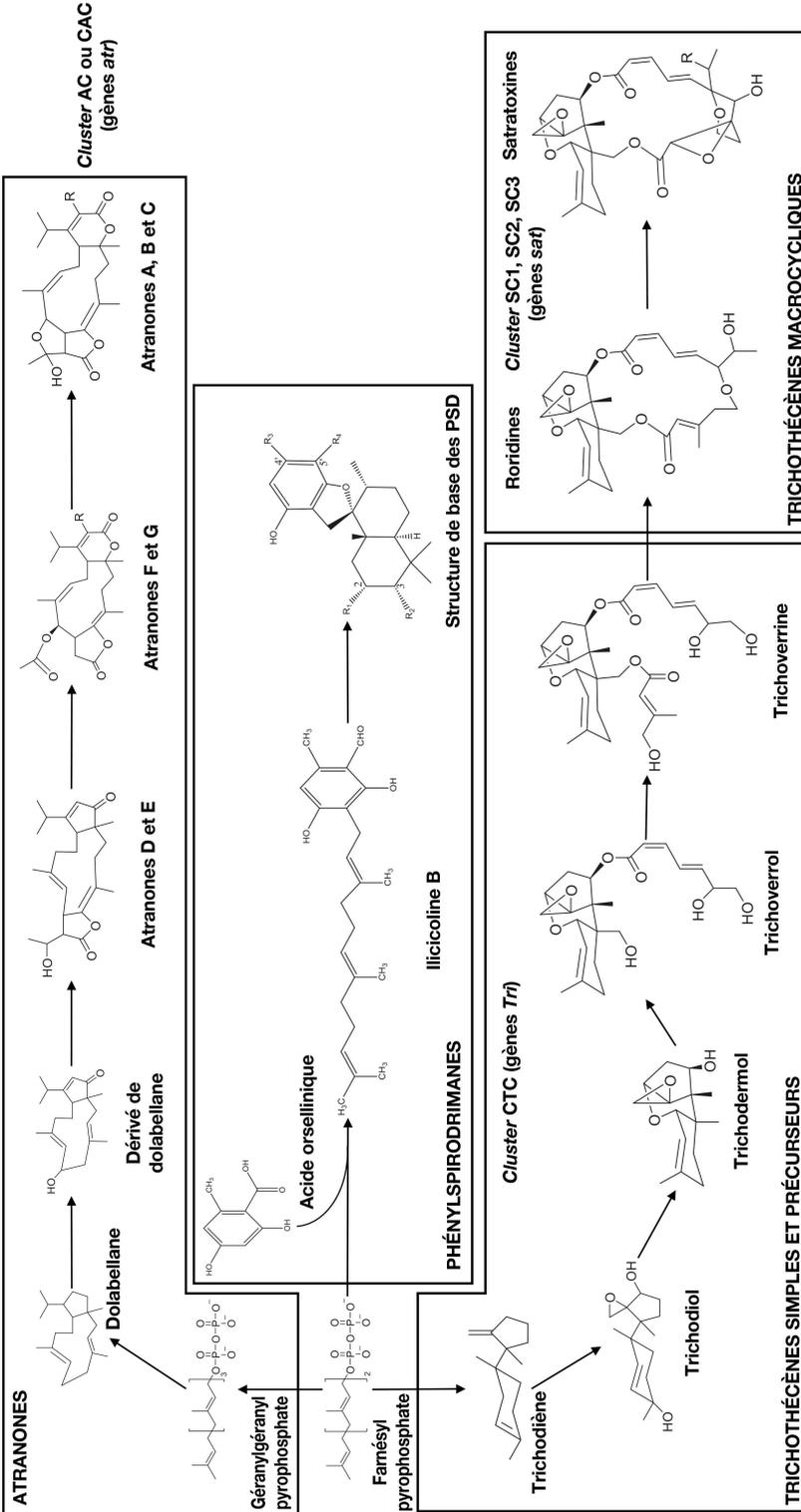


Figure 12.4. Voies de biosynthèse simplifiées des atranones, des phénylspirotrimes (PSD), des trichothécènes simples et des trichothécènes macrocycliques. D'après Semeiks *et al.*, 2014 ; et Ibrahim *et al.*, 2022.

## » Espèces productrices

En 1958, *Stachybotrys atra* et *Stilbospora chartarum* ont été considérés comme une même espèce nommée *Stachybotrys chartarum* (Lombard, 2016). Cette espèce de *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb. Ex link) Hughes est un concept encore large et est également connue sous différents synonymes dont *Stachybotrys atra* et *S. alternans*. Certaines espèces comme *Stachybotrys junnanensis*, *S. chlorohalonata* et *S. eucylindrospora* sont très similaires à *S. chartarum*. Son isolement n'est pas facile, car les cultures sont souvent envahies par d'autres genres courants, comme *Aspergillus* et *Penicillium*. Sa culture pure doit être réalisée sur milieu riche en cellulose. Sur milieu contenant de l'extrait de malt (MEA), les colonies sont gris-blanc puis gris-noir et présentent un mycélium pigmenté en noir. De plus, les caractéristiques phénotypiques de ce genre (taille des phialides, ornementation des conidies...) sont très variables, ce qui rend difficile l'identification interspécifique, même parfois avec des outils moléculaires. Enfin, la forme, la couleur, la taille et l'ornementation des conidies peuvent changer selon leur âge (Dylağ *et al.*, 2022). En se basant sur des critères moléculaires (séquences *tri5*, *chs1* et *tub1*), Andersen *et al.* (2003) ont identifié deux taxa différents, *S. chartarum* et *S. chlorohalonata*, et deux principaux chémotypes au sein de *S. chartarum*. Selon Wang *et al.* (2015), *S. chartarum* représente un complexe d'espèces dont l'identification d'espèces cryptiques nécessite l'utilisation d'outils moléculaires.

## » Milieux contaminés

*Stachybotrys* est un genre comportant des espèces saprophytes ou pathogènes de plantes et d'animaux, avec une répartition géographique très large. *S. chartarum* est capable de se développer à des pH de 3 à 9,8 (optimal de 5,6 à 6) et à des températures de 20 à 25 °C. Un paramètre clé est l'humidité : une humidité relative (HR) supérieure à 90 % est nécessaire pour sa croissance et une activité de l'eau (aw) supérieure à 0,9 pour la production de mycotoxines. Les conidies de *S. chartarum* sont regroupées en têtes humides qui, après séchage, peuvent être dispersées dans l'air et constituer des bioaérosols fongiques. Le caractère cellulolytique de cette moisissure, souvent qualifiée d'agent de pourriture molle (*soft rot fungi*), est à l'origine du fait qu'elle est fréquemment retrouvée sur des végétaux morts comme la paille ou les herbes culinaires et sur des matériaux de construction (papier peint, plâtre...) (Dylağ *et al.*, 2022). *Stachybotrys* est considéré comme un colonisateur tertiaire intervenant suite aux espèces pionnières telles qu'*Aspergillus* et *Penicillium* spp. capables, quant à elles, de croître à des aw inférieures à 0,8 et des HR inférieures à 80 %.

La croissance fongique et la production de mycotoxines ont particulièrement lieu lorsque le matériau riche en cellulose est pauvre en azote et présente une humidité élevée. D'autres facteurs tels que la peinture sur le support et la lumière semblent intervenir sur le profil toxino-gène (Jagels *et al.*, 2020).

Des espèces de *Stachybotrys* ont d'abord été identifiées dans le secteur agricole comme pathogènes en Ukraine et dans d'autres pays d'Europe de l'Est au début des années 1930. Puis, cette moisissure a été retrouvée dans des habitats dégradés ainsi que dans les fourrages humides et dans des bioaérosols issus de stabulations (Lanier

*et al.*, 2012). Plusieurs intoxications identifiées sous le terme de stachybotryotoxicose ont ainsi été décrites chez les chevaux et le bétail, après la consommation de foin et d'aliments dont la contamination résultait d'un stockage humide (Dylağ *et al.*, 2022).

L'habitat intérieur constitue aussi un environnement particulièrement propice au développement des moisissures. La présence d'humidité et le temps passé à l'intérieur sont des facteurs susceptibles de favoriser le développement des moisissures et l'exposition aux bioaérosols fongiques, qui sont à l'origine de maladies respiratoires telles que l'asthme et les allergies. Selon certains auteurs, *Stachybotrys* pourrait également être un facteur étiologique du syndrome des bâtiments malsains (*Sick Building Syndrome*), qui rassemble des symptômes très différents et dont les causes sont multiples et restent mal connues (Redlich *et al.*, 1997). De plus, depuis 1993, *S. chartarum* est considéré comme un agent responsable d'hémorragies pulmonaires chez les nourrissons à Cleveland, Ohio, États-Unis. Toutefois, selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention), *S. chartarum* ne peut pas être reconnu comme agent étiologique certain de ces hémorragies pulmonaires décrites chez des nourrissons de 1993 à 1996 ; pour autant, 91 % des 52 cas décrits ont été associés à la présence de cette moisissure (Dylağ *et al.*, 2022).

C'est dans ce cadre que les espèces du genre *Stachybotrys* font partie des champignons à l'origine de problèmes de santé les plus redoutés en milieu intérieur. Shelton *et al.* (2002) ont montré la présence de *S. chartarum* dans 6 % des 1 717 habitats étudiés aux États-Unis. De même, les mycotoxines produites par *Stachybotrys* peuvent être détectées en milieu intérieur. Ces dernières ont été retrouvées sur des matériaux de construction (toile de verre, papier peint, polystyrène, laine de verre...), mais aussi dans les poussières. Des satratoxines ont, en effet, été quantifiées dans l'air d'habitats dégradés par l'eau (Jagels *et al.*, 2019). Došen *et al.* (2016) ont mis en évidence la présence de PSD dans les poussières. Ils les ont détectés dans onze échantillons de poussières, à des taux de 600 pg/cm<sup>2</sup> dans la pièce endommagée et de 340 pg/cm<sup>2</sup> dans la pièce adjacente de leur étude. Ces larges distributions en quantités détectables dans la poussière suggèreraient que les PSD pourraient être de bons biomarqueurs d'exposition au genre *Stachybotrys* en milieu intérieur.

## ► Métabolisme et genèse de forme modifiée

Les données sur le métabolisme des stachybotryotoxines sont peu nombreuses. En effet, aucune étude sur le métabolisme des atranones *in vitro* et *in vivo* n'a encore été réalisée, à l'inverse de la satratoxine G et des PSD. Amuzie *et al.* (2010) ont mis en évidence, *via* une administration intranasale, que la satratoxine G était rapidement absorbée par le nez, distribuée au niveau des tissus respiratoires, immunitaires et neuronaux, puis éliminée. Il est apparu par ailleurs que suite à cette exposition intranasale une quantité significative de cette mycotoxine était retenue dans les fosses nasales, ce qui pourrait expliquer par la suite les observations faites chez des souris par Ibrahim *et al.* en 2022 d'une apoptose des neurones sensoriels olfactifs, avec atrophie de l'épithélium olfactif.

Lindemann *et al.* (2022) se sont intéressés, en utilisant les microsomes hépatiques équin et humain, aux métabolismes *in vitro* de quatre types de PSD : le stachybotrydial,

le stachybonoïde, le L-671 et le stachybotrylactame. Des métabolites de phase I et II ont été mis en évidence, mais les auteurs tiennent à souligner que ces résultats dépendent de la structure chimique des PSD considérés et de l'origine du modèle hépatique utilisé. En effet, ils ont constaté que l'activité métabolique du modèle hépatique humain était plus élevée que pour le modèle équin. Des réactions d'oxydation et d'hydroxylation (phase I) ainsi que des métabolites conjugués à des groupements sulfates et glucuronides (phase II) ont été détectés pour tous les PSD étudiés.

## ► Toxicité

La plupart des mycotoxines de *S. chartarum* présentent un danger pour la santé humaine. L'exposition humaine aux mycotoxines de *Stachybotrys* peut avoir lieu par contact cutané, ingestion et inhalation. Le chémotype S incluant les roridines, verrucarines et satratoxines est le plus cytotoxique (Andersen *et al.*, 2003). Il est impliqué dans des maladies chez les chevaux, la stachybotryotoxicose pouvant avoir lieu après absorption orale de mycotoxines. Chez les animaux, les intoxications se traduisent par une inflammation des muqueuses, une rhinite, une conjonctivite, une neutropénie et des symptômes tels que les diarrhées et la fièvre, et peuvent conduire au décès de l'animal (Wang *et al.*, 2015).

Chez les humains, comme évoqué précédemment, l'exposition aux toxines a surtout lieu dans des bâtiments détériorés par l'humidité ou l'eau. L'exposition aux trichothécènes macrocycliques peut causer des hémorragies pulmonaires chez les nourrissons ou des symptômes liés au syndrome des bâtiments malsains. Des manifestations inflammatoires de la peau et des muqueuses ont été décrites, ainsi que des symptômes respiratoires (toux, rhinite, oppression thoracique...). L'inhalation de conidies de *S. chartarum* peut provoquer des lésions pulmonaires, en particulier lorsqu'elle est répétée (Dyląg *et al.*, 2022).

Le mécanisme exact responsable de la toxicité de *Stachybotrys* n'est pas totalement connu. Les trichothécènes macrocycliques seraient à l'origine de la formation d'adduits aux protéines, les atranones causeraient une inflammation pulmonaire. En se liant de façon irréversible à la sous-unité ribosomale 60S, les satratoxines inhibent la biosynthèse des protéines et peuvent induire l'apoptose dans des lignées de cellules neuronales (Karunasena *et al.*, 2010). Les trichothécènes macrocycliques sont beaucoup plus cytotoxiques que les trichothécènes de type A (comme la toxine HT-2) et de type B (comme le déoxynivalénol). La satratoxine H possède par exemple une DL<sub>50</sub> d'un milligramme par kilogramme chez la souris en intrapéritonéale contre 9 mg/kg pour la toxine HT-2. La cytotoxicité des trichothécènes macrocycliques est associée à un processus d'apoptose après activation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Chez la souris, une exposition intranasale à la satratoxine G induit une inflammation et une apoptose des cellules centrales de l'épithélium olfactif (Ibrahim *et al.*, 2022).

D'autres composés formés tels que des protéinases, hémolysines,  $\beta$ -glucanes et PSD contribueraient à la physiopathologie des intoxications par *Stachybotrys*. La stachylisine, une molécule de type hémolysine, pourrait par exemple être impliquée

dans l'hémosidérose pulmonaire liée à l'exposition à *S. chartarum*. Certains PSD tels les stachybochartines ou encore les bistachybotrines sont cytotoxiques, mais à un degré moindre que les trichothécènes macrocyliques (Ibrahim *et al.*, 2022 ; Lindemann *et al.*, 2022).

### ►► Autres activités

La richesse métabolique de *Stachybotrys* est également explorée dans le domaine des bioactivités thérapeutiques. Certains dérivés de PSD de *Stachybotrys* semblent avoir des activités anti-inflammatoires, antibactériennes ou antivirales. C'est le cas des stachybotrysines A et G et de la stachybosine qui montrent une activité anti-VIH. D'autres métabolites comme la stachyfline, isolée de *Stachybotrys*, présente un potentiel contre le virus de la grippe. Certaines atranones et analogues semblent, quant à elles, avoir une activité cytotoxique sur des lignées cellulaires d'ostéosarcome ou présenter des activités antimicrobiennes (Ibrahim *et al.*, 2022).

Enfin, certaines espèces de *Stachybotrys* comme *S. elegans* semblent posséder une activité régulatrice sur le développement de *Rhizoctonia solani* en produisant des enzymes telles que des chitinases et des glucanases (Wang *et al.*, 2015).

### ►► Conclusion

*Stachybotrys* est un genre complexe d'un point de vue taxonomique et chimique. Sur le plan écologique, il s'agit d'une moisissure aux propriétés cellulolytiques qui a été mise en évidence dans des habitats humides dégradés ainsi que dans des fourrages humides. *S. chartarum* peut être subdivisé en plusieurs génotypes et chémotypes, à l'origine de nombreux métabolites secondaires tels que les satratoxines, les atranones et les phénylspirodrimanes. Certaines de ces mycotoxines nécessitent une surveillance en raison de leurs activités cytotoxiques et de leur implication dans des symptômes chez l'animal et l'humain, en particulier au niveau respiratoire.

### ►► Références

- Amuzie C.J., Islam Z., Kim J.K. *et al.*, 2010. Kinetics of satratoxin G tissue distribution and excretion following intranasal exposure in the mouse. *Toxicological Sciences*, 116, 433, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq142>.
- Andersen B., Nielsen K.F., Thrane U. *et al.*, 2003. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia*, 95, 1227, <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833031>.
- Dayras M., Sfecci E., Bovio E. *et al.*, 2023. New Phenylspirodrimanes from the Sponge-Associated Fungus *Stachybotrys chartarum* MUT 3308. *Marine Drugs*, 21, 135, <https://doi.org/10.3390/md21030135>.
- Došen I., Andersen B., Phippen C.B. *et al.*, 2016. *Stachybotrys* mycotoxins, from culture extracts to dust samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 5513, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9649-y>.

- Dylağ M., Spychała K., Zielinski J. *et al.*, 2022. Update on *Stachybotrys chartarum*-Black Mold Perceived as Toxicogenic and Potentially Pathogenic to Humans. *Biology*, 11, 352, <https://doi.org/10.3390/biology11030352>.
- Hinkley S.F., Mazzola E.P., Fettinger J.C. *et al.*, 2000. Atranones A-G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry*, 55, 663, [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00231-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00231-4).
- Ibrahim S.R.M., Choudhry H., Asseri A.H. *et al.*, 2022. *Stachybotrys chartarum* — A Hidden Treasure, Secondary Metabolites, Bioactivities, and Biotechnological Relevance. *Journal of Fungi*, 8, 504, <https://doi.org/10.3390/jof8050504>.
- Jagels A., Lindemann V., Ulrich S. *et al.*, 2019. Exploring Secondary Metabolite Profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. *Toxins*, 11, 133, <https://doi.org/10.3390/toxins11030133>.
- Jagels A., Stephan F., Ernst S. *et al.*, 2020. Artificial vs natural *Stachybotrys* Infestation-Comparison of mycotoxin production on various building materials. *Indoor Air*, 30, 1268, <https://doi.org/10.1111/ina.12705>.
- Jarvis B.B., 2003. *Stachybotrys chartarum*, a fungus for our time. *Phytochemistry*, 64, 53, [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00275-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00275-9).
- Karunasena E., Larranaga M.D., Simoni J.S. *et al.*, 2010. Building-associated neurological damage modeled in human cells, A mechanism of neurotoxic effects by exposure to mycotoxins in the indoor environment. *Mycopathologia*, 170, 377, <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9330-5>.
- Lanier C., André V., Séguin V. *et al.*, 2012. Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19, 61.
- Lindemann V., Jagels A., Behrens M. *et al.*, 2022. *In Vitro* Metabolism of Phenylspirodrimanones Derived from the Indoor Fungus *Stachybotrys*. *Toxins*, 14, 395, <https://doi.org/10.3390/toxins14060395>.
- Lombard L., Houbraken J., Decock C. *et al.*, 2016. Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia*, 36, 156, <https://doi.org/10.3767/003158516X691582>.
- Redlich C.A., Sparer J., Cullen M.R., 1997. Sick-building syndrome. *Lancet*, 349, 1013, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)07220-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07220-0).
- Semeiks J., Borek D., Otwinowski Z. *et al.*, 2014. Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genomics*, 15, 590, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-590>.
- Shelton B.G., Kirkland K.H., Flanders W.D. *et al.*, 2002. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1743, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1743-1753.2002>.
- Ulrich S., Niessen L., Ekruth J. *et al.*, 2020. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Research*, 36, 83, <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00371-x>.
- Ulrich S., Lang K., Niessen L. *et al.*, 2022. The Evolution of the Satratoxin and Atranone Gene Clusters of *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Fungi*, 8, 340, <https://doi.org/10.3390/jof8040340>.
- Wang Y., Hyde K.D., McKenzie E.H.C. *et al.*, 2015. Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity*, 70, 17, <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0319-0>.



## Partie II

---

# La problématique mycotoxines et les enjeux à venir

Réduire le risque d'exposition des consommateurs aux mycotoxines nécessite, entre autres :

- la mise en œuvre de plans de surveillance ;
- la définition de stratégies de prévention des événements de contamination ;
- le développement de modèles de prédiction du risque prenant en compte l'évolution des pratiques de production, de transformation et de consommation, ainsi que les changements environnementaux, dont ceux liés au climat.

Si, en effet, les mycotoxines produites par les espèces du genre *Fusarium* sur céréales ont été au premier plan des préoccupations des filières au cours des dernières décennies, leur importance tend à diminuer et d'autres problématiques émergent comme celles liées aux aflatoxines et aux alcaloïdes de l'ergot.

L'atteinte des objectifs précédents ne pourra être obtenue sans une connaissance approfondie de l'écophysiologie des champignons toxigènes, sans la compréhension des facteurs et mécanismes qui conditionnent la présence de mycotoxines tout au long des chaînes agri-agroalimentaires, et sans une vision précise et exhaustive des interactions entre les champignons toxigènes, les matrices colonisées et les communautés microbiennes présentes sur ces matrices.

De plus, ces champs d'investigation ne peuvent pas être dissociés des systèmes de production, de stockage et de transformation. Ils doivent aussi prendre en compte la réglementation européenne sur ces contaminants et son évolution constante vers une augmentation du nombre de mycotoxines réglementées et vers une modulation,

le plus souvent un abaissement, des seuils autorisés. Les progrès technologiques et méthodologiques ouvrent la voie au développement de nouvelles stratégies analytiques vers des méthodes plus spécifiques ou rapides, ainsi qu'à une nouvelle dynamique dans l'identification de solutions de biocontrôle et de procédés de décontamination. L'ensemble de ces enjeux scientifiques et technologiques sera discuté au travers des différents chapitres constituant la seconde partie de cet ouvrage.

# **Effet des conditions environnementales sur la croissance fongique et la production de mycotoxines**

Claudia López Rodríguez, Akita Meklat  
et Carol Verheecke-Vaessen

## **► Introduction**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires des moisissures ; leur production est conditionnée par une interaction complexe de différents facteurs qui peuvent être de nature biotique ou abiotique. L'identification et la caractérisation de ces derniers sont importantes afin de pouvoir mettre en place des systèmes de prédiction, de prévention et de gestion de la contamination en mycotoxines au sein de la chaîne agri-agroalimentaire. De même, une connaissance approfondie de l'implication de chacun de ces facteurs dans la croissance fongique et la production de mycotoxines par les champignons est essentielle pour comprendre leur potentiel de production dans l'environnement dynamique qu'est la chaîne agri-agroalimentaire.

La température et la disponibilité de l'eau (déterminée par l'activité de l'eau ;  $a_w$ ) sont les conditions environnementales primaires les plus importantes qui contrôlent la croissance des champignons mycotoxinogènes et la production de mycotoxines. En outre, une connaissance approfondie du cycle de vie des champignons mycotoxinogènes, de leur écologie et des niches écologiques qu'ils colonisent est indispensable. Cela implique aussi de prendre en considération la complexité et le dynamisme de la présence de différents genres et espèces le long de la chaîne agri-agroalimentaire, et plus spécialement durant les étapes clés du préstockage, du stockage et des premières transformations des produits agroalimentaires.

Dans ce chapitre, nous présenterons des exemples de l'impact de certains paramètres physicochimiques de l'environnement sur la croissance des principales espèces fongiques toxigènes et leur production des principales mycotoxines.

## ► Écophysiologie des principales espèces fongiques toxigènes

Il est important de connaître les conditions optimales et limites associées à la croissance fongique et à la production de mycotoxines. Parmi les différents genres producteurs de mycotoxines, les conditions de croissance des *Aspergillus* spp. sont plus chaudes (6 à 55 °C) et potentiellement plus sèches ( $a_w \leq 0,77$ ) par comparaison à celles des *Fusarium* spp. (5 à 37 °C,  $a_w \leq 0,88$ ), *Penicillium* spp. (2 à 34 °C,  $a_w > 0,80$ ) et *Alternaria* spp. (1 à 34 °C,  $a_w > 0,84$ ) (Lee *et al.*, 2015). Même si les membres d'un même genre peuvent avoir des conditions de croissance similaires, les conditions environnementales de production de toxines sont propres à chaque famille de toxine. Dans les prochaines sections, nous explorerons des exemples de conditions environnementales de production pour les principales mycotoxines réglementées au sein de l'Union européenne.

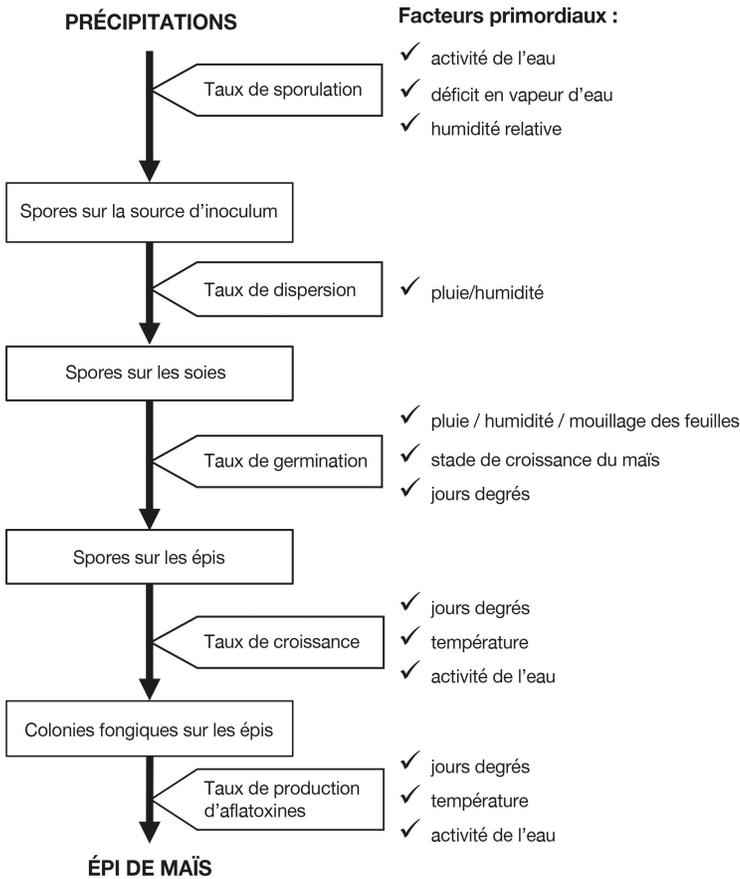
### Les aflatoxines

Les conditions de production d'aflatoxines par les *Aspergilli* section *Flavi* (chapitre 1) dans le maïs sont les plus documentées. Les deux espèces productrices principales sont *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Pour *A. flavus*, la croissance est observée pour des températures comprises entre 5 et 42 °C pour une  $a_w \leq 0,82$  ; pour *A. parasiticus*, la croissance a lieu à une  $a_w$  supérieure à 0,80 pour des températures comprises entre 18 et 36 °C (Garcia *et al.*, 2011), avec une production d'aflatoxines connue à des températures comprises entre 10 et 40 °C et une  $a_w \leq 0,85$ . Il a également été montré, en milieu infusé de maïs, que *A. flavus* peut produire des aflatoxines en moins de 24 heures à 36 °C pour une  $a_w$  de 0,995 (données non publiées). Les conditions de production favorables sont conservées parmi les isolats même si la quantité d'aflatoxines accumulée peut varier.

Un modèle mécanistique a été élaboré pour *A. flavus* prenant en considération l'environnement, la maturité de la plante et l'écophysiologie de l'espèce (figure 13.1). Il permet de prédire correctement 70 % des concentrations en aflatoxines.

### L'ochratoxine A

Une autre mycotoxine produite par les *Aspergilli* est l'ochratoxine A (OTA) (voir chapitre 2). Cette dernière est produite par les espèces des sections *Circumdati* et *Nigri*. Le tableau 13.1 illustre les conditions optimales de germination et croissance des souches ochratoxinogènes et celles de la production d'OTA dans le café. Les conditions limites pour la croissance de ces espèces sont une température de 15 °C et une  $a_w$  de 0,87 (Vipotnik *et al.*, 2017). Concernant la production d'OTA, *A. westerdijkiae* ne produit pas d'OTA à 23 °C (sauf à une  $a_w$  de 0,99) ou au-dessus de 37 °C indépendamment de la valeur de  $a_w$ , alors que *A. steynii* la produit à une  $a_w \leq 0,91$  à 23 °C et à 37 °C pour une  $a_w$  de 0,95-0,97 (Gil-Serna *et al.*, 2014). *A. ochraceus* et *A. carbonarius* ne produisent pas d'OTA à une  $a_w$  de 0,87 et une température de 15 °C (Kapetanakou *et al.*, 2009). Dans certaines denrées telles que les raisins, la contamination par l'OTA est très courante en raison des températures comprises



**Figure 13.1.** Modèle prédictif de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur maïs. Source : Battilani *et al.*, 2013.

entre 15 et 34 °C pendant leur récolte. Ces conditions, associées à une  $a_w$  élevée, favorisent la croissance et la production d'OTA chez des espèces très ochratoxino-gènes telles que *A. carbonarius* (Cervini *et al.*, 2020). En plus des conditions environnementales, la quantité d'OTA produite dépend de la souche fongique et du temps d'incubation dans un environnement donné.

**Tableau 13.1.** Conditions optimales de germination, croissance et production d'ochratoxine A par les principaux *Aspergilli* ochratoxinogènes du café.

Espèces	Germination		Croissance		Production d'ochratoxine A	
	T (°C)	$a_w$	T (°C)	$a_w$	T (°C)	$a_w$
<i>A. ochraceus</i>	20-30	0,95-0,99	24-31	0,95-0,99	25-30	0,98
<i>A. westerdijkiae</i>	20-30	0,95-0,99	20-30	0,95-0,99	28	0,99
<i>A. steynii</i>	20-30	0,95-0,99	28-32	0,95-0,99	28	0,99
<i>A. carbonarius</i>	32-35	0,95	32-37	0,95-0,99	15-25	0,96-0,98

L'OTA est également produite par *Penicillium nordicum* et *P. verrucosum*. Ce dernier est le principal producteur d'OTA sur le blé et croît à une  $a_w \approx 0,85$  et une température comprise entre 2 et 34 °C. Les conditions environnementales permettant la production d'OTA par *P. verrucosum* sont plus restrictives et correspondent à une  $a_w \approx 0,83$  et une température comprise entre 3 et 35 °C. Cette production dans le blé survient aux étapes clés du stockage, où le compactage des grains et la respiration de ces derniers peuvent entraîner une augmentation de la concentration de CO<sub>2</sub> dans l'air. Toutefois, cette dernière peut finir par inhiber la croissance du champignon et la production d'OTA, si elle atteint au moins 50 % de CO<sub>2</sub> dans l'air (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

## La patuline

*Aspergillus*, *Paecilomyces* et *Penicillium* sont les genres producteurs de la patuline (PAT). *Penicillium expansum* est plus particulièrement l'espèce principale produisant la PAT, notamment dans les pommes (voir chapitre 3). *P. expansum* peut croître à des températures comprises entre 3 et 35 °C avec pour température optimale environ 25 °C. La production de PAT, quant à elle, est optimale à 16 °C avec des températures de production comprises entre 8 et 25 °C. Néanmoins, ces températures sont discutées, avec certaines études montrant que la production de PAT est stimulée lorsque la température diminue de 20 à 10 °C ou 4 °C, alors que d'autres ont observé une stimulation à 25 °C et une diminution à 4 °C (Tannous *et al.*, 2016).

*P. expansum* peut se développer à une  $a_w \approx 0,83$ . Néanmoins, la production de la PAT n'a été détectée qu'à une  $a_w \approx 0,90$ . Cette production est également possible à des pH compris entre 2,5 et 4. Cela est d'autant plus important que la PAT est stable aux pH de 2,5 à 5,5, augmentant le risque d'accumulation durant les procédés de transformation des aliments comme la pomme.

Sur la base de ces données, un modèle prédictif est disponible pour les producteurs de pommes et les industriels de jus de fruits (Tannous *et al.*, 2016).

## Les trichothécènes

Les paramètres environnementaux de production des divers trichothécènes (types A, B, C et D) sont différents malgré des structures chimiques très similaires.

### Type B : déoxynivalénol

Parmi les trichothécènes, la production de déoxynivalénol (DON) est la plus étudiée (voir chapitre 5). *Fusarium graminearum* est le principal producteur de DON dans le blé et peut se développer à des températures comprises entre 5 et 37 °C, pour une  $a_w < 0,90$ . Après inoculation de *F. graminearum* sur grains de blé, la production optimale de DON a lieu pour une  $a_w$  de 0,995 et une température de 30 °C, elle est observée dès les premiers jours de croissance avec une production optimale après six semaines. Il est important de noter que les conditions environnementales influencent également la forme des mycotoxines produites. Ainsi, selon les  $a_w$  testées, un ensemble de quatre souches de *F. graminearum* produisent du DON à

hauteur de 60 % ( $a_w$  0,98 ; après 10 jours d'incubation à 25 °C) et seulement 16 % ( $a_w$  0,94) du cocktail DON, 15ADON et 3ADON (Medina *et al.*, 2017).

En se basant sur ces données et des paramètres environnementaux complémentaires du champ tels que l'humidité relative, les précipitations, ainsi que le temps de séchage des feuilles et le stade de croissance de la plante, un modèle mécanistique capable de prédire à 84,1 % la concentration en DON (basse, moyenne ou élevée) a été défini (Liu *et al.*, 2018). Ce modèle a récemment été complété par une étude des facteurs environnementaux en condition de stockage du blé concluant qu'une température inférieure à 15 °C et une  $a_w$  inférieure à 0,76 sont nécessaires pour éviter la croissance de *F. graminearum* et la production de DON (Pei *et al.*, 2022).

*F. graminearum* est prévalent sur tous les continents, néanmoins, dans le nord-est de l'Asie, *Fusarium asiaticum* devient prédominant et pourrait s'étendre à d'autres continents, notamment du fait de sa capacité d'adaptation aux températures plus élevées (Xu *et al.*, 2021). Afin de comprendre le risque lié à cette espèce, un modèle probabiliste a été développé (figure 13.2) et a mis en évidence une différence de probabilité de production de DON entre souches de cette espèce, avec notamment une probabilité élevée pour la production de DON à des températures de 5 à 15 °C (Garcia-Cela *et al.*, 2022).

## Type A : T-2 et HT-2

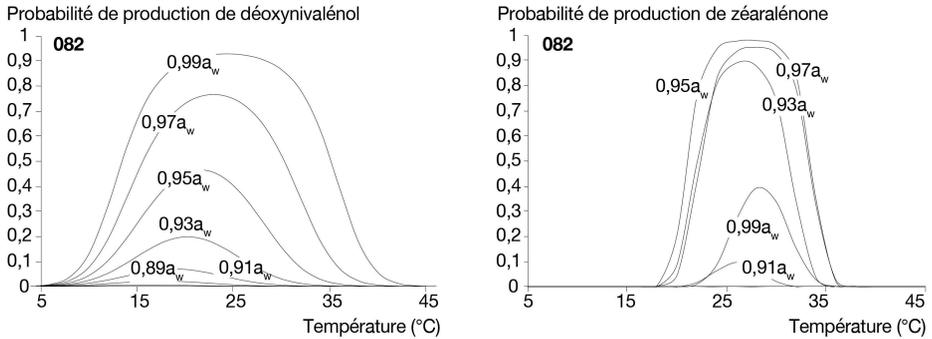
Les toxines T-2 et HT-2 sont produites par *Fusarium sporotrichioides* et *F. langsethiae* dans le nord de l'Europe. La présence de T-2 et HT-2 dans l'avoine est un problème majeur. Des études récentes ont montré que la croissance et la production de T-2 et HT-2 par *F. langsethiae* sont stoppées à une  $a_w$   $\eta$  0,90 (après 10 jours) pour des températures inférieures à 10 °C et supérieures à 34 °C (Verheecke-Vaessen *et al.*, 2021).

En se basant sur les données écophysiologiques de *F. langsethiae*, les données de contamination en T-2 et HT-2 sur neuf saisons et les données météorologiques de la Norvège, un modèle adapté au champ a été développé mettant en évidence que des températures basses et un temps humide ou des températures modérées au moment de la montaison, ainsi que des températures élevées et une humidité élevée au stade laineux, entraînent un risque de présence de T-2 et HT-2 supérieure à 500  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  dans les grains d'avoine (Hjelkrem *et al.*, 2018).

## La zéaralénone

*F. graminearum* et *F. asiaticum* produisent également de la zéaralénone (ZEN), principalement sur le blé. Même si le DON et la ZEN sont produits par les mêmes champignons, les conditions environnementales de production des deux mycotoxines sont différentes. La production de ZEN se fait sur une plage de températures plus restreinte en comparaison de celle du DON, avec une absence totale de production à des températures inférieures à 15 °C et une  $a_w$  inférieure à 0,93. Les conditions de production de métabolites associés à la ZEN tels que la  $\alpha$ -zéaralénol ( $\alpha$ -ZOL) et la  $\beta$ -ZOL ont montré que ces composés ne commençaient à s'accumuler dans

le grain de blé qu'aux conditions optimales de production de la ZEN situées à une température de 25 °C pour une  $a_w$   $\omega$  0,93. Ces conditions de production optimales ont également été confirmées pour *F. asiaticum*, avec un maximum de probabilités d'accumulation de ZEN à 25 °C pour une  $a_w > 0,91$  (figure 13.2).



**Figure 13.2.** Probabilité estimée de la production de (a) déoxynivalénol (DON) et de (b) zéaralénone (ZEN), sous différentes conditions environnementales pour la souche de *F. asiaticum* 082, lors d'une colonisation sur milieu de blé après 10 jours.

Source : Garcia-Cela *et al.*, 2022.

## Les fumonisines

*Fusarium verticillioides* est le principal producteur de fumonisines (FUM) sur le maïs. La germination du champignon commence à une température de 5 °C jusqu'à 37 °C, avec une  $a_w$   $\omega$  0,88 (tableau 13.2). Les conditions de production des toxines sont plus restrictives, avec une gamme de températures entre 10 et 37 °C et une  $a_w$  entre 0,922 et 0,995. Il est intéressant de souligner que les conditions environnementales impactent le ratio de production des FUM B1, B2, B3, B4. Ainsi, selon ces paramètres, le ratio de FB1/FB3 peut passer de 14,33 (à 20 °C, 0,91  $a_w$ ) à 6,22 (à 30 °C, 0,95  $a_w$ ). La variation de ces ratios peut avoir un impact important dans l'accumulation de FUM dans les aliments, d'autant que les réglementations actuelles ne prennent pas en compte les FB3 et FB4.

**Tableau 13.2.** Conditions environnementales permettant la germination et la croissance de *Fusarium verticillioides* et d'*Aspergillus niger*, et la production de leurs toxines. D'après Perera *et al.* (2021) et Samapundo *et al.* (2005).

Champignons	Facteurs	Germination	Croissance	Production de toxines
<i>Fusarium verticillioides</i>	Température (°C)	5 ~ 37	2,5 ~ 37	10 ~ 37
	Activité de l'eau ( $a_w$ )	0,88 ~ 0,995	0,90 ~ 0,995	0,92 ~ 0,995
<i>Aspergillus niger</i>	Température (°C)	-	> 20 ~ et > 35	> 20 ~ et < 35
	Activité de l'eau ( $a_w$ )	-	0,92 ~ 0,995	0,92 ~ 0,995

Les FUM sont également produites par les champignons du genre *Aspergillus*, notamment *A. niger* et *A. welwitschiae* dans le raisin. L'écophysiologie de la production de FUM par ces champignons est encore mal connue, mais ils peuvent les

produire à des températures plus élevées que *F. verticillioides* ( $> 35\text{ °C}$ ) et pour une  $a_w$  plus basse ( $< 0,92$ ) (Perera *et al.*, 2021). Des études complémentaires seraient nécessaires pour comprendre quelles sont les limites de production pour ces champignons, plus particulièrement quand le taux de sucre augmente à l'approche de la récolte et que l' $a_w$  du grain de raisin diminue.

## Les toxines émergentes d'*Alternaria*

La famille des mycotoxines d'*Alternaria* comprend principalement l'alternariol (AOH), le méthyléther monométhyle de l'alternariol (AME), la tentoxine (TEN), l'altenuène (ALT) et l'acide ténuazonique (TeA) (voir chapitre 9). La croissance des espèces d'*Alternaria* est influencée par des facteurs abiotiques qui exercent leur influence en interaction, en particulier la température, l' $a_w$  et le pH (tableau 13.3). *Alternaria alternata* et *A. tenuissima* germent de 1 à 35 °C avec une  $a_w$  minimale nécessaire de 0,84 et un pH de 2,5 à 10. La production de toxines est soumise à des conditions plus restrictives de températures ( $> 10$  et  $< 35\text{ °C}$ ) et une  $a_w > 0,88$ .

**Tableau 13.3.** Conditions environnementales permettant la germination et la croissance d'*Alternaria alternata* et d'*A. tenuissima*, et la production de leurs toxines. D'après Lee *et al.*, 2015.

Facteurs	Germination	Croissance	Production de toxines
Température (°C)	1 ~ 35	$> 1$ et $< 35$	$> 10$ et $< 35$
Activité de l'eau ( $a_w$ )	0,84 ~ 0,995	$> 0,85$	$> 0,88$
pH	2,5 ~ 10	$> 2,5$ et $< 10$	$> 2,5$ et $< 9$

Parmi les différentes mycotoxines produites par les *Alternaria*, les conditions de production des ALT, AOH et AME sont les plus connues. L'optimum de production pour ces trois toxines est à une température de 25 °C et des  $a_w$  de 0,94 à 0,995. Ainsi, la toxine AOH d'*Alternaria* peut être produite à partir de 5 °C et l'ALT peut être produite à partir d'une  $a_w$  de 0,88. Cependant, à la limite inférieure de cette plage d' $a_w$  (c'est-à-dire 0,90), très peu de ces mycotoxines sont produites (Lee *et al.*, 2015).

## » Écophysiologie et interaction des champignons mycotoxinogènes : impact sur la production de toxines

La plupart des données écophysiologiques connues sur les champignons mycotoxinogènes sont obtenues *in vitro* sur milieu synthétique ou sur grains irradiés, mais ne prennent pas en compte un des paramètres majeurs qui est la compétition au sein de la niche microbienne pour les nutriments et l'espace. L'étude de cette compétition est importante, car celle-ci détermine le profil de mycotoxines produites par l'association d'espèces fongiques en interaction.

L'exemple le plus connu est l'interaction entre *A. flavus* et *F. verticillioides*. La présence des deux champignons sur un milieu à base de maïs entraîne un impact sur la production d'aflatoxines et FUM, avec une augmentation de la production d'aflatoxines à

15 °C et 20 °C et une baisse à 25-30 °C, et une augmentation de la production de FUM à 20-25 °C. Sur la base de ces données, un modèle basé sur une approche d'intelligence artificielle a été développé et une capacité de prédiction pour les deux familles de toxines  $\omega$  75 % a été validée (Camardo Leggieri *et al.*, 2021).

Cette interaction entre champignons peut également avoir un impact réducteur de la production de toxines. En effet, l'utilisation de souches non toxigènes de l'espèce *A. flavus* est devenue un outil de biocontrôle commercialisé contre l'accumulation d'aflatoxines (voir chapitres 15 et 17). Néanmoins, l'efficacité d'inhibition de la production d'aflatoxines est dépendante des paramètres environnementaux, avec une efficacité de réduction de la concentration en aflatoxines comprise entre 20 % ( $a_w$  de 0,95 ; 30 °C) et 82 % ( $a_w$  de 0,98 ; 35 °C) sur grain de maïs (Gasperini *et al.*, 2019).

## ►► Conclusion

La connaissance de l'impact des paramètres environnementaux sur la croissance fongique et la production de mycotoxines est un prérequis essentiel pour comprendre le cycle de vie du champignon et développer des outils de lutte efficaces contre la production de toxines. Parmi ces paramètres environnementaux, la température et la disponibilité en eau (mesurée par l' $a_w$ ) sont les paramètres primordiaux. Dans ce chapitre, nous avons résumé la connaissance actuelle quant à l'impact de ces paramètres sur les principaux genres producteurs de mycotoxines.

Néanmoins, la connaissance d'autres paramètres environnementaux, tels que le pH, la concentration en gaz ( $O_2$  et  $CO_2$ ), ainsi que l'interaction avec la matrice, le mycobiome et le microbiome de la phyllosphère des grains et des denrées étudiées, est primordiale afin d'augmenter la fiabilité de prédiction du risque. Une meilleure compréhension de la dynamique de l'impact de ces paramètres en interaction est cruciale.

Ces dynamiques complexes sont en constante évolution, et seront accélérées par le changement climatique qui, par l'augmentation de la température, les épisodes de sécheresse et la concentration accrue en  $CO_2$  dans l'atmosphère, entraîne une augmentation de la production de toxines par certains champignons tels que *A. flavus* sur le maïs (Medina *et al.*, 2017) ou *F. langsethiae* sur l'avoine (Verheecke-Vaessen *et al.*, 2019)

Enfin, dans ce chapitre nous avons également présenté les nouveaux modèles développés sur la base des données écophysiologiques et fournissant des valeurs de prédiction indispensables pour l'industrie agroalimentaire. Conjointement à une meilleure compréhension de l'évolution et de l'adaptabilité des champignons à l'interaction des facteurs biotiques et abiotiques au sein de leur environnement, ces modèles constituent l'avenir de la prédiction de la présence de cocktails de mycotoxines produites par de multiples champignons mycotoxinogènes le long de la chaîne alimentaire.

## ► Références

- Battilani P., Camardo Leggieri M., Rossi V. *et al.*, 2013. AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture*, 94, 38-46, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.03.005>.
- Cairns-Fuller V., Aldred D., Magan N., 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1215-1221, <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2005.02695.X>.
- Camardo Leggieri M., Mazzoni M., Battilani P., 2021. Machine Learning for Predicting Mycotoxin Occurrence in Maize. *Frontiers in Microbiology*, 12, 661132, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661132>.
- Cervini C., Gallo A., Piemontese L. *et al.*, 2020. Effects of temperature and water activity change on ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* in field-simulating conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 315, 108420, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108420>.
- García D., Ramos A.J., Sanchis V. *et al.*, 2011. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 28, 406-417, <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.10.004>.
- García-Cela E., Verheeecke-Vaessen C., Ósk-Jónsdóttir I. *et al.*, 2022. Growth Kinetic Parameters and Prediction of Growth and Zearalenone and Deoxynivalenol Production Boundaries by Three *Fusarium asiaticum* Strains Isolated from Wheat. *Fermentation*, 8, 577, <https://doi.org/10.3390/fermentation8110577>.
- Gasparini A.M., Rodríguez-Sixtos A., Verheeecke-Vaessen C. *et al.*, 2019. Resilience of Biocontrol for Aflatoxin Minimization Strategies, Climate Change Abiotic Factors May Affect Control in Non-GM and GM-Maize Cultivars. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2525, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02525>.
- Gil-Serna J., Vazquez C., Sandino F.G. *et al.*, 2014. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Research International*, 61, 127-131, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.058>.
- Hjelkrem A.G.R., Aamot H.U., Brodal G. *et al.*, 2018. HT-2 and T-2 toxins in Norwegian oat grains related to weather conditions at different growth stages. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 501-514, <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1394-3>.
- Kapetanakou A.E., Panagou E.Z., Gialitaki M. *et al.*, 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control*, 20, 725-732, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.008>.
- Lee H.B., Patriarca A., Magan N., 2015. *Alternaria* in Food, Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology*, 43, 93-106, <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93>.
- Liu C., Manstretta V., Rossi V. *et al.*, 2018. Comparison of Three Modelling Approaches for Predicting Deoxynivalenol Contamination in Winter Wheat. *Toxins*, 10, 277, <https://doi.org/10.3390/TOXINS10070267>.
- Medina A., Akbar A., Baazeem A. *et al.*, 2017. Climate change, food security and mycotoxins, Do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, 31, 143-154, <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2017.04.002>.
- Pei P., Xiong K., Wang X. *et al.*, 2022. Predictive growth kinetic parameters and modelled probabilities of deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* on wheat during simulated storing conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 133, 349-361, <https://doi.org/10.1111/JAM.15557>.
- Perera D., Savocchia S., Prenzler P.D. *et al.*, 2021. Occurrence of fumonisin-producing black aspergilli in Australian wine grapes, effects of temperature and water activity on fumonisin production by *A. niger* and *A. welwitschiae*. *Mycotoxin Research*, 37, 327-339, <https://doi.org/10.1007/S12550-021-00438-8>.

- Samapundo S., Devlieghere F., De Meulenaer B. *et al.*, 2005. Effect of Water Activity and Temperature on Growth and the Relationship between Fumonisin Production and the Radial Growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on Corn. *Journal of Food Protection*, 68, 1054-1059, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1054>.
- Tannous J., Atoui A., El Khoury A. *et al.*, 2016. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production, effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science and Nutrition*, 4, 611-622, <https://doi.org/10.1002/FSN3.324>.
- Verheecke-Vaessen C., Diez-Gutierrez L., Renaud J. *et al.*, 2019. Interacting climate change environmental factors effects on *Fusarium langsethiae* growth, expression of Tri genes and T-2/HT-2 mycotoxin production on oat-based media and in stored oats. *Fungal Biology*, 123, 618-624, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.008>.
- Verheecke-Vaessen C., Garcia-Cela E., Lopez-Prieto A. *et al.*, 2021. Water and temperature relations of *Fusarium langsethiae* strains and modelling of growth and T-2 and HT-2 mycotoxin production on oat-based matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 348, 09203, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109203>.
- Vipotnik Z., Rodríguez A., Rodrigues P., 2017. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 244-251, <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.10.031>.
- Xu F., Liu W., Song Y. *et al.*, 2021. The distribution of *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum* causing fusarium head blight of wheat in relation to climate and cropping system. *Plant Disease*, 105, 2830-2835, <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0013-RE>.

# Facteurs et mécanismes de régulation de la biosynthèse des mycotoxines

Olivier Puel, Chrystian Zetina-Serrano et Sophie Lorber

## ►► Introduction

Comme en attestent les chapitres précédents, les mycotoxines n'appartiennent pas à une seule famille chimique, mais constituent un groupe disparate de molécules d'origines biosynthétiques différentes. Cependant, la synthèse de ces molécules obéit à des processus communs. Un grand nombre de travaux visant à caractériser les mécanismes, d'une part de biosynthèse et d'autre part de régulation, ont été menés sur des espèces toxigènes ou d'intérêt pour les industries pharmaceutique et agroalimentaire. Aussi, c'est par le biais de nombreux exemples que nous tenterons de comprendre comment un champignon synthétise ses mycotoxines, quels sont les facteurs environnementaux qui déclenchent cette synthèse et quels sont les mécanismes de régulation régissant le métabolisme spécialisé fongique.

## ►► Voie de biosynthèse et *clusters* de gènes

Les mycotoxines, comme tout métabolite spécialisé, sont les produits de cascades enzymatiques dont les précurseurs sont des unités chimiques simples issues du métabolisme primaire telles que l'acétyl-CoA, le malonyl-CoA ou les acides aminés. La synthèse débute généralement par l'action d'enzymes qui catalysent la formation du squelette de la molécule. Parmi ces enzymes peuvent être citées les polycétide synthases (PKS pour *Polyketide Synthase* en anglais), qui prendront en charge des métabolites du cycle de Krebs tels que l'acétyl-CoA, les enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (NRPS pour *Non Ribosomal Peptide Synthetase*), qui auront comme substrat des acides aminés, mais également des terpène cyclases ou

des tryptophane prényltransférases, qui catalyseront les réarrangements de molécules dérivées de la voie du mévalonate telles que l'isopentényl-pyrophosphate (IPP), le diméthylallyl-PP, le géranyl-PP ou le farnésyl-PP. La structure du squelette sera ensuite modifiée *via* une multitude de réactions chimiques variées (réduction, hydroxylation, méthylation, acétylation, cyclisation, époxydation), qui se combineront entre elles pour aboutir à un produit qui ne sera plus transformé et qui sera généralement sécrété par la cellule fongique.

Dans la plupart des cas, toutes les enzymes d'une voie de biosynthèse sont actives au même moment de façon à ce que le produit d'une enzyme soit pris immédiatement en charge par l'enzyme suivante, et ainsi de suite le long de la cascade biosynthétique. Ce processus implique donc que, simultanément, toutes les enzymes impliquées soient produites et que les gènes les codant soient coactivés. Cela est rendu possible par l'organisation physique de ces gènes, qui sont regroupés sous forme de *clusters*. En règle générale, tous les gènes sont activés par un facteur de transcription (FT) spécifique codé par un gène très souvent localisé à l'intérieur même du *cluster*. Deux types de FT spécifiques peuvent être distingués : les FT à doigt de zinc, représentant plus de 90 % des FT codés par des gènes localisés dans des *clusters* associés au métabolisme spécialisé, et les FT à glissière à leucine (*leucine zipper* ou bZIP).

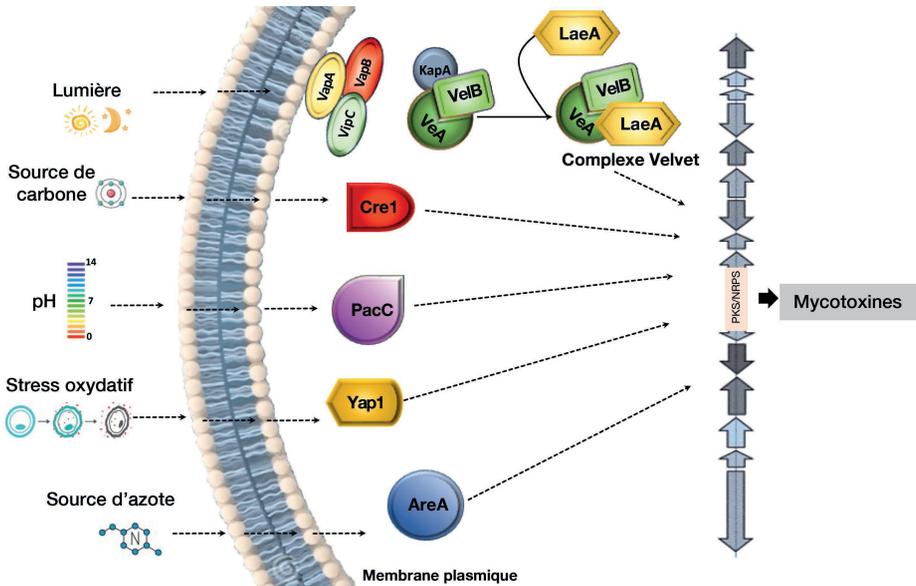
AflR, le FT activant la production des aflatoxines (AF) chez *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, fait figure d'exemple historique (chapitre 1). Isolé concomitamment chez ces deux espèces, AflR est le premier FT associé à la synthèse d'un métabolite spécialisé. Il présente un motif riche en résidus de cystéine,  $Zn(II)_2Cys_6$ , qui s'organisent autour de deux atomes de zinc composant une structure en forme de trèfle qui va se fixer sur l'ADN au niveau d'une région de 11 paires de bases : 5'-TCGN<sub>5</sub>CGA-3'. Le motif de fixation d'AflR a été identifié sur les promoteurs de 18 gènes sur les 30 gènes que contient le *cluster* des AF, y compris sur celui du gène *aflR*, suggérant une autorégulation. Parmi les mycotoxines dont les niveaux de contamination sont soumis à une réglementation, PatL a été caractérisé comme l'activateur de la synthèse de la patuline (PAT) chez *Penicillium expansum* (chapitre 3). Une analyse d'homologie montre qu'un gène orthologue codant pour PatL, localisé dans le *cluster* de la PAT, est présent chez toutes les espèces productrices de PAT, quel que soit le genre. Ce gène est également conservé chez toutes les espèces de *Penicillium* dont le génome a été séquencé à ce jour, laissant suggérer que ce FT aurait d'autres fonctions au sein du genre *Penicillium*. Au sein du *cluster* de gènes impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes se loge le gène *tri6*, codant pour un FT de type doigt de zinc indispensable pour la production de ces composés chez *Fusarium graminearum*. Ce gène est commun à toutes les espèces produisant les trichothécènes des types A et B. Des analyses transcriptomiques, d'une part, et de ChIP-Seq, d'autre part, ont montré que chez *F. graminearum* TRI6 fait office de FT global étendant son influence au-delà des seuls gènes du *cluster* des trichothécènes sur potentiellement environ 200 autres gènes cibles.

En ce qui concerne d'autres toxines majeures, seuls les FT spécifiques de la voie de biosynthèse de l'ochratoxine A (OTA) et de la voie de biosynthèse de la zéaralénone (ZEN) appartiennent à la famille des FT à bZIP. Il s'agit respectivement de OTAR1 et ZEB2. Le mécanisme d'action original de ce dernier a été plus particulièrement étudié. Il a été décrit précédemment dans cet ouvrage (chapitre 4). Aussi, nous ne nous y attarderons pas.

De nombreux autres FT spécifiques ont été identifiés. Les séquençages de génomes ont révélé qu'environ 50 % des *clusters* liés au métabolisme spécialisé abritaient au moins un gène codant pour un FT. C'est ainsi le cas de FUM21, GLIZ et CTNA, trois autres FT de type Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> impliqués respectivement dans la régulation de la synthèse des fumonisines, de la gliotoxine et de la citrinine (CIT). Aujourd'hui, seul le FT spécifique de la voie de biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot demeure inconnu. Bien qu'identifié depuis 2003, le *cluster* de gènes impliqué serait dépourvu de gène régulateur.

## ► Stimuli environnementaux et régulateurs globaux associés

Les champignons doivent s'adapter à tout changement de leur environnement et répondre rapidement à tout stimulus (figure 14.1). La synthèse de métabolites spécialisés fait partie de leurs panoplies de réponse. Le métabolisme spécialisé est dépendant aussi du stade développemental du champignon. Par exemple, la raréfaction des ressources nutritives va induire chez certains champignons la reproduction par sporulation et ainsi la production de métabolites spécifiques.



**Figure 14.1.** Facteurs de transcription globaux impliqués dans la régulation des *clusters* de gènes du métabolisme spécialisé chez les champignons microscopiques. L'illustration montre un modèle de *cluster* de gènes contenant un gène codant pour une enzyme hybride PKS-NRPS.

## Le pH

Un des stimuli environnementaux les plus étudiés induisant ou réprimant la production de mycotoxines est le pH (Macheleidt *et al.*, 2016 ; Keller, 2019). Celui-ci influence la production d'OTA, des AF, de la fumonisine et des trichothécènes, avec

une réponse médiée par le FT PacC (Li *et al.*, 2022). Ce dernier active la production de pénicilline ou de PAT à pH alcalin, mais réprime la biosynthèse des AF, des fumonisines ou des trichothécènes, dans la même gamme de pH. Ce FT contient trois motifs Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> à doigt de zinc identiques chez les ascomycètes. Un pH neutre ou alcalin extracellulaire est requis pour l'activation de PacC *via* deux réactions protéolytiques. L'une d'elles est catalysée par la protéase PalB, elle-même guidée par PalA se fixant sur la forme immature de PacC, qui devient incapable de pénétrer dans le noyau ; la seconde est catalysée par le protéasome. PalA et PalB font partie de la voie Pal qui non seulement participe à l'activation de PacC, mais aussi permet à la cellule fongique de percevoir le pH ambiant. Une fois tronqué, PacC pénètre dans le noyau et va se fixer à l'aide de ses trois structures à doigt de zinc à des motifs spécifiques présents sur les promoteurs, activant ainsi les gènes qui s'expriment dans des conditions alcalines et réprimant, à l'inverse, les gènes exprimés en conditions acides. Les mécanismes de régulation actionnés en aval de PacC sont mal connus. Très récemment, il a été montré que PacC régule positivement l'expression des ATPases EnaA-EnaC, éléments clés de la tolérance vis-à-vis des ions des métaux alcalins tels que Na<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup> chez *Aspergillus nidulans* et *P. expansum*. La création de mutants déficients pour ces trois protéines conduit à une diminution significative des expressions des gènes du *cluster* de la PAT et par conséquent à une diminution de la production de la toxine.

## Sources de carbone et d'azote

Depuis une trentaine d'années, la composition du substrat a été étudiée comme facteur influençant le métabolisme spécialisé (Macheleidt *et al.*, 2016 ; Keller, 2019). Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser uniquement sur la source d'azote ou de carbone.

La capacité des champignons à métaboliser une large gamme de composés azotés leur permet de coloniser une grande variété d'habitats et de survivre à des environnements appauvris en sources azotées préférentielles. En effet, une grande majorité des espèces fongiques favorise certaines molécules comme l'ammonium ou la glutamine. Lors de l'appauvrissement de ces sources, l'utilisation de sources secondaires nécessite un système enzymatique qui a été réprimé tant que les sources azotées principales étaient présentes en quantité suffisante. Il s'avère que le mécanisme régulateur régissant cette répression conditionne également la capacité du champignon à synthétiser des métabolites spécialisés tels que les mycotoxines (Tudzynski, 2014). Le principal régulateur du métabolisme est le FT AreA à doigt de zinc Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>2</sub>, qui se fixe au moins à deux motifs 5'HGATAR-3', situés à moins de 30 paires de bases l'un de l'autre. Plusieurs voies de biosynthèse sont soumises à l'action d'AreA telles que celles de la PAT, des AF et des fumonisines. Chez *F. graminearum*, la délétion du gène *areA* inhibe la production des trichothécènes, mais pas celle de la ZEN.

La source de carbone joue aussi un rôle primordial dans la production des mycotoxines, en activant ou en réprimant certaines voies de biosynthèse. À titre d'exemple, le glucose va stimuler la production d'AF, tandis que le glucose, le saccharose ou l'arabinose déclenchent la production d'OTA chez *Aspergillus niger*. La production de ces mycotoxines en réponse à la source de carbone trouve son origine dans l'action

de CreA, le plus connu des régulateurs du métabolisme du carbone. Autre exemple, la perte de CreA induit une absence de production de la PAT lorsque *P. expansum* se développe dans les pommes (El Hajj Assaf *et al.*, 2020).

## Stress oxydant et stress osmotique

Pour la cellule fongique, les stress oxydant et osmotique sont deux types de stress auxquels elle est confrontée et auxquels elle doit répondre pour survivre. La biosynthèse de certaines mycotoxines telles que les AF a été décrite comme une réponse métabolique à un stress oxydant. Aujourd'hui, il est clairement établi qu'un stress oxydant active aussi la production des trichothécènes chez *F. graminearum*. Yap1, un facteur de transcription de type bZIP, a été identifié comme coordonnant l'interaction entre le stress oxydant et le métabolisme spécialisé. Lors d'un stress oxydant, Yap1 s'accumule à l'intérieur du noyau et se fixe sur les promoteurs de gènes codant pour des enzymes antioxydantes. Aussi, en présence d'agent oxydant, Yap1 permet de rétablir le potentiel redox de la cellule fongique. En son absence, le stress oxydant persiste, ce qui induit la production de certaines mycotoxines. Ainsi, chez *F. graminearum*, l'invalidation de ce facteur a conduit à une surproduction de trichothécènes qui s'explique par la surexpression des gènes du *cluster*. Chez *A. parasiticus*, l'absence de Yap1 conduit à une activation précoce du régulateur spécifique AfIR entraînant une production prématurée d'AF (Reverberi *et al.*, 2018).

Les liens entre d'autres FT impliqués dans la réponse au stress oxydant et le métabolisme spécialisé ont été particulièrement étudiés ces dernières années. Chez *F. graminearum*, en l'absence du facteur de transcription Atf1, une diminution de la production des trichothécènes *in planta* accompagnée d'une moindre virulence est observée (Liu *et al.*, 2015) tandis qu'AtfB, son homologue chez *A. parasiticus*, est directement impliqué dans la régulation de la production d'AF puisqu'il se fixe sur les promoteurs de six gènes du *cluster* des AF (Hong *et al.*, 2013). Chez certaines espèces, le stress osmotique peut réguler la production de mycotoxines. C'est le cas pour *Penicillium verrucosum*, où des teneurs croissantes en NaCl du milieu induisent la production d'OTA, contrairement à la production de CIT qui décroît au fur à mesure de l'accroissement de la concentration en NaCl. Cette réponse au stress osmotique met en jeu la voie signalétique HOG (*High Osmolarity Glycerol*). Cela a été confirmé, d'une part, par l'évaluation de l'état de phosphorylation de la HOG MAP kinase et, d'autre part, par l'invalidation de *hog*, le gène correspondant (El Hajj Assaf *et al.*, 2020).

## La lumière

Depuis des décennies, la lumière est identifiée comme un autre paramètre clé de la régulation du métabolisme spécialisé. Une régulation positive de la production d'alternariol par la lumière a été décrite tandis que l'effet contraire a été observé pour la voie commune menant à la synthèse de la stérigmatocystine (ST) et des AF. Grâce à des photorécepteurs, les champignons détectent la lumière de différentes longueurs d'onde. Chez *Neurospora crassa*, la plupart des réponses à la lumière sont déclenchées par la lumière bleue *via* les protéines *white collar* (Keller, 2019),

alors que chez *Aspergillus nidulans* la lumière rouge joue un rôle dominant (Yang *et al.*, 2022). Chez *Alternaria alternata*, la lumière bleue et la lumière rouge semblent toutes deux importantes.

La réponse à la lumière est contrôlée en aval par un complexe protéique appelé complexe Velvet, constitué de trois protéines : VelB, VeA et LaeA. Cette dernière protéine possède un domaine de fixation S-adenosyl-méthionine présent chez toutes les méthyltransférases. Chez *A. nidulans*, ce complexe va connecter le développement et la reproduction sexuée avec le métabolisme spécialisé. À la lumière, seules VeA et VelB vont interagir. À l'obscurité, les protéines VelB, VeA et LaeA interagissent entre elles et l'importine  $\alpha$  KapA leur permet de pénétrer dans le noyau. La membrane nucléaire franchie, le complexe VelB/VeA/LaeA va se fixer sur les promoteurs des gènes cibles et activer leur expression. De plus, LaeA favoriserait le relâchement de l'hétérochromatine en modifiant la méthylation des histones, permettant ainsi l'accès des FT aux régions promotrices des gènes. LaeA jouerait donc le rôle de régulateur épigénétique global du métabolisme spécialisé, ce qui est suggéré par la réduction du métabolisme spécialisé lorsque LaeA est invalidé. Cependant, cette hypothèse n'a pas encore été étayée par une preuve solide, en l'occurrence, l'identification du substrat méthylé par LaeA.

Depuis l'article fondateur de Bayram *et al.* (2008), plusieurs équipes ont étudié le rôle de ce complexe chez de nombreuses espèces. Chez *P. expansum*, la production de PAT est sérieusement altérée en l'absence d'une des trois protéines, confirmant qu'un complexe Velvet fonctionnel est indispensable à la biosynthèse de cette mycotoxine (El Hajj Assaf *et al.*, 2020 ; Tahtah *et al.*, 2023). Il en est de même chez *A. flavus* où des interactions entre VelB, VeA et LaeA sont requises pour la production d'AFB<sub>1</sub> et d'AFB<sub>2</sub> (Moon *et al.*, 2023). Ce complexe protéique n'est pas propre à la famille des *Aspergillaceae* représentée ici par les genres *Aspergillus* et *Penicillium* (classe des *Eurotiomycetes*).

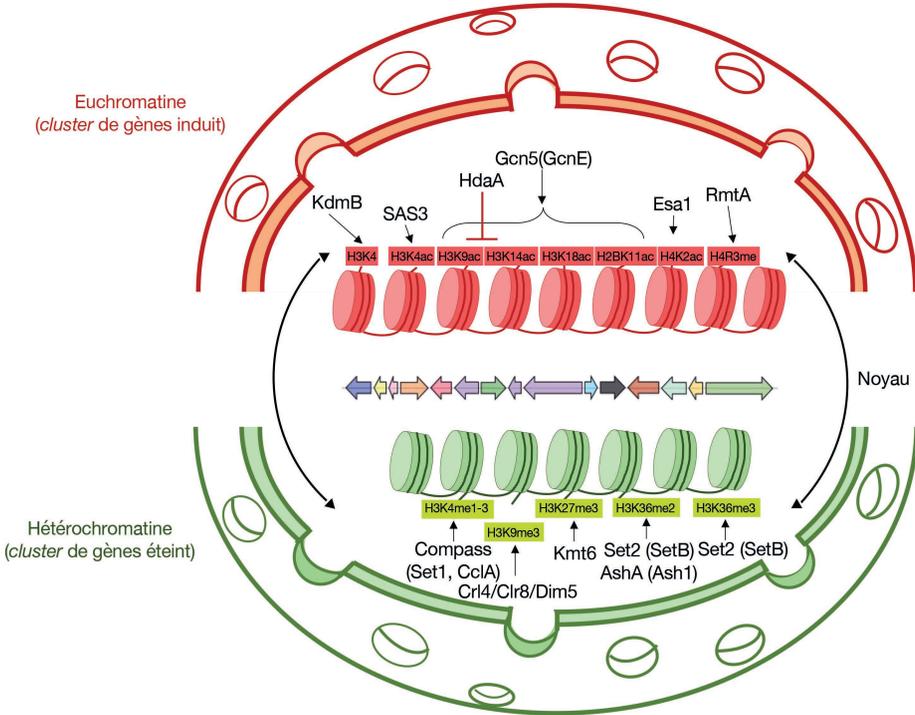
Un complexe similaire est présent chez des espèces d'autres classes telles que les *Sordariomycetes* (*Fusarium* spp., *N. crassa*) ou les *Leotiomycetes* (*Botrytis cinerea*). À titre d'exemple, chez *F. graminearum*, l'invalidation du gène de l'une des trois protéines du complexe conduit systématiquement à une réduction de la synthèse du déoxynivalénol (DON), accompagnée *in planta* d'une atténuation de la virulence (Merhej *et al.*, 2012).

Bien que de nombreuses études aient montré l'importance de la température et de l'activité en eau  $a_w$  (chapitre 13), aucun FT global régulant la réponse du champignon à ces signaux environnementaux n'a encore été identifié.

## ► Régulation épigénétique

La colocalisation sous forme de *clusters* des gènes soumis à une même régulation et impliqués dans la synthèse d'un métabolite spécialisé confère des avantages à l'organisme qui le possède : la capacité à répondre à une pression écologique dynamique et la possibilité de transférer à une autre espèce, en un seul évènement, tout un arsenal de gènes associés à une fonction, ici la capacité de produire un métabolite spécialisé.

Cependant, la contrepartie d'une organisation des gènes en *clusters* est que de vastes régions chromosomiques doivent être accessibles pour permettre une transcription efficace. Ainsi, l'état de relâchement de la chromatine est un paramètre important dans la régulation de la biosynthèse des mycotoxines (figure 14.2).



**Figure 14.2.** La chromatine a un impact sur la régulation transcriptionnelle des *clusters* de métabolites spécialisés (MS). Les *clusters* de gènes de MS peuvent être situés dans des régions génomiques hétérochromatiques transcriptionnellement répressives (en vert). En réponse à différents signaux environnementaux, la chromatine peut passer (flèches noires) d'hétérochromatine à euchromatine transcriptionnellement active (en rouge), permettant ainsi l'activation des *clusters* de MS. D'après Collemare et Seidl, 2019.

## Acétylation et désacétylation des histones

Les premiers éléments en faveur d'une régulation épigénétique ont été mis en évidence par une étude montrant une corrélation entre le niveau d'acétylation de l'histone 4 au niveau des promoteurs des gènes du *cluster* des AF et l'ordre de la transcription des différents gènes (Roze *et al.*, 2007). En effet, plus les extrémités N-terminales des histones sont acétylées, plus la chromatine est décompactée et les sites de liaisons des FT et de la RNA polymérase accessibles. Cette observation a été confirmée chez *A. nidulans* pour le gène *hdaA* qui code pour une histone désacétylase. L'absence de ce gène aboutit à la surexpression d'AflR.

L'une des acétyltransférases les plus étudiées est GCN5, responsable de l'acétylation des résidus lysine K9 et K14 de l'histone 3 (H3K9 et H3K14) à de nombreux loci chez

*A. nidulans*. Chez *A. flavus*, GcnE, qui acétyle uniquement en H3K14, est requis pour la production des AF. Chez *F. graminearum*, la délétion de *gcn5* induit une inhibition de la production de DON suggérant que l'acétylation des lysines H3K18 et/ou H2BK11 est importante pour la biosynthèse du DON. Très récemment, une étude a montré que la forme tronquée de PacC se fixe, à pH alcalin, sur *gcn5*, ce qui compromet l'acétylation d'extrémités N-terminales de H3 et H2B (Gu *et al.*, 2022) et suggère que la répression de la biosynthèse des trichothécènes par PacC passe par l'activité de GCN5.

La famille MYST est une autre famille d'acétyltransférases importante. Chez *A. nidulans*, un des membres de cette famille, Esa1, régule positivement la production de ST en acétylant l'histone H4 en H4K2 au niveau du *cluster* des AF/ST. Lors de ces travaux, il a été mis en évidence qu'une surexpression de *esa1* restaure la production de ST chez une souche déficiente  $\Delta$ *LaeA*, suggérant que cette méthyltransférase agit sur l'histone H4. Un autre membre de la famille MYST, SAS3, a été étudié pour son implication dans la régulation du métabolisme spécialisé chez *F. graminearum*. Cette acétyltransférase est indispensable à l'acétylation de H3K4. De même, SAS3 est requis pour une production normale du DON.

## Méthylation et déméthylation des histones

L'acétylation n'est pas le seul type de modifications post-traductionnelles de l'extrémité N-terminale des histones. Parmi les autres types, la méthylation des lysines fait figure de processus majeur dans la régulation épigénétique du métabolisme spécialisé. Contrairement à l'acétylation des histones qui est associée généralement à l'activation transcriptionnelle, la méthylation n'est pas synonyme d'une telle activation.

Le complexe protéique COMPASS, hautement conservé chez les eucaryotes, est impliqué dans la méthylation de H3K4. Au sein du complexe, la méthyltransférase associée est dénommée Set1. Chez *P. expansum*, Set1 est requise pour la mono-, di- et triméthylation de H3K4 au niveau de plusieurs régions du *cluster* de la PAT, activant de ce fait sa biosynthèse (Xu *et al.*, 2023). De même, la triméthylation H3K4me3 par Set1 conduit à l'activation des voies de biosynthèse des trichothécènes et des fumonisines respectivement chez *F. graminearum* et *F. verticillioides* (Gu *et al.*, 2017 ; Liu *et al.*, 2015). Par contre, la perte de CclA codant pour un partenaire de Set1 au sein du complexe COMPASS conduit à la surproduction de gliotoxine chez *A. fumigatus*. La triméthylation H3K9me3 est catalysée par Crl4/ClrD/Dim-5, la même protéine portant des noms différents selon les espèces. Cette triméthylation est une marque dite répressive. En effet, chez *A. nidulans*, la perte de ClrD conduit à une augmentation de l'expression des gènes de plusieurs *clusters* du métabolisme spécialisé, dont celui des AF/ST. Chez *F. verticillioides*, Dim-5 est le responsable majeur de la triméthylation H3K9me3 et réprime la production de fumonisines.

Initialement caractérisée chez la drosophile, la méthyltransférase KMT6, responsable de la marque répressive H3K27me3, fait partie du complexe PRC2. Bien que conservé dans le règne fongique, le gène correspondant ainsi que d'autres gènes codant pour des composants du complexe PRC2 sont absents des génomes des *Aspergillaceae*. De ce fait, la lysine 27 de l'histone H3 n'est pas modifiée. Excepté chez ces espèces, la marque H3K27me3 est très fréquente sur les extrémités

subtélomériques des chromosomes fongiques, régions à la fois très riches en hétérochromatine et en *clusters* du métabolisme spécialisé. Chez les espèces du genre *Fusarium*, un tiers du génome est couvert par cette marque. Chez *F. fujikuroi*, la perte de *KMT6* mène à l'activation du *cluster* de la beauvéricine (Niehaus *et al.*, 2016). Chez *Epichloe festucae*, la perte de *eshB*, le gène orthologue de *kmt6*, conduit à la dérégulation du *cluster* des alcaloïdes de l'ergot (Chujo et Scott, 2014).

Les membres de la famille Set2 sont à ce jour les seules H3K36 méthyltransférases identifiées chez les champignons. Chez *A. flavus*, deux méthyltransférases : AshA (Ash1) et SetB (Set2) régulent la diméthylation H3K36me<sub>2</sub>, tandis que SetB (Set2) catalyse aussi la triméthylation H3K36me<sub>3</sub>. Il semblerait que chez *F. fujikuroi* ces deux enzymes ciblent des régions chromosomiques différentes, Ash1 intervenant plutôt au niveau des extrémités subtélomériques. La perte d'un de ces deux gènes génère une sous-expression drastique des gènes du *cluster* de l'AF et conduit à une absence de production de l'AFB1 (Yang *et al.*, 2022). De même, lorsque la lysine K36 est substituée par une alanine pour les deux gènes, aucune méthylation n'est possible et aucune trace d'AFB1 n'est détectée, confirmant que la méthylation de H3K36 est indispensable à la production de l'AFB1. Chez *F. verticillioïdes*, Set2 est requis pour la production de fumonisine B1.

En plus des résidus lysines, certains résidus arginines comme le H4R3 peuvent aussi être méthylés au niveau des histones. La méthylation conduit à une activation ou à une répression. Cela dépend si la diméthylation survient sur un seul des atomes d'azote terminaux (activation) ou si elle se répartit sur les deux atomes (répression). Le seul exemple d'arginine méthyltransférase impliquée dans la régulation du métabolisme spécialisé fongique est l'arginine méthyltransférase A (RmtA ou AMT1 selon les espèces). Celle-ci régule positivement la production du DON chez *F. graminearum* et de l'AFB1 chez *A. flavus*.

Le compactage de la chromatine en hétérochromatine et son relâchement en euchromatine sont des phénomènes dynamiques durant la vie de la cellule fongique. Aussi, les marques de méthylation ou d'acétylation sont réversibles et peuvent être supprimées respectivement par des lysine déméthylases ou désacétylases. Deux classes de lysine déméthylases ont été rapportées dans la littérature, les déméthylases possédant un domaine Jumonji C (JmjC) et des amine oxydases Kdm1. Seules les enzymes possédant le domaine JmjC sont capables de déméthyliser les trois formes de méthylation (me<sub>3</sub>) des lysines. Chez *A. nidulans*, KdmB est une déméthylase H3K4me<sub>3</sub> spécifique contenant un domaine JmjC. Cette déméthylase est requise pour une induction normale des gènes de plusieurs *clusters*, dont celui des AF/ST. H2A.Z est un variant d'histone hautement conservé chez les eucaryotes et il a été prouvé que deux modifications post-transcriptionnelles d'histone (H3K4me<sub>2/3</sub> et H3K27me<sub>3</sub>), impliquées dans la production de MS chez les champignons filamenteux, se colocalisent avec ce variant. Chez *F. graminearum*, une souche mutante de délétion  $\Delta H2A.Z$  a montré une réduction drastique de la production de DON et de 15-ADON (Chen *et al.*, 2020).

## ►► Conclusion

La régulation de la biosynthèse des mycotoxines est un processus complexe, extrêmement contrôlé à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau épigénétique, en lien direct quelquefois avec le développement et la reproduction du champignon. La production des mycotoxines est déclenchée par de nombreux stimuli environnementaux (pH, lumière, stress oxydant, sources de carbone, d'azote et de minéraux) qui agissent par l'intermédiaire de facteurs de transcription globaux, eux-mêmes activant les facteurs spécifiques localisés au sein des *clusters*. Bien que de nombreux mécanismes de régulation aient été déjà identifiés, il en reste certainement encore beaucoup à caractériser pour élucider l'ensemble des processus moléculaires régulant la production des mycotoxines. De plus, la connaissance est très inégale selon les mycotoxines ; en particulier, elle reste très parcellaire pour les toxines émergentes, comme la beauvéricine, les enniatines, l'apicidine, l'aurofusarine ou la moniliformine.

## ►► Références

- Bayram O., Krappmann S., Ni M. *et al.*, 2008. VelB/VeA/LacA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320, 1504-1506, <https://doi.org/10.1126/science.1155888>.
- Chen Z., Zehraoui E., Atanasoff-Kardjalieff A.K. *et al.*, 2020. Effect of H2A.Z deletion is rescued by compensatory mutations in *Fusarium graminearum*. *PLoS Genetics*, 16, e1009125, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009125>.
- Chujo T., Scott B., 2014. Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis. *Molecular Microbiology*, 92, 413-434, <https://doi.org/10.1111/mmi.12567>.
- Collemare J., Seidl M.F., 2019. Chromatin-dependent regulation of secondary metabolite biosynthesis in fungi, is the picture complete? *FEMS Microbiology Review*, 43, 591-607, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz018>.
- El Hajj Assaf C., Zetina-Serrano C., Tahtah N. *et al.*, 2020. Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* genus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9462, <https://doi.org/10.3390/ijms21249462>.
- Gu Q., Tahir H.A.S., Zhang H. *et al.*, 2017. Involvement of FvSet1 in fumonisine B1 biosynthesis, vegetative growth, fungal virulence, and environmental stress responses in *Fusarium verticillioides*. *Toxins*, 9, 43, <https://doi.org/10.3390/toxins9020043>.
- Gu Q., Wang Y., Zhao X. *et al.*, 2022. Inhibition of histone acetyltransferase GCN5 by a transcription factor FgPacC controls fungal adaption to host-derived iron stress. *Nucleic Acids Research*, 50, 6190-6210, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac498>.
- Hong S.-Y., Roze L.V., Wee J. *et al.*, 2013. Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in *Aspergilli*. *Microbiology-Open*, 2, 144-160, <https://doi.org/10.1002/mbo3.63>.
- Keller N.P., 2019. Fungal secondary metabolism, regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 167-180, <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>.
- Li B., Chen Y., Tian S., 2022. Function of pH-dependent transcription factor PacC in regulating development, pathogenicity, and mycotoxin biosynthesis of phytopathogenic fungi. *FEBS Journal*, 289, 1723-1730, <https://doi.org/10.1111/febs.15808>.
- Liu Y., Liu N., Yin Y. *et al.*, 2015. Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism and multiple stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environmental Microbiology*, 17, 4615-4630, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12993>.

- Macheleidt J., Mattern D.J., Fischer J. *et al.*, 2016. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50, 371-392, <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>.
- Merhej J., Urban M., Dufresne M. *et al.*, 2012. The Velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 363, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x>.
- Moon H., Han K.-H., Yu J.H., 2023. Upstream regulation of development and secondary metabolism in *Aspergillus* species. *Cells*, 12, 2, <https://doi.org/10.3390/cells12010002>.
- Niehaus E.-M., Studt L., von Bargen K.W. *et al.*, 2016. Sound of silence, the beauvericin cluster in *Fusarium fujikuroi* is controlled by cluster-specific and global regulators mediated by H3K27 modification. *Environmental Microbiology*, 18, 4282, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13576>.
- Reverberi M., Zjalic S., Ricelli A. *et al.*, 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis, a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryotic Cell*, 7, 988, <https://doi.org/10.1128/EC.00228-07>.
- Roze L.V., Arthur A.E., Hong S.-Y. *et al.*, 2007. The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Molecular Microbiology*, 66, 713-726, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05952.x>.
- Tahtah N., Zetina-Serrano C., Rocher O. *et al.*, 2023. Implication of VelB in the development, pathogenicity and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 195, 112121, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112121>.
- Tudzynski B., 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 5, 656, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00656>.
- Xu X., Chen Y., Li B. *et al.*, 2023. Histone H3K4 methyltransferase PeSet1 regulates colonization, patulin biosynthesis, and stress responses of *Penicillium expansum*. *Microbiology Spectrum*, 11, e03545-22, <https://doi.org/10.1128/spectrum.03545-22>.
- Yang K., Tian J., Keller N.P., 2022. Post-translational modifications drive secondary metabolite biosynthesis in *Aspergillus*, a review. *Environmental Microbiology*, 24, 2857-2881, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16034>.

# **Quelles pratiques agronomiques pour limiter la contamination par des mycotoxines en prérécolte ?**

Béatrice Orlando et Benoît Méléard

## **►► Introduction**

Quelques espèces de champignons, naturellement présentes dans l'environnement, sont à l'origine des principales contaminations au champ des denrées agricoles par des mycotoxines. La maîtrise du risque de contamination repose prioritairement sur la lutte prophylactique, dans l'objectif de limiter la survie de l'inoculum. En France, les principales cultures concernées sont les céréales ; la gestion agronomique des mycotoxines abordée ici se focalise par conséquent sur ces grandes cultures.

Les actions à mettre en œuvre débutent bien avant le semis, par le choix de la rotation et par la gestion des résidus de la culture précédente, afin de maîtriser le potentiel infectieux dans l'environnement de la parcelle. À l'implantation, le choix de semences non contaminées et une date de semis adaptée de la culture vont compléter ces mesures dans une stratégie d'évitement. Le choix de variétés moins sensibles aux contaminations est un levier efficace, mais l'information est disponible pour un nombre limité de couples toxines/cultures.

## **►► Une gestion multifactorielle qui s'adapte pour chaque couple toxine/culture**

La gestion des mycotoxines est multifactorielle et peut s'appuyer sur divers leviers d'atténuation : le pilotage de l'irrigation, l'utilisation de la protection fongicide, le contrôle des graminées adventices ou des populations d'insectes foreurs, pour citer

les plus courants. Toutefois, le déploiement de ces techniques de prévention ne prend un sens que dans des ensembles cohérents de pratiques agricoles, en interaction avec le climat. En effet, leur action est variable selon les communautés fongiques présentes et les spécificités de la culture concernée, car l'occurrence des mycotoxines varie d'une production à l'autre (tableau 15.1). Ainsi, du fait de la multiplicité des facteurs agroclimatiques et des techniques culturales entrant en jeu, la gestion des mycotoxines au champ se conduit au cas par cas, c'est-à-dire pour chaque couple mycotoxine/grain. Elle s'est beaucoup développée depuis 30 ans, mais elle n'est documentée correctement que sur quelques mycotoxines : aflatoxines, déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines, ainsi que sur l'ergot et ses alcaloïdes. Toutefois, cette approche verticale gagnerait à être raisonnée à l'échelle du système cultural. En effet, certaines pratiques pertinentes vis-à-vis d'une problématique — semis direct, limitation de la fauche des bordures de parcelles, par exemple — peuvent constituer un facteur favorable à une contamination de la culture.

**Tableau 15.1.** Occurrence des mycotoxines produites au champ pour les principales productions françaises, dans les conditions pédoclimatiques françaises actuelles (exprimée en fréquence de détection).

	DON	ZEN	T2-HT2	FB	BEA	MON	ENN	TA	AE	AF	PA
Blé tendre	gris foncé										
Blé dur	gris foncé										
Orge de printemps	gris foncé										
Orge d'hiver	gris foncé										
Maïs	gris foncé										
Seigle	gris foncé										
Sorgho	gris foncé										
Avoine	gris foncé										
Triticale	gris foncé										
Pomme											gris foncé
Autres fruits, Légumes								gris foncé			gris foncé
Oléoprotéagineux	gris foncé										

En blanc : Présence non étudiée ; en gris clair : absence ou présence faible ; en gris moyen : présence moyennement élevée ; en gris foncé : présence importante.

DON : déoxynivalénol ; ZEN : zéaralénone, T2-HT2 : toxines T2 + HT2 ; FB : fumonisines B1 + B2 ; BEA : beauvéricine ; MON : moniliformine ; ENN : enniatines A, A1, B et B1 ; TA : toxines d'*Alternaria* ; AE : alcaloïdes de l'ergot ; AF : aflatoxines ; PA : patuline.

## ► Maîtriser le potentiel infectieux dans l'environnement de la parcelle : un enjeu majeur

### Influence du précédent cultural

Pour de nombreux champignons, tels que *Fusarium* spp. ou *Aspergillus flavus*, la phase saprophyte s'effectue sur les résidus de culture restant au sol après la récolte (Moreau et Gourdain, 2013). Le précédent cultural et par conséquent la quantité

et la nature des résidus présents dans la parcelle post-récolte peuvent également affecter la biologie des champignons qui vont y passer leur stade saprophyte. À titre d'exemple, un précédent maïs suivi d'un semis direct (sans gestion des résidus) laisse au printemps suivant, pour la culture en place, cinq fois plus de résidus en surface qu'un précédent blé (Caron *et al.*, 2006).

La production d'inoculum sur ces résidus dépend également de l'espèce végétale et de la composition chimique de ses résidus, notamment leur rapport carbone sur azote (C/N). Par exemple, la valeur C/N de la paille de blé est élevée (134), alors que la valeur C/N des feuilles de blé est dix fois plus faible (Nicolardot *et al.*, 2007). Les résidus avec un faible rapport C/N, en particulier les tiges et les grains de maïs, les épillets et les grains de blé faiblement infestés, fournissent un habitat favorable, permettant un développement saprotrophe plus long avant la production de périthèces, par rapport aux résidus pauvres avec un rapport C/N élevé, comme les tiges et les grains de blé gravement infestés (Khonga et Sutton, 1988). Ce rapport évolue par ailleurs au cours de la décomposition des résidus et influence la croissance et la production de macroconidies. Les macroconidies sont produites sur les résidus à un stade précoce de décomposition alors que la production de périthèces a lieu plus tard, lorsque la décomposition est beaucoup plus avancée et les conditions de croissance sont moins favorables.

## Travail du sol et gestion des résidus

Il a été démontré, en inoculant des résidus de différentes cultures, que *Fusarium graminearum* est capable de se développer en saprophyte et de réaliser une reproduction sexuée par production de périthèces sur tout type de résidu, sans distinction entre plantes hôtes et non hôtes de sa phase pathogène (Moreau et Gourdain, 2013). La gestion de ces résidus constitue donc un levier agronomique incontournable dans la maîtrise du potentiel infectieux d'une parcelle : broyer et enfouir précocement les résidus d'un précédent accélère leur décomposition avant le semis, une quasi-nécessité en système de non-labour (Moreau et Gourdain, 2013 ; Orlando, 2022).

Dans le cas de résidus de culture de maïs, présents en quantité importante à la récolte, les tiges servent également de refuge hivernal aux larves de foreurs, pyrales et sésamies, qui iront infester les maïs au printemps suivant. Or, la présence de foreurs constitue un des principaux facteurs de risque de contamination par les fumonisines. Aussi, en système de maïs sur maïs, un broyage fin après la récolte, suivi d'un enfouissement, est indispensable dans toutes les parcelles de maïs grain pour réduire le potentiel infectieux de ces résidus et détruire les larves de foreurs. En maïs fourrage, dans les parcelles les plus infestées, ces opérations culturales ont aussi leur utilité, car des larves peuvent se réfugier dans les 20 cm de tiges restant au champ. Les broyeurs sous bec qui équipent les cueilleurs de la moissonneuse-batteuse ne sont pas adaptés pour assurer un broyage suffisamment fin des résidus. Un passage de broyeur spécifique après la récolte est par conséquent conseillé pour affiner les résidus et faciliter leur enfouissement.

Concernant *Claviceps purpurea*, la phase saprophyte du pathogène s'effectue à même le sol. Les sclérotés tombés à terre à la récolte constituent une source de contamination importante pour les campagnes suivantes, d'autant plus qu'ils sont viables pendant

deux ans (Maunas et Leclère, 2013). En revanche, le labour, en enfouissant à plus de 10 cm les sclérotés, permet de diminuer de 85 % le potentiel infectieux de la parcelle (figure 15.1). Certains sclérotés peuvent toutefois y échapper et se maintenir en surface, l'efficacité du labour n'est donc pas totale. À l'inverse, il est recommandé l'année suivante de se limiter à un travail du sol superficiel pour éviter d'exhumer en surface des sclérotés enfouis l'année précédente. Un second labour n'est pas la solution, car il est susceptible de ramener jusqu'à 60 % de sclérotés dans les couches superficielles du sol. Adapter le travail en cas d'infestation participe ainsi efficacement à la lutte contre l'ergot des céréales, mais impose d'alterner judicieusement labour et travail superficiel.

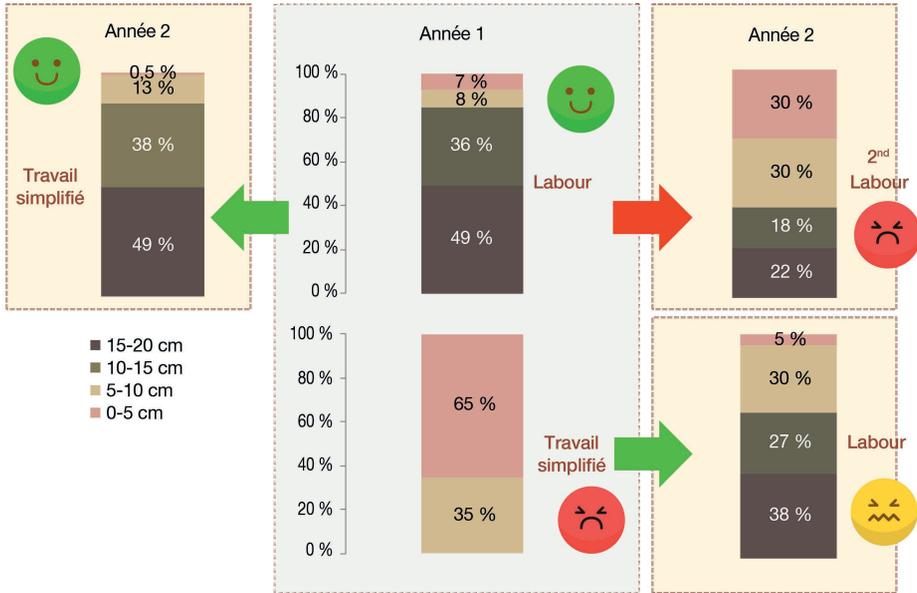


Figure 15.1. Distribution des sclérotés (en pourcentage) dans les horizons du sol, en fonction de la stratégie adoptée pour le travailler. Source : Maumené *et al.*, 2016.

## ► Prévention à l'implantation de la culture

### Qualité des semences

L'utilisation de semences contaminées par des *Fusarium* a un impact visible dès la levée sur l'ensemble de la parcelle, avec des fontes de semis se traduisant par des manques à la levée. La préparation du lot de semences revêt donc un aspect capital dans la gestion du risque de contamination, en limitant la propagation de la maladie dans la parcelle. Le passage à la table densimétrique est une première étape majeure à l'obtention d'une semence de qualité, car elle va permettre d'éliminer les petits grains fusariés. Le traitement des semences contre la fusariose va ensuite accompagner efficacement cette étape pour assurer le peuplement. Des précautions d'usage s'imposent toutefois : le traitement de semences doit en effet être appliqué de façon homogène sur chaque grain, afin de le protéger des contaminations qu'il peut porter, mais aussi de celles venant du sol.

Concernant *Claviceps purpurea*, il n'existe aucun traitement de semence homologué. La préparation des lots de semences doit à ce titre être très rigoureuse et ne tolérer aucun sclérote ou fragment de sclérote, car un apport d'ergot même faible constitue un facteur de première importance dans les risques de contamination de la culture implantée. Pour cette raison, il est préconisé de prélever systématiquement un échantillon de semences et de rechercher la présence d'ergot. En cas de détection, le lot doit être nettoyé au moyen d'une table densimétrique ou d'un trieur optique, puis l'absence de sclérotés doit être vérifiée après le nettoyage.

## Choix variétal et date de semis

Au sein de chaque espèce cultivée, il existe des différences de sensibilité des variétés aux contaminations fongiques ainsi qu'à la toxinogénèse. En France, celle-ci est caractérisée pour la principale toxine d'intérêt, le déoxynivalénol, sur blés et triticales. Pour décrire cette sensibilité et orienter le choix de l'agriculteur, Arvalis publie chaque année un classement de sensibilité à l'accumulation de DON des variétés de blé et de triticales (Arvalis, publications annuelles) inscrites au Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées. Il n'existe pas de classement sur les autres cultures.

La réponse génétique à la sensibilité à l'ergot a aussi été étudiée, en particulier sur seigle, espèce la plus sensible à la maladie. Ce comportement est attribué au caractère allogame de cette culture. La fécondation croisée entre deux plantes conduit à une durée de floraison plus étalée et plus ouverte que celle des blés autogames, ce qui accroît la fenêtre de contamination possible. Par ailleurs, des différences de sensibilité ont aussi été observées selon le mode de production des variétés de seigle, lignées ou hybrides (résultat du croisement de deux lignées différentes). Dans le cas de la production de variétés hybrides, le mécanisme d'hybridation empêche l'autopollinisation dans la lignée maternelle. Si l'inoculum est présent dans l'environnement, l'ergot est susceptible de prendre la place du pollen de seigle au sein de la fleur et de la contaminer. Des essais conduits sur des variétés en parcelles expérimentales démontrent que les lignées sont les moins contaminées et que les variétés hybrides possédant le gène *RfpI* (issu de IRAN IX) sont moins contaminées que les autres hybrides (Roucou et Orlando, 2021). Ce gène augmente fortement la production pollinique, ce qui diminue la période de sensibilité des hybrides à l'ergot, démontrant l'efficacité indirecte de ce gène spécifique au seigle.

Bien que non autorisée en France, l'utilisation du maïs Bt est un levier efficace dans la lutte contre les mycotoxines. Cet organisme génétiquement modifié, au génome complété artificiellement pour obtenir le gène *cryIAb*, possède la faculté de produire son propre insecticide. Résistante aux attaques d'insectes foreurs, la plante apparaît bénéficier de contaminations limitées en fumonisines, en déoxynivalénol mais également en aflatoxines (Wu, 2022).

Outre la sensibilité variétale, le rythme de développement des plantes est aussi variable et peut à ce titre être exploité dans une stratégie d'évitement. En particulier, il existe des différences de précocité des variétés, corrélées à une somme de degrés-jours, mais aussi à la sensibilité à la vernalisation (températures froides hivernales) et à la photopériode. Si cette précocité a peu d'impact sanitaire sur les

cultures d'hiver comme les blés ainsi que les orges de printemps, elle doit être prise en compte pour les cultures d'été comme le maïs. Il faut veiller à un choix de précocité de variété approprié, afin que les besoins en sommes de températures (base 6-30 °C) des variétés pour atteindre la maturité physiologique soient compatibles avec les disponibilités en sommes de températures du lieu d'implantation en fonction de la date de semis. Au-delà du 10-15 mai, la révision du groupe de précocité des variétés s'impose (Orlando, 2022). Pour cela, il est primordial de veiller à la compatibilité entre les besoins en température de la variété pour atteindre la maturité physiologique, les disponibilités en température du lieu et la date de semis. Cela constitue une stratégie d'évitement indispensable à mettre en œuvre pour éviter les récoltes tardives.

Au même titre que la précocité variétale, la date de semis a peu d'impact sanitaire sur les cultures d'hiver comme les blés, et elle n'est donc pas prise en compte directement dans la stratégie de limitation du risque mycotoxines. Toutefois, au sein d'une même exploitation, il est recommandé de diversifier ses variétés pour une même espèce, afin de réduire le risque que toutes les parcelles soient exposées à des conditions favorisantes au même moment. Pour les cultures d'été telles que le maïs, il en va autrement du fait de l'importance des contaminations qui peuvent intervenir sur les phases tardives du cycle des plantes. Aussi, il faut éviter de récolter à des périodes où les conditions météorologiques deviennent propices aux contaminations et, à ce titre, proscrire les semis tardifs pour limiter les décalages de cycle induisant des récoltes retardées qui exposent davantage aux risques sanitaires.

## » Actions curatives en cours de culture

La phénologie de la plante joue un rôle déterminant dans les contaminations. L'identification des stades critiques durant lesquels un pathogène peut s'installer pour ensuite produire des mycotoxines est par conséquent primordiale (encadré).

### **Phénologie de la culture : identifier les stades critiques**

Le stade floraison femelle, juste après la sortie des soies, constitue un stade critique majeur pour l'infection des cultures par *Fusarium*, *Aspergillus* (Gourdain *et al.*, 2009 ; Orlando, 2022) ou *Claviceps purpurea* (Orlando, 2013) : les spores alors présentes sont susceptibles de pénétrer dans l'épi en empruntant le canal des soies. Les conditions climatiques et la dynamique compétitive de la population fongique sont déterminantes.

Dans le cas du maïs, la contamination sur épis peut aussi intervenir par « opportuniste » : *Fusarium* et *Aspergillus* s'installent d'autant plus facilement dans la plante que celle-ci est en état de stress (Orlando, 2022). Le stress hydrique, mais aussi les blessures provenant des insectes foreurs, la grêle ou les infections fongiques déjà en place sur les grains constituent des portes d'entrée pour ces deux pathogènes. C'est également le cas pour les pommes, dont la contamination par les *Penicillium* spp. producteurs de patuline a lieu sur les fruits abimés.

## La gestion de l'irrigation peut affecter les niveaux de contamination

D'un point de vue sanitaire, une plante stressée, notamment par le manque d'eau, sera plus sensible aux attaques de maladies ou de ravageurs.

Les céréales à paille sont sensibles au manque d'eau, de la montaison (ou avant, dans les sols superficiels) jusqu'au remplissage des grains. C'est à ce moment que l'irrigation peut être nécessaire et s'avère la plus rentable, mais elle doit être stoppée durant huit jours au cours de la floraison, stade phénologique critique pour les contaminations en *Fusarium* spp. ou *Claviceps purpurea*, comme décrit dans l'encadré. Passé la floraison, l'irrigation peut reprendre si nécessaire.

Pour le maïs, dans les sols superficiels, la période de sensibilité au stress hydrique s'étend du stade 10 feuilles au stade 50 % d'humidité du grain (32 % de matière sèche pour la plante entière). On segmente en trois phases le cycle de la plante selon l'effet du stress hydrique associé :

- le stress précoce (avant l'initiation de l'épi et de la panicule), qui a un effet limité sur le rendement ;
- le stress à floraison, qui impacte fortement le nombre de grains par épi, et donc le rendement final et la valeur alimentaire du fourrage en cas d'ensilage ;
- le stress lors du remplissage du grain, qui accélère la sénescence des feuilles et peut accroître le développement de maladies telles que la fusariose et la sensibilité des tiges creuses, et agit également sur le poids de mille grains.

À la différence des céréales à paille, la décision d'irriguer ou non ne prend pas en compte la période critique de la floraison et le risque *Fusarium* associé, car l'impact sur le rendement serait trop important. Les parcelles non irriguées sont plus sensibles aux contaminations en *F. verticillioïdes* producteurs de fumonisines (Miller, 2001). Enfin, ce sont dans les parcelles de maïs non irriguées qu'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, en cas de climat chaud et sec, deviennent très compétitifs et peuvent devenir les espèces fongiques dominantes dans le sol, induisant un risque de production d'aflatoxines sur le maïs ou le sorgho en culture.

## Contrôler le développement de la fusariose sur épis

Les stratégies de lutte fongicide pour maîtriser la qualité sanitaire consistent à appliquer des produits efficaces contre *F. graminearum* lors de la floraison, afin de limiter l'installation des pathogènes sur les épis. Cette stratégie ne s'applique pas sur maïs, car les cultures sont déjà trop hautes à floraison, rendant impossible le passage des pulvérisateurs dans les champs.

Une fois la culture mise en place, le traitement de la fusariose des épis constitue le seul levier curatif disponible pour l'agriculteur pour lutter contre le déoxynivalénol et la zéaralénone. Ce traitement, systématique sur blé dur, s'ajuste au cas par cas sur blé tendre. Il n'est pas mis en œuvre sur les autres céréales à paille ni sur maïs et sorgho.

Sur blé tendre, un traitement est réalisé à partir de l'épiaison sur environ la moitié des surfaces cultivées, avec des variations annuelles et régionales (Maumené *et al.*, 2022). Le choix du traitement dépend principalement des caractéristiques agronomiques de la parcelle influant sur le risque mycotoxines, telles que le précédent, le travail du sol et la sensibilité de la variété en place. Il dépend également

des conditions de pluviométrie autour de la floraison (+/- 7 jours), ainsi que des contraintes réglementaires en vigueur pour ces mycotoxines.

Sur blé dur, espèce plus sensible avec peu de résistance variétale, le traitement à la floraison est systématique. Son efficacité sur épis est au mieux de 50 % quand les meilleures conditions sont réunies. Les meilleurs résultats sont obtenus par des interventions à l'apparition des premières étamines. Si l'application précoce n'a pas été possible, un traitement pratiqué jusqu'à 15 jours après floraison démontre également une efficacité significative.

Quelle que soit la culture, les conditions d'une bonne efficacité d'un traitement antifusariose sont contraignantes (Gourdain *et al.*, 2011) :

– le volume de produit appliqué doit être suffisamment important pour toucher les épis ;

– la date de traitement doit avoir lieu sur une fenêtre de temps très courte à la floraison et en l'absence de vent, dans des conditions d'hygrométrie favorables à la pénétration du produit.

Pour les toxines T2-HT2, il n'existe pas de traitement homologué en France, mais Somma *et al.* (2022) ont démontré sur blé dur que certaines molécules efficaces contre *F. graminearum* pouvaient également l'être contre *F. sporotrichoïdes* et *F. langsethiae*. Concernant *Claviceps purpurea* ou *Aspergillus* spp., il n'existe pas de traitement homologué à ce jour.

## Contrôler les graminées adventices pour limiter l'amplification de l'ergot du seigle

Les graminées adventices sont des vecteurs et amplificateurs des contaminations par l'ergot en culture. Leur effet relais a été bien caractérisé et l'importance de leur gestion a été soulignée (Orlando *et al.*, 2019). En effet, la période de floraison des graminées adventices concorde très souvent avec la période de germination des sclérotés, alors que la floraison des cultures est généralement plus tardive. Environ 7 jours après la contamination primaire par l'ergot sur les adventices, qui fleurissent précocement au printemps, celles-ci peuvent produire du miellat contenant des spores. Les risques de concomitance avec la floraison de la culture et donc de contamination secondaire par l'ergot sur culture sont alors augmentées. De ce fait, les désherbages inefficaces ou plus généralement les parcelles fortement contaminées par des graminées adventices constituent des situations propices aux contaminations par l'ergot sur culture. Ce phénomène se voit en outre amplifié par le développement des populations de graminées résistantes aux solutions de désherbage, telles que le vulpin ou le ray-grass. Enfin, une attention particulière doit être portée au contrôle des graminées adventices pour limiter l'entretien du potentiel infectieux dans et autour des parcelles *via* la chute des sclérotés en fin de cycle.

## Contrôler les populations d'insectes foreurs sur maïs

Les galeries creusées dans les épis par les insectes foreurs constituent autant de portes d'entrée pour *Fusarium* et *Aspergillus*. À ce titre, la protection des parcelles vis-à-vis des pyrales, sésamies et héliothis est indispensable lorsque les niveaux

d'infestation le justifient. Selon le lieu, la vigilance s'impose dans les situations les plus à risque, en cas de semis tardifs ou d'implantation de variétés tardives.

Pour limiter la progression des pathogènes, et donc l'accumulation de toxines dans les grains, la date de récolte ne doit pas être trop différée après maturité (Orlando, 2022). Cette fin de cycle offre souvent des conditions favorables au développement des champignons et à la production de toxines.

## Optimiser la date de récolte du maïs

Peu étalée dans le temps au sein d'une région donnée, la date de récolte n'a pas d'impact sur la qualité sanitaire des céréales à paille. En revanche, elle peut jouer un rôle déterminant sur les contaminations en déoxynivalénol, zéaralénone et aflatoxines sur maïs. Elle n'a, par contre, pas d'impact connu sur les fumonisines et son incidence n'a pas été étudiée pour les autres toxines. En conséquence, pour les cultures de maïs, lorsque des symptômes liés à la présence de *Fusarium graminearum* ou d'*Aspergillus* spp. sont installés, la récolte ne doit pas être trop différée après la maturité physiologique pour limiter la progression des champignons et la toxino-génèse dans les grains. Les récoltes tardives sont à proscrire : récolter après le 1<sup>er</sup> novembre expose à un risque avéré de dégradation de la qualité sanitaire des lots (Orlando, 2022).

## ► Outils d'accompagnement à disposition des agriculteurs et collecteurs

### Grilles agronomiques pour évaluer les risques à la parcelle

Comme rappelé plus haut, l'accumulation de mycotoxines dans les grains est multifactorielle et elle s'étudie au cas par cas. Si le climat au cours de la culture et plus particulièrement autour de la floraison constitue un facteur majeur, l'agronomie et les choix d'itinéraires techniques à la parcelle peuvent moduler les teneurs finales présentes dans le grain. L'étude conjointe des teneurs en mycotoxines dans les grains à la récolte et des pratiques agricoles permet d'identifier et de hiérarchiser les pratiques agricoles, et de proposer aux agriculteurs et collecteurs des grilles d'évaluation du risque de présence d'une toxine donnée, pour une culture déterminée. Ces grilles reprennent les principaux facteurs de risque impliqués dans les contaminations. Elles peuvent se limiter aux facteurs agronomiques ou intégrer des séquences climatiques d'intérêt. Par exemple pour le déoxynivalénol sur blé tendre (figure 15.2), elle intègre le précédent, le travail du sol, le choix de la variété et le cumul des pluies autour de la floraison. La finalité est double : optimiser davantage le traitement anti-fusariose ciblé contre *Fusarium graminearum*, principale espèce fongique productrice de DON en France, mais aussi justifier de la façon la plus objective possible un traitement contre la fusariose des épis. Tenir compte des pluies réelles sur la parcelle avant floraison et des prévisions climatiques sur les quelques jours qui suivent permet de traiter uniquement lorsque le risque est avéré.

Quelles pratiques agronomiques pour limiter la contamination par des mycotoxines en pré-récolte ?

Gestion des résidus*		Sensibilité variétale	Risque	Pluie (mm) autour de la floraison (+/-7 jours)		
				< 10	10-40	> 40
Céréales à paille, colza, lin, pois, féverole, tournesol	Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles	1			
		Moyennement sensibles				
	Sensibles	3			T	
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	2			
Moyennement sensibles						
Betteraves, pommes de terre, soja, autres	Labour ou résidus enfouis	Sensibles	3			T
		Peu sensibles	2			
	Moyennement sensibles					
	Sensibles	4		T	T	
Maïs et sorgho fourrages	Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles	2			
		Moyennement sensibles				
	Sensibles	4		T	T	
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	5		T	T
Moyennement sensibles		6	T	T	T	
Maïs et sorgho grains	Labour ou résidus enfouis	Sensibles	4		T	T
		Moyennement sensibles	3			T
	Peu sensibles	2				
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	5		T	T
Moyennement sensibles		6	T	T	T	
		Sensibles	7	T	T	T

**Figure 15.2.** Grille d'évaluation du risque d'accumulation du déoxynivalénol (DON) dans le grain de blé tendre et d'aide au traitement contre la fusariose sur épi (*Fusarium graminearum*). Source : Gourdain, 2012.

Le risque DON est évalué de 1 (très faible) à 7 (très fort). Une variété est dite sensible si sa note d'accumulation en DON est inférieure ou égale à 3,5, et peu sensible si cette note dépasse 5,5.

T = parcelles conseillées au traitement contre la fusariose de l'épi. \* Pour limiter la présence de l'inoculum, il convient de réduire au maximum les résidus lors de la floraison des blés. Le labour profond est une bonne solution. D'autres techniques, comme un broyage fin et une incorporation en surface des résidus rapidement après récolte, fournissent un résultat proche.

## Modèles de prédiction agroclimatiques pour évaluer les risques à la parcelle

En complément des grilles agronomiques, des modèles de prévision de teneur en mycotoxines existent, essentiellement sur blé (Gourdain *et al.*, 2009 et 2011). Mis à disposition des entreprises de collecte et de stockage, ce type d'outil tient compte des conditions agronomiques et climatiques réelles de l'année et permet à son utilisateur d'évaluer le niveau sanitaire global de son ou ses bassin(s) de collecte et de stockage en fonction des risques. Cela permet de prévoir et d'anticiper les contaminations pour mettre en place un plan de gestion interne à travers un plan de surveillance, d'allotement ou encore de nettoyage des lots.

### ►► La prévention en périrécolte

Quelle que soit la culture, il ne faut pas récolter sous la pluie ou tant que la rosée matinale n'est pas évaporée. Le grain doit être récolté aussi propre que possible afin de limiter la collecte de tiges, épis, grains cassés et petits grains, graines étrangères, glumes, glumelles et poussières. Cela implique un bon nettoyage de la moissonneuse-batteuse, mais également un bon réglage : vitesse de rotation et écartement du batteur et du contre-batteur, débit d'air du ventilateur.

Prévoir un nettoyage méticuleux de son matériel de récolte entre deux parcelles permettra également de ne pas disséminer des graines d'adventices d'une parcelle à l'autre.

La teneur en eau des grains est un élément essentiel pour contrôler le développement fongique et la production de mycotoxines. À la récolte, les céréales à paille ont des teneurs en eau habituellement inférieures ou égales à 15 % ne nécessitant pas de séchage spécifique, alors que pour le maïs et le sorgho elles sont proches de 24 %, voire davantage, nécessitant de les sécher avant conservation.

Lorsque les lots nécessitent d'être séchés, cette action doit être réalisée au plus vite après la récolte, car la flore de champ présente sur les grains continue de se développer et peut produire des mycotoxines. Les chantiers de récolte doivent donc être coordonnés avec les chantiers de séchage pour réduire au maximum le délai de préstockage humide : il est fortement déconseillé de garder plus de 2 jours un maïs humide en tas.

### ►► Conclusion

La prévention agronomique du risque mycotoxines s'est beaucoup développée en 20 ans. La gestion technique des risques sur grains progresse et deux maîtres-mots doivent rester à l'esprit : « travailler au cas par cas » (par exemple l'aflatoxine B1 n'a pas les mêmes origines et effets que le déoxynivalénol, et ne concerne pas toutes les cultures) et « mieux vaut prévenir que guérir ». Pour autant, cette approche verticale gagnerait à être raisonnée à l'échelle du système cultural, car certaines pratiques

ciblées vis-à-vis d'une problématique — semis direct, limitation de la fauche des bordures de parcelles, par exemple — peuvent constituer un facteur défavorable du point de vue de la qualité sanitaire.

L'agriculture de demain doit relever de nombreux défis : nourrir l'humanité, avec une demande sans cesse accrue provenant des pays émergents, tout en réduisant son empreinte environnementale, afin de fournir les matières premières adaptées aux différents usages. Des efforts accompagnent ces évolutions, notamment la réorientation de l'amélioration variétale (céréales réclamant moins d'azote par exemple) et le travail sur la performance énergétique des systèmes de production (production intégrée, agriculture biologique, systèmes herbagers, techniques alternatives au labour, etc.) et des circuits de distribution. Le biocontrôle, alternative aux produits phytosanitaires conventionnels actuellement à l'étude, fait l'objet de nombreuses mesures dans le domaine de la recherche, de l'innovation et de la réglementation (voir chapitre 18). L'agriculture doit également participer à la lutte contre le changement climatique et s'y adapter en réalisant la transition agroécologique. Tous ces défis sont autant de causes qui pourraient faire évoluer, d'une part, la nature des pathogènes et des mycotoxines associées dans les cultures, et d'autre part, l'efficacité de certaines méthodes de lutte contre les mycotoxines utilisées aujourd'hui.

## ► Références

- Arvalis, publications annuelles. Brochures « Résultats des essais variétés maïs grain et maïs fourrage » et « Choisir et décider », disponibles sur [www.editions-arvalis.fr](http://www.editions-arvalis.fr).
- Caron D., Dupont De Dinechin L. *et al.*, 2006. *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs en fonction du travail du sol, in AFPP — 8<sup>e</sup> Conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, 5 et 6 décembre 2006.
- Gourdain E., 2012. Des enquêtes sur le terrain et des modèles pour gérer le DON. *Perspectives agricoles*, 388, 20-23.
- Gourdain E., Piraux F., Barrier-Guillot B., 2009. Gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre du champ au silo avec Myco-LIS®. *Industries des céréales*, 165, 14-15.
- Gourdain E., Piraux F., Barrier-Guillot B., 2011. A model combining agronomic and weather factors to predict occurrence of deoxynivalenol in durum wheat kernels. *World Mycotoxin Journal*, 4, 129-139, <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1190>.
- Khonga E.B., Sutton J.C., 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Plant Pathology*, 10, 232-239, <https://doi.org/10.1080/07060668809501730>.
- Maumené C., Couleaud G., Hamernig D. *et al.*, 2022. Traitement fongicide de fin de cycle sur blé tendre : un nécessaire réexamen, in Phloème, biennales de l'innovation des systèmes céréaliers, 3 et 4 novembre, Paris.
- Maumené C., Orlando B., Labreuche J. *et al.*, 2016. Tillage, an efficient lever to limit ergot in cereals, in 5<sup>th</sup> International Symposium Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and Perspectives, Ghent, Belgique, 11 mai.
- Maunas L., Leclère A., 2013. Ergot des céréales : un travail profond du sol réduit les contaminations extérieures. *Perspectives agricoles*, 402, 42-45.
- Miller J.D., 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives*, 109, 321-324, <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s2321>.
- Moreau E., Gourdain E., 2013. Blé et fusariose des épis, le poids des débris. *Phytoma*, 666, 14-18.

- Nicolardot B., Bouziri L., Bastian F. *et al.*, 2007. A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1631-1644, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.012>.
- Orlando B., 2013. Ergot des céréales, une dissémination à courte portée. *Perspectives agricoles*, 402, 40-42.
- Orlando B., 2022. Déoxynivalénol sur maïs grain. Évaluer et gérer le risque à la récolte. *Perspectives agricoles*, 502, 50-54.
- Orlando B., Bonin L., Ezcurati C. *et al.*, 2019. Contaminations en ergot des céréales : rôle des adventices et complexité de leur gestion dans un contexte de pressions réglementaires croissant, in 24<sup>e</sup> Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Orléans, 3, 4 et 5 décembre.
- Roucou A., Orlando B., 2021. Conduite du seigle : différencier les parcelles de seigle selon leur risque « ergot ». *Perspectives agricoles*, 490, 16-20.
- Somma S., Scarpino V., Quaranta F. *et al.*, 2022. Impact of fungicide application to control T-2 and HT-2 toxin contamination and related *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* producing species in durum wheat. *Crop Protection*, 159, 106020, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106020>.
- Wu F., 2022. Mycotoxin risks are lower in biotech corn. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102792, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102792>.

## Chapitre 16

---

# Conditions d'apparition et gestion préventive des contaminations par des mycotoxines en post-récolte

Francis Fleurat-Lessard

### ►► Introduction

Les stocks de céréales constituent la base de l'alimentation de milliards d'individus. Après la récolte, quand les conditions d'humidité des grains sont favorables, le risque de voir apparaître des moisissures est permanent. La prolifération de moisissures sur les grains stockés va provoquer un échauffement de ceux-ci et l'apparition de « points chauds et humides », qui va évoluer vers une prise en masse des grains, agglomérés par une trame dense de filaments mycéliens. Cette invasion fongique se traduit par une perte irréversible de capacité germinative et du potentiel technologique. De plus, parmi le cortège des espèces fongiques qui sont susceptibles d'envahir les grains stockés, certaines sont productrices de mycotoxines. Dans ce contexte de risque pour la santé humaine et animale, une réglementation sévère s'applique dans l'Union européenne afin de minimiser ou de réduire au maximum le risque de trouver sur le marché communautaire des lots de céréales contaminés par les mycotoxines « de stockage » dans toute la chaîne après récolte, du grain récolté à l'aliment prêt à consommer (Commission européenne, 2023). Pour prévenir les contaminations fongiques, plusieurs mesures sont recommandées auprès des professionnels, la première étant liée à la qualité sanitaire des grains entrant dans les silos. Dans ce chapitre consacré à un état des lieux des risques de contamination des grains stockés par des moisissures toxigènes, trois volets de connaissances indispensables pour mettre en œuvre une lutte intégrée seront détaillés (Fleurat-Lessard, 2017) : la connaissance de l'écophysiologie des moisissures de stockage ; le suivi de l'évolution des cortèges floristiques au cours de la conservation des grains à long terme ; les mesures de prévention.

## ► Écophysiologie des moisissures des grains stockés

Le développement des moisissures dans les stocks de grains dépend principalement de l'état physicochimique de l'écosystème du stock et en particulier de l'humidité relative à l'équilibre (HRE), de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) et de la température des grains. Il est influencé par les facteurs de l'environnement du stockage (nature de la cellule, phénomènes de condensation, absence de ventilation de refroidissement pour les stockages longs) et la durée de conservation. En relation avec les caractéristiques de développement des espèces fongiques qui prolifèrent sur les grains, combinant l' $a_w$  et la température limite de croissance, il est possible de regrouper ces espèces en trois groupes écophysiologiques distincts : hygrophile, mésophile et xérotolérant (tableau 16.1).

**Tableau 16.1.** Principales espèces de la mycoflore pouvant se développer sur différentes céréales et leur répartition dans les trois groupes écophysiologiques.

Groupe écophysiologique	Blé tendre	Orge et avoine	Maïs
Mycoflore du champ (hygrophile)	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>A. tenuissima</i>	<i>Alternaria</i> spp.
	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>E. purpurascens</i>	<i>E. purpurascens</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. graminearum</i>
	<i>Ulocladium atrum</i>	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Fusarium verticillioides</i>
	<i>Geniculifera</i> sp.	<i>Helminthosporium sativum</i>	<i>Cephalosporium</i> sp.
	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Acremonium strictum</i>
Mycoflore intermédiaire (mésophile)	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. cladosporioides</i>
	<i>Mucor hyemalis</i>	<i>M. hyemalis</i>	<i>M. hyemalis</i>
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>R. stolonifer</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>A. pullulans</i>
	<i>Verticillium lecanii</i>	<i>V. lecanii</i>	<i>V. lecanii</i>
	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma</i> spp.
	<i>Absidia glauca</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Papulaspora</i> spp.
	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Chaetomium</i> spp.	<i>Chaetomium</i> spp.
Mycoflore de stockage (xérotolérante)	<i>Eurotium chevalieri</i>	<i>E. chevalieri</i>	<i>E. chevalieri</i>
	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>E. amstelodami</i>	<i>Eurotium</i> spp.
	<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>P. cyclopium</i>	<i>P. chrysogenum</i>
	<i>Penicillium stoloniferum</i>	<i>P. spinulosum</i>	<i>P. funiculosum</i>
	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. westerdijkiae</i>
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>
	<i>Wallemia sebi</i>	<i>W. sebi</i>	<i>Penicillium rubrum</i>
	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. westerdijkiae</i>
	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. verrucosum</i>
	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>

Le groupe des champignons hygrophiles des céréales regroupe les espèces qui se développent sur les épis en formation pendant la culture et correspond à la mycoflore du champ. Le groupe des espèces saprophytes et thermophiles (mésophiles), encore appelé « microflore intermédiaire », comporte des espèces qui infectent les épis à l'approche de la récolte, souvent à la faveur des dégâts des oiseaux ou des insectes phytophages, et qui vont proliférer pendant le stockage, si les conditions d'humidité et de température sont favorables. *Fusarium proliferatum* ou *Aspergillus flavus* font partie de ce groupe des mésophiles. Les espèces du groupe des moisissures xérotolérantes, désignées comme « microflore de stockage », peuvent coloniser les grains conservés à une teneur en eau supérieure à la norme commerciale (Cahagnier *et al.*, 2005 ; Magan et Aldred, 2007). *Penicillium verrucosum* ou *Aspergillus westerdijkiae* (anciennement *Aspergillus ochraceus*) sont les principaux représentants de ce troisième groupe. Toutefois, seules quelques espèces se développant au cours du stockage sont capables de produire des mycotoxines (tableau 16.2).

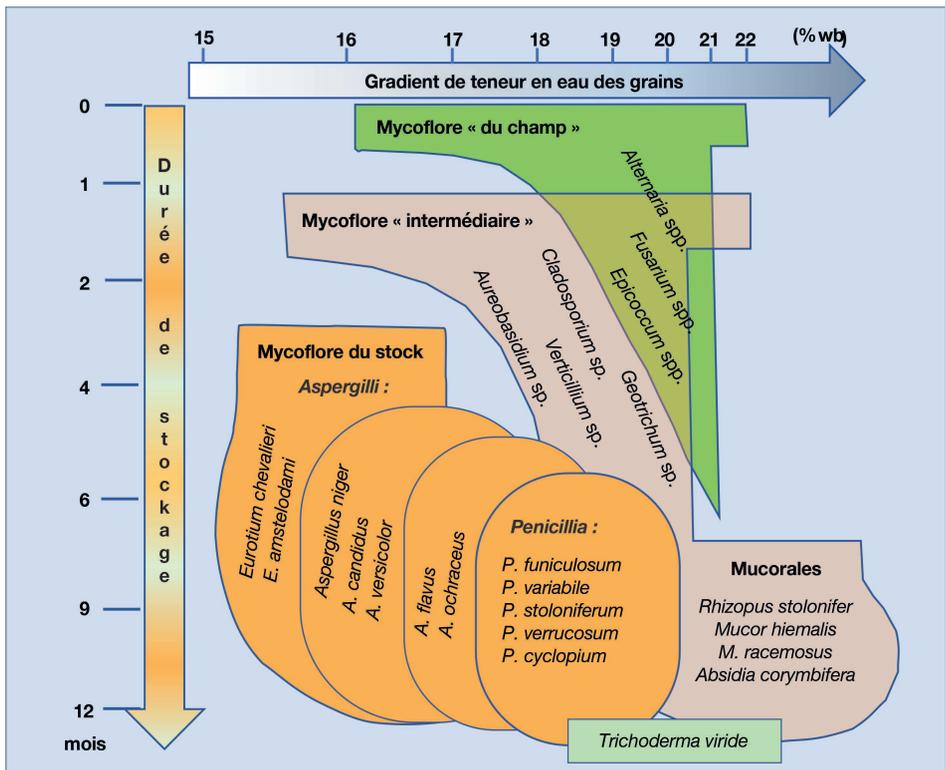
**Tableau 16.2.** Mycotoxines et espèces fongiques productrices pouvant se développer après la récolte en conditions thermo-hydriques favorables.

Mycotoxine	Espèce mycotoxinogène	Groupe écophysiologique
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Xérotolérant
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Xérotolérant
Citrinine	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Xérotolérant
Acide cyclopiazonique	<i>Penicillium cyclopium</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>A. versicolor</i>	Mésophile
Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>A. versicolor</i>	Xérotolérant
Patuline	<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Penicillium expansum</i>	Mésophile

## » Interaction entre la dynamique des espèces fongiques et les conditions de conservation

Au moment de la récolte, seules les espèces fongiques hygrophiles sont présentes, lesquelles vont progressivement disparaître au profit de la microflore intermédiaire, puis des moisissures de stockage, qui n'apparaissent qu'au terme de plusieurs mois de conservation (figure 16.1).

L'influence majeure de l' $a_w$  des grains à la mise en stockage a été maintes fois démontrée, comme dans l'étude de l'écologie du cortège d'espèces fongiques qui s'installe au cours de la période de stockage dans le blé tendre conservé sous une HRE de 85 % (Fourar *et al.*, 2010). Cette même étude a confirmé la régression de



**Figure 16.1.** Représentation schématique de la succession du cortège d'espèces apparaissant au cours du stockage du maïs en relation avec l'écophysiologie des moisissures des grains stockés. D'après Pelhate, 1982.

la flore hygrophile en début de conservation, remplacée successivement par la flore semi-xérophile, puis la flore de stockage, à partir du troisième mois de conservation (Fourar *et al.*, 2011). Le risque de présence de mycotoxines étant associé à la prolifération de la flore de stockage (groupes des *Aspergilli* et des *Penicillia*), le seuil de teneur en eau minimale permettant la production d'ochratoxine A (OTA) et aflatoxine B1 (AFB1) a été étudié (Cahagnier *et al.*, 1993 et 2005 ; Magan et Aldred, 2007). Ces auteurs ont démontré que la croissance d'une espèce mycotoxinogène de la flore de stockage n'est pas systématiquement accompagnée d'une production de mycotoxine. Les seuils d' $a_w$  et de température minimum de production de mycotoxines par les espèces fongiques de la flore de stockage sont systématiquement supérieurs à ceux de la croissance fongique *stricto sensu* (tableau 16.3).

**Tableau 16.3.** Limite inférieure de teneur en eau et activité d'eau du grain permettant la croissance mycélienne et la production de mycotoxines des espèces de la flore de stockage. D'après Beuchat, 1981 ; Cahagnier *et al.*, 1993 et 2005 ; Magan *et al.*, 2003.

Espèce fongique	Mycotoxine	A <sub>w</sub> limite pour la croissance	Teneur en eau limite pour la croissance (%)	A <sub>w</sub> limite pour la toxinogénèse	Teneur en eau limite pour la toxinogénèse (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	AFB1	0,78-0,84	17,6-19,0	0,84	19,2
<i>A. parasiticus</i>	AFB1	0,84	19,0	0,87	20,2
<i>A. westerdijkiae</i>	OTA	0,77	16,5	0,85	19,6
<i>Penicillium griseofulvum</i>	PAT	0,81	18,0	0,95	27,0
<i>P. expansum</i>	PAT	0,82-0,84	18,3-19	0,99	30,0
<i>P. aurantiogriseum</i>	OTA	0,82-0,85	18,5-19,6	0,87-0,9	20,2-22,0
<i>P. verrucosum</i>	OTA	0,80-0,81	18,0	0,83-0,86	18,8-19,8
<i>Fusarium proliferatum</i>	FB1	0,88	20,5	0,93	25,0
<i>F. verticillioides</i>	FB1	0,88	20,5	0,93	25,0

AFB1 : aflatoxine B1 ; OTA : ochratoxine A ; FB1 : fumonisine B1 ; PAT : patuline.

## ► Gestion préventive des risques de contamination des grains stockés par les mycotoxines

La gestion intégrée des risques de prolifération des moisissures dans les stocks de céréales et de contamination par les mycotoxines est prioritairement basée sur la prévention. Cette approche préventive est similaire à celle de la protection intégrée des cultures (PIC ou *Integrated Pest Management* [IPM] en anglais). Au plan pratique, elle comporte plusieurs étapes successives visant à :

1. Limiter le risque de dégradation de la qualité par des opérations avant stockage ;
2. Effectuer un suivi des conditions de stockage pour alerter sur l'apparition de situations favorables à la prolifération des moisissures (*monitoring* par capteurs et sondes de la température et de l'HRE) ;
3. Détecter rapidement l'apparition de moisissures dans certaines parties du stock (par la surveillance d'indicateurs métaboliques de la croissance mycélienne) ;
4. Appliquer les mesures de prévention limitant la production de mycotoxines (en maintenant l'a<sub>w</sub> au-dessous du seuil de toxinogénèse par un refroidissement du grain, par exemple).

Si les contaminations n'ont pu être prévenues à temps, certains procédés technologiques peuvent permettre de réduire la charge finale des produits céréaliers en mycotoxines (certains de ces procédés sont détaillés ci-après, ainsi qu'au chapitre 17).

## Complément de séchage à la récolte en cellule-sècheuse

Dans le cas du séchage, la technique de séchage « à basse température » *in situ* en cellule de stockage est considérée comme un procédé de prévention du risque de développement des moisissures mycotoxinogènes. Dans les pays du nord de l'Europe, le passage d'orge de brasserie ou d'avoine, récoltée humide, dans une cellule sècheuse est une pratique courante à la récolte pour enlever 3 à 5 points de teneur en eau. La cellule sècheuse cylindrique est équipée d'un système de brassage continu du grain par des vis de « remontage » alignées sur le diamètre de la cellule et animées d'un mouvement circulaire, ainsi que d'un système de ventilation séchante par insufflation d'air à 60 °C maximum, à un débit de 140 m<sup>3</sup> . h<sup>-1</sup> d'air par mètre cube de grain.

## Tri optique

Le tri optique, qui permet de séparer les grains présentant une couleur ou un aspect anormal, fait appel à deux types de trieurs : le trieur à rayonnement dans le proche infrarouge (NIRS) et le trieur optique fonctionnant dans l'ultraviolet ou les longueurs d'onde de la lumière visible. Le premier permet l'identification instantanée et l'élimination des grains de maïs fortement contaminés par des mycotoxines de *Fusarium graminearum* (déoxynivalénol ou DON en majorité) à un débit de grain de plusieurs tonnes à l'heure. L'identification des grains anormaux est réalisée par un scanner aux longueurs d'onde de 715 et 965 nm. Dans cette configuration, le trieur NIRS identifie 98 % des grains de maïs d'aspect anormal, dû à l'attaque fongique, et plus de 95 % des grains à coloration anormale due à une contamination par différentes espèces fongiques des céréales (*A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium* spp., *Trichoderma zeae*, etc.) (McMullin *et al.*, 2015).

Le second type de trieur optique, le plus répandu aujourd'hui, est couramment utilisé dans les procédés de nettoyage des grains en meunerie. Il permet de séparer les sclérotés d'ergot dans les céréales susceptibles d'en contenir (seigle et triticale, principalement), les grains à point noir caractéristiques d'une infection par les espèces du genre *Fusarium*, ainsi que tous les autres grains présentant une différence d'aspect ou de couleur significative par rapport au grain sain. Dans les moulins, ces trieurs prennent la place autrefois tenue par les trieurs à alvéoles ou les nettoyeurs séparateurs et autres systèmes de séparation densimétrique. Les appareils commerciaux peuvent réduire de 50 % la quantité de grains fortement attaqués par les moisissures (ce qui représente entre 3 et 9 % de grains en poids), avec une efficacité supérieure pour les grains contaminés par le DON que pour ceux contaminés par la fumonisine B1 ou FB1 (Pearson *et al.*, 2009). La rapidité des appareils de tri optique a été fortement augmentée en multipliant les longueurs d'onde du faisceau détecteur. Les trieurs optiques peuvent réduire de 99 % la présence de sclérotés d'ergot dans un lot de blé ou d'orge.

## Identification des situations de stockage à risque de moisissure

### Facteurs-clés de la croissance des moisissures de stockage

Le facteur déterminant pour l'activation de la germination des spores fongiques et la croissance mycélienne est l'activité de l'eau dans le grain ( $a_w$ ). Les facteurs secondaires de modulation sont la température, la teneur en oxygène au sein de la masse de grain stockée et le type de structure de stockage (Fleurat-Lessard, 2017). Pour les espèces qui produisent de l'OTA, *A. westerdijkiae* et *P. verrucosum*, de nombreux autres facteurs entrent en jeu dans leur croissance et leur production de mycotoxine, comme la réhydratation accidentelle à la surface du stock ou la condensation d'eau le long des parois et dans les angles des cellules métalliques, induisant un « point chaud » localisé.

L'autre facteur favorable à la prolifération des moisissures à l'intérieur de la masse de grains est la présence d'impuretés humides, en quantité anormale, dans un lot intégré au chargement d'une cellule sans nettoyage préalable des grains. Les lots de céréales récoltés et stockés à une humidité légèrement supérieure à la limite supérieure de conformité sont rapidement envahis par les espèces de moisissures xérotolérantes des genres *Eurotium* et *Aspergillus*, et colonisés par des acariens et des insectes mycétophages qui vont disséminer l'inoculum fongique dans la périphérie des points chauds. Pour des céréales récoltées encore humides comme le maïs, la durée entre la récolte et le séchage doit être réduite au maximum pour une inhibition rapide de la prolifération de la microflore intermédiaire (genres *Cladosporium*, *Geotrichum* et *Verticillium*).

### Séchage et maintien de l' $a_w$ au-dessous du seuil de la croissance fongique

Un des objectifs majeurs de la conservation des céréales après récolte est de maintenir la teneur en eau dans toutes les parties du stock au-dessous du seuil de développement des moisissures. Pour les céréales, le seuil d' $a_w$  « de sauvegarde » (0,70) correspond à la limite supérieure de teneur en eau de 15 % (sur base humide) admise commercialement. Mais de nombreuses études ont montré que cette limite n'était qu'une moyenne résultant d'une hétérogénéité de teneur en eau des grains pouvant s'écarter de plus de 2 % de cette moyenne. Pour réduire les risques de développement des moisissures pendant le stockage à long terme, la limite commerciale de teneur en eau acceptable pour certaines espèces fragiles comme l'orge de brasserie a été abaissée à 14 %. Pour satisfaire à ces spécifications, le séchage des lots récoltés au-dessus de la norme doit être réalisé avant le stockage. Dans l'attente du séchage, le refroidissement des stocks au-dessous de 15 °C par ventilation à l'air ambiant ou à l'air réfrigéré par machine frigorifique permet d'allonger la durée de conservation sans risque de développement fongique (Jacobsen et Fleurat-Lessard, 2002).

## Surveillance des indices de développement fongique

### Détection des odeurs de moisi avec un « nez électronique »

Quand un stock est envahi par des moisissures, il s'en dégage une odeur caractéristique qualifiée d'odeur de moisi. Les substances volatiles produites par les espèces de moisissures mycotoxinogènes qui se développent dans les grains humides peuvent servir de marqueur de prolifération fongique et de marqueur de risque de mycotoxinogénèse. Plusieurs molécules odorantes volatiles produites par les moisissures des grains stockés ont été identifiées. On citera, entre autres, le 1-octen-3-ol, le 3-octanone, les 2- et 3-méthyl-1-butanol, le 3-méthylfuran, le 2-heptanone, le 3-pentanone et la géosmine (Richard-Molard *et al.*, 1976). La détection de ces odeurs caractéristiques dans l'espace de tête d'un échantillon de grain peut être réalisée avec un analyseur de type « nez électronique ». Cette technologie est basée sur un réseau de semi-conducteurs qui captent les composés volatils se dégageant de l'échantillon, quand ce dernier est parcouru par un courant d'air épuré. La signature de l'odeur qui se dégage de l'échantillon est le résultat d'un algorithme qui effectue la comparaison automatique avec les signatures d'odeurs de référence stockées dans une base de données. Des appareils portables permettent de réaliser cette identification d'odeurs anormales de moisi dans un échantillon de grain (Paolesse *et al.*, 2006 ; Pascale, 2009) ou directement *in situ* sur le stock de grain.

### Surveillance en continu de la teneur en CO<sub>2</sub>

La respiration des grains secs est pratiquement nulle. Lorsque l' $a_w$  du grain dépasse le seuil d'effondrement des forces de rétention de l'eau ( $a_w \approx 0,70$ ), la respiration du grain est activée, en majeure partie entretenue par la croissance des moisissures (Cahagnier *et al.*, 2005). Aujourd'hui, des appareils de surveillance de la teneur en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), installés à la base des cellules de stockage des grains, permettent de détecter une respiration qui devient anormale par rapport à la teneur naturelle de l'air en CO<sub>2</sub> ( $\approx 380$  à 450 ppm). La production de CO<sub>2</sub> étant corrélée à la teneur en eau des grains, de nombreuses études ont montré que les capteurs à CO<sub>2</sub> permettaient de détecter précocement les augmentations de concentration relatives au développement des moisissures dans les zones de grains humides en voie de détérioration (Maier *et al.*, 2010 ; Neethirajan *et al.*, 2010). La zone de conservation sans risque correspond à des teneurs en CO<sub>2</sub> comprises entre 450 et 500 ppm (v/v). Quand la teneur en CO<sub>2</sub> atteint 1 000 ppm (0,1 %), cela signifie qu'un problème de développement de moisissure débute. Lorsque cette teneur dépasse 2 000 ppm, la détérioration des grains est certaine et une intervention pour faire baisser la teneur en eau des grains est nécessaire (Ramachandran, 2022 ; Zhai *et al.*, 2015).

### Tests rapides semi-quantitatifs de détermination de la teneur en mycotoxines

Les tests rapides immunochromatographiques (tests « bandelette ») et immunoenzymatiques (kit Elisa) sont deux techniques de diagnostic rapide couramment utilisées pour détecter rapidement des teneurs en mycotoxines. Ces techniques sont

développées dans le chapitre consacré aux méthodes analytiques applicables aux mycotoxines (chapitre 19).

## Prévention et anticipation de la croissance des moisissures pendant le stockage

Il n'existe aucune méthode de décontamination complète des grains contenant des niveaux de mycotoxines supérieurs à la limite réglementaire. En conséquence, l'application des méthodes de prévention des risques de développement des moisissures dans les zones à humidité favorable est primordiale pour les grains stockés en masse. Les deux facteurs-clés qui déterminent la dynamique de prolifération des moisissures de stockage (mycotoxinogènes ou non) et sur lesquels il est possible d'intervenir sont la teneur en eau et la température dans la masse de grain. Dans l'écosystème du stock de grain, le monitoring des variables associées au développement global des moisissures de stockage (teneur en eau des grains, teneur en CO<sub>2</sub> en partie basse de cellule, usage du « nez électronique » et de la thermographie à IR en surface des stocks, par exemple) est primordial pour évaluer le risque de contamination, dès le début de la croissance fongique, car les seuils de tolérance des mycotoxines comme l'OTA et l'AFB1 sont extrêmement faibles pour les céréales utilisées en alimentation humaine.

### Ventilation de refroidissement des grains en cellule de stockage

L'abaissement de la température des grains stockés, de 20 à 10 °C par exemple, permet de conserver le blé ou l'orge de brasserie à une teneur en eau supérieure à la teneur minimale qui serait requise pour la croissance de *Penicillium verrucosum* et la production d'OTA à 20 °C (Magan *et al.*, 2003). Plus la température décroît, plus le besoin en eau nécessaire à la croissance des moisissures augmente. Par exemple, à la température minimale de croissance de *P. verrucosum* de 4 °C, la teneur en eau minimale nécessaire à la production d'OTA se situe à 20,6 %, alors que quand la température du grain est à 24 °C, la teneur en eau minimale nécessaire à la toxino-génèse n'est plus que de 18,5 % (Pardo *et al.*, 2006).

En combinant les effets de la température et de la teneur en eau sur la dynamique de croissance des moisissures, des modèles de prédiction de la durée de stockage sans risque de prolifération des moisissures ont été validés pour l'orge de brasserie (Jacobsen et Fleurat-Lessard, 2002).

## ►► Conclusion

L'approche intégrée de gestion des risques toxiques amenés par les mycotoxines de moisissures de stockage s'appuie sur des indicateurs pertinents qui constituent une aide à la décision d'intervention pour le responsable du lot de céréales à conserver ou à mettre sur le marché.

Les indicateurs à prendre en compte sont :

- le suivi des marqueurs de prolifération des moisissures (activité respiratoire, production de chaleur et d'odeurs anormales...) pendant la période de conservation des stocks, lorsque la température dans la masse des grains est supérieure à 5-7 °C ;
- le relevé régulier des sondes et capteurs de surveillance de l'état général des grains pendant la conservation de longue durée (silothermométrie embarquée, sondes d' $a_w$  ou thermohygrométriques, caméra infrarouge d'observation des températures de surface des stocks...), pour détecter précocement les situations à risque ;
- la détection rapide de la teneur en mycotoxines des grains, dans les endroits du tas de grains ou de la cellule qui présentent un état général « à risque moisissure » et de contamination potentiel par des mycotoxines de stockage (avec des kits rapides immunochimiques ou immunochromatographiques) ;
- la connaissance des moyens disponibles pour limiter une contamination probable par des mycotoxines, compatibles avec le type de débouché visé.

Lorsque la contamination des stocks de céréales par des mycotoxines de stockage n'a pas pu être maîtrisée et être détectée à temps, des interventions pour éliminer une partie des contaminants peuvent être tentées. Des méthodes ou procédés physiques, biologiques ou chimiques permettant de réduire les quantités de mycotoxines présentes dans les grains de céréales ou des produits céréaliers ont été décrits dans diverses revues de synthèse (Bullerman et Bianchini, 2007 ; Magan et Aldred, 2007 ; Varga *et al.*, 2010 ; Jard *et al.*, 2011).

## ►► Références

- Beuchat L.R., 1981. Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 26, 345-349.
- Bullerman L.B., Bianchini A., 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 140-146, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>.
- Cahagnier B., Jacobsen E.E., Fleurat-Lessard F., 2005. Des moisissures aux mycotoxines : signification écophysiological de marqueurs biochimiques de croissance fongique et prévision des durées de conservation sans risque de détérioration, in Fleurat-Lessard F., Ndiaye A., Knight J.D. (éd.), *Stored Malting Barley: Management of quality using an expert system*, colloque Inra n° 101, Reims, 28-29 mai 2001, Inra éditions, Paris, 121-136.
- Cahagnier B., Lesage L., Richard-Molard D., 1993. Mould growth and conidiation in cereal grains as affected by water activity and temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 7-13, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01423.x>.
- Commission européenne, 2023. Règlement concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) n° 1881/2006. *JOUE*, L119, 103-157.
- Fleurat-Lessard F., 2017. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seed-borne fungi and contamination by storage mould mycotoxins. *Journal of Stored Products Research*, 71, 22-40, <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.10.002>.
- Fourar R., Fleurat-Lessard F., Bouznad Z., 2010. A systemic approach to qualitative changes in the stored wheat ecosystem: prediction of deterioration risks in unsafe storage conditions in relation to relative humidity level, infestation by *Sitophilus oryzae* (L.), and wheat variety. *Journal of Stored Products Research*, 47, 48-61, <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2010.09.002>.
- Fourar R., Fleurat-Lessard F., Bouznad Z., 2011. A systemic approach of qualitative changes in the stored wheat ecosystem: prediction of deterioration risks in unsafe storage conditions in relation to relative humidity, infestation by *Sitophilus oryzae* (L.), and variety influence, in Carvalho O.M.,

- Fields P.G., Adler C.S. *et al.* (éd.), *Proceedings 10<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection*, juin-juillet 2010, Estoril (P), Julius Kühn-Institut, Berlin, Allemagne, 111-117.
- Jacobsen E.E., Fleurat-Lessard F., 2002. Estimation of safe storage periods for malting barley using a model of heat production based on respiration experiments, in Credland P., Armitage D.M., Bell C.H., Coglan P.M. (éd.), *Proceedings 8<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection*, York, Royaume-Uni, 22-26 juillet 2002, CABI, Wallingford, Royaume-Uni, 456-463.
- Jard G., Liboz T., Mathieu F., Guyonvarch A., Lebrihi A., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in fields to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants*, 28, 1590-1609, <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>.
- Magan N., Aldred D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131-139, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034>.
- Magan N., Hope R., Cairns V., Aldred D., 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 723-730, <https://doi.org/10.1023/A:1026082425177>.
- Maier D.E., Channaiah L.H., Martinez-Kawas A. *et al.*, 2010. Monitoring carbon dioxide concentration for early detection of spoilage in stored grain, in Carvalho O.M., Fields P.G., Adler C. *et al.* (éd.), *Proceedings 10<sup>th</sup> Int. Working Conference on Stored Product Protection*, juin-juillet 2010, Estoril, Portugal, Julius Kühn-Institut, Berlin, Allemagne, 505-509, <https://doi.org/10.5073/jka.2010.425.332>.
- McMullin D., Mizaikoff B., Krska R., 2015. Advancements in IR spectroscopic approaches for the determination of fungal derived contaminations in food crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 653-660, <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8145-5>.
- Neethirajan S., Freund M.S., Jayas D.S. *et al.*, 2010. Development of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) sensor for grain quality monitoring. *Biosystems Engineering*, 106, 395-404, <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.05.002>.
- Paolesse R., Alimelli A., Martinelli E. *et al.*, 2006. Detection of fungal contamination of cereal grain samples by an electronic nose. *Sensors and Actuators*, B 119, 425-430, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.12.047>.
- Pardo E., Ramos A.J., Sanchis V., Marín S., 2006. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.003>.
- Pascale M.N., 2009. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 117, 15-25, <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0917015P>.
- Pearson T.C., Wicklow D.T., Brabec D.L., 2009. Characteristics and sorting of white food corn contaminated with mycotoxins. *Applied Engineering in Agriculture*, 26, 109-113, <https://doi.org/10.13031/2013.29463>.
- Pelhate J., 1982. Écologie de la microflore des grains et graines, in Multon J.L. (éd.), *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés*, Lavoisier Tec&Doc/Apria, Paris, 273-290.
- Ramachandran R.P., 2022. Integrated approach on stored grain quality management with CO<sub>2</sub> monitoring — A review. *Journal of Stored Products Research*, 96, 101950, <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.101950>.
- Richard-Molard D., Cahagnier B., Poisson J., Drapon R., 1976. Évolutions comparées des constituants volatiles et de la microflore de maïs stockés sous différentes conditions de température et d'humidité. *Annales de technologie agricole*, 25, 29-44.
- Varga J., Kocsubé S., Péteri Z. *et al.*, 2010. Chemical, physical and biological approaches to prevent Ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. *Toxins*, 2, 1718-1750, <https://doi.org/10.3390/toxins2071718>.
- Yannikouris A., Jouany J.P., 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, 81-99, <https://doi.org/10.1051/animres:2002012>.
- Zhai H.C., Zhang S.B., Huang S.X., Cai J.P., 2015. Prevention of toxigenic fungal growth in stored grains by carbon dioxide detection. *Food Additives and Contaminants Part A*, 32, 596-603, <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.968221>.

# **Devenir des toxines au cours des procédés de transformation des produits alimentaires**

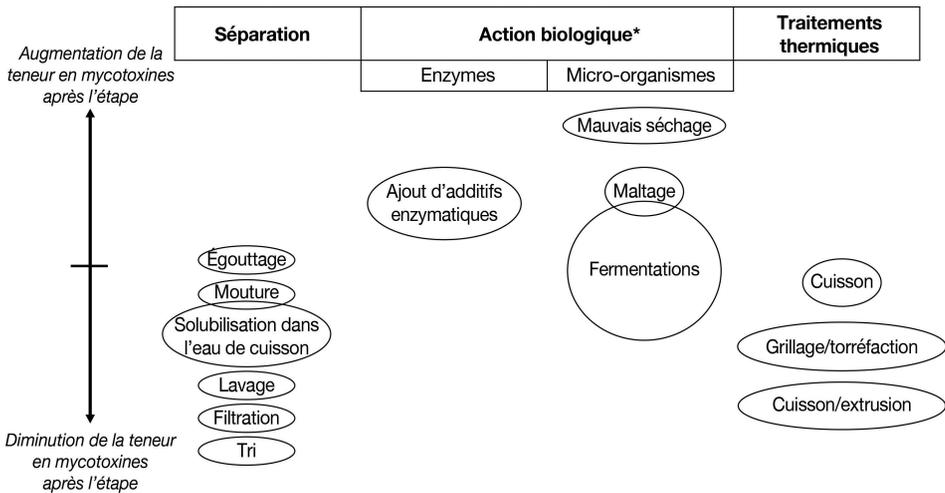
Gwénaëlle Jard et Jean-Denis Bailly

## **►► Introduction**

Les étapes de transformation peuvent avoir un impact sur la teneur en mycotoxines du produit fini. L'objectif de ce chapitre est d'illustrer le devenir de certaines mycotoxines présentes dans les matières premières végétales, et parfois animales, au cours des principaux procédés de transformation utilisés en industrie agroalimentaire. Compte tenu du nombre considérable de couples procédés/toxines possibles, il ne s'agira pas ici de réaliser un inventaire exhaustif, mais d'illustrer par des exemples l'impact possible de certaines étapes de fabrication des aliments. Une synthèse est présentée en figure 17.1.

## **►► Devenir des mycotoxines dans les produits végétaux**

Le devenir des mycotoxines est variable selon les matières premières utilisées (céréales, fruits, noix...), la concentration et la nature des toxines. Certaines étapes de première (fractionnement, maltage...) et de deuxième transformations (panification, pastification, brassage) peuvent influencer sur la concentration en mycotoxines dans le produit fini.



**Figure 17.1.** Impact de certains procédés de transformation sur la teneur en mycotoxines.

\* L'action biologique des micro-organismes comprend la croissance de moisissures toxigènes, leur inhibition par des bactéries ou levures, et l'adsorption ou la biotransformation des mycotoxines par les parois de bactéries ou levures.

## Devenir au cours de la première transformation

### Mouture

L'étape de mouture ne permet pas vraiment de diminuer le taux de mycotoxines des grains de blé (Schaarschmidt et Fahl-Hassek, 2018). En revanche, les différentes fractions obtenues après mouture n'en contiennent pas la même quantité. Le son (partie externe du grain la plus fréquemment colonisée par les moisissures) est plus riche en mycotoxines, alors que la farine et la semoule raffinées en contiennent moins. La colonisation des grains par les moisissures toxigènes, la diffusion des mycotoxines au sein du grain et la sensibilité relative des différentes fractions du grain à la toxogénèse déterminent la quantité de mycotoxines que l'on peut retrouver dans les farines (Pinson-Gadai *et al.*, 2007). Dans le cas de la production de farine complète, une quantité de son importante est incorporée dans la farine et la quantité de mycotoxines dans le produit final peut donc se rapprocher de celle du grain.

Il a été constaté qu'au cours du broyage humide réalisé pour la production d'amidon de maïs, les fumonisines se retrouvent en majorité dans l'eau de trempage ou dans les autres fractions, et deviennent indétectables dans l'amidon produit (Schaarschmidt et Fahl-Hassek, 2021a).

### Maltage

Le maltage (production de malt à partir d'orge) est la première étape de la fabrication de la bière. Elle est constituée de trois phases : le trempage, la germination et le touraillage. Le trempage et la germination sont effectués dans certaines conditions de température et d'humidité (10-15 °C, 42-48 % d'humidité). Pendant le trempage, le déoxynivalénol (DON), ses dérivés et les fumonisines se solubilisent dans l'eau

de trempage, permettant une réduction de la concentration en mycotoxine dans le malt (Pascari *et al.*, 2018). La germination, en revanche, favorise la croissance des moisissures et notamment de *Fusarium langsethiae*, producteur de toxines T-2/HT-2. Cette étape peut entraîner une production de mycotoxines et de conjugués glycosylés qui peuvent atteindre 3 à 7 fois la concentration initiale. Le touraillage (7 h entre 60 et 80 °C) destiné à produire du malt torréfié permet d'éliminer les moisissures présentes, mais n'impacte pas la teneur en mycotoxines qui sont généralement thermostables.

## Devenir au cours de la deuxième transformation

### Emploi d'additifs lors de la formulation

Les farines utilisées par les boulangers sont souvent des mélanges contenant des améliorants de panification comme des enzymes ( $\alpha$ -amylases, xylanases ou protéases). Dans certaines conditions de température (30 °C), ces enzymes permettraient de libérer du DON initialement présent dans les parois des cellules des grains et augmenteraient ainsi sa concentration dans le pâton, par rapport à un pain fabriqué avec une farine sans enzymes (Schaarschmidt et Fauhl-Hassek, 2018).

### Macération et activation d'enzymes

Pendant la phase de macération des vins rouges, la concentration d'ochratoxine A (OTA) a généralement tendance à augmenter, à cause de l'extraction de la toxine initialement présente sur le raisin (La Placa *et al.*, 2023). Lors de la fabrication de la bière, les enzymes du malt sont activées pendant l'empâtage. Des paliers de température permettent d'activer de manière optimale les différentes enzymes pour hydrolyser les sucres, les protéines et l'amidon, transformés en sucres fermentescibles par des levures. Les conjugués du DON présents dans le malt sont alors déglycosylés lors de cette étape, ce qui entraîne une augmentation de la teneur en DON (Pascari *et al.*, 2018).

### Élimination de résidus solides par filtration

La filtration est couramment utilisée en industrie pour séparer la partie liquide, qui suivra le processus de transformation, des résidus solides à éliminer. Par exemple, le moût est séparé des drèches par filtration avant la phase d'ébullition, puis de fermentation, lors de la fabrication de bière. Les mycotoxines se retrouvent réparties dans les drèches et dans le moût. La zéaralénone (ZEN) semble, elle, se retrouver principalement dans les drèches.

Le processus de vinification, dans son ensemble, réduit la teneur en OTA du vin d'environ 80 % par rapport à celle du raisin. C'est le cas de l'étape de clarification, qui consiste à utiliser des agents de clarification (bentonite, gélatine...) pour permettre le collage et la précipitation des résidus solides, qui sont ensuite éliminés par filtration (La Placa *et al.*, 2023). De même, le stockage en bouteilles après fermentation joue ce rôle grâce à la décantation de ces agglomérats. Cependant, toutes les étapes de vinification ne contribuent pas de la même manière à cette réduction.

## Fermentations

Les mycotoxines peuvent être dégradées en composés non ou moins toxiques par les micro-organismes responsables des fermentations (alcoolique et lactique). Dans certains cas, ce n'est pas la fermentation en tant que telle qui permet de diminuer le taux de mycotoxines, mais l'adsorption des molécules sur les parois des levures ou des bactéries utilisées, phénomène qui est alors réversible.

La fabrication de pain se fait par fermentation de farine grâce à des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou en utilisant des levains de panification (levures et bactéries). Les pratiques de panification étant variées (température et durée de fermentation, composition microbienne du levain, présence d'améliorants dans la farine, caractéristiques physicochimiques du pâton...), les activités enzymatiques et leur impact sur les mycotoxines sont variables (Vidal *et al.*, 2014). À chaque étape de fabrication, il peut y avoir un relargage de mycotoxines ou, au contraire, une transformation des mycotoxines en conjugués (glycosylés par exemple), qui ne seront pas forcément détectés lors de l'analyse du produit. Les bactéries lactiques et acétiques présentes dans les levains de panification sont susceptibles de biotransformer les mycotoxines en composés moins toxiques ou de les adsorber et ainsi de les piéger. Lors d'une expérimentation récente, la fermentation (par des levains ou de la levure commerciale) et la cuisson du pain ont permis de diminuer de moitié la concentration en DON, mesurée dans la pâte après pétrissage et ensuite dans le pain cuit. Les mécanismes impliqués ne sont pas encore complètement élucidés. En revanche, la concentration en OTA semble rester stable.

Lors de la fermentation alcoolique qui a lieu lors du brassage, les levures sont capables de piéger les mycotoxines (Pascari *et al.*, 2018). Ainsi, certaines mycotoxines (ZEN et OTA) se retrouvent en grande partie dans les résidus de fermentation. Cela doit être pris en considération lorsque ces sous-produits sont ensuite utilisés en tant que co-produits dans l'alimentation animale (Lopes *et al.*, 2023). Après le brassage, les concentrations d'aflatoxines, d'OTA, de fumonisines et de ZEN résiduels représentent moins de 20 % de la contamination initiale du malt. Le DON peut, quant à lui, se retrouver dans la bière.

Les données sur les mycotoxines dans les boissons fermentées traditionnelles sont rares, malgré une production et une consommation très répandues dans certains pays avec, parfois, un fort risque d'utilisation de matières premières contaminées. La fermentation par un écosystème microbien complexe provenant de la matière première et de l'environnement peut être un moyen pour limiter le risque de présence de mycotoxines dans ce type de produits, grâce à la production de métabolites inhibant la croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altération (dont les moisissures toxigènes) ou par des phénomènes d'adsorption. À titre d'exemple, la fermentation de maïs est un procédé qui permet d'abaisser la teneur en aflatoxines, soit par transformation de ces dernières, soit par adsorption réversible sur les parois de bactéries lactiques par exemple (Schaarschmidt et Fauhl-Hassek, 2021b).

Or certaines études mettent en évidence la présence de fumonisines dans des boissons fermentées traditionnelles d'Afrique du Sud produites à partir de maïs (Shephard *et al.*, 2005). La fermentation ne suffit donc pas, en général, à s'affranchir de la présence de mycotoxines dans ces boissons et une grande attention doit

être portée à la sélection de la matière première, correctement stockée et triée avant la fermentation.

La concentration en OTA du moût diminue fortement lors des fermentations alcoolique et malolactique qui ont lieu pendant la fabrication du vin (La Placa *et al.*, 2023). L'OTA, potentiellement déjà présente dans le moût est adsorbée par les résidus de raisins et par les levures œnologiques, avec toutefois un taux d'adsorption très différent selon les souches de levures utilisées. De même, les teneurs en patuline sont drastiquement réduites lors de la fermentation alcoolique menant à l'élaboration du cidre et autres boissons alcooliques à base de pommes (Sant'Ana *et al.*, 2008).

## Séchage

Le séchage des fruits, des noix et des épices est aussi un défi pour éviter le développement de moisissures toxigènes. En effet, il s'agit ici de limiter la durée pendant laquelle le produit est dans des conditions d'humidité et de température favorables à la croissance fongique et à la production de mycotoxines. Par exemple, il est conseillé d'effectuer le séchage aux environs de 37 °C et de stocker ensuite les figues séchées à des températures inférieures à 10 °C, pour éviter la croissance d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines.

Pendant la fabrication du chocolat, les fèves de cacao sont d'abord mises à fermenter par des levures et des bactéries dans des conditions humides pour développer les arômes recherchés. Quand le séchage n'est pas effectué directement après la phase de fermentation, des espèces fongiques peuvent croître (conditions chaudes et humides) et la teneur en OTA peut augmenter dans le cacao (Dzelagha *et al.*, 2020).

La fabrication de pâtes alimentaires comporte une étape de mélange de semoule de blé dur avec de l'eau, puis une extrusion à travers un moule pour leur donner leur forme. Les pâtes fraîches sont ensuite séchées. On peut utiliser un séchage à basse (environ 60 °C pendant 10 à 15 h) ou à haute température (90 °C pendant 5 h). Lors de la fabrication de pâtes sèches, il y a peu d'effet de dilution des mycotoxines lors du procédé puisque l'eau ajoutée pour donner la forme aux pâtes est ensuite évaporée lors du séchage. Le séchage, qu'il soit à basse ou haute température, n'a ainsi que peu d'impact sur la concentration en DON (Vidal *et al.*, 2016).

## ► Devenir des mycotoxines dans les produits d'origine animale

La contamination des aliments utilisés pour l'alimentation des animaux de production peut entraîner la présence de résidus de mycotoxines ou de leurs métabolites dans différents tissus et leur excrétion dans le lait ou les œufs. Pourtant, à l'exception de l'aflatoxine M1 (AFM1) dans le lait, il n'existe pas de valeurs réglementaires concernant des teneurs maximales en mycotoxines dans les aliments d'origine animale (règlement UE 2023/915).

Les procédés de transformation pouvant influencer la teneur en mycotoxines sont souvent limités à la fermentation (fabrication fromagère) ou au traitement

thermique (voir section suivante). De plus, l'utilisation d'une flore fongique technologique peut rendre possible la synthèse de certaines mycotoxines au cours du procédé de transformation.

## Contamination du lait par l'AFM1 et devenir pendant la fabrication fromagère

L'AFM1, dérivé hydroxylé mais toujours toxique de l'aflatoxine B1 (AFB1), est susceptible d'être excrétée dans le lait à hauteur de 5-10 % de la quantité d'AFB1 ingérée par l'animal.

L'acidification jusqu'au pH isoélectrique des caséines (pH = 4,6) qui a lieu lors de l'étape de coagulation lactique pour la fabrication du yaourt n'impacte pas la concentration en AFM1. Lors de la fabrication de fromage, l'AFM1 présente initialement dans le lait se retrouvant majoritairement dans le caillé, l'élimination du lactosérum n'est pas un moyen de diminuer la contamination (Sarmast *et al.*, 2021). Les fromages frais peuvent ainsi être plus contaminés que le lait dont ils sont issus. En outre, malgré les activités métaboliques intenses des ferments lors de l'affinage, l'impact sur la concentration de l'AFM1 demeure limité.

## Contamination directe des aliments par la flore technologique

La production de certains aliments d'origine animale requiert une phase d'affinage pendant laquelle des micro-organismes vont, grâce à leurs activités protéolytique ou lipolytique, participer directement à l'apparition du goût, de la texture, de l'odeur et de l'aspect extérieur du produit. Cependant, ce développement microbien pose la question du risque éventuel de synthèse de mycotoxine pendant l'affinage, si des moisissures toxigènes sont présentes et sont dans des conditions propices à la production de toxines. Il convient toutefois de rappeler que la composition de ce type de produits, en particulier la proportion protéines/glucides, est beaucoup moins favorable à la toxinogénèse que celle observée dans les céréales par exemple.

## Charcuterie et salaisons

Au cours de l'affinage des produits de salaison sèche, une flore d'affinage complexe, comprenant de nombreuses espèces fongiques, se développe. Parmi elles, on trouve notamment des espèces connues pour produire de l'OTA (*Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium nordicum*...). Cette toxine peut être produite en petite quantité (quelques centaines de picogrammes par kilogramme) sur les produits de salaison sèche (Chen *et al.*, 2022). La maîtrise de l'activité de l'eau des produits et le maintien de la compétition microbienne sont alors des points clés de maîtrise de la sécurité sanitaire. Une étude récente a démontré que la flore microbienne des saucisses sèches était extrêmement riche et variait au cours de l'affinage des produits (Coton *et al.*, 2021). Dans cette étude, différentes espèces potentiellement toxigènes de *Penicillium* ont été observées et 5 mycotoxines différentes ont pu être détectées dans les produits (OTA, acide cyclopiazonique, acide mycophénolique,

citrinine et citréoviridine). Ces toxines ont été mesurées en surface des produits et l'impact toxicologique reste à étudier.

## Fromages

Comme pour les produits de salaison, la contamination des fromages au cours de la fabrication peut être liée au développement d'une flore indigène ou à l'ensemencement des produits par une souche fongique spécifique. Les données disponibles concernent surtout le risque associé aux deux principales espèces fongiques utilisées en fromagerie et en particulier *Penicillium roqueforti*. En effet, *P. roqueforti* peut produire différentes mycotoxines telles que la toxine PR, la roquefortine, l'acide mycophénolique, la roquefortine A... Les conditions d'ensemencement de cette espèce dans le fromage (faible teneur en oxygène, compétition avec la flore lactique, matrice riche en protéines et très pauvre en glucides) limitent le risque d'une contamination importante du produit fini. Cependant, les développements analytiques ont permis de mettre en évidence la présence de certaines toxines dans des fromages à pâte persillée de type « bleus » (Hymery *et al.*, 2014). Le risque toxique semble malgré tout modéré compte tenu de la part de ce type d'aliment dans l'alimentation totale.

Les souches utilisées en fromagerie doivent donc être sélectionnées afin de limiter le risque de contamination mycotoxique des produits finis. Le développement éventuel de nouveaux aliments utilisant des matrices végétales pour produire des substituts « végans » au fromage doit faire l'objet d'une évaluation minutieuse, car il est possible que *P. roqueforti* soit alors dans des conditions beaucoup plus favorables à la toxinogénèse que dans le milieu fromage.

## ► Effets des traitements thermiques

L'effet des traitements thermiques est intimement lié à la thermorésistance des mycotoxines. Le type de matrice joue également un grand rôle puisqu'il impacte le transfert de chaleur au cœur du produit, ainsi que la stabilisation des mycotoxines au sein du produit en fonction de ses caractéristiques (pH,  $a_w$ ). Alors que la préparation des aliments à des températures allant jusqu'à 100 °C a peu d'effet sur la plupart des mycotoxines, les températures plus élevées utilisées pour la friture, la torréfaction et l'extrusion peuvent réduire la concentration en mycotoxines (Karlovsy *et al.*, 2016). Le stockage au froid, la congélation ou la lyophilisation n'ont, en revanche, aucun effet.

## Pasteurisation et stérilisation

Comme la plupart des mycotoxines sont thermorésistantes, la pasteurisation ou la stérilisation n'ont que peu d'impact sur leur concentration. C'est, par exemple, le cas de la patuline lors de la pasteurisation de jus de pommes, de l'AFM1 lors du traitement UHT (ultra haute température) du lait ou du DON lors d'appertisation par autoclavage (association d'une température élevée et d'une pression importante).

## Cuisson

### Cuisson du pain et des biscuits

Même si la cuisson du pain se fait jusqu'à 250 °C, en général, la température de la croûte et de la mie ne dépasse pas les 100 °C. Ainsi, la structure des mycotoxines peut rester intacte. L'effet de la cuisson du pain est controversé (Schaarschmidt et Fauhl-Hassek, 2018). Si certaines études rapportent une légère diminution de la concentration en DON, dans d'autres, aucun effet n'est observé. Le facteur de réduction (concentration en DON finale/initiale) lié à l'étape de cuisson est estimé entre 0,6 et 1. En combinant l'effet de la première transformation et de la deuxième transformation (mouture, facteur de dilution lié à la recette et panification), le facteur de réduction atteint 0,2 à 0,6 pour du pain blanc et entre 0,3 et 0,8 pour du pain complet. La réglementation considère un facteur de 0,4 entre la teneur maximale tolérée dans le blé (1 250 µg/kg de DON) et celle acceptable dans le pain (500 µg/kg). Concernant la ZEN, les toxines T-2/HT-2 ou les fumonisines, la concentration est stable ou ne diminue que légèrement pendant la cuisson, selon le type de matrice et le protocole de cuisson. La cuisson des biscuits permet de détruire ou d'immobiliser environ les deux tiers de l'OTA.

### Grillage et torréfaction

Lors du grillage et de la torréfaction des fruits à coque, une forte réduction de la teneur en aflatoxines et en OTA (jusqu'à 85 %) peut être observée, par exemple sur des pistaches contaminées qui ont été trempées dans un mélange aromatique, puis torréfiées à 150 °C (Jalili *et al.*, 2020). Une dégradation thermique de l'OTA est aussi observée lors de la torréfaction du café et du cacao. Le procédé utilisé et le degré de torréfaction influencent fortement la concentration résiduelle. Globalement, la transformation des fèves de cacao en chocolat permet d'aboutir à des concentrations négligeables en OTA et en aflatoxines dans le chocolat. Cela est également dû à l'ajout d'autres ingrédients (par exemple, des produits laitiers et des sucres), qui diluent les mycotoxines. La torréfaction des cacahuètes permet de diminuer la teneur en AFB1, mais ne suffit pas pour éliminer totalement cette mycotoxine.

### Cuisson/extrusion

La cuisson-extrusion consiste d'abord en un chauffage sous pression avec une contrainte de cisaillement pour que le produit atteigne son point de fusion ou de plastification, puis en une extrusion à haute pression, à travers un moule donnant la forme à l'aliment. La cuisson-extrusion est un procédé qui peut permettre de réduire le taux de mycotoxines en fonction des paramètres utilisés et du type de mycotoxine (Schaarschmidt et Fauhl-Hassek, 2021). Par exemple, la diminution de la concentration en DON liée à la fabrication de flocons de maïs est estimée entre 1 et 40 %. Certaines études mentionnent une réduction jusqu'à 60 % pour les fumonisines. La production des céréales pour petit-déjeuner entraîne aussi une réduction significative de la teneur en OTA. Par contre, ce procédé n'a pas d'effet sur les aflatoxines. Il est important d'analyser les produits finis, car les mycotoxines peuvent être liées ou transformées par le procédé de cuisson-extrusion et donc induire quand même une toxicité après ingestion.

## Friture

Le type de cuisson affecte de manière significative le devenir des fumonisines dans le maïs (Schaarschmid et Fauhl-Hassek, 2021). Il faut atteindre 190 °C pour diminuer de moitié la teneur en fumonisines pendant une cuisson par friture pour faire des chips de maïs, alors qu'il faut aller jusqu'à 218 °C dans le cas de la torréfaction d'une farine de maïs. Le mode d'éclatement des popcorns, aliment très consommé chez les enfants, influe également sur le devenir des mycotoxines (DON et fumonisines principalement). Une réduction des teneurs en mycotoxines est observée lors de l'éclatement, avec une diminution plus nette pour l'éclatement réalisé en plongeant les grains dans de l'huile (comparé à l'éclatement par micro-ondes ou chauffage à l'air chaud) (Schambri *et al.*, 2021).

## Cuisson à l'eau

La cuisson à l'eau des pâtes peut réduire le taux de mycotoxines d'environ 40 % par relargage de mycotoxines dans l'eau de cuisson, qui est ensuite éliminée, ou par dilution (liée à l'absorption d'eau par les pâtes pendant la cuisson) (Visconti *et al.*, 2004). Utiliser un volume d'eau plus important pour la cuisson des pâtes et les faire cuire plus longtemps permet au DON de mieux se solubiliser dans l'eau de cuisson. La cuisson du riz permet de diminuer de 35 % sa teneur en AFB1.

## ►► Conclusion

Le devenir des mycotoxines au cours des procédés de transformation est très variable selon le type de mycotoxines, les matrices alimentaires et les procédés. Certaines étapes peuvent diminuer leur concentration alors que d'autres conduisent, au contraire, à une augmentation de la contamination pendant la fabrication. Puisque l'élimination complète des mycotoxines des produits alimentaires par les procédés de transformation est rarement possible, il est nécessaire de prévenir au maximum la contamination des matières premières, en amont de la transformation, et d'éviter la prolifération de moisissures toxigènes pendant cette transformation.

## ►► Références

- Chen Y., Chen J., Zhu Q. *et al.*, 2022. Ochratoxin A in Dry-Cured Ham: OTA-Producing Fungi, Prevalence, Detection Methods, and Biocontrol Strategies — A Review. *Toxins*, 14, 693, <https://doi.org/10.3390/toxins14100693>.
- Coton M., Deniel F., Mounier J. *et al.*, 2021. Microbial Ecology of French Dry Fermented Sausages and Mycotoxin Risk Evaluation During Storage. *Frontiers in Microbiology*, 12, 737140, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737140>.
- Dzelagha B.F., Ngwa N.M., Bup D.N., 2020. A Review of Cocoa Drying Technologies and the Effect on Bean Quality Parameters. *International Journal of Food Science*, 2020, 8830127, <https://doi.org/10.1155/2020/8830127>.

- Hymery N., Vasseur V., Coton M. *et al.*, 2014. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review: Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 13, 437-456, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>.
- Jalili M., Selamat J., Rashidi L., 2020. Effect of Thermal Processing and Traditional Flavouring Mixture on Mycotoxin Reduction in Pistachio. *World Mycotoxin Journal*, 3, 381-389, <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2486>.
- Karlovsky P., Suman M., Berthiller F. *et al.*, 2016. Impact of Food Processing and Detoxification Treatments on Mycotoxin Contamination. *Mycotoxin Research*, 3, 179-205, <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>.
- La Placa L., Tsitsigiannis D., Leggieri M.C. *et al.*, 2023. From Grapes to Wine: Impact of the Vinification Process on Ochratoxin A Contamination. *Foods*, 12, 260, <https://doi.org/10.3390/foods12020260>.
- Lopes P., Sobral M.M.C., Lopes G.R. *et al.*, 2023. Mycotoxins' Prevalence in Food Industry By-Products: A Systematic Review. *Toxins*, 15, 249, <https://doi.org/10.3390/toxins15040249>.
- Pascari X., Ramos A.J., Marín S. *et al.*, 2018. Mycotoxins and Beer. Impact of Beer Production Process on Mycotoxin Contamination. A Review. *Food Research International*, 103, 121-29, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.038>.
- Pinson-Gadais L., Barreau C., Chaurand M. *et al.*, 2007. Distribution of Toxigenic *Fusarium* spp. and Mycotoxin Production in Milling Fractions of Durum Wheat. *Food Additives and Contaminants*, 24, 53-62, <https://doi.org/10.1080/02652030600892958>.
- Règlement (UE) 2023/915 de la commission du 25 avril 2023 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) n° 1881/2006. *Journal officiel de l'Union européenne*, L 119/103.
- Sant'Ana A.D.S., Rosenthal A., De Massaguer P.R., 2008. The Fate of Patulin in Apple Juice Processing: A Review. *Food Research International*, 41, 441-453, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.001>.
- Sarmast E., Fallah A.A., Jafari T. *et al.*, 2021. Impacts of Unit Operation of Cheese Manufacturing on the Aflatoxin M1 Level: A Global Systematic Review and Meta-Analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 148, 111772, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111772>.
- Schambri P., Brunet S., Bailly J.D. *et al.*, 2021. Effect of Popcorn (*Zea mays* var. Everta) Popping Mode (Microwave, Hot Oil, and Hot Air) on Fumonisin and Deoxynivalenol Contamination Levels. *Toxins*, 13, 486, <https://doi.org/10.3390/toxins13070486>.
- Schaarschmidt S., Fahl-Hassek C., 2018. The Fate of Mycotoxins During the Processing of Wheat for Human Consumption: Mycotoxins during Wheat Processing. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 17, 556-593, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12338>.
- Schaarschmidt S., Fahl-Hassek C., 2021a. The Fate of Mycotoxins during the Primary Food Processing of Maize. *Food Control*, 121, 107651, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107651>.
- Schaarschmidt S., Fahl-Hassek C., 2021b. The Fate of Mycotoxins during Secondary Food Processing of Maize for Human Consumption. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 20, 91-148, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12657>.
- Shephard G.S., Van Der Westhuizen L., Gatyeni P.M. *et al.*, 2005. Fumonisin Mycotoxins in Traditional Xhosa Maize Beer in South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9634-9637, <https://doi.org/10.1021/jf0516080>.
- Vidal A., Bendicho J., Sanchis V. *et al.*, 2016. Stability and Kinetics of Leaching of Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-Glucoside and Ochratoxin A during Boiling of Wheat Spaghettis. *Food Research International*, 85, 182-190, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.037>.
- Vidal A., Marín S., Morales H. *et al.*, 2014. The Fate of Deoxynivalenol and Ochratoxin A during the Breadmaking Process, Effects of Sourdough Use and Bran Content. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 53-60, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.006>.
- Visconti A., Haidukowski E.M., Pascale M., Silvestri M., 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters*, 153, 181-199, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.032>.

# Limiter les contaminations par les mycotoxines à l'aide de solutions de biocontrôle

Caroline Strub, Sophie Lorber, Florence Forget  
et Angélique Fontana

## ►► Introduction

La contamination par des mycotoxines peut se produire au champ, pendant le stockage, au cours de la transformation d'une denrée, ainsi que chez le consommateur. Extrêmement stables, elles sont difficiles à éliminer ou à éradiquer lorsqu'elles pénètrent dans la chaîne agroalimentaire.

La meilleure stratégie pour contrôler la teneur en mycotoxines dans les denrées alimentaires est de prévenir leur formation au champ ou au cours du stockage et de la transformation. Les stratégies reposent actuellement sur de bonnes pratiques agricoles et sur l'utilisation de fongicides de synthèse, mais ces derniers sont très décriés du fait de leurs effets délétères sur la santé des consommateurs et sur l'environnement. En outre, l'exposition répétée des moisissures aux fongicides peut entraîner l'apparition de souches résistantes, ce qui diminue l'efficacité des stratégies de maîtrise et peut poser un risque de transfert de gènes de résistance à des souches pathogènes pour l'humain. L'objectif de production d'aliments sains, exempts de mycotoxines et de résidus de fongicides, a conduit à une recherche active pour développer de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation d'agents microbiens de biocontrôle<sup>4</sup>. D'autres stratégies de biocontrôle basées sur l'utilisation de composés naturels, tels que des extraits de plantes, donnent des résultats prometteurs pour réduire la contamination par les mycotoxines, sans forcément affecter la croissance des champignons.

4. <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2024-352>, note de service DGAL/SDSPV/2024-352 (consulté le 24/06/2024).

## » Le biocontrôle

Le biocontrôle occupe une place à part dans les moyens de prévention, car il peut être mis en œuvre avant et après la récolte. En outre, l'application de micro-organismes bénéfiques, au champ, avant la récolte, peut prévenir l'accumulation de mycotoxines pendant le stockage des denrées (Sarocco et Vannacci, 2018).

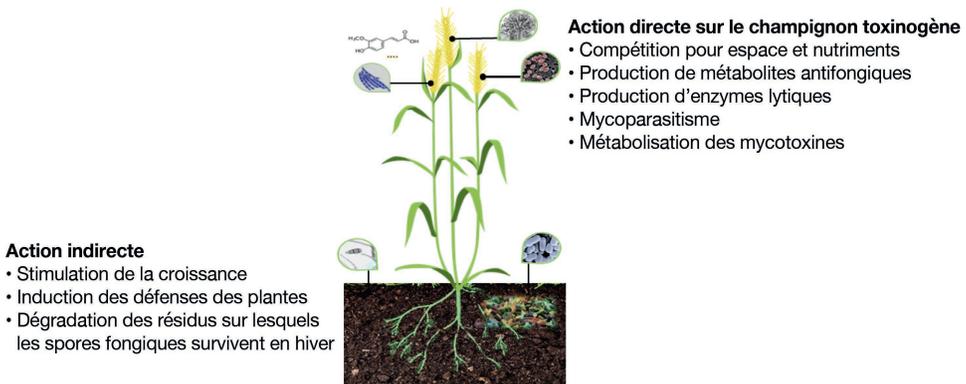
Le biocontrôle regroupe un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels. Les produits de biocontrôle sont définis à l'article L. 253-6 du Code rural et de la pêche maritime. Ils se répartissent en deux catégories :

- les macro-organismes, principalement des invertébrés, notamment des acariens, des insectes et des nématodes. Le biocontrôle utilisant des macro-organismes est communément appelé lutte biologique ;
- les produits phytopharmaceutiques qui comprennent des micro-organismes, des médiateurs chimiques tels que les phéromones et les kairomones, et des substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale.

L'évaluation des produits phytopharmaceutiques et des substances actives qui les composent est encadrée et harmonisée, avant leur mise sur le marché, au niveau européen par le règlement (CE) n° 1107/2009. Depuis 2015, l'Anses gère les autorisations de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, des matières fertilisantes et supports de culture, et des adjuvants.

## Des micro-organismes prometteurs pour lutter contre la contamination par des mycotoxines

Les micro-organismes utilisés en tant qu'agents de biocontrôle peuvent interagir avec l'agent pathogène, soit directement (parasitisme, antibiose, sécrétion d'enzymes lytiques), soit indirectement (compétition pour l'espace et les nutriments) (figure 18.1). Ils peuvent également affecter la plante hôte en stimulant ses défenses ou en favorisant sa croissance (Nguyen *et al.*, 2017). Malgré ce large éventail de mécanismes, les micro-organismes permettant de limiter efficacement l'occurrence des mycotoxines sont encore peu nombreux.



**Figure 18.1.** Différents mécanismes d'action expliquant l'efficacité de certains agents de biocontrôle contre les champignons toxigènes infectant les cultures céréalières.

Les solutions qui ont été les plus étudiées et qui, dans certaines conditions, ont montré une réelle efficacité en plein champ sont celles basées sur l'utilisation de souches d'*Aspergillus flavus* n'ayant pas la capacité de synthétiser les aflatoxines. On parle alors de souches non toxigènes. L'efficacité de ces solutions résulterait de plusieurs mécanismes : l'occupation de l'espace par les souches non toxigènes, un effet inhibiteur de croissance et de production d'aflatoxines exercé par les souches non toxigènes en contact avec les souches toxigènes, la production de métabolites spécialisés antifongiques par les souches non toxigènes (Sweany *et al.*, 2021). Plusieurs souches d'*A. flavus* non toxigènes ont été brevetées et plusieurs produits commercialisés. Différentes solutions ont été homologuées aux États-Unis pour réduire les contaminations sur maïs et arachides. Une attention particulière pour l'élaboration de ces solutions repose sur l'utilisation de souches non toxigènes endogènes des régions productrices où elles sont appliquées. L'utilisation combinée de différents isolats autochtones des zones ciblées a pour objectif d'augmenter les chances de promouvoir des communautés non toxigènes diverses à long terme et, par conséquent, de conserver l'efficacité du produit de biocontrôle au cours du temps (Ortega-Beltran et Cotty, 2017). Ainsi, des produits à base de mélanges de souches ont été homologués pour une utilisation sur maïs et arachide dans différents pays d'Afrique, dont le Nigeria (Moral *et al.*, 2020) et le Sénégal (Senghor *et al.*, 2020). Une limitation potentielle de l'utilisation de souches non toxigènes pour le biocontrôle de champignons indésirables serait cependant le risque de recombinaison sexuée entre les lignées toxigènes et les souches de biocontrôle, qui pourrait conduire à l'émergence de souches toxigènes particulièrement virulentes. En Europe, il n'existe pas à l'heure actuelle d'autorisation de mise sur le marché de solutions de biocontrôle à base de souches non toxigènes d'*A. flavus*.

La capacité à réduire l'incidence de la fusariose et la contamination par le déoxynivalénol (DON) a été démontrée chez d'autres micro-organismes et en particulier chez plusieurs bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces*. C'est également le cas de certains champignons des genres *Clonostachys* et *Trichoderma*, ainsi que les oomycètes du genre *Pythium*. Plusieurs souches non pathogènes de *Trichoderma* ont été particulièrement étudiées et leurs mécanismes d'action élucidés : compétition pour l'espace et les nutriments, production de métabolites antifongiques, biostimulation et induction des défenses des plantes. Certaines de ces souches possèdent aussi la capacité à glycosyler et donc à détoxifier les trichothécènes (Tian *et al.*, 2022). Cependant, les résultats prometteurs obtenus *in vitro* au laboratoire, en conditions contrôlées en serre et parfois en essais plein champ ne sont pas toujours transférables pour l'élaboration d'un produit de biocontrôle. En France, en 2024, le seul produit de biocontrôle homologué contre la fusariose du blé est une solution dont l'ingrédient actif est *Pythium oligandrum*.

Le potentiel de certaines levures pour réduire le développement d'agents toxigènes a aussi fait l'objet d'études. Ainsi, différentes levures utilisées seules ou en combinaison avec d'autres techniques de conservation se sont montrées efficaces pour lutter contre *Penicillium expansum* sur les pommes (Spadaro et Droby, 2016). Par exemple, l'application d'une souche de levure antagoniste, *Metschnikowia pulcherrima*, comme agent de biocontrôle sur la surface de pommes inoculées avec *P. expansum*, a inhibé la croissance fongique et la production de patuline (PAT)

pendant le stockage (Settier-Ramírez *et al.*, 2021). *M. pulcherrima*, levure peu fermenteuse, est présentée comme une alternative aux sulfites qui empêchent naturellement le développement de micro-organismes indésirables. Les mécanismes par lesquels les levures limitent le développement des moisissures toxigènes comprennent, en sus des mécanismes précédemment mentionnés, la compétition nutritionnelle pour le fer, la formation de biofilms mais également le *quorum sensing*, qui est la capacité d'un micro-organisme à évaluer et à réagir à la densité de population (Freimoser *et al.*, 2019).

Le développement d'approches métagénomiques permettant de caractériser les communautés microbiennes présentes dans les sols, la rhizosphère, les communautés endophytes des graines et tissus végétaux, celles se développant sur les grains et fruits tout au long de leur maturation et stockage est une voie prometteuse. Elle permettrait d'identifier de nouveaux agents ou consortia microbiens capables d'inhiber l'infection et le développement des agents fongiques toxigènes, ainsi que leur production de mycotoxines. L'utilisation de communautés synthétiques pourrait être une solution plus efficace que celles exploitant l'activité d'une seule souche.

## Le pouvoir d'extraits naturels pour limiter les teneurs en mycotoxines

Une autre grande famille de produits de biocontrôle étudiée pour leur capacité à limiter l'accumulation des mycotoxines dans les denrées alimentaires est constituée par des composés naturels végétaux. Parmi toutes les substances naturelles issues pour la plupart du métabolisme spécialisé des plantes, certaines sont particulièrement efficaces pour réduire la croissance des champignons et/ou la production de leurs toxines. Elles peuvent être divisées en trois classes selon leur nature chimique.

### Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont largement étudiées et exploitées dans les secteurs cosmétique, médical, paramédical et agroalimentaire (Sarkic et Stappen, 2018). Elles sont constituées d'un mélange complexe de composés volatils, isolés des plantes essentiellement par hydrodistillation et entraînement à la vapeur. Elles sont majoritairement divisées en trois familles : les terpénoïdes, qui résultent de l'assemblage de sous-unités isopentényl pyrophosphate, les phénylpropanoïdes dérivés de l'acide shikimique et les dérivés des acides gras. On y retrouve parfois des composés azotés ou soufrés, dont les isothiocyanates. Ces composés sont lipophiles et se distinguent par leurs propriétés aromatiques, expliquant leur utilisation comme arômes ou parfums (Chizzola, 2013). Par ailleurs, certains composés sont employés pour leurs nombreuses activités biologiques : bactéricide, insecticide et fongicide. Les HE sont des molécules d'origine naturelle, biodégradables et sont donc considérées comme une alternative possible aux pesticides de synthèse.

À titre d'exemple, les HE de laurier, de cumin, de fenugrec, de mélisse, de menthe et de sauge ont montré un impact important sur la production d'ochratoxine A (OTA) par *Aspergillus carbonarius*, sur un milieu synthétique de raisin. L'HE d'écorce de

cannelle a présenté une toxicité élevée envers plusieurs champignons (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp.) et possède la capacité d'inhiber la production d'aflatoxine B1 (AFB1) (Chelagema *et al.*, 2021).

L'utilisation de certaines HE reconnues comme GRAS (*Generally recognized As Safe*) par la FDA (Food Drug Administration) en tant qu'additifs ou arômes alimentaires est autorisée aux États-Unis. Puisque leurs composants actifs sont fortement volatils, elles sont principalement utilisées comme agents de fumigation des produits agricoles après la récolte. Un certain nombre d'HE commercialisées peuvent être ainsi utilisées dans les cultures produites selon le cahier des charges de l'Agriculture biologique. Il s'agit essentiellement d'HE de jojoba, romarin, thym, cannelle, menthe, cumin, aneth et clou de girofle.

Néanmoins, l'utilisation à grande échelle des HE reste limitée en raison de cette nature volatile, de leur dégradation sous l'effet de la lumière, la chaleur, l'oxygène et l'humidité, et de leurs impacts sur les propriétés organoleptiques des aliments. Pour atténuer ce dernier effet, des stratégies telles que l'encapsulation des HE ont été testées (Kumar *et al.*, 2010). De plus, leur utilisation se heurte à plusieurs difficultés, dont la phytotoxicité et la toxicité pour les mammifères. En effet, les furanocoumarines contenues dans certaines HE peuvent causer une irritation et des brûlures. De même, une toxicité sur les fibroblastes humains est rapportée pour une exposition au linalol, composé trouvé dans l'HE de thym et de lavande (Prashar *et al.*, 2004). Leur usage comme additifs, arômes alimentaires ou biopesticides doit être autorisé par les organismes chargés de la sécurité alimentaire.

Leur mécanisme d'action repose en grande partie sur l'inhibition de la croissance fongique. Par exemple, l'HE de *Curcuma longa* qui contient de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -turmérone, du camphol et de l'eucalyptol a une activité fongicide liée à une altération du potentiel de la membrane mitochondriale chez *A. flavus*, altération qui conduit à la mort cellulaire (Hu *et al.*, 2015). Cet effet est aussi observé pour l'HE de *Curcuma amada*, qui contient de l' $\alpha$ -zingibérène, du géraniol (citral A), du 6-gingérol et du 6-shogaol. Une déstabilisation de la membrane cellulaire suite à l'application de cette HE entraîne une perte de l'intégrité cellulaire et une inhibition de la production d'ergostérol chez *A. flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Kavitha *et al.*, 2020). L'application de l'HE de romarin, qui contient le 1,8-cinéole (eucalyptol), le camphre et l' $\alpha$ -pinène, entraîne aussi une inhibition importante de la production d'ergostérol chez *A. flavus* (da Silva Bomfim *et al.*, 2019). L'HE de clou de girofle, de cannelle et de noix muscade, dont l'eugénol est l'un des composés bioactifs majeurs, entraîne une apoptose dans les cellules fongiques et aussi une inhibition des gènes de régulation du métabolisme spécialisé (*laeA*, *lipA* et *metP*; Muñoz Castellanos *et al.*, 2020).

## Les extraits aqueux ou hydroalcooliques

Les extraits aqueux de plantes sont riches en composés phénoliques totaux et présentent souvent une activité antioxydante (Skotti *et al.*, 2014).

Une étude ciblée sur l'effet de cinq extraits aqueux de menthe, de séné, de thym, de basilic et de safran a montré un potentiel antifongique important vis-à-vis d'*A. flavus*, ainsi qu'une diminution concomitante de la production d'AFB1 (Omidpanah *et al.*, 2015). L'extrait aqueux de poivre noir entraîne également une inhibition de

la synthèse d'AFB1 chez toutes les espèces toxigènes d'*Aspergillus* de la section *Flavi* étudiées (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii* et *A. minisclerotigenes*), à l'exception d'*A. nomius*. Dans cette étude, l'effet sur la synthèse de mycotoxines ne s'accompagne pas d'une inhibition significative de la croissance fongique (El Mahgubi *et al.*, 2013). La capacité d'extraits foliaires bruts d'une variété sauvage de piment à inhiber la croissance mycélienne et la germination des conidies d'*Alternaria alternata* a été décrite ; l'efficacité de cette inhibition dépendait de la dose appliquée (Chelagema *et al.*, 2021). De même, un extrait méthanolique d'écorces de grenades a démontré un effet inhibiteur sur la germination des spores et la croissance mycélienne de *Fusarium sambucinum*. La bioactivité d'un extrait aqueux de la micromérie de Grèce a aussi été étudié par El Khoury *et al.* (2017). Ces auteurs ont mis en évidence une inhibition de la production d'AFB1 par *A. flavus* sans que le développement fongique ne soit affecté. L'extrait alcoolique de *Curcuma longa* a montré un effet inhibiteur sur différents champignons pathogènes tels que *Fusarium sp.*, *A. alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* et *Cladosporium cladosporioides* (Chelagema *et al.*, 2021).

Comparés aux huiles essentielles, ces extraits peuvent présenter plusieurs avantages : une toxicité probablement négligeable ou très réduite, en particulier lors d'une exposition par voie orale, et une absence de modifications organoleptiques des aliments, car leurs taux en composés volatiles fortement aromatiques sont beaucoup plus faibles (Skotti *et al.*, 2014). Cependant, il faudrait développer des formulations adaptées à leur utilisation au cours du stockage des matières premières agricoles. Parmi les produits commercialisés, on peut citer un extrait naturel de vigne contenant des polyphénols qui est proposé en tant que solution antifongique naturelle.

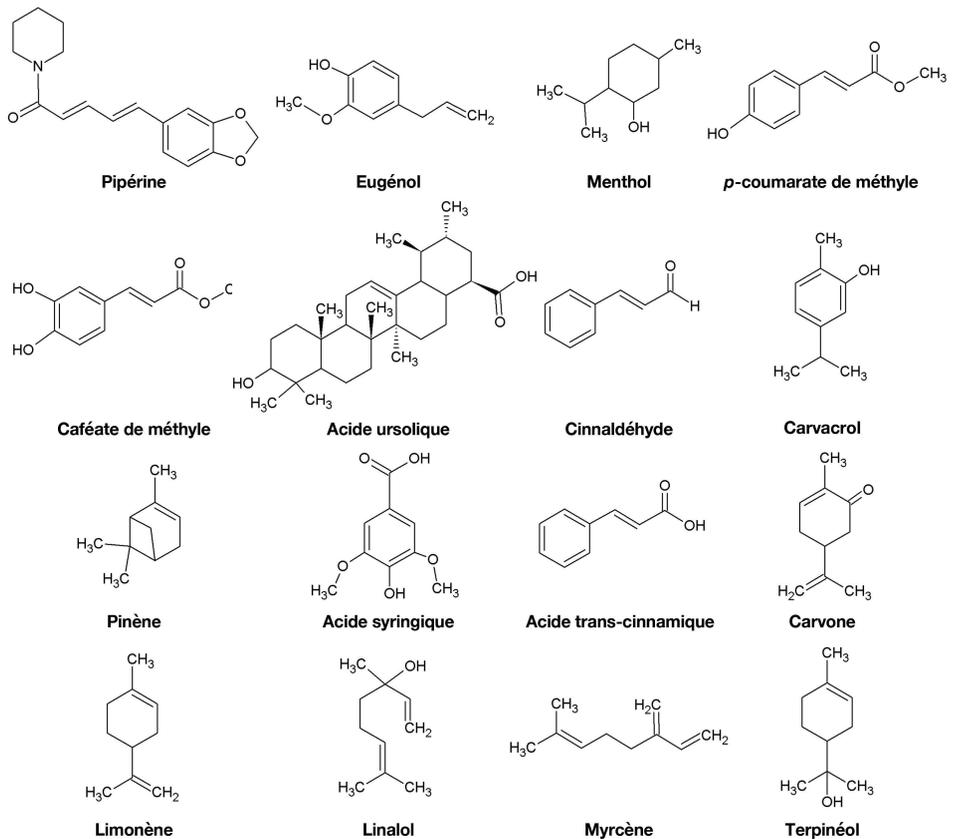
Les mécanismes d'action des extraits de plantes impliqués dans l'inhibition de la croissance fongique et/ou de la contamination par les mycotoxines ont fait l'objet d'une synthèse bibliographique rédigée par Chelagema *et al.* (2021). Les extraits peuvent perturber et altérer la membrane cellulaire, et inhiber la formation de la paroi cellulaire, induire le dysfonctionnement des mitochondries fongiques, inhiber les pompes d'efflux ou encore aboutir à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène dans le cytoplasme des cellules fongiques. Ils agissent parfois directement sur la biosynthèse des mycotoxines en inhibant l'expression des gènes impliqués dans leur synthèse.

## Les biomolécules pures

Il existe trois groupes majeurs de composés bioactifs dans les plantes : les phénylpropanoïdes, composés aromatiques possédant un groupement hydroxyle (des phénols simples jusqu'aux polyphénols), qui représentent la classe de molécules la plus conséquente, les alcaloïdes et les terpènes. De nombreuses molécules, isolées à partir d'extraits végétaux ou d'huiles essentielles actives contre la croissance fongique et/ou la production de toxines, ont été étudiées. La structure de certaines de ces molécules est reportée sur la figure 18.2.

La production d'AFB1 par *A. flavus* a été inhibée par la pipérine, un alcaloïde du poivre noir et du poivre long, la croissance fongique étant peu affectée (Caceres *et al.*, 2017). Quatre composés communs à de nombreuses HE, l'eugénol (phénol

simple de la famille des phénylpropènes), le thymol et le carvacrol (phénols terpéniques), ainsi que le menthol (monoterpénol), ont démontré des propriétés anti-aflatoxinogènes et fongistatiques sur la croissance d'*A. flavus*. Le trans-*p*-coumarate de méthyle et le caféate de méthyle (phénylpropanoïdes), l'acide syringique (acide hydroxybenzoïque) et l'acide ursolique (triterpène) ont eu un effet inhibiteur sur la croissance d'*A. alternata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium pallidoroseum* et *Helminthosporium* sp. ; seul *A. alternata* s'est révélé résistant à l'acide syringique (Chelagema *et al.*, 2021). L'acide trans-cinnamique (phénylpropanoïde) a impacté la biosynthèse des AF chez *A. flavus* et *A. parasiticus*, et du DON chez *Fusarium culmorum* et *F. graminearum*, tandis que le cinnamaldéhyde (phénylpropanoïde) a affecté la production d'AFB1 chez *A. flavus*, et d'OTA chez *A. carbonarius* et *Penicillium verrucosum*.



**Figure 18.2.** Structure des biomolécules étudiées pour leur effet antifongique et inhibiteur de la production de mycotoxines.

L'activité antifongique des terpènes (carvone, carvacrol, limonène, linalol, myrcène, pinène, terpinéol, thymol) serait essentiellement due à leur caractère lipophile, qui leur permet de pénétrer dans les cellules fongiques et d'interagir avec les membranes, puis d'induire une altération de la perméabilité cellulaire et du potentiel

électrochimique. Les composés phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes en raison de la présence de groupements hydroxyles et carboxyles. Ils modulent le statut redox en supprimant les radicaux libres et les ions métalliques chélateurs, inhibant l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Le traitement à l'eugénol des moisissures entraîne la réduction des activités enzymatiques impliquées dans la réponse au stress oxydant. En parallèle, une inhibition de la production d'AFB1 due à une modulation négative de l'expression de la presque totalité des gènes du *cluster* de l'AFB1 par les facteurs de transcription, en particulier MtfA et VeA, est observée (Caceres *et al.*, 2016). L'exposition d'*A. flavus* à la pipérine induit une inhibition de l'expression de la majorité des gènes du *cluster* de la biosynthèse de l'AFB1, y compris les gènes régulateurs *aflR* et *aflS*. Cette exposition entraîne aussi une modulation de l'expression de plusieurs facteurs de transcription bZIP tels que VeA, indispensable pour la production de certaines mycotoxines (Caceres *et al.*, 2017).

L'un des principaux avantages des produits phytochimiques réside dans leur biodégradabilité, ce qui en fait de bons candidats en tant que produit de biocontrôle. Cependant, ils sont parfois peu solubles et leur production, leur stockage et leur manutention les exposent à des conditions pouvant provoquer leur dégradation (l'humidité, la chaleur et la lumière). Il est important d'améliorer les solutions de formulation pour pallier les problèmes de solubilité et de stabilité des molécules actives contenues dans ces extraits. Par ailleurs, il est intéressant de se concentrer sur les composés naturels capables d'impacter la biosynthèse des mycotoxines sans réduire de manière significative la croissance des souches de moisissures, afin de maintenir l'équilibre écologique.

## ► La détoxification par voie microbiologique

Plusieurs levures, bactéries et champignons ont montré leur capacité à biotransformer des molécules de mycotoxines en métabolites moins toxiques. Par exemple, les enzymes du tractus digestif des ruminants, et plus spécifiquement celles de l'écosystème microbien de leur tube digestif, sont capables de détoxiquer certaines mycotoxines comme les fumonisines. Mais les deux mycotoxines de stockage, l'AFB1 et l'OTA, sont peu sensibles à cette biotransformation enzymatique (Yannikouris et Jouany, 2002).

La fermentation alcoolique se produisant dans la fabrication des boissons alcoolisées (bière et cidre, en particulier) et la fermentation lactique dans les ensilages de maïs grain réduisent de façon importante la toxicité de certaines mycotoxines comme les fumonisines et la PAT (Niderkorn *et al.*, 2007). Les mycotoxines présentes dans les céréales destinées à l'ensilage ou à la transformation en boisson alcoolisée (par exemple maïs et malt d'orge de brasserie) sont en effet métabolisées au cours de la fermentation et converties en métabolites à la toxicité réduite (Dalié *et al.*, 2010). En outre, de nombreux lactobacilles sont capables d'inhiber la croissance d'espèces aflatoxinogènes présentes dans les ensilages de maïs et ainsi de diminuer la concentration en AFB1.

Cependant, des études visant à enrichir les ensilages de maïs en cocktails de lactobacilles « détoxifiants » ont donné des résultats opposés, avec une augmentation des mycotoxines produites par *Fusarium* spp. et *Alternaria* spp. (Gallo *et al.*, 2021). De plus, la réduction de toxicité des mycotoxines observée pendant la fermentation alcoolique ou l'ensilage n'est pas toujours une véritable détoxification ; il peut aussi s'agir d'effet direct de complexation (Kim *et al.*, 2019).

Les gènes de micro-organismes, dont l'activité de détoxification des mycotoxines est due à une réaction enzymatique (dé-époxydation, glycosylation, acétylation, estérification), peuvent être clonés et exprimés dans des micro-organismes hôtes hétérologues impliqués dans les procédés de fermentation alcoolique, acétique ou lactique. Ce procédé d'inactivation enzymatique de la toxicité des mycotoxines présentes dans les matrices alimentaires de base de l'alimentation humaine et animale est considéré comme respectueux de l'environnement, comparé aux procédés de dégradation chimiques. Il apparaît comme la meilleure stratégie de détoxification des matières premières de l'alimentation humaine ou animale. Les premières applications de la détoxification enzymatique de certaines fusariotoxines comme le DON sont déjà anciennes. Pour la détoxification des mycotoxines produites par d'autres espèces fongiques (AFB1, OTA, PAT ou ZEN), l'identification des souches bactériennes les plus efficaces pour détoxifier les substrats alimentaires contaminés commence à donner des résultats probants (Nazhand *et al.*, 2020).

## ►► Conclusion

Le contrôle des mycotoxines par des micro-organismes ou des extraits naturels est une solution prometteuse. Cependant, cette approche est indissociable des bonnes pratiques agricoles et de la mise en œuvre d'une bonne gestion des denrées après la récolte. Les questions concernant la sécurité, la durabilité et l'impact sur les écosystèmes de ces produits phytosanitaires sont encore nombreuses et légitimes. Par conséquent, de nombreuses études doivent être menées afin d'évaluer les effets de ces produits sur la santé humaine, animale et végétale, ainsi que sur l'environnement.

Les stratégies de prévention mises en œuvre tout au long de la chaîne agroalimentaire ne sont pas toujours suffisantes et d'autres méthodes de décontamination et/ou de détoxification sont par conséquent nécessaires.

## ►► Références

- Caceres I., El Khoury R., Bailly S., Oswald I.P., Puel O., Bailly J.D., 2017. Piperine inhibits aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus* by modulating fungal oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology*, 107, 77-85, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.08.005>.
- Caceres I., El Khoury R., Medina Á. *et al.*, 2016. Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach. *Toxins*, 8, 123, <https://doi.org/10.3390/toxins8050123>.
- Chelaghema A., Strub C., Colas de la Noue A., Schorr-Galindo S., Fontana A., 2021. Plants for plants: would the solution against mycotoxins be the use of plant extracts, *in* Montet D.,

- Brabet C., Schorr-Galindo S., Ray R.C. (éd.), *Mycotoxins in Food and Beverages: Innovations and Advances, Part II*, Boca Raton, CRC Press, 154-174, <https://doi.org/10.1201/9781003176046>.
- Chizzola R., 2013. Regular monoterpenes and sesquiterpenes (essential oils), in Ramawat K., Mérillon J.M. (éd.), *Natural Products*, Berlin, Heidelberg, Allemagne, Springer, 96, 2973-3008, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_130](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_130).
- Da Silva Bomfim N., Kohiyama C.Y., Nakasugi L.P., Nerilo S.B., Mossini S.A.G., Romoli J.C.Z. *et al.*, 2019. Antifungal and antiaflatoxic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. *Food Additives and Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37, 153-161, <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1678771>.
- Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F., 2010. Lactic acid bacteria — Potential of control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, 370-380, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>.
- El Khoury R., Caceres I., Puel O. *et al.*, 2017. Identification of the anti-aflatoxinogenic activity of *Micromeria graeca* and elucidation of its molecular mechanism in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 9, 87, <https://doi.org/10.3390/toxins9030087>.
- El Mahgubi A., Bailly S., Tadrist S. *et al.*, 2013. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control*, 32, 143-148, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.013>.
- Freimoser F.M., Rueda-Mejia M.P., Tilocca B. *et al.*, 2019. Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 154, <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>.
- Gallo A., Fancello F., Ghilardelli F. *et al.*, 2021. Effects of several lactic acid bacteria inoculants on fermentation and mycotoxins in corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 277, 114962, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114962>.
- Hu Y., Luo J., Kong W. *et al.*, 2015. Uncovering the antifungal components as fumigants in turmeric (*Curcuma longa* L.) essential oil against *Aspergillus flavus* by partial least squares. *RSC Advances*, 5, 41967, <https://doi.org/10.1039/c5ra01725d>.
- Kavitha K., Vijaya N., Krishnaveni A. *et al.*, 2020. Nanomaterials for antifungal applications. *Nanotoxicity*, 19, 385-398, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819943-5.00019-1>.
- Kim S.W., Holanda D.M., Gao X. *et al.*, 2019. Efficacy of a yeast cell wall extract to mitigate the effect of naturally co-occurring mycotoxins contaminating feed ingredients fed to young pigs: impact on gut health, microbiome, and growth. *Toxins*, 11, 633, <https://doi.org/10.3390/toxins11110633>.
- Kumar A., Shukla R., Singh P. *et al.*, 2010. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 539-543, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.028>.
- Moral J., Garcia-Lopez M.T., Camiletti B.X. *et al.*, 2020. Present status and perspective on the future use of aflatoxin biocontrol products. *Agronomy*, 10, 491, <https://doi.org/10.3390/agronomy10040491>.
- Muñoz Castellanos L., Amaya Olivas N., Ayala-Soto J. *et al.*, 2020. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) and pepper (*Piper nigrum* L.) essential oils and functional extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Microbiology*, 2020, 1702037, <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>.
- Nazhand A., Durazzo A., Lucarini M. *et al.*, 2020. Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *Foods*, 9, 644, <https://doi.org/10.3390/foods9050644>.
- Nguyen P.A., Strub C., Fontana A., Schorr-Galindo S., 2017. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104, 10-27, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.004>.
- Niderkorn V., Morgavi D.P., Pujos E. *et al.*, 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage. *Food Additives and Contaminants*, 24, 406-415, <https://doi.org/10.1080/02652030601101110>.

- Omidpanah S., Sadeghi H., Mohamadian M., Manayi A., 2015. Evaluation of antifungal activity of aqueous extracts of some medicinal plants against *Aspergillus flavus*, pistachio aflatoxin producing fungus *in vitro*. *Drug Development and Therapeutics*, 6, 66-69, <https://doi.org/10.4103/2394-6555.162446>.
- Ortega-Beltran A., Cotty P.J., 2017. Frequent shifts in *Aspergillus flavus* populations associated with maize production in sonora, Mexico. *Phytopathology*, 108, 412-420, <https://doi.org/10.1094/PHTO-08-17-0281-R>.
- Prashar A., Locke I.C., Evans C.S., 2004. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 37, 221-229, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2004.00307.x>.
- Sarkic A., Stappen I., 2018. Essential oils and their single compounds in cosmetics — A critical review. *Cosmetics*, 5, 1-21, <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011>.
- Sarrococo S., Vannacci G., 2018. Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop Protection*, 110, 160-170, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.013>.
- Senghor L.A., Ortega-Beltran A., Atehnkeng J. *et al.*, 2020. The atoxigenic biocontrol product Aflasafe SN01 is a valuable tool to mitigate aflatoxin contamination of both maize and groundnut cultivated in Senegal. *Plant Disease*, 104, 510-520, <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0575-RE>.
- Settier-Ramírez L., López-Carballo G., Hernández-Muñoz P. *et al.*, 2021. New isolated *Metschnikowia pulcherrima* strains from apples for postharvest biocontrol of *Penicillium expansum* and patulin accumulation. *Toxins*, 13, 397, <https://doi.org/10.3390/toxins13060397>.
- Skotti E., Anastasaki E., Kanellou G. *et al.*, 2014. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.013>.
- Spadaro D., Drobny S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Sciences and Technology*, 47, 39-49, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>.
- Sweany R.R., Mack B.M., Moore G.G. *et al.*, 2021. Genetic responses and aflatoxin inhibition during co-culture of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 13, 794, <https://doi.org/10.3390/toxins13110794>.
- Tian Y., Zhang D., Cai P. *et al.*, 2022. Elimination of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) via microbial and enzymatic strategies: Current status and future perspectives. *Trends in Food Sciences and Technology*, 124, 96-107, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.002>.
- Yannikouris A., Jouany J.P., 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, 81-99, <https://doi.org/10.1051/animres:2002012>.
- Ziegenhagen R., Heimberg K., Lampen A., Hirsch-Ernst K.I., 2021. Safety aspects of the use of isolated piperine ingested as a bolus. *Foods*, 10, 2121, <https://doi.org/10.3390/foods10092121>.

---

# Méthodes de quantification des mycotoxines

Graziella Rigal, Stéphane Bernillon et Vessela Atanasova

## ► Introduction

Les mycotoxines, issues de nombreuses familles chimiques, présentent des structures moléculaires très différentes. Cette diversité associée à un panel de matrices variées nécessite d'adapter les protocoles d'extraction et de dosage au couple mycotoxine/matrice étudié. Pour répondre aux besoins de quantification de ces composés, les méthodes analytiques sont régulièrement classées en deux groupes de techniques : les tests rapides utilisés comme outils d'estimation et de criblage, et les méthodes conventionnelles qui permettent une quantification fine et spécifique des niveaux de contamination. Parmi les méthodes conventionnelles figurent les méthodes de référence<sup>5</sup>, ainsi que les méthodes normalisées de dosage des mycotoxines dans diverses matrices. Les principaux organismes de normalisation sont l'Afnor (Association française de normalisation), le CEN (Comité européen de normalisation) et l'ISO (International Standard Organisation).

Les méthodes de dosage des mycotoxines suivent généralement le même schéma analytique : extraction des mycotoxines de l'échantillon, purification si besoin de l'extrait obtenu, puis détection et quantification. Le prélèvement de l'échantillon et son broyage éventuel en amont restent des étapes cruciales pour s'assurer de sa bonne représentativité.

---

5. Les méthodes de référence sont des méthodes de dosage de composés qui présentent les meilleurs critères analytiques parmi les méthodes disponibles et qui sont utilisées pour évaluer d'autres méthodes. Pour être acceptées, les méthodes de référence doivent avoir fait l'objet d'une normalisation par un organisme spécialisé, national ou international.

## ► Importance de l'échantillonnage

La contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines est souvent très hétérogène, ce qui entraîne des difficultés pour obtenir un échantillon représentatif. Des études montrent que, dans les grains, ces molécules peuvent être concentrées dans des points chauds de contamination. Par exemple, pour les aflatoxines produites par *Aspergillus*, la présence de ces points chauds a été démontrée dans les graines d'arachide par les travaux de Whitaker en 2006. Cet auteur a dosé les aflatoxines dans dix mini-prélèvements de graines d'arachide d'un même lot et a mis en évidence une très grande disparité, avec des valeurs minimales et maximales allant de 0 à 69 ng . g<sup>-1</sup> pour un lot ou de 29 à 197 ng . g<sup>-1</sup> pour un autre. Cette hétérogénéité, souvent observée dans les lots de céréales, peut s'expliquer par un faible nombre de graines pouvant être très fortement contaminées au sein d'un lot ; elle résulte d'un développement de moisissures de manière isolée. Outre l'hétérogénéité, les facteurs comme la nature du conditionnement du produit (vrac, sacs ou emballages individuels) et la taille du lot à échantillonner influent également sur la difficulté de l'échantillonnage.

Lors de la détermination de la conformité ou non d'un lot vis-à-vis de limites maximales réglementaires, il est important que la prise d'essai issue de l'échantillon soit la plus représentative possible de l'ensemble du lot. Le résultat analytique obtenu donne alors une valeur avec une incertitude minimale, s'approchant le plus possible de la valeur « vraie ». Ainsi, le règlement d'exécution (UE) n° 2023/2782 définit les modalités d'échantillonnage et les performances analytiques à mettre en œuvre pour les analyses officielles de détermination de mycotoxines dans les produits alimentaires, et notamment les quantités à prélever en fonction de la taille des lots et par type de produit, les dispositions spécifiques à certains produits et les critères d'acceptation des lots. Pour plus d'information à ce sujet, le lecteur peut consulter les revues de Shephard (2016) et Tittlemer *et al.* (2021).

## ► L'étape de broyage : importance de la granulométrie

La granulométrie du broyat est également un facteur à prendre en considération, car elle a une incidence sur la mesure des teneurs en mycotoxines. Dans le cadre d'une étude interlaboratoire, il a été démontré que les teneurs en déoxynivalénol dans les céréales sont inversement proportionnelles à la granulométrie du broyat (Raimbault *et al.*, 2011). Pour les méthodes conventionnelles ainsi que pour les méthodes rapides, le broyage doit être effectué selon les préconisations décrites. Le non-respect de ces préconisations (type de grille, durée du broyage et quantité broyée) peut entraîner une granulométrie inadaptée et avoir un impact sur les résultats. Il est également important d'utiliser un matériel dont l'ensemble des éléments est facilement accessible, car il est nécessaire de s'assurer de leur bon nettoyage afin d'éviter les contaminations croisées entre deux échantillons.

## ► Extraction des mycotoxines

Après broyage de l'échantillon, les mycotoxines sont extraites à l'aide d'un solvant organique ou d'un mélange de solvants polaires ou apolaires adapté aux molécules ciblées et à la technique analytique employée. L'acétate d'éthyle et des solutions aqueuses de méthanol ou d'acétonitrile font partie des plus utilisés. La tendance actuelle pour la préparation des échantillons consiste à minimiser l'utilisation de solvants, tout particulièrement ceux qui sont nocifs pour l'environnement et la santé, tout en maintenant l'efficacité de l'approche analytique. Dans ce sens, les protocoles des méthodes rapides évoluent également vers la fourniture de solutions tamponnées sous forme concentrée à diluer, à la place par exemple d'un mélange méthanol/eau.

Il est important de noter que l'extraction préconisée par les méthodes rapides et normalisées ne permet pas toujours d'extraire la totalité des mycotoxines, ce qui engendre une sous-estimation de la contamination, et ce pour deux raisons. La première résulte de la complexation des mycotoxines à la matrice végétale. Par exemple, l'extraction des fumonisines du maïs par les méthodes de référence ne permet d'avoir accès qu'aux fumonisines libres, alors que 30 à 40 % des fumonisines dans le maïs peuvent être fortement liés à la matrice végétale (fumonisines cachées ou modifiées). Des méthodes indirectes d'extraction permettent alors d'en doser la totalité (Dall'Asta *et al.*, 2009). La seconde raison résulte de la potentielle métabolisation des toxines au sein de la matrice. Les plantes et bactéries possèdent des activités enzymatiques capables de dégrader partiellement les mycotoxines, ou de leur ajouter un groupement glycosyl ou sulfate, comme dans le cas de la zéaralénone et du déoxynivalénol (Pfleger et Schwake-Anduschus, 2023). Avec les méthodes rapides, ces toxines modifiées peuvent donner lieu à la présence de réactions croisées.

En plus des techniques d'extraction conventionnelles, des techniques ont été développées plus récemment, notamment l'extraction par fluide supercritique, l'extraction par solvant accélérée, connue aussi sous le nom d'extraction par liquide pressurisé, et l'extraction assistée par micro-ondes (Juan *et al.*, 2005 ; Du *et al.*, 2018 ; Janik *et al.*, 2021). Elles exigent moins de temps et moins de volume de solvant et présentent le plus souvent une meilleure efficacité d'extraction en termes de rendement du fait des conditions utilisées, notamment pression et température élevées. Ces techniques d'extraction sont dites universelles, car elles permettent l'extraction simultanée de plusieurs familles de mycotoxines et sont le plus souvent couplées à une détection par spectrométrie de masse.

Ces dernières années, des méthodes QUECHERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) couplées exclusivement avec la détection par spectrométrie de masse, alliant rapidité, facilité, faible coût, efficacité, robustesse et sécurité, ont été développées pour l'extraction simultanée de plusieurs classes de toxines (Malachova *et al.*, 2018). Cependant, comme les toxines peuvent appartenir à des classes chimiques différentes, le rendement d'extraction de chacune doit être précisément évalué pour que la méthode puisse être validée.

## ► Méthodes rapides de dosage des mycotoxines

Les méthodes rapides, faciles à mettre en œuvre dans un laps de temps restreint, ont pour but d'établir des prédiagnostics afin de libérer des lots ne contenant pas (ou peu) de mycotoxines ou, au contraire, de permettre un isolement rapide des produits susceptibles de dépasser les limites réglementaires. Pour le dosage des mycotoxines, plus de 200 références sont actuellement commercialisées. Les techniques de type Elisa (*Enzyme-Linked Immuno Assay*) sont les plus représentées.

### Les grandes familles de techniques d'analyse dites « rapides »

#### Les kits immuno-enzymatiques de type Elisa

Le principe des kits Elisa est basé sur une reconnaissance entre antigène (la mycotoxine recherchée ou une famille de mycotoxines) et anticorps. Il s'agit principalement de tests de type compétitif avec une détection directe ou indirecte. Dans les deux cas, une enzyme contenue dans le complexe antigène/anticorps transforme un substrat en un composé coloré spécifique. L'intensité de la couleur est alors lue avec un spectrophotomètre dans le domaine de la lumière visible (450 nm ou 650 nm) et comparée à une courbe d'étalonnage. Une lecture différentielle avec un filtre à 630 nm peut être aussi préconisée.

Selon les mycotoxines et les matériels utilisés, les résultats sont semi-quantitatifs ou quantitatifs et peuvent donner des résultats sur- ou sous-estimés selon le couple mycotoxine/matrice analysé. Les limites des kits doivent aussi être prises en considération par les utilisateurs (présence de réactions croisées, respect du domaine d'application validé) pour une utilisation optimale. Le tableau de synthèse 19.1, en fin de chapitre, propose une vue générale des avantages et contraintes des kits Elisa.

#### Les bandelettes/cartes immunologiques

Le principe de la méthode est là aussi basé sur la capacité d'un anticorps à reconnaître spécifiquement un antigène (la mycotoxine ciblée ou une famille de mycotoxines). Ces anticorps sont greffés sur une membrane. Lors du dépôt de l'extrait de l'échantillon, des mycotoxines conjuguées liées à une enzyme ( $Ag^*$ ) entrent en compétition avec les mycotoxines contenues dans l'échantillon vis-à-vis des anticorps greffés. En absence de mycotoxines dans l'échantillon, les  $Ag^*$  interagissent avec tous les anticorps et déclenchent une coloration intense par réaction de l'enzyme avec un substrat contenu dans la membrane. En présence de mycotoxines dans l'échantillon, celles-ci vont interagir préférentiellement avec les anticorps de surface et réduire la quantité d' $Ag^*$  se fixant sur les anticorps. Ainsi, l'intensité de la couleur sera inversement proportionnelle à la quantité des mycotoxines présentes dans l'échantillon. L'interprétation des résultats, la plupart du temps générés automatiquement par des lecteurs spécifiques, se fait grâce à cette intensité de la réaction colorée.

Limitées à leur début par une lecture visuelle et donnant de ce fait des résultats qualitatifs, ces méthodes ont été nettement améliorées par l'utilisation de lecteurs optiques spécifiques permettant ainsi l'expression du résultat par classe de valeurs

ou au microgramme par kilogramme près. Les résultats peuvent être qualitatifs, semi-quantitatifs ou quantitatifs. Selon le fournisseur, mais aussi le couple mycotoxine/matrice analysé, les teneurs en mycotoxines peuvent être surestimées ou sous-estimées.

Récemment, des tests capables de mesurer plusieurs mycotoxines sur une même bandelette ont été développés pour des analyses « terrain ». Leur rapidité et leur simplicité d'utilisation en font un atout indéniable pour une prise de décision rapide. Néanmoins, il s'agit d'un outil de diagnostic rapide, avec des limites qui doivent être prises en considération par les utilisateurs, comme la présence de réactions croisées ou d'effets matrices. Le domaine d'application validé par le fournisseur doit être également respecté (tableau 19.1).

## Autres techniques

Deux techniques ont donné lieu à la commercialisation d'automates capables d'analyser de façon concomitante plusieurs mycotoxines. La première d'entre elles est l'immunologie compétitive couplée à la chimioluminescence. Il s'agit d'un dispositif de semi-conducteurs avec un ensemble de régions contenant des anticorps immobilisés et spécifiques à différentes mycotoxines (biopuces). Des niveaux accrus de mycotoxines dans un échantillon entraînent une diminution de la liaison du conjugué marqué à la peroxydase de raifort et donc une diminution du signal de chimioluminescence émis. Le signal lumineux généré par chacune des régions de test de la biopuce est ensuite analysé à l'aide d'une technologie d'imagerie numérique.

La seconde de ces techniques est la fluorescence associée à la cytométrie en flux. Elle consiste en un test immunologique compétitif dans lequel les anticorps sont liés à des microbilles fluorescentes analysées en cytométrie en flux. Le réactif de test comprend des mycotoxines marquées avec une molécule fluorescente. Ces « marqueurs » sont attirés par les anticorps, de même que les mycotoxines présentes dans l'échantillon. Un comptage par cytométrie permet ensuite de quantifier les mycotoxines marquées : plus le signal fluorescent est fort, plus la présence de mycotoxines dans l'échantillon est faible.

Au-delà de ces techniques, d'autres méthodologies en développement peuvent être évoquées. La spectrométrie proche infrarouge regroupe ainsi un ensemble de méthodes qui reposent sur l'étude de spectres d'absorption créés lors de l'interaction de rayonnements infrarouges avec les molécules de l'échantillon étudié. Les spectres infrarouges sont constitués de pics d'absorption correspondant aux fréquences de l'onde que les molécules peuvent absorber. Ces « empreintes » sont complexes à interpréter et doivent être corrélées avec des valeurs de référence des molécules étudiées.

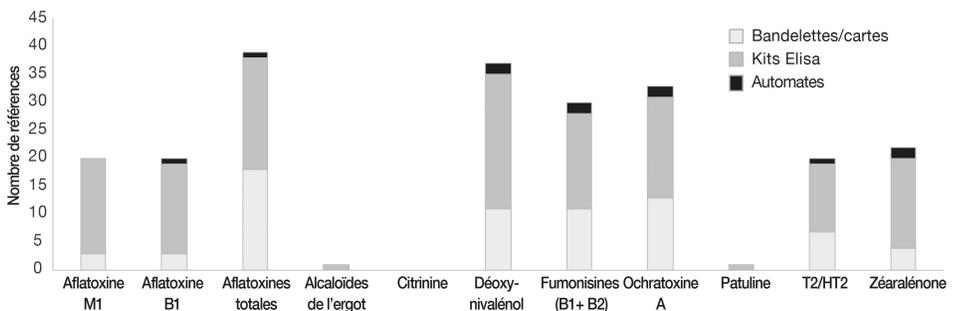
Il existe aussi des alternatives à l'utilisation d'anticorps biologiques, qui ont pour atout commercial de présenter stabilité et reproductibilité, sans soulever de questions éthiques relatives à l'utilisation d'animaux. Ces techniques bioanalytiques sont basées sur la reconnaissance moléculaire. Parmi ces molécules de biorecognition émergentes, on peut citer des anticorps polyclonaux (pAb), monoclonaux (mAb), recombinants (rAb), les aptamères, les peptides courts et les polymères à empreinte moléculaire (MIP). Ces développements ont donné naissance à des

formats spécifiques de microplaques, de tubes, de dispositifs à flux latéral ainsi qu'à des biocapteurs (Wang *et al.*, 2022).

Enfin, d'autres techniques se basent sur des nanomatériaux tels que des nanoparticules de métaux nobles, des particules magnétiques, des points quantiques et des nanomatériaux de carbone et de silice. Ils sont utilisés soit comme supports pour l'immobilisation de biomolécules, soit comme marqueurs électroactifs ou optiques pour la transduction et l'amplification du signal. Plusieurs tests basés sur des nanoparticules, pour les aflatoxines par exemple, ont été développés (Xue *et al.*, 2019).

## Quelles sont les mycotoxines pouvant être analysées par les méthodes rapides ?

Les principales mycotoxines réglementées sont détectables voire quantifiables par des méthodes rapides, mais certaines ne font pas ou peu l'objet de solutions commercialisées à ce jour (citrinine, patuline), comme le montre la figure 19.1. Deux facteurs influencent le développement et la mise sur le marché de tests rapides : le prix du développement comparé au potentiel du marché, mais aussi les contraintes techniques liées aux structures chimiques des analytes.



**Figure 19.1.** Nombre et type de solutions d'analyses rapides commercialisées en Europe en 2023. Source : RMT AI-Chimie, 2023. Les automates représentent deux matériels pouvant analyser de façon simultanée plusieurs mycotoxines.

## Comment choisir sa technique rapide ?

Une première série de questions interconnectées entre elles permet de poser le sujet et d'orienter son choix parmi les techniques disponibles :

- Quelle(s) mycotoxine(s) ?
- Quelle(s) matrice(s) ?
- Quel niveau de concentration ?
- Quels sont les structures, matériels et compétences à disposition ?

Une fois ces contours définis, il est conseillé de demander un accompagnement aux fournisseurs pour la mise en œuvre du produit. Outre l'expertise des fournisseurs, il existe aussi des documents d'accompagnement listant les points critiques de ces

analyses comme la norme XP V03-147 : Produits alimentaires — Détermination des mycotoxines — Guide d'utilisation des kits immunoenzymatiques format microplaques — kits Elisa, 2020.

## Quelles sont les sources répertoriant l'offre existante ?

La Commission européenne diligente ponctuellement le laboratoire européen de référence (EURL) pour effectuer des bilans sur les méthodes rapides à disposition des opérateurs sur une famille précise de mycotoxines<sup>6</sup>. Par ailleurs, un travail de synthèse des références commercialisées en France est réalisé, depuis 2022, dans le cadre du réseau mixte technologique « Contaminations chimiques de la chaîne alimentaire » (RMT-AI chimie)<sup>7</sup>.

## Conclusion sur les méthodes rapides

L'offre s'adapte à des demandes de surveillance de plus en plus diversifiées en matière de couples mycotoxines/matrices. En parallèle se dessinent des axes d'amélioration ayant pour objectifs :

- la simplification et l'homogénéisation des protocoles (harmonisation des protocoles d'extraction, utilisation d'un même extrait pour plusieurs mycotoxines) ;
- l'automatisation de certaines étapes (utilisation d'automates pour les dépôts, les lavages) ;
- la possibilité de détecter voire de quantifier plusieurs mycotoxines en simultané ;
- la protection du manipulateur et de l'environnement (limitation de l'emploi de produits classés cancérogènes, QR code pour télécharger les certificats de lots et les protocoles).

Les résultats pouvant être influencés par de nombreux facteurs intrinsèques à la structure utilisatrice, des essais en interne sont nécessaires pour connaître les limites de ces méthodes, mais aussi pour que les utilisateurs puissent optimiser leur pratique par rapport à leurs besoins. Dans la plupart des cas, selon les mycotoxines et les matrices analysées, les limites de détection ou de quantification sont supérieures aux méthodes conventionnelles.

## » Méthodes conventionnelles de dosage des mycotoxines

Les méthodes conventionnelles sont essentiellement utilisées pour fournir un résultat quantitatif précis et/ou pour confirmer un résultat positif obtenu avec un test rapide. Elles permettent de quantifier des contaminations très faibles en mycotoxines, de l'ordre du nanogramme au microgramme par kilogramme de substrat selon la toxine dosée, la matrice/denrée investiguée et la technique utilisée. Elles sont fondées

6. Par exemple, [https://www.wur.nl/en/show/eurl-mp-report\\_004-inventory-t2-ht2-screening-tests.htm](https://www.wur.nl/en/show/eurl-mp-report_004-inventory-t2-ht2-screening-tests.htm) (consulté le 01/12/2023).

7. <http://www.rmt-al-chimie.org/moodle/course/view.php?id=132> (consulté le 01/12/2023).

essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules, puis de leur détection par spectrophotométrie, fluorimétrie ou spectrométrie de masse. Avant le dosage, une étape de purification de l'extrait est souvent préconisée.

### Purification

Après l'extraction, la purification peut être nécessaire afin de concentrer l'extrait, d'isoler les molécules d'intérêt et ainsi éviter d'éventuelles interférences, permettant d'augmenter la sensibilité de la méthode analytique. Généralement, la purification est réalisée par extraction en phase solide sur des colonnes SPE (*Solid Phase Extraction*) garnies de différents types de phases comme la phase normale (SiOH, Florisil), la phase inverse (silice greffée type C18, C8 ou C4, divinylbenzène), l'échange d'anions ou encore l'adsorbant type charbon/alumine/célite (Afssa, 2009).

Des colonnes d'immunoaffinité (IAC) basées sur des anticorps spécifiques d'une mycotoxine ont été également développées. Il en existe pour la plupart des mycotoxines, comme les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone, les fumonisines et le déoxynivalénol. Elles constituent une alternative plus spécifique de purification à l'aide d'anticorps de mycotoxines fixés sur une matrice neutre, le tout conditionné dans une colonne. La spécificité des anticorps fournit des extraits plus sélectifs comparés aux autres techniques de purification, contribuant ainsi à la précision, l'exactitude et la sensibilité de la méthode de dosage.

Lors de l'utilisation des colonnes de purification, il faut respecter le mode d'emploi préconisé car, dans une colonne, le volume de la phase (anticorps, échange d'anion...) et notamment la densité des sites de fixation des composés à doser déterminent une capacité maximale de fixation des molécules de toxines. Ainsi, dans le cas des échantillons très contaminés, il est nécessaire de diluer l'extrait avant le passage sur la colonne pour ne pas dépasser la capacité maximale de fixation, au risque de sous-estimer la concentration en mycotoxines.

### Détection et dosage

Les techniques de détection et de dosage nécessaires pour répondre au besoin de contrôle des mycotoxines dans les denrées alimentaires, mais aussi aux besoins de recherche, n'ont cessé d'évoluer. Les études centrées sur cette thématique montrent clairement que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée aux détecteurs spectrophotométriques en ultraviolet (UV), à barrette de diodes (*Diode Array Detection*, DAD) ou à fluorescence (FLD) est actuellement la technique de référence la plus couramment employée pour l'analyse des mycotoxines, devant la chromatographie gazeuse.

### Détection par spectrophotométrie

La chromatographie liquide couplée à un détecteur spectrophotométrique est utilisée pour les analyses des mycotoxines comme la patuline, les trichothécènes de type B, la zéaralénone, les enniatines et la beauvéricine, qui, grâce à leurs structures chimiques, absorbent dans l'ultraviolet (UV). Le détecteur UV à longueur d'onde

fixe est le plus souvent remplacé par la barrette de diodes beaucoup plus spécifique, car elle permet l'acquisition des spectres ultraviolets des molécules analysées (tableau 19.1). Cependant, la détection à l'aide d'un DAD des molécules comme les trichothécènes de type B, les enniatines et la beauvéricine qui ne présentent pas de spectre UV d'absorption spécifique est à considérer avec précaution. Même si, parmi les détecteurs pouvant être couplés avec la chromatographie liquide, les détecteurs UV et DAD sont connus comme étant moins sensibles pour certaines mycotoxines, des méthodes d'analyse avec des limites de quantification très basses (de l'ordre du microgramme par kilogramme de substrat) ont été développées. Par exemple, la méthode de dosage de la patuline dans les fraises mise au point par Sadok *et al.* (2018) présente des limites de quantification de  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , celle développée par Llorens *et al.* (2002) pour le dosage de la zéaralénone dans les céréales présente des limites de quantification de  $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

## Détection par fluorimétrie

Pour les mycotoxines possédant des spectres d'excitation et d'émission spécifiques, la détection par fluorescence est la meilleure alternative face au manque de sensibilité et de spécificité de leur détection UV ou DAD (tableau 19.1). Avec le dosage par HPLC-FLD, les limites de détection peuvent atteindre des valeurs de l'ordre du nanogramme par kilogramme, comme pour le dosage de l'ochratoxine A dans les vins rouges ( $0,5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Remiro *et al.*, 2010). De nombreux protocoles analytiques existent pour le dosage par HPLC/FLD de différentes mycotoxines comme l'ochratoxine A, les aflatoxines, la zéaralénone et les fumonisines. Ainsi, les propriétés naturelles de ces mycotoxines à émettre une fluorescence, comme les aflatoxines, la zéaralénone et l'ochratoxine A, sont exploitées. Pour les autres, des réactions chimiques de dérivatisation sont utilisées afin de rendre les molécules ciblées fluorescentes (par exemple dérivatisation avec l'orthophthaldialdéhyde des fumonisines).

## Détection par spectrométrie de masse

Depuis une vingtaine d'années se développe une technique de détection plus coûteuse : la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Outre le fait que cette technique ne nécessite pas l'optimisation d'une séparation chromatographique fine, elle permet d'obtenir simultanément une haute spécificité et une limite de détection très basse, de l'ordre du nanogramme par kilogramme de substrat (tableau 19.1). Cependant, cette limite est dépendante des molécules. Des variantes basées sur la fragmentation des ions (MS/MS) ou sur leur mesure avec une très grande précision (HRMS) améliorent cette spécificité. L'ionisation des toxines est généralement réalisée par *electrospray* (ESI), même si certaines répondent mieux par ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). La LC-MS permet d'analyser plusieurs classes de toxines lors d'une même acquisition (De Santis *et al.*, 2017). Elle permet également d'accéder aux toxines modifiées, par exemple, par une glycosylation ou une sulfatation. Bien que nécessitant un investissement plus conséquent, les méthodes conventionnelles produisent des résultats plus précis lorsque le processus de validation a été respecté. Elles restent incontournables pour l'obtention de valeurs réglementaires.

La quantification est souvent réalisée par étalonnage externe. Pour gagner en précision, elle peut se faire en utilisant un étalon interne, homologue de la mycotoxine marquée avec des isotopes stables. Néanmoins, la quantification par LC-MS des mycotoxines peut être affectée par la présence d'interférents dans la matrice (« effet matrice ») qui altèrent la justesse de la méthode. La validation de méthode devient alors strictement dépendante de la matrice étudiée.

**Tableau 19.1.** Avantages et contraintes des principales méthodes analytiques de dosages des mycotoxines décrites dans ce chapitre.

Méthodes analytiques	Avantages	Contraintes
Les bandelettes/cartes immunologiques	Rapide Facile à utiliser Faible coût Utilisation pour criblage Utilisable si peu d'échantillons Équipement mobile	Respect du domaine d'application Lecteur spécifique fournisseur Présence de réactions croisées Confirmation nécessaire des valeurs proches des limites réglementaires
Les kits immuno-enzymatiques de type Elisa ( <i>Enzyme-Linked Immuno Assay</i> )	Rapide Facile à utiliser Faible coût Utilisation pour criblage Sensible	Respect du domaine d'application Présence de réactions croisées Confirmation nécessaire des valeurs proches des limites réglementaires
Chromatographie liquide couplée au détecteur UV (HPLC-UV)	Sensible Ne nécessite pas de dérivation Méthodes officielles disponibles	Coûteux Nécessite une étape de purification Peu spécifique
Chromatographie liquide couplée au détecteur barrette de diodes (HPLC-DAD)	Sensible Spécifique pour certaines mycotoxines (ex. : zéaralénone) Ne nécessite pas de dérivation Méthodes officielles disponibles	Coûteux Nécessite une étape de purification Peu spécifique pour certaines mycotoxines (ex. : enniatines, trichothécènes B)
Chromatographie liquide couplée au détecteur fluorimètre (HPLC-FLD)	Grande sensibilité Grande spécificité Méthodes officielles disponibles	Coûteux Nécessite une étape de purification Souvent nécessite une étape de dérivation
Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)	Analyse multitoxine Très grande sensibilité Très grande spécificité Méthodes officielles disponibles	Très coûteux Nécessite opérateur qualifié Effet matrice

## ►► Conclusion

Depuis une quinzaine d'années, les approches analytiques mises en œuvre pour l'analyse des mycotoxines ont évolué. L'importance de l'échantillonnage et la rigueur apportée à la préparation de l'échantillon sont des préalables maintenant bien connus pour s'assurer de la fiabilité des résultats. Le développement de nouvelles méthodes analytiques associées à des techniques novatrices a permis d'optimiser la détection, l'identification et le dosage de ces composés.

Les méthodes rapides sont en constante évolution, prenant en compte les besoins des utilisateurs en termes de spécificité de matrices, mais aussi de facilité d'emploi. Une course à la demande de méthodes toujours plus rapides et fiables est engagée pour répondre à la dynamique de la réglementation. Le paysage analytique de ces méthodes rapides continue à évoluer vers l'utilisation de méthodologies autres qu'immunologiques.

Les méthodes conventionnelles très sensibles présentent des limites de quantification de plus en plus basses, permettant de répondre au besoin de contrôles liés à l'application de la réglementation en vigueur, mais aussi aux besoins de la recherche. Leur spécificité est appréciable du fait de la diversité des structures chimiques analysées dans des matrices particulièrement complexes.

Les évolutions analytiques vont vers des quantifications simultanées de mycotoxines. Cette évolution est absolument nécessaire compte tenu des résultats récents démontrant les interactions synergiques, antagonistes ou additives entre les effets toxiques des mycotoxines. Les protocoles demandent néanmoins à être améliorés afin d'augmenter leur spécificité et limites de quantification, et d'élargir les champs d'application à de nouvelles matrices comme les produits végétaux fermentés, des céréales dites mineures (épeautre, millet) et/ou dont les surfaces de culture tendent à augmenter (sorgho). Outre les mycotoxines réglementées, ces avancés méthodologiques doivent également prendre en compte les mycotoxines non réglementées, ainsi que les dérivés des mycotoxines comme les formes masquées. C'est une étape indispensable pour répondre aux enjeux actuels d'une alimentation saine et durable.

## ►► Références

- Afssa, 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>.
- Dall'Asta C., Mangia M., Berthiller F. *et al.*, 2009. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1335, <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2933-3>.
- De Santis B., Debegnach F., Gregori E. *et al.*, 2017. Development of a LC-MS/MS method for the multi-mycotoxin determination in composite cereal-based samples. *Toxins*, 9, 169, <https://doi.org/10.3390/toxins9050169>.
- Du L.J., Chu C., Warner E. *et al.*, 2018. Rapid microwave-assisted dispersive micro-solid phase extraction of mycotoxins in food using zirconia nanoparticles. *Journal of Chromatography Part A*, 1561, 1, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.031>.
- Janik E., Niemcewicz M., Podogrocki M. *et al.*, 2021. The existing methods and novel approaches in mycotoxins' detection. *Molecules*, 26, 3981, <https://doi.org/10.3390/molecules26133981>.

- Juan C., González L., Soriano J.M. *et al.*, 2005. Accelerated solvent extraction of ochratoxin A from rice samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9348, <https://doi.org/10.1021/jf051560q>.
- Llorens A., Mateo R., Mateo J.J. *et al.*, 2002. Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 19, 272, <https://doi.org/10.1080/02652030110081173>.
- Malachova A., Stranska M., Vaclavikova M. *et al.*, 2018. Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 801, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0750-7>.
- Pfleger F., Schwake-Anduschus C., 2023. Relevance of zearalenone and its modified forms in bakery products. *Mycotoxin Research*, 39, 153, <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00493-3>.
- Raimbault J.M., Darrozes S., Véron-Delor G., 2011. Incidence de la granulométrie du broyat sur la teneur en déoxynivalénol. *Industries des céréales*, 173, 30.
- Règlement (UE) n° 2782/2023 : Règlement d'exécution (UE) 2023/2782 de la commission du 14 décembre 2023 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) n° 401/2006, [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=OJ%3AL\\_202302782](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=OJ%3AL_202302782).
- Remiro R., Ibáñez-Vea M., González-Peñas E. *et al.*, 2010. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. *Journal of Chromatography Part A*, 1217, 8249, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.004>.
- Sadok I., Szmagara A., Staniszewska M.M., 2018. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberry. *Food Chemistry*, 245, 364, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.093>.
- Shephard G.S., 2016. Current status of mycotoxin analysis: a critical review. *Journal of AOAC International*, 99, 842, <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0111>.
- Tittlemier S.A., Brunkhorst J., Cramer B. *et al.*, 2021. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2019-2020. *World Mycotoxin Journal*, 14, 3, <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2664>.
- Wang Y., Zhang C., Wang J. *et al.*, 2022. Knopp D. Recent progress in rapid determination of mycotoxins based on emerging biorecognition molecules: A Review. *Toxins*, 14, 73, <https://doi.org/10.3390/toxins14020073>.
- Whitaker T.B., 2006. Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 23, 50, <https://doi.org/10.1080/02652030500241587>.
- Xue Z., Zhang Y., Yu W. *et al.*, 2019. Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotechnology and nanomaterials — A review. *Analytica Chimica Acta*, 1069, 1, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.032>.

# Évaluation des risques sanitaires liés aux mycotoxines et réglementation

Isabelle Oswald, Béatrice Orlando et Nathalie Arnich

## ►► Introduction

L'évaluation des risques sanitaires en alimentation humaine et animale s'inscrit dans le processus de l'analyse des risques tel que défini par l'OMS (Organisation mondiale de la santé, 2009), lequel comprend trois composantes :

- l'évaluation des risques, qui détermine la probabilité pour qu'un effet indésirable survienne dans une population après exposition au danger ;
- la gestion des risques, qui comprend la planification, la mise en œuvre et l'évaluation de toutes les actions prises pour protéger les consommateurs, les animaux et l'environnement ;
- la communication des risques, qui permet des échanges interactifs entre toutes les parties intéressées.

Au cours d'une évaluation des risques liés aux mycotoxines, il est nécessaire d'identifier le danger, puis de le caractériser en déterminant la relation entre la dose et les effets observés, ensuite d'en estimer le niveau d'exposition, et enfin de caractériser les risques en comparant la dose d'exposition et la dose considérée comme repère toxicologique pour l'humain ou l'animal.

## ►► La caractérisation du danger

Pour caractériser le danger, les agences sanitaires élaborent des valeurs toxicologiques de référence (VTR) ou à défaut identifient des repères toxicologiques qui pourront être comparés à l'estimation de l'exposition alimentaire en vue de la caractérisation du risque. Les tableaux 20.1 et 20.2 répertorient les VTR ou autres

repères toxicologiques retenus par l'Efsa (European Food Safety Authority) et par le Jecfa (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), pour la toxicité aiguë et la toxicité chronique des mycotoxines chez l'humain. Des repères toxicologiques existent également pour les différentes espèces animales (Terciolo *et al.*, sous presse). Le tableau 20.1 regroupe les VTR ou autres repères toxicologiques pour les toxines qui présentent un seuil d'effet toxique. Le tableau 20.2 concerne les mycotoxines cancérigènes et génotoxiques, et qui ne présentent donc pas de seuil d'effet toxique. À noter que, pour certaines toxines, comme l'OTA, des valeurs toxicologiques de référence ont été déterminées pour leurs effets à seuil et pour leurs effets sans seuil.

**Tableau 20.1.** Valeurs toxicologiques de référence ou autres repères toxicologiques pour les mycotoxines caractérisées par un seuil d'effet toxique.

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Alcaloïdes de l'ergot (AE)	ARfD et DJT groupée pour les 12 AE d'intérêt avec un facteur d'équivalence toxique de 1 ARfD = 1 µg/kg p.c. DJT = 0,6 µg/kg p.c./j <i>Efsa, 2012a</i>	ARfD et DJT groupée pour les 12 AE d'intérêt avec un facteur d'équivalence toxique de 1 ARfD = DJT = 0,4 µg/kg p.c. <i>Jecfa, 2022</i>
Citrinine	Pas d'ARfD Pas de VTR, mais un niveau non préoccupant de 0,2 µg/kg p.c./j (la néphrotoxicité). Cependant, à ce niveau d'exposition, un risque de génotoxicité et de cancérogénicité ne peut être exclu. <i>Efsa, 2012b</i>	Pas d'évaluation
Déoxynivalénol (DON)	ARfD et DJT groupée (DON, 3ADON, 15ADON, DON-3-glucoside) avec un facteur d'équivalence toxique de 1 ARfD = 8 µg/kg DJT = 1 µg/kg p.c./j <i>Efsa, 2017a</i>	ARfD et DJT groupée (DON, 3ADON, 15ADON) avec un facteur d'équivalence toxique de 1 ARfD = 8 µg/kg p.c. DJT = 1 µg/kg p.c./j <i>Jecfa, 2011</i>
Fumosinines de type B (FB)	DJT groupée (FB1, FB2, FB3, FB4) avec un facteur d'équivalence toxique de 1 Pas d'ARfD (pas de toxicité aiguë) DJT = 1 µg/kg p.c./j pour la somme de FB1, FB2, FB3, FB4 <i>Efsa, 2018</i>	DJT groupée (FB1, FB2, FB3, FB4) avec un facteur d'équivalence toxique de 1 Pas d'ARfD (pas de toxicité aiguë). DJMTP = 2 µg/kg p.c./j <i>Jecfa, 2017</i>

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Nivalénol (NIV)	ARfD et DJT groupée (NIV et NIV-3-glucoside) avec un facteur d'équivalence toxique de 1 ARfD = 14 µg/kg p.c. DJT = 1,2 µg/kg p.c./j <i>Efsa, 2017b</i>	Pas d'évaluation
Ochratoxine A (OTA)	Pas d'ARfD BMDL <sub>10</sub> = 4,73 µg/kg p.c./j (pour les effets non cancérigènes — Voir tableau 20.2 pour les effets cancérigènes génotoxiques) <i>Efsa, 2020a</i>	Pas d'ARfD DHTP = 0,100 µg/kg p.c./ semaine <i>Jecfa, 2007</i>
Patuline	Pas d'évaluation	DJMTP = 0,4 µg/kg p.c./j <i>Jecfa, 1995</i>
Toxines T-2, toxine HT-2 et diacétoxysirpénol (DAS)	ARfD et DJT groupée (T-2, HT-2 et formes modifiées) avec un facteur d'équivalence toxique de 1 ARfD = 0,3 µg/kg p.c. DJT = 0,02 µg/kg p.c./j <i>Efsa, 2017c</i>	ARfD et DJT groupée (DAS, T-2 et HT-2) avec un facteur d'équivalence de 0,2 pour le DAS ARfD = 0,320 µg/kg p.c. DJT = 0,025 µg/kg p.c./j <i>Jecfa, 2023</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i>	Téntoxine, non génotoxique TTC = 1,5 µg/kg p.c./j Acide ténuazonique, non génotoxique TTC = 1,5 µg/kg p.c./j (Voir tableau 20.2 pour l' <i>alternariol</i> et l' <i>alternariol monométhyl éther, génotoxiques</i> ) <i>Efsa, 2011a</i>	Pas d'évaluation
Zéaralénone (ZEN)	DJT groupée (ZEN et formes modifiées) avec un facteur d'équivalence de 0,2 à 60 Pas d'ARfD (pas de toxicité aiguë) DJT = 0,25 µg/kg p.c./j <i>Efsa, 2016</i>	Pas d'ARfD (pas de toxicité aiguë) DJMTP = 0,5 µg/kg p.c./j <i>Jecfa, 1999</i>

ARfD (*acute reference dose*) : dose de référence aiguë ; BMD (*benchmark dose*) : dose correspondant à un niveau spécifié de réponse, obtenue par modélisation de la relation dose-réponse, à partir de données expérimentales ou épidémiologiques ; BMDL : borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de cette dose ; DHTP : dose hebdomadaire tolérable provisoire ; DJMTP : dose journalière maximale tolérable provisoire ; DJT : dose journalière tolérable ; TTC (*threshold of toxicological concern*) : seuil de préoccupation toxicologique.

**Tableau 20.2.** Repères toxicologiques pour les mycotoxines cancérigènes et génotoxiques caractérisées par un effet toxique sans seuil.

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Aflatoxines	BMDL10 groupée (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1) avec un facteur d'équivalence toxique de 0,1 pour l'AFM1  BMDL10 = 0,4 µg d'AFB1/kg p.c./j (carcinome hépatocellulaire chez les rats) <i>Efsa, 2020b</i>	L'ingestion d'un nanogramme d'AFB1/kg p.c./j durant la vie entière serait associée à la survenue de 0,269 cas de cancer pour 100 000 personnes chez les porteurs du virus de l'hépatite B (HBsAg+) et à 0,017 cas de cancer pour 100 000 personnes chez les non-porteurs (HBsAg-). <i>Jecfa, 2017</i>
Ochratoxine A (OTA)	BMDL10 = 14,5 µg/kg p.c./j (tumeurs rénales chez le rat) <i>(Voir tableau 20.1 pour les effets non néoplasiques)</i> <i>Efsa, 2020a</i>	Le Jecfa a retenu une approche à seuil <i>(Voir tableau 20.1)</i> <i>Jecfa, 2007</i>
Stérigmatocystine	BMDL10 = 0,16 mg/kg p.c./j (hémangiosarcome hépatique chez les rats) <i>Efsa, 2013a</i>	BMDL10 = 0,16 mg/kg p.c./j (hémangiosarcome hépatique chez les rats) <i>Jecfa, 2017</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i>	Alternariol (AOH) génotoxique, TTC = 0,0025 µg/kg p.c./j.  Alternariol monométhyl éther (AME), génotoxique, TTC = 0,0025 µg/kg p.c./j. <i>(Voir tableau 20.1 pour la tentoxine [TEN] et l'acide ténuazonique [TeA], non génotoxiques)</i> <i>Efsa, 2011a</i>	Pas d'évaluation

Pour la signification des sigles, voir le tableau 20.1.

## ► L'estimation de l'exposition alimentaire

L'estimation de l'exposition alimentaire aux mycotoxines repose sur l'utilisation de données de consommation représentatives de la population humaine et animale, et de données de contamination des aliments et des matières premières.

Au niveau européen, l'Efsa collecte les données de contamination des aliments et des matières premières dans les différents pays et met à disposition des données de consommation humaine (The Efsa Comprehensive European Food Consumption Database<sup>8</sup>). En France, les données de consommation humaine les plus récentes

8. <https://www.efsa.europa.eu/en/data-report/food-consumption-data#the-efsa-comprehensive-european-food-consumption-database> (consulté le 06/09/2024).

proviennent de l'enquête Inca<sup>9</sup>, la troisième étude individuelle nationale des consommations alimentaires publiée par l'Anses en 2017. Les données de contamination peuvent provenir d'analyses de denrées brutes ou préparées telles que consommées (dans le cadre des Études de l'alimentation totale menées par l'Anses, par exemple<sup>10</sup>).

Deux niveaux de consommation peuvent être pris en compte : la moyenne des consommations de chaque denrée et la consommation des forts consommateurs (95<sup>e</sup> percentile). Il est également important de tenir compte de la consommation de groupes d'individus particuliers comme les enfants ou comme les personnes végétariennes/véganes.

## ► La caractérisation du risque

La caractérisation du risque consiste à comparer l'exposition des différents groupes de consommateurs à la valeur de référence (VTR ou repère toxicologique). Si l'exposition est inférieure à celle-ci, on considère que le risque pour le consommateur peut être écarté. À l'inverse, si l'exposition est supérieure, le risque pour le consommateur ne peut pas être exclu. Il revient alors au gestionnaire du risque d'envisager les mesures nécessaires pour diminuer la contamination alimentaire afin de diminuer l'exposition. Dans le cas des mycotoxines ayant un effet cancérigène génotoxique (mycotoxines « sans seuil »), une approche différente est utilisée. L'exposition est comparée à la BMDL (borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de cette dose), en retenant une marge d'exposition critique de 10 000. On ne parle pas dans ce cas de caractérisation du risque, mais de préoccupation sanitaire.

Pour caractériser les risques liés à une exposition aiguë (sur une journée ou un repas), l'exposition sera celle des forts consommateurs (généralement percentile 95 de la population). Pour caractériser les risques liés à une exposition chronique (c'est-à-dire sur le long terme), il convient de prendre en compte l'exposition moyenne et l'exposition des forts consommateurs (percentile 95), en séparant les adultes et les enfants.

Les tableaux 20.3 et 20.4 résument, pour l'humain, l'exposition et la caractérisation du risque de différentes mycotoxines.

9. <https://www.anses.fr/fr/content/inca-3-evolution-des-habitudes-et-modes-de-consommation-de-nouveaux-enjeux-en-matiere-de> (consulté le 06/09/2024).

10. <https://www.anses.fr/fr/content/etude-de-l'alimentation-totale-eat-2-l'anses-met-a-disposition-les-donnees-de-son-analyse> (consulté le 06/09/2024).

**Tableau 20.3.** Détermination de l'exposition et caractérisation du risque chez l'humain des mycotoxines ayant un seuil d'effet toxique.

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Alcaloïdes de l'ergot (AE)	<p><b>Exposition aiguë</b> des forts consommateurs comprise entre 0,06 et 0,73 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque pour le consommateur pouvant être écarté</p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0,014 et 0,19 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><i>Efsa, 2012a</i></p>	<p><b>Exposition aiguë</b> des enfants et des adultes forts consommateurs pouvant atteindre respectivement 0,98 et 0,49 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque pour le consommateur ne pouvant pas être exclu</p> <p><b>Exposition chronique</b> des enfants forts consommateurs pouvant atteindre 0,86 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque ne pouvant pas être exclu</p> <p><i>Jecfa, 2022</i></p>
Citrinine	Trop peu de données pour caractériser l'exposition	Pas d'évaluation
Déoxynivalénol (DON)	<p>Exposition groupée DON + 3DON + 15DON + DON-3-glucoside</p> <p><b>Exposition aiguë</b> des forts consommateurs comprise entre 0,7 et 6,7 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0,5 et 3,7 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque ne pouvant pas être exclu (en particulier pour les plus jeunes, ainsi que pour les adultes et les adolescents forts consommateurs)</p> <p><i>Efsa, 2017a</i></p>	<p>Exposition groupée DON + 3DON + 15DON</p> <p>(Seule l'exposition au DON a été mesurée, les formes acétylées représentant moins de 10 %.)</p> <p><b>Exposition aiguë</b> des forts consommateurs de 9 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>(basée sur une consommation de pain contaminé à la limite réglementaire)</p> <p>Risque ne pouvant pas être exclu</p> <p><b>Exposition chronique</b> moyenne comprise entre 0,2 et 14,5 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math>, selon les parties du monde (0,25 pour le <i>cluster</i> incluant la France). Les expositions nationales montrent cependant une exposition des enfants forts consommateurs supérieure à 1 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math></p> <p>Risque ne pouvant pas être exclu</p> <p><i>Jecfa, 2011</i></p>
Fumosinines de type B (FB)	Pas d'évaluation de l'exposition	<p>Exposition groupée (FB1 + FB2 + FB3)</p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 1,6 et 4,3 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math> pour les adultes, et 2,3 et 6,4 <math>\mu\text{g}/\text{kg p.c./j.}</math> pour les enfants</p> <p>Risque ne pouvant pas être exclu</p> <p><i>Jecfa, 2018</i></p>

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Nivalénol (NIV)	<p><b>Exposition aiguë</b>, pas d'évaluation</p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 1,1 et 224 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><i>Efsa, 2013b</i></p>	Pas d'évaluation
Ochratoxine A (OTA)	<p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 2,4 et 51,7 ng/kg p.c./j.</p> <p>Chez la plupart des consommateurs, les marges d'exposition sont supérieures à 200, indiquant qu'un risque peut être écarté, sauf dans le cas des forts consommateurs jeunes, pour lesquels le risque ne peut pas être exclu.</p> <p><i>Efsa, 2020a</i></p>	<p><b>Exposition chronique</b> moyenne comprise entre 8 et 17 ng/kg p.c./semaine</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><i>Jecfa, 2007</i></p>
Patuline	Pas d'évaluation	Pas d'évaluation
T-2/HT-2 et DAS	<p><b>Exposition aiguë</b> des forts consommateurs comprise entre 34 et 170 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 4,22 et 146 ng/kg p.c./j. (supérieure à la DJT)</p> <p>Risque ne pouvant être exclu</p> <p><i>Efsa, 2017d</i></p>	<p>Exposition groupée DAS, T2 et HT2</p> <p><b>Exposition aiguë.</b> Pas de données pour le DAS. Exposition maximale des forts consommateurs à T-2 et HT-2 estimée à 170 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté pour la somme des trois toxines</p> <p><b>Exposition chronique.</b> Données d'exposition seulement pour T-2 et HT-2, faute de données disponibles pour le DAS. Exposition des forts consommateurs comprise entre 1,9 et 210 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque sanitaire ne pouvant être exclu</p> <p><i>Jecfa, 2023</i></p>
Toxines d' <i>Alternaria</i>	<p><b>Tentoxine</b></p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0,01 et 13 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><b>Acide ténuazonique</b></p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs entre 89 et 362 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p><i>Efsa, 2011a</i></p>	Pas d'évaluation

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Zéaralénone (ZEN)	<p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 4,7 et 54 ng/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p>Cette conclusion ne prend pas en compte l'exposition aux formes modifiées, ce qui conduit à une sous-estimation du risque.</p> <p><i>Efsa, 2011b</i></p>	<p><b>Exposition chronique</b> moyenne entre 0,03 et 0,06 µg/kg p.c./j.</p> <p>Risque pouvant être écarté</p> <p>Cette conclusion ne prend pas en compte l'exposition aux formes modifiées, ce qui conduit à une sous-estimation du risque.</p> <p><i>Jecfa, 1999</i></p>

**Tableau 20.4.** Détermination de l'exposition et préoccupation sanitaire des mycotoxines caractérisées par un effet toxique sans seuil.

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Aflatoxines	<p><b>Aflatoxine B1</b></p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0,35 et 14,1 ng/kg p.c./j.</p> <p>Marges d'exposition, dans la plupart des cas, inférieures à 10 000 et correspondant à une situation de préoccupation sanitaire</p> <p><b>Aflatoxine M1</b></p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0,12 et 7,88 ng/kg p.c./j.</p> <p>Marges d'exposition, dans la plupart des cas, inférieures à 10 000</p> <p>Une préoccupation sanitaire ne peut pas être exclue, en particulier pour les plus jeunes.</p> <p><i>Efsa, 2020b</i></p>	<p><b>Aflatoxine B1</b></p> <p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0,4 et 26,9 ng/kg p.c./j., selon les régions du monde (1,4 et 1,7 pour le <i>cluster</i> où se trouve la France)</p> <p>L'estimation des risques de cancer varie selon les parties du monde entre &lt; 0,01 et 3,94 cancers induits par l'aflatoxine par an pour 100 000 habitants (&lt; 0,01-0,10 pour le <i>cluster</i> où se trouve la France).</p> <p><b>Aflatoxine M1</b></p> <p>Compte tenu de sa moindre cancérogénicité et de l'exposition alimentaire, l'AFM1 contribue de manière négligeable (&lt; 1 %) au risque de cancer induit par les aflatoxines pour la population générale.</p> <p><i>Jecfa, 2017</i></p>
Ochratoxine A (OTA)	<p><b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 2,4 et 51,7 ng/kg p.c./j.</p> <p>Marges d'exposition, dans la plupart des cas, inférieures à 10 000 et correspondant à une situation de préoccupation sanitaire.</p> <p><i>Efsa, 2020a</i></p>	<p><i>Le Jecfa a retenu une approche à seuil (voir tableau 20.1)</i></p> <p><i>Jecfa, 2007</i></p>

Mycotoxines	Efsa	Jecfa
Stérigmatocystine	Pas de données d'exposition <i>Efsa, 2013a</i>	<b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 0 et 44 ng/kg p.c./j., avec une situation de préoccupation sanitaire pour les régions africaines. Cependant, en Europe, la présence de stérigmatocystine n'a été détectée dans aucun échantillon. Il n'a donc pas été possible d'estimer l'exposition de la population. <i>Jecfa, 2017</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i>	<b>Alternariol</b> <b>Exposition chronique</b> des forts consommateurs comprise entre 5,9 et 82 ng/kg p.c./j. Nécessité de données de toxicité supplémentaires pour évaluer le risque potentiel pour la santé <b>Alternariol monométhyl éther</b> <b>Exposition chronique</b> chez l'adulte des forts consommateurs comprise entre 3,1 et 15 ng/kg p.c./j. Nécessité de données de toxicité supplémentaires pour évaluer le risque potentiel pour la santé <i>Efsa, 2011a</i>	Pas d'évaluation

## ► La réglementation

La législation de l'Union européenne vise à protéger les consommateurs en établissant des teneurs maximales pour les mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale. L'objectif est de maintenir des teneurs de mycotoxines à des niveaux aussi faibles qu'il est raisonnablement possible de le faire, en observant les meilleures pratiques d'agriculture, de stockage et de transformation des aliments : c'est le principe Alara (*As Low As Reasonably Achievable*). Les études d'évaluation du risque s'appuient sur la réglementation européenne ; elles contribuent à l'élaboration des politiques destinées à protéger les consommateurs européens des risques liés à l'alimentation. Cette réglementation<sup>11</sup> évolue de manière permanente pour tenir compte de l'évolution des connaissances et notamment des résultats des évaluations des risques ou des études d'exposition, mais également des connaissances scientifiques et technologiques de ces contaminations dans les aliments (tableau 20.5). Le règlement (UE) 2023/915 (abrogeant le règlement 1881/2006) fixe des teneurs maximales pour certaines mycotoxines dans

11. [https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/contaminants/legislation\\_en](https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/contaminants/legislation_en) (consulté le 26/08/2024).

des denrées alimentaires pour l'humain. La directive 2002/32/CE fixe les teneurs maximales pour certaines mycotoxines dans les matières destinées à l'alimentation animale. Des règlements définissent, en complément, des procédures d'échantillonnage à mettre en œuvre lors des contrôles et les critères de performance des méthodes d'analyse (voir chapitre 19).

La réglementation ne prend pas en compte toutes les mycotoxines connues à ce jour. Celles non visées par la réglementation sont considérées comme des mycotoxines émergentes.

**Tableau 20.5.** Teneurs maximales en mycotoxines règlementées (en gras) ou recommandées (en italique) pour l'alimentation humaine et animale en Europe, juillet 2024.

Mycotoxines	Nutrition humaine <sup>(a)</sup>		Nutrition animale <sup>(b)</sup>	
	Matières premières*	Produits transformés, aliments	Matières premières*	Produits transformés, aliments
Aflatoxine B1	<b>2-12 µg/kg</b>	<b>0,10-8 µg/kg</b>	<b>20 µg/kg</b>	<b>5-20 µg/kg</b>
Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	<b>4-15 µg/kg</b>	<b>4-10 µg/kg</b>	–	–
Aflatoxine M1	–	<b>0,025-0,050 µg/kg</b>	–	–
Ochratoxine A	<b>2-20 µg/kg</b>	<b>0,5-80 µg/kg</b>	<i>250 µg/kg</i>	<i>10-100 µg/kg</i>
Déoxynivalénol	<b>750 - 1 500 µg/kg</b>	<b>200 - 1 000 µg/kg</b>	<i>8 000 - 12 000 µg/kg</i>	<i>900 - 5 000 µg/kg</i>
Zéaralénone	<b>75-350 µg/kg</b>	<b>20-400 µg/kg</b>	<i>2 000 - 3 000 µg/kg</i>	<i>100-500 µg/kg</i>
Fumonisinés B1 + B2	<b>1 000 - 4 000 µg/kg</b>	<b>200 - 2 000 µg/kg</b>	<i>60 000 µg/kg</i>	<i>5 000 - 50 000 µg/kg</i>
Citrinine	–	<b>100 µg/kg</b>	–	–
Ergot	<b>0,2-0,5 g/kg</b>	–	<b>1 g/kg</b>	–
Somme des 12 AE d'intérêt	–	<b>20-500 µg/kg</b>	–	–
Toxines T2 + HT2	<b>50 - 1 250 µg/kg</b>	<b>10-100 µg/kg</b>	<i>500 - 2 000 µg/kg</i>	<i>50 - 250 µg/kg</i>
Alternariol	<i>30 µg/kg</i>	<i>2-10 µg/kg</i>	–	–
Alternariol monométhyl éther	<i>30 µg/kg</i>	<i>2-10 µg/kg</i>	–	–
Acide ténuazonique	<i>100 - 1 000 µg/kg</i>	<i>500 - 10 000 µg/kg</i>	–	–

(a) : teneurs exprimées sur le produit mis sur le marché, indépendamment de sa teneur en eau ; (b) : pour une teneur en eau de 12 % ; \* : y compris les denrées non transformées destinées à une consommation humaine directe ; – : toxine ne faisant l'objet d'aucune réglementation.

## » La surveillance

En Europe, l'Efsa fournit un appui scientifique et technique à la Commission européenne et aux pays de l'UE dans tous les domaines ayant un impact sur la sécurité sanitaire des aliments, dont les mycotoxines. Elle est également chargée de coordonner les évaluations des risques (voir ci-dessus), d'identifier les risques émergents et de dispenser des conseils en matière de gestion des crises.

Lorsqu'un risque est mis en évidence, les pays de l'UE et la Commission peuvent adopter des mesures provisoires de précaution, tout en respectant un haut degré de protection de la santé.

Le système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*<sup>12</sup>, auquel participent les pays de l'UE, la Commission et l'Efsa, prévoit le partage d'informations sur :

- les mesures visant à restreindre la circulation de denrées alimentaires ou à imposer leur retrait du marché ;
- les mesures visant à empêcher, limiter ou soumettre à des conditions particulières la mise sur le marché ou l'utilisation éventuelle de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux ;
- le rejet d'un lot de denrées alimentaires importées.

Ces informations sont également mises à la disposition du grand public. À titre d'exemple, sur l'année civile 2022, 494 notifications ont concerné les mycotoxines sur les 4 336 notifications du portail.

Lorsqu'une denrée alimentaire ou un aliment pour animaux présente un risque sérieux et non maîtrisable pour la santé ou l'environnement, les mesures de protection d'urgence de la Commission peuvent consister, notamment, à suspendre le commerce ou les importations du produit concerné. Les pays de l'UE peuvent prendre des mesures similaires si la Commission ne prend pas les mesures qui s'imposent.

Aucune denrée alimentaire ne peut être mise sur le marché si elle est dangereuse pour la santé ou impropre à la consommation. De ce fait, le règlement (CE) n° 315/93 modifié définit les contaminants, interdit la mise sur le marché de denrées alimentaires contenant une quantité inacceptable, du point de vue de la santé publique et en particulier sur le plan toxicologique, d'un contaminant et prévoit que les teneurs en contaminants doivent être maintenues aux niveaux les plus faibles que permettent raisonnablement de bonnes pratiques, au cours de toutes les étapes de la chaîne alimentaire (principe Alara).

En France, chaque année, dans le cadre du dispositif de surveillance sanitaire de la chaîne alimentaire, la direction générale de l'alimentation (DGAL) pilote et coordonne la mise en œuvre de plans de surveillance et de contrôle (PSPC). Sur la base de prélèvements aléatoires représentatifs de la production ou de la consommation, les plans de surveillance (PS) permettent d'évaluer le niveau de contamination en France. Ces données peuvent être utilisées pour estimer l'exposition

12. [https://food.ec.europa.eu/safety/rasff\\_en](https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en) (consulté le 30/06/2024).

du consommateur<sup>13</sup> et ainsi identifier si les mesures de gestion pour la maîtriser sont suffisantes ou doivent être renforcées. À titre d'exemple, dans le dispositif de surveillance des aliments pour animaux sur la campagne 2021, 246 analyses ont porté sur les mycotoxines, ce qui correspond à 16 % des analyses du plan. Les plans de contrôle (PC), quant à eux, portent sur des denrées ciblées qui représentent un risque élevé de contamination et vont permettre notamment d'évaluer l'efficacité des mesures de gestion précédemment mises en œuvre. Des plans exploratoires (PE) peuvent être programmés afin d'acquérir des connaissances sur un couple contaminant/matrice non réglementé. En cas de résultat d'analyse induisant un risque pour le consommateur, les professionnels ont l'obligation de déclarer leurs rappels de produits sur le site officiel Rappel conso<sup>14</sup>. Ce site public informe les consommateurs sur les rappels de produits, de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux. En 2022, 10 rappels ont été publiés concernant l'ochratoxine A, les aflatoxines et la patuline.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) apporte son expertise scientifique à toutes les étapes de la chaîne alimentaire, depuis la production des aliments d'origine animale ou végétale jusqu'à l'assiette du consommateur. Elle évalue, en France, les risques liés à la contamination des aliments par des agents pathogènes et des substances toxiques.

Les études de l'alimentation totale pilotées par l'Anses complètent les plans de surveillance des ministères pour de nombreux contaminants dans les aliments, incluant des mycotoxines réglementées et non réglementées.

## ► Conclusion

L'évaluation des risques liés aux mycotoxines souligne que ces toxines sont relativement fréquentes en alimentation humaine et animale. Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) qui ont été établies pour de nombreuses mycotoxines et la caractérisation du risque montrent que l'exposition humaine peut parfois dépasser ces VTR et que le risque pour le consommateur ne peut pas être exclu. Il revient au gestionnaire des risques de mettre en place les mesures pour limiter l'exposition. Toutes les mycotoxines ne sont pas réglementées (toxines dites émergentes, voir chapitres 7 et 10) et il convient d'être vigilant sur l'avancée des connaissances scientifiques (occurrence, toxicité...) qui peuvent conduire à faire évoluer les VTR, moduler l'évaluation des risques et actualiser la réglementation. Enfin, les VTR ont été établies pour des mycotoxines prises individuellement ou par familles alors que l'humain et l'animal sont exposés à des mélanges de mycotoxines. Les effets et les interactions (additifs, synergiques, antagonistes) de ces mélanges doivent être étudiés et pris en compte, en particulier dans le cas où plusieurs mycotoxines ont un même organe cible/type d'effet toxique (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017).

13. <https://agriculture.gouv.fr/plans-de-surveillance-et-de-contrôle> (consulté le 06/09/2024).

14. <https://rappel.conso.gouv.fr>.

## ► Références

- Alassane-Kpembé I., Schatzmayr G., Marin D. *et al.*, 2017. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 16, 3489-3507, <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>.
- Directive (UE) 2002/32 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux.
- Efsa, 2011a. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *Efsa Journal*, 9, 2407, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>.
- Efsa, 2011b. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *Efsa Journal*, 9, 2197, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>.
- Efsa, 2012a. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *Efsa Journal*, 10, 2798, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2798>.
- Efsa, 2012b. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *Efsa Journal*, 10, 2605, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605>.
- Efsa, 2013a. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *Efsa Journal*, 11, 3254, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3254>.
- Efsa, 2013b. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *Efsa Journal*, 11, 3262, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>.
- Efsa, 2016. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *Efsa Journal*, 14, 4425, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4425>.
- Efsa, 2017a. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *Efsa Journal*, 15, 4718, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>.
- Efsa, 2017b. Scientific Opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for nivalenol and its modified forms. *Efsa Journal*, 15, 4751, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4751>.
- Efsa, 2017c. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *Efsa Journal*, 15, 4655, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4655>.
- Efsa, 2017d. Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *Efsa Journal*, 15, 4972, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4655>.
- Efsa, 2018. Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *Efsa Journal*, 16, 5172, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5172>.
- Efsa, 2020a. Scientific Opinion on the risk assessment of ochratoxin A in food. *Efsa Journal*, 18, 6113, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>.
- Efsa, 2020b. Risk assessment of aflatoxins in food. *Efsa Journal*, 18, 6040, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>.
- Jecfa, 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants: 44<sup>th</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 859.
- Jecfa, 1999. Evaluation of certain food additives and contaminants: 53<sup>rd</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 896.
- Jecfa, 2007. Safety evaluation of certain contaminants in food: 68<sup>th</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 947.
- Jecfa, 2011. Safety evaluation of certain contaminants in food: 72<sup>nd</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 959.
- Jecfa, 2017. Evaluation of certain contaminants in food: 83<sup>rd</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 1002.
- Jecfa, 2022. Evaluation of certain contaminants in food: 91<sup>st</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 1036.
- Jecfa, 2023. Evaluation of certain contaminants in food: 93<sup>rd</sup> report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *WHO Technical Report Series*, 1040.

## Les mycotoxines

- OMS, 2009. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food (Environmental health criteria, 240).
- Recommandation (UE) 165/2013 concernant la présence de toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits à base de céréales, <http://data.europa.eu/eli/reco/2013/165/oj>.
- Recommandation (UE) 553/2022 sur le contrôle de la présence de toxines d'*Alternaria* dans les denrées alimentaires, <http://data.europa.eu/eli/reco/2022/553/oj>.
- Recommandation (UE) 576/2006 concernant la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à l'alimentation animale, <http://data.europa.eu/eli/reco/2006/576/oj>.
- Règlement (UE) n° 315/93 portant établissement des procédures communautaires relatives aux contaminants dans les denrées alimentaires, <http://data.europa.eu/eli/reg/1993/315/oj>.
- Règlement (UE) 2023/915 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) n° 1881/2006, <http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>.
- Terciolo C., Garofalo M., Payros D. *et al.*, sous presse. Hazard assessment of mycotoxins for farm and companion animals: a European perspective, in Santos R., *Mycotoxins: From Field to Feed*, Brill, Wageningen Academic, Pays-Bas.

## Problématiques des mélanges

Imourana Alassane-Kpembé et Isabelle Oswald

### ►► Introduction

La plupart des moisissures produisent plusieurs mycotoxines simultanément. Plusieurs moisissures peuvent coexister ou se succéder sur un même substrat. Les régimes alimentaires, aussi bien chez l'humain que chez l'animal, intègrent plusieurs matières premières qui sont autant de sources potentielles d'entrée des mycotoxines dans une ration. La co-occurrence des mycotoxines dans les aliments et la coexposition qui en résulte sont donc la règle, et non l'exception. Cette exposition simultanée à plusieurs mycotoxines s'inscrit dans une réalité encore plus complexe qui fait interagir, au sein des organismes, une très grande variété d'entités chimiques d'origine endogène ou exogène connue sous le nom d'exposome chimique. Ce concept a été introduit pour promouvoir une vision holistique de l'exposition interne de l'organisme à des produits chimiques d'origine anthropique ou naturelle, et à leurs produits de biotransformation.

La toxicité des mycotoxines, à l'image des autres contaminants alimentaires, a le plus souvent été étudiée individuellement. Cette approche est sans doute utile pour établir le profil toxicologique d'un contaminant pris isolément et pour établir ses valeurs toxicologiques de référence à des fins de réglementation. En revanche, elle ne permet pas d'apprécier les risques associés à un cocktail de contaminants. En effet, des composés présents en faibles concentrations qui, individuellement, ne produisent pas d'effets significatifs, peuvent interagir une fois en mélange et provoquer des réponses substantielles. Il faut donc avoir une bonne compréhension de la façon dont les interactions des mycotoxines entre elles, ou avec d'autres éléments de l'exposome chimique, modifient le risque global d'altération du fonctionnement normal de l'organisme. Les cocktails constitués par les mycotoxines au sein de l'exposome peuvent affecter l'amplitude de la réponse de l'organisme à une stimulation, c'est-à-dire la toxicodynamie des substances, mais également la capacité de l'organisme à disposer de ces substances, c'est-à-dire leur toxicocinétique.

Ce chapitre aborde l'occurrence des mélanges impliquant les mycotoxines et donne un aperçu des interactions toxicodynamiques des mycotoxines entre elles ou avec les principales autres entités de l'exposome chimique. Il présente également leurs interactions toxicocinétiques qui impliquent les effecteurs en amont de la détection, du transport et de la biotransformation des xénobiotiques.

## ►► Multi-expositions impliquant des mycotoxines

La réalité des multi-expositions aux mycotoxines peut être appréhendée sous l'angle de l'analyse des aliments ou sous celui de l'analyse des fluides biologiques des animaux ou des hommes. Entre 2012 et 2019, des analyses de matières premières ou d'aliments destinés à l'humain ou à l'animal dans certains pays européens ont montré que 70 à 100 % des échantillons étaient contaminés par plus d'une mycotoxine (Tolosa *et al.*, 2021). En outre, entre 4 et 34 mycotoxines ont été simultanément détectées dans les prélèvements de sérum et d'urine récoltés pendant 24 heures sur 600 individus de 5 pays, dans le cadre du projet européen Efcoval (De Ruyck *et al.*, 2020).

En France, la seconde étude de l'alimentation totale (EAT2), réalisée de 2006 à 2010, et l'étude individuelle nationale des consommations alimentaires (Inca), toutes deux menées par l'Anses, ont identifié 153 contaminants des aliments et mis en exergue la présence des mycotoxines dans les grands mélanges chimiques auxquels la population française est exposée. En effet, sur les sept profils de coexposition les plus représentés dans la population, trois comportent des mycotoxines (Traoré *et al.*, 2016). En particulier, le profil de coexposition correspondant à un régime alimentaire basé sur une combinaison d'aliments simples non transformés et qui couvre 18 % de la population comporte quatre mycotoxines : le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV), la zéaralénone (ZEN) et la toxine HT-2, en association avec des éléments-traces métalliques, du bisphénol A et des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Deux autres profils de coexposition correspondant à 31 % de la population française associent les mycotoxines ZEN et DON à différents pesticides. Cette association entre un pesticide, le métalaxyl utilisé comme fongicide, et une mycotoxine, l'aflatoxine B<sub>2</sub>, a également été rapportée dans 62 % des échantillons de vin rouge analysés dans une étude en Espagne (Pérez-Ortega *et al.*, 2012).

## ►► Interactions toxicodynamiques des mycotoxines : comment les évaluer ?

Une interaction toxicodynamique est définie comme un écart entre la toxicité observée pour un mélange de substances toxiques et la toxicité prédite pour ce mélange, sur la base des relations dose-réponse individuelles de ses constituants. De façon concrète, évaluer une interaction pour un mélange revient à dire si l'amplitude d'effet toxique observée pour ce mélange est supérieure (effet synergique),

inférieure (effet antagoniste) ou égale (effet additif) à l'amplitude d'effet toxique prédite pour le mélange, sur la base d'un modèle d'additivité appliqué aux données.

Trois principaux modèles d'additivité ont été utilisés dans les études d'interaction des mycotoxines : le modèle d'addition des doses, le modèle d'addition des réponses et le modèle de l'effet médian de la loi d'action de masse (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017a).

Le modèle d'addition des doses postule que les substances testées agissent sur les mêmes cibles cellulaires, selon un mécanisme similaire, mais avec des potentiels d'amplitudes différentes. Il considère ainsi que chaque substance intervient dans la toxicité du mélange de manière proportionnelle à son efficacité et à sa dose. Le modèle d'addition des réponses part du principe que les substances en mélange agissent indépendamment les unes des autres et considère que la réponse du mélange peut être prédite par la fraction des réponses reliée aux substances individuelles qui le composent.

Il est très peu probable que des substances bioactives dans un mélange puissent avoir des mécanismes d'action totalement indépendants ou rigoureusement identiques. Des chevauchements de mécanismes d'action sont plutôt la norme. Pour cette raison, beaucoup d'études utilisent le modèle d'additivité de l'effet médian de la loi d'action de masse, qui ne formule aucune hypothèse sur les mécanismes d'action. Il se base uniquement sur le paramètre de puissance et la pente des courbes dose-réponse individuelles des substances pour prédire une réponse correspondant à l'absence d'interaction ou une réponse additive dans le mélange.

## ► Effets des mycotoxines sur l'amplitude de la réponse toxicologique

### Toxicité combinée des mycotoxines

Une évaluation des interactions dans la toxicité intestinale combinée du DON et d'autres trichothécènes B (TCTB), menée avec le modèle d'additivité de l'effet médian de la loi d'action de masse, a révélé un effet synergique de ces mycotoxines sur le renouvellement de l'épithélium intestinal et l'activité pro-inflammatoire (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017b). Cette étude a établi que les mélanges de faibles doses de TCTB avaient, en fonction des paramètres de toxicité intestinale considérés, des effets de deux à dix fois plus importants que ceux anticipés sur la base des toxicités individuelles de chacune des mycotoxines.

Des interactions de type synergique ont également été rapportées pour l'hépatotoxicité et l'altération de l'expression des enzymes de biotransformation provoquées par de faibles doses d'autres mycotoxines de *Fusarium* en mélange, en utilisant une lignée d'hépatocytes humains (Smith *et al.*, 2017).

Outre la toxicité combinée des seules mycotoxines réglementées, des schémas de combinaison impliquant des mycotoxines émergentes ont également été examinés. Par exemple, une activité œstrogénique synergique a été identifiée pour la ZEN et une mycotoxine émergente, l'alternariol (AOH), en utilisant une lignée cellulaire humaine (Vejdovsky *et al.*, 2017a). À l'inverse, les dix mycotoxines émergentes les plus représentées dans l'alimentation du porc n'ont démontré aucune interaction

avec le DON par rapport à leur cytotoxicité à l'endroit de cellules intestinales (Khoshal *et al.*, 2019). Les toxicités combinées de tous les mélanges testés n'étaient pas significativement différentes de celle du DON pris isolément.

## Toxicité des cocktails de mycotoxines et d'autres contaminants alimentaires

La toxicité des mélanges de mycotoxines et de nombreux autres contaminants tels que les pesticides, les métaux lourds et autres toxiques qui peuvent être présents dans les aliments commence seulement à être investiguée.

L'association entre le DON et le cadmium a montré que le type d'interaction entre ces deux contaminants varie de l'antagonisme à la synergie, selon l'organe étudié (Le *et al.*, 2018). Au niveau intestinal, les effets induits par la coexposition sur la fonction de barrière sont similaires aux effets de chaque contaminant pris isolément. Dans le cas du bisphénol A et des mycoœstrogènes ZEN et AOH, les effets combinés de leur activité de perturbateur endocrinien sur des cellules de l'endomètre humain se sont révélés modérément antagonistes à presque additifs (Aichinger *et al.*, 2020).

On sait aussi que le mélange de ZEN et de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un pesticide heureusement interdit d'utilisation dans la majorité des pays, augmente la production de testostérone par les cellules de Leydig (Eze *et al.*, 2018). Cela signifie que la coexposition ZEN-DDT peut exacerber les effets néfastes sur la reproduction. De même, l'hépatotoxicité induite par la patuline (PAT) chez la souris est significativement augmentée en présence du pesticide chlorpyrifos (Lu *et al.*, 2019).

Des métabolites microbiens non fongiques comme le chloramphénicol, la nonactine et la geldanamycine sont parfois retrouvés dans des aliments contaminés par des mycotoxines. Pour autant, l'association des toxines fongiques et bactériennes comme modèle de cocontamination n'a bénéficié que de très peu d'attention pour des études d'interaction. Les rares toxines bactériennes étudiées en mélange avec le DON sont la céréulide et la colibactine. La céréulide est une toxine produite par des souches de *Bacillus cereus* et d'espèces apparentées, qui est retrouvée en mélange avec du DON dans certains aliments de base en Afrique. L'intérêt de ce mélange réside dans le fait que l'une et l'autre de ces toxines sont cytotoxiques et provoquent des vomissements en cas d'intoxication aiguë. Une interaction de type synergique a été rapportée pour la cytotoxicité et l'altération de la fonction de barrière, ainsi que pour la réponse immunitaire de l'intestin provoquée par la céréulide et le DON, mais la question de leur activité émétique combinée reste entière.

La colibactine, une génotoxine produite par certaines souches d'*Escherichia coli*, est associée à un nombre croissant de cancers colorectaux dans les pays développés. On sait, par ailleurs, que les dommages à l'ADN observés dans les cellules épithéliales intestinales de rats colonisés par des souches d'*Escherichia coli* produisant de la colibactine sont exacerbés en présence du DON (Payros *et al.*, 2017). De façon globale, on peut s'interroger sur les interactions entre les mycotoxines contaminant l'alimentation et le microbiote intestinal, au regard de la carcinogénèse intestinale.

## Toxicité des cocktails de mycotoxines et de constituants de plantes

Des interactions toxicodynamiques peuvent également exister entre les mycotoxines et des constituants végétaux. L'association la plus emblématique est celle des mycoœstrogènes ZEN et AOH avec les isoflavones du soja, génistéine et daidzéine, qui sont des phytoœstrogènes. En fonction des doses et des ratios de combinaison, cette association a montré une activité œstrogénique synergique (Vejdovsky *et al.*, 2017b). À l'opposé, pour des concentrations dans l'organisme pouvant être atteintes par une consommation modérée de bière, les phytoœstrogènes du houblon, xanthohumol et 8-prényl-naringénine, ont une activité antagoniste de celles de la ZEN et de son métabolite l' $\alpha$ -zéaralénol.

Une association plus controversée est celle de l'ochratoxine A (OTA) et d'une toxine végétale, l'acide aristolochique, dans l'étiologie de la néphropathie endémique des Balkans. Cependant, une étude chez les rongeurs a établi que l'OTA exacerbe la formation des adduits à l'ADN provoqués par l'acide aristolochique dans les reins, suggérant que les deux composés pourraient interagir pour favoriser le développement de tumeurs cancéreuses rénales.

### ► Effets des mycotoxines sur le devenir des xénobiotiques dans l'organisme

Notre connaissance de la façon dont les expositions aux mycotoxines peuvent affecter le transport des xénobiotiques dans l'organisme et leur métabolisme a beaucoup progressé ces dernières années (Galtier *et al.*, 2008). Les xénobiotiques sont des molécules exogènes qui sont présentes exceptionnellement dans l'organisme et qui ne sont ni des substrats ni des produits habituels des réactions métaboliques. Ces molécules sont transformées dans l'organisme et éliminées par diverses réactions chimiques réparties en trois phases de biotransformation. Les enzymes de phase I, principalement représentées par la superfamille du cytochrome p450 (CYP), catalysent des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les enzymes de phase II, telles que les UDP-glucuronosyltransférases, les sulfotransférases, les N-acétyltransférases, les glutathion S-transférases et les méthyltransférases, transforment les métabolites issus de la phase I en produits plus polaires prêts à être excrétés par les urines. Quant à la phase III des réactions de biotransformation, elle met en œuvre des protéines comme la glycoprotéine P (P-gp), MRP2 et BCRP, qui sont des pompes d'efflux permettant aux cellules de rejeter, à l'extérieur, des xénobiotiques ou leurs métabolites. Les protéines P-gp et BCRP en particulier confèrent une résistance cellulaire aux médicaments anticancéreux, en raison de l'acquisition d'un phénotype de multirésistance aux médicaments.

Après le passage transmembranaire, le processus de biotransformation des xénobiotiques est initié par l'activation de capteurs cellulaires particuliers, les xénorécepteurs, dont les plus connus sont AhR, CAR et PXR.

Certaines mycotoxines peuvent interférer avec les étapes du métabolisme des xénobiotiques. Dans le cas particulier des médicaments, ces interactions pourraient avoir

des conséquences pharmacothérapeutiques en réduisant ou augmentant l'activité médicamenteuse attendue. Cela pourrait également avoir des conséquences sur la santé publique des consommateurs de produits animaux.

## Interférences des mycotoxines avec le transport membranaire des xénobiotiques

Les mycotoxines peuvent moduler le transport des xénobiotiques, notamment des médicaments, par leurs effets sur les protéines d'efflux. Ces interférences sont de la plus haute importance, car elles peuvent affecter l'efficacité et l'innocuité d'un traitement médicamenteux.

Les mycotoxines exercent des effets contrastés sur l'expression des protéines d'efflux. On observe une induction de l'expression des protéines P-gp, MRP1 et MRP2 après une exposition des cellules à ZEN, alors que la fumitrimorgine C (FTC) produite par *Aspergillus fumigatus* est connue pour inverser le profil de résistance multidrogue des cellules cancéreuses, en inhibant BCRP (Prouillac *et al.*, 2009). Ainsi, un prétraitement par FTC augmente l'activité cytotoxique du topotécan dans le traitement du cancer de l'ovaire ou du cancer du poumon à petites cellules, et celle de la mitoxantrone, dans le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration (Tèo *et al.*, 2019).

Chez les animaux de la ferme, on a observé une perte d'expression de la P-gp dans l'iléon de porcs nourris avec un régime contaminé par le DON, alors que l'exposition des poulets de chair aux fumonisines (FB1), à des niveaux de contamination de l'aliment proches de la réglementation de l'Union européenne, active l'expression de la protéine d'efflux dans le jéjunum (Antonissen *et al.*, 2017). Une réduction significative de l'absorption orale de l'enrofloxacin chez le poulet exposé aux fumonisines a été rapportée en même temps que cette activation. L'enrofloxacin (EFX), antibiotique de la famille des quinolones, est en effet un substrat bien connu de la P-gp.

## Interférences des mycotoxines avec l'activité des xénorécepteurs

L'un des mécanismes les mieux décrits est l'interaction entre ZEN et l'orthologue humain de PXR (hPXR). En effet, la liaison de la ZEN provoque des changements conformationnels de hPXR, ce qui entraîne, d'une part, la libération de la protéine corépresseur N-CoR, et d'autre part, le recrutement des protéines coactivatrices *Steroid Receptor Coactivator-1*, *Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1* et *PPAR-Binding Protein*.

L'activation des xénorécepteurs représente la base moléculaire d'une classe importante d'interactions médicamenteuses. Pour cette raison, ZEN est considérée comme une source potentielle d'interactions aliment-médicament.

Plusieurs autres mycotoxines, AFB<sub>1</sub>, PAT, FB<sub>1</sub>, OTA et AOH, activent également PXR CAR ou AhR.

## Modulation de la biotransformation des xénobiotiques par les mycotoxines

Les mycotoxines régulent généralement, soit à la hausse, soit à la baisse, l'expression des enzymes de biotransformation. L'AFB1 et la toxine T-2, par exemple, diminuent les taux hépatiques des isoenzymes 1A, 2A, 2B et 3A du cytochrome P450 du porc ou du lapin (Galtier *et al.*, 2008), alors que les mycotoxines structurellement apparentées DON et NIV augmentent l'expression de l'isoenzyme 2B du cytochrome P450, et celle des isoenzymes  $\alpha$  et  $\Sigma$  de la glutathion-S-transférase des rongeurs. Une particularité est observée avec la FB1, qui augmente sélectivement l'expression de CYP1A1 et 4A1, et diminue celle de CYP1A2 et 2C11 chez le rat.

Des évaluations de la pharmacocinétique du midazolam (MDZ) et de l'enrofloxacine (EFX) menées dans un contexte d'exposition aux mycotoxines ont permis de mieux appréhender les implications des régulations à la hausse ou à la baisse de l'expression des enzymes de biotransformation (Devreese *et al.*, 2014).

Le MDZ est un anesthésique important qui est principalement métabolisé dans le foie humain par les CYP3A4, 3A5 et 3A7, entraînant la production de métabolites hydroxylés. Il est utilisé comme substrat modèle pour étudier la voie de biotransformation du CYP3A. La mycotoxine émergente enniatine B1, qui est également métabolisée par le CYP3A, réduit l'efficacité de la biotransformation du MDZ par les microsomes hépatiques humains, en diminuant son taux d'hydroxylation (Ivanova *et al.*, 2019). À l'opposé, ZEN, qui est un inducteur du CYP3A, modifie significativement la biodisponibilité orale absolue du MDZ chez le porc. Tout cela suggère qu'un ajustement posologique pourrait être nécessaire en cas d'exposition d'un organisme à l'enniatine B1 ou à ZEN, afin de maintenir les concentrations de MDZ dans la fenêtre thérapeutique ou dans la fenêtre de sécurité.

L'exposition aux mycotoxines pourrait également avoir des conséquences dans la mise en œuvre d'une antibiothérapie à base d'enrofloxacine (EFX) en médecine aviaire. Contrairement aux mammifères, la biotransformation de l'EFX en son métabolite de phase I, la ciprofloxacine, est très limitée chez la volaille. L'exposition du poulet de chair à l'AFB1 diminue l'absorption orale de l'EFX et accroît la rémanence de son résidu, la ciprofloxacine, dans le foie, les reins et la graisse (Kalpana *et al.*, 2015). Cela suggère qu'un ajustement de la posologie et du délai d'attente défini pour la consommation des animaux destinés à l'alimentation humaine après l'administration d'EFX pourrait être nécessaire en cas d'exposition de volailles à l'AFB1.

### ► Conclusion

L'exposition simultanée d'organismes à des mycotoxines et à d'autres xénobiotiques peut entraîner des interactions multiformes. Les interactions toxicodynamiques des effets de mycotoxines et d'autres contaminants provoquant des manifestations de toxicité similaires, ont fait l'objet de nombreuses études. Toutefois, des données

préliminaires mettent aussi en évidence le potentiel négligé d'interaction pharmacocinétique entre des mycotoxines et des médicaments.

Les études portant sur les effets de l'exposition à des cocktails de mycotoxines ou à des mélanges de mycotoxines et d'autres contaminants de l'alimentation humaine ou animale ont montré que leur toxicité combinée ne peut pas toujours être prédite sur la base des effets individuels des constituants du cocktail. Les interactions ainsi mises en évidence varient de la synergie à l'antagonisme, en passant par l'additivité, en fonction des mélanges analysés, voire des gammes de doses étudiées.

De nombreuses mycotoxines interfèrent avec des xénobiotiques. D'autres mycotoxines modulent l'expression de classes importantes d'enzymes métabolisant les médicaments et de protéines de transport. Elles pourraient ainsi modifier la biodisponibilité, le profil des métabolites et la cinétique d'élimination des médicaments. Par conséquent, ces mycotoxines présentent un potentiel important d'interaction pharmacocinétique avec des médicaments administrés concomitamment. En raison de ces interactions, certains ajustements posologiques peuvent être nécessaires pour maintenir les concentrations du médicament dans les limites thérapeutiques et de sécurité, en cas d'exposition de l'organisme à des mycotoxines.

## ► Références

- Aichinger G., Pantazi F., Marko D., 2020. Combinatory estrogenic effects of bisphenol A in mixtures with alternariol and zearalenone in human endometrial cells. *Toxicology Letters*, 319, 242-249, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.10.025>.
- Alassane-Kpembi I., Puel O., Pinton P., Cossalter A.M. *et al.*, 2017b. Co-exposure to low doses of the food contaminants deoxynivalenol and nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. *Archives of Toxicology*, 91, 2677-2687, <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1902-9>.
- Alassane-Kpembi I., Schatzmayr G., Marin D., Taranu I. *et al.*, 2017a. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3489-3507, <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>.
- Antonissen G., Devreese M., De Baere S. *et al.*, 2017. Impact of *Fusarium* mycotoxins on hepatic and intestinal mRNA expression of cytochrome P450 enzymes and drug transporters, and on the pharmacokinetics of oral enrofloxacin in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 101, 75-83.19, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.006>.
- De Ruyck K., Huybrechts I., Yang S., Arcella D. *et al.*, 2020. Mycotoxin exposure assessments in a multi-center European validation study by 24-hour dietary recall and biological fluid sampling. *Environment International*, 137, 105539, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105539>.
- Devreese M., Antonissen G., De Baere S. *et al.*, 2014. Effect of administration route and dose escalation on plasma and intestinal concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin in broiler chickens. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10, 1-9, <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0289-1>.
- Eze U.A., Huntriss J., Routledge M.N., Gong Y.Y., 2018. Toxicological effects of regulated mycotoxins and persistent organochloride pesticides: *In vitro* cytotoxic assessment of single and defined mixtures on MA-10 murine Leydig cell line. *Toxicology in Vitro*, 48, 93-103, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.019>.
- Galtier P., Laffitte J., Oswald I.P., Loiseau N., 2008. Molecular interection between mycotoxins and liver enzymes involved in drug metabolism in rodents and farm animals. *Krmiva*, 50, 205-213, [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=45495](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=45495).

- Ivanova L., Denisov I., Grinkova Y.V., 2019. Biotransformation of the Mycotoxin Enniatin B1 by CYP P450 3A4 and Potential for Drug-Drug Interactions. *Metabolites*, 9, 158, <https://doi.org/10.3390/metabo9080158>.
- Kalpana S., Srinivasa Rao G., Malik J.K., 2015. Impact of aflatoxin B1 on the pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in broiler chickens. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 645-649, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.023>.
- Khoshal A.K., Novak B., Martin P.G.P., Jenkins T. *et al.*, 2019. Co-occurrence of DON and Emerging Mycotoxins in Worldwide Finished Pig Feed and Their Combined Toxicity in Intestinal Cells. *Toxins*, 11, 727, <https://doi.org/10.3390/toxins11120727>.
- Le T.H., Alassane-Kpembi I., Oswald I.P., Pinton P., 2018. Analysis of the interactions between environmental and food contaminants, cadmium and deoxynivalenol, in different target organs. *Science of the Total Environment*, 622-623, 841-848, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.014>.
- Lu S., Liu S., Cui J., Liu X. *et al.*, 2019. Combination of Patulin and Chlorpyrifos Synergistically Induces Hepatotoxicity via Inhibition of Catalase Activity and Generation of Reactive Oxygen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 11474-11480, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04814>.
- Payros D., Dobrindt U., Martin P. *et al.*, 2017. Food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio*, 8, e00007-17, <https://doi.org/10.1128/mBio.00007-17>.
- Pérez-Ortega P., Gilbert-Lopez B., Garcia-Reyes J.F. *et al.*, 2012. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography part A*, 1249, 32-40, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.020>.
- Prouillac C., Viderman B., Mazallon M., Lecoeur S., 2009. Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). *Toxicology*, 263, 100-107, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.023>.
- Teo M.Y., Rathkopf D.E., Kantoff P., 2019. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual Review of Medicine*, 70, 479-499, <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051517-011947>.
- Tolosa J.Y., Ruiz M.J., Vila-Donat P. *et al.*, 2021. Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 158, 112661, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112661>.
- Traoré T., Bechaux C., Sirot V., Crepet A., 2016. To which chemical mixtures is the French population exposed? Mixture identification from the second French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 179-188, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.10.028>.
- Smith M.C., Hymery N., Troadec S., Pawtowski A. *et al.*, 2017. Hepatotoxicity of fusariotoxins, alone and in combination, towards the HepaRG human hepatocyte cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 439-451, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.022>.
- Vejdovszky K., Hahn K., Braun D. *et al.*, 2017a. Synergistic estrogenic effects of *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins *in vitro*. *Archives of Toxicology*, 91, 1447-1460, <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1795-7>.
- Vejdovszky K., Schmidt V., Warth B., Marko D., 2017b. Combinatory estrogenic effects between the isoflavone genistein and the mycotoxins zearalenone and alternariol *in vitro*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61, 1600526, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600526>.

# **L'exposition aux mycotoxines dans un contexte de changements climatiques et de pratiques**

Jean Michel Savoie, Marie Hélène Robin et Florence Forget

## **►► Introduction**

La contamination de productions végétales alimentaires par des champignons mycotoxigènes implique leur présence au champ ou en post-récolte et une atteinte de leur cible végétale dans des conditions environnementales favorables à leur implantation et leur développement. S'ils en ont la capacité génétique, ils produiront alors des mycotoxines. Les changements climatiques et les modifications des pratiques agricoles pour atteindre une production bas intrants, avec un bilan carbone neutre ou positif, peuvent donc affecter l'occurrence des mycotoxines et les niveaux de contamination des aliments proposés aux consommateurs. Par ailleurs, de nouvelles habitudes alimentaires et d'approvisionnement guidées par des motivations de santé et des préoccupations environnementales sont aussi susceptibles de modifier le risque d'exposition des consommateurs. Dans ce chapitre, nous donnons quelques illustrations, pour les filières « céréales à paille » et « maïs », des conséquences possibles des changements qui s'opèrent dans ces trois domaines : climat, agriculture, habitudes de consommation.

## **►► Conséquences probables des changements climatiques sur le risque « mycotoxine » en céréaliculture**

### **Au champ**

Plus de 20 espèces de *Fusarium* sont associées à la fusariose de l'épi des céréales et sont responsables de contaminations par des mycotoxines. Dans nos contrées, si les trichothécènes B (TCTB) et la zéaralénone (ZEN) sont les mycotoxines les

plus fréquemment rencontrées, les récoltes céréalières peuvent aussi être contaminées par une grande diversité d'autres mycotoxines produites par les *Fusarium* spp., dont les toxines T2/HT2 et les mycotoxines dites émergentes, parmi lesquelles les enniatines et les beauvéricines (Orlando *et al.*, 2019). Chaque espèce associée à la production de l'une de ces mycotoxines possède une écophysiologie propre, avec une variabilité intraspécifique. Ainsi, les conditions de température, humidité et teneur en CO<sub>2</sub> influent différemment, selon les espèces, sur la croissance fongique et la production de toxines. Par exemple, les producteurs de fumonisines (FUM) (dont *Fusarium verticillioides*) ou d'aflatoxines (AF) (dont *Aspergillus flavus*) se développent à des températures optimales autour de 30 °C, alors que *Fusarium graminearum* et *F. culmorum*, producteurs de déoxynivalénol (DON), requièrent des températures plus fraîches (environ 25 °C). Par ailleurs, un même épi peut être colonisé au cours de son développement par plusieurs espèces fongiques et les cocontaminations par différentes mycotoxines sont fréquentes. L'augmentation de la température moyenne (+ 2 à 5 °C) et de la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique (350-400 contre 650 - 1 200 ppm), la variation de l'intensité et de la distribution des pluies, ainsi que les événements météorologiques contrastés et extrêmes, et surtout les incertitudes qui accompagnent les changements climatiques pourraient influencer sur la composition de la communauté fongique affectant les épis et les niveaux de contamination en différentes mycotoxines.

Compte tenu de la complexité des interactions et des variations locales, il est difficile d'évaluer la nature et l'intensité de ces effets. Cependant, en associant des modèles qui reflètent les conditions écologiques de l'infection du blé par *Fusarium* spp. et de leur production de mycotoxines avec des projections des changements climatiques, il est possible de proposer des scénarios. Ces modèles de prédiction sont en cours d'amélioration avec l'intégration d'autres paramètres tels que la régulation de la toxino-génèse, la phénologie et physiologie de la plante hôte. Ainsi, une augmentation très significative des concentrations de DON est attendue d'ici à 2040 pour le blé dans le nord-ouest de l'Europe (Van der Fels-Klerx *et al.*, 2016). La sévérité de la fusariose du blé augmenterait également avec un doublement de la teneur en CO<sub>2</sub> atmosphérique (Váry *et al.*, 2015). Ces concentrations en CO<sub>2</sub> pourraient rendre les maïs plus sensibles à la colonisation par *F. verticillioides*, mais sans augmentation de la contamination en FUM (Vaughan *et al.*, 2014).

Des modifications d'équilibre entre espèces fusariennes ont déjà été observées. Le remplacement de *F. culmorum*, autrefois prédominant dans le blé, par *F. graminearum* pourrait être attribué à des étés européens plus chauds (Van der Lee *et al.*, 2015). L'augmentation de la présence de *F. poae* dans les récoltes céréalières pourrait aussi être une conséquence des changements climatiques (Infantino *et al.*, 2023). La prévalence du DON pourrait être aggravée ou réduite, et d'autres mycotoxines actuellement considérées comme secondaires, mais tout aussi nocives, pourraient devenir un problème majeur à l'avenir. Si en 2023 les *Fusarium* spp. restent les plus courants dans les épis de maïs européen, plusieurs étés extrêmement chauds et secs ont aussi conduit à une occurrence accrue d'*A. flavus*. En conséquence, la présence généralisée et les niveaux élevés d'AF, non conformes à la législation de l'UE, ont été signalés dans de nombreux lots de maïs en Italie du Nord. Selon les modèles de prédiction d'évolution du risque d'AF (Battilani *et al.*, 2016), la contamination des

mais par cette toxine pourrait devenir très préoccupante en Europe. Cependant, les effets des changements climatiques seront régionaux et préjudiciables ou avantageux en fonction de la zone géographique et du scénario de changement climatique considéré. En Europe du Nord, les effets pourraient être positifs, avec l'élargissement de la zone de culture du maïs associé à un risque minime d'AF. À l'inverse, le bassin méditerranéen sera le point chaud de nombreux effets négatifs, avec des changements extrêmes dans les précipitations et sécheresses, des températures élevées et des concentrations de CO<sub>2</sub> atmosphérique ayant un impact sur la production et la contamination du maïs par les AF. Des travaux de recherche introduisant d'autres espèces toxigènes dans le système analysé génèrent des connaissances de base dont l'intégration dans les modèles prédictifs permettra de considérer la co-occurrence des champignons et des mycotoxines associées (Leggieri *et al.*, 2021).

Il est indéniable que les changements climatiques auront un impact sur la diversité et les niveaux de contamination des céréales en mycotoxines. Cependant, il est très difficile d'anticiper l'ampleur de ces changements à des niveaux locaux spécifiques. Il est nécessaire d'acquérir des données nouvelles pour répondre aux questions clés des effets des changements climatiques sur les populations de champignons toxigènes en fonction de leur écophysiologie et de leurs potentiels adaptatifs, ainsi que sur les co-occurrences dans les parcelles agricoles. Accroître la connaissance est aussi indispensable pour prédire les changements dans les profils de mycotoxines, avec des prédominances possibles de mycotoxines actuellement considérées comme d'importance secondaire. Les effets des changements climatiques sur la phénologie des plantes hôtes et la coïncidence avec le cycle de vie des champignons, ainsi que la modification de leurs mécanismes de défense, devront être connus. Les interactions entre les champignons mycotoxigènes et d'autres composantes des microbiotes dans les niches écologiques de la phyllosphère et de la rhizosphère sont aussi susceptibles d'être affectées par les changements climatiques.

## Au cours du stockage

Les conditions d'apparition des moisissures mycotoxigènes des céréales stockées et la gestion préventive des contaminations ou la remédiation sont traitées au chapitre 16. Brièvement, il a été démontré qu'une non-maîtrise de la température et de l'humidité des grains sous l'effet d'une pluviométrie importante en hiver et au printemps peut entraîner des pertes significatives dues aux insectes et aux mycotoxines. La ventilation avec de l'air prélevé à l'extérieur et plus froid que le grain, généralement la nuit, pratiquée par paliers, est le moyen le plus utilisé pour obtenir les meilleures conditions de stockage. Or, avec les changements climatiques, il est constaté que le nombre d'heures où la température extérieure est suffisamment basse pour atteindre chaque palier tend à diminuer (Tanguy et Cabeza-Orcel, 2023). Cela rend plus difficile la maîtrise de la température et de l'humidité des gros volumes de grains. De plus, avec l'augmentation de la fréquence d'événements climatiques extrêmes et la volonté de réduire les dépenses énergétiques pour des raisons environnementales et économiques, le maintien des conditions physicochimiques en dessous des seuils permettant l'activité biologique des champignons toxigènes pourrait devenir plus difficile à obtenir et les opérateurs auront tendance à réduire

la marge de sécurité dans la conduite des installations pour économiser l'énergie. En revanche, les changements climatiques, avec des débuts d'étés secs dans de nombreuses régions conduisant à des taux d'humidité des grains très faibles à la récolte, pourraient faciliter un stockage optimal.

## » Conséquences probables des évolutions des pratiques de production céréalières sur le risque « mycotoxine »

### Au champ

Il existe des leviers techniques actionnables dans la lutte contre la contamination par les mycotoxines qui permettent de réduire le potentiel d'inoculum, de favoriser l'évitement, de valoriser les systèmes de défense des plantes et la résistance génétique, bien qu'il soit difficile de maîtriser l'interaction entre la variabilité du climat, la phénologie de la culture et le cycle du champignon (voir chapitre 15). Les produits phytosanitaires fongicides sont encore largement utilisés pour la lutte contre les fusarioses et les mycotoxines, sans que cela se traduise par une diminution claire du risque de contamination. Globalement, les systèmes de culture n'ayant pas recours aux fongicides font état d'une contamination équivalente ou moins importante que les systèmes utilisant de tels produits. Malgré l'absence d'utilisation de fongicides, un système biologique semble généralement capable de maintenir la contamination par les mycotoxines à de faibles niveaux (Brodal *et al.*, 2016). Cela pourrait être dû aux effets bénéfiques de certaines pratiques mises en œuvre dans les développements de l'agroécologie et recommandées par les pouvoirs publics. La politique agricole commune 2023-2027 incite les agriculteurs à utiliser des systèmes de rotation des cultures, qui sont un des leviers majeurs de contrôle des fusarioses. De plus, dans le cadre de la transition agroécologique, des pratiques telles que l'allongement des rotations, les cultures associées, le choix de la date ou la densité de semis offrent un potentiel intéressant pour limiter les risques de contamination par la fusariose et les teneurs en mycotoxines associées. *A contrario*, d'autres pratiques agricoles pourraient favoriser la contamination des épis par les champignons toxigènes, du fait de la création de réservoirs d'inoculum. C'est le cas de l'agriculture de conservation des sols qui bannit le labour profond permettant d'enfouir les résidus de récolte en interculture et de limiter la disponibilité de l'inoculum, s'accompagnant de la persistance de graminées adventices qui sont de potentiels réservoirs d'espèces toxigènes de *Fusarium* et/ou de *Claviceps* productrices d'alcaloïdes d'ergot. Il reste nécessaire d'acquérir des données de terrain fiables pour réaliser une analyse bénéfice/risque de l'ensemble du système mettant en œuvre ces pratiques agricoles qui accompagnent les transitions, en incluant la problématique mycotoxines.

La génétique végétale et le biocontrôle sont les deux leviers les plus prometteurs pour une stratégie de lutte intégrée contre les champignons mycotoxigènes comme pour d'autres phytopathogènes. La sélection variétale a été réalisée sur des critères de résistance à la fusariose et n'a que très peu considéré la résistance à la synthèse de mycotoxines. Les développements récents de la métabolomique et des connaissances sur les systèmes de régulation de la toxinogénèse ouvrent des perspectives intéressantes pour

identifier des marqueurs chimiques de résistance aux mycotoxines, utilisables en sélection variétale. Le développement des cultures d'espèces négligées est aussi un levier génétique actionnable. Nous pouvons citer le développement des cultures de sorgho comme alternatives au maïs. Cependant, les conséquences sur le risque mycotoxines global restent à évaluer car, comme pour le maïs, les genres fongiques *Aspergillus* et *Fusarium* sont capables de contaminer le sorgho de manière significative. Le recours à des variétés populations paysannes (constituées d'un ensemble d'individus aux génotypes variés, à base génétique large, exprimant des phénotypes proches sélectionnés au champ par des agriculteurs et multipliés en pollinisation libre) et aux cultures en mélange, qui recréent de la diversité cultivée, est aussi mis en avant comme une pratique alternative. Les conséquences à long terme sur les taux de contamination des céréales en mycotoxines méritent d'être étudiées.

Dans le contexte de la stratégie nationale de déploiement du biocontrôle, l'utilisation d'agents biologiques ou de substances d'origine naturelle est amenée à s'intensifier dans le futur, alors que les solutions commerciales actuellement disponibles contre la fusariose des épis sont peu nombreuses et d'une efficacité limitée. Cependant, diverses formulations sont en cours de développement. Comme pour la sélection variétale, l'agent pathogène est ciblé en priorité et peu de recherches sont entreprises sur des produits de biocontrôle inhibant la synthèse de mycotoxines, alors que les travaux de recherche en cours suggèrent que les mécanismes d'action et les doses pour le contrôle effectif de la toxinogénèse diffèrent de ceux du biocontrôle du champignon toxigène. Que ce soit pour les substances d'origine naturelle ou les organismes vivants révélant des potentiels intéressants en conditions contrôlées, les efforts de développement devront porter sur les formulations permettant leur persistance et leur libération spatio-temporelle adaptée, dans un contexte d'interactions biotiques et abiotiques multiples sur les plantes (voir aussi chapitre 18).

## Au cours du stockage

Les systèmes de stockage en vrac en grands volumes regroupent les productions de plusieurs agriculteurs et impliquent des opérateurs intermédiaires pour le séchage, le transport et le convoyage pour remplir les silos. Bien qu'une analyse HACCP soit généralement pratiquée pour identifier les points critiques de contrôle, le grain peut devenir sensible à la détérioration d'origine fongique si les conditions environnementales ne sont pas rigoureusement contrôlées (Magan *et al.*, 2014). Une sensibilisation de tous les acteurs est nécessaire. De plus en plus, le stockage à la ferme pendant de courtes périodes est pratiqué par les céréaliers cultivant plus de 20 hectares (Tanguy et Cabeza-Orcel, 2023). Le niveau d'équipement en systèmes de ventilation pour refroidir et sécher les grains augmente. En revanche, une enquête, menée en 2023 auprès de quelques agriculteurs travaillant des surfaces plus faibles et pratiquant le stockage, a montré leur sensibilisation à la question des insectes, mais aussi leur peu de prise de conscience de la problématique mycotoxines, leur manque de connaissances et de sensibilisation à cette problématique et aux mesures de prévention (Robin et Malpel, comm. pers.). La diffusion d'une information ciblée et adaptée est nécessaire pour réduire le risque mycotoxines lié au stockage à la ferme.

Le séchage des lots récoltés au-dessous de la norme commerciale de 14,5 % de teneur en eau est indispensable et le stock doit être refroidi en dessous de 14,5 °C par ventilation à l'air ambiant ou l'air refroidi, avant d'atteindre sa valeur seuil. Cependant, la teneur en eau minimum des grains pour la croissance de *Penicillium verrucosum* ou d'*Aspergillus ochraceus*, producteurs d'OTA, et d'*A. flavus*, producteur d'AFB1, est d'environ 17 %, et 1 % supplémentaire peut suffire pour la production des mycotoxines (Magan *et al.*, 2014). Une marge de 2 % permet de prendre en compte l'hétérogénéité de teneur en eau des grains. Pour réduire les coûts, il peut être économiquement valable de piloter les installations de stockage dans la zone d'incertitude (14,5-16,5 %), grâce à une surveillance continue de l'évolution de l'état sanitaire et physicochimique de la masse des grains. Du fait des restrictions d'usage des insecticides chimiques, le stockage sous atmosphère confinée, contrôlée ou modifiée est en plein essor. Il peut être décliné en sacs étanches ou dans des installations en dur. Il est réputé induire une augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> par respiration du grain et conduire à des conditions défavorables aux moisissures d'altération et à l'accumulation de mycotoxines après-récolte. Cependant, les concentrations en CO<sub>2</sub> efficaces contre la plupart des champignons mycotoxigènes s'avèrent très élevées (> 50 % CO<sub>2</sub>) (Magan *et al.*, 2010). C'est pourquoi l'inertage avec injection de CO<sub>2</sub> ou d'azote (N<sub>2</sub>) peut être une technique efficace et aisée à mettre en œuvre sur de faibles volumes, bien que plus onéreuse.

En somme, les évolutions des pratiques d'organisation de la chaîne de valeur des céréales ne devraient pas être source de nouveaux risques de contamination au stockage, si l'accompagnement des agriculteurs stockeurs est organisé. Une surveillance optimisée des gros stocks et un pilotage raisonné des installations devraient permettre aux opérateurs de s'approcher des valeurs critiques sans les dépasser et de répondre ainsi aux besoins de baisse des consommations énergétiques.

## Mycotoxines et économie circulaire

La filière céréalière, comme les autres productions agricoles, est engagée dans le développement d'une économie circulaire impliquant de nouvelles utilisations des coproduits et une valorisation de ce qui pouvait être considéré autrefois comme déchets. La problématique mycotoxine doit être prise en compte dans ces nouveaux usages. Nous l'illustrons ici avec deux exemples.

Les drèches de brasserie, qui sont riches en protéines, reviennent maintenant non seulement dans l'alimentation animale, mais aussi dans l'alimentation humaine sous différentes formes. Or, comme pour les sons, ces coproduits peuvent concentrer les mycotoxines présentes dans les grains initiaux ou se développant pendant le maltage, surtout AF, ZEN et OTA (Inoue *et al.*, 2013), ainsi que les enniatines.

La production de biogaz par digestion anaérobie est une alternative intéressante pour l'utilisation du maïs surcontaminé en mycotoxines, notamment en aflatoxines. Le digestat obtenu après son passage dans le réacteur à biogaz serait toujours caractérisé par des teneurs en AFB1 inférieures à la limite réglementaire pour l'alimentation animale, en raison de la réduction de la teneur en mycotoxines qui peut atteindre 69 % (Giorni *et al.*, 2018).

## ► Changements d'habitudes alimentaires et de consommation, et risque « mycotoxine »

L'augmentation de la consommation de certains aliments est susceptible de favoriser l'exposition des populations aux mycotoxines. Une étude de cas recensant les pratiques alimentaires émergentes en France a montré un accroissement des consommations de graines et graines germées, fruits à coque, laits végétaux, confitures maison, farines sans gluten (Eygue *et al.*, 2020). Ces aliments sont privilégiés par certains consommateurs réceptifs aux arguments nutritionnels réels ou supposés. Mais ce sont aussi des aliments particulièrement sensibles à la contamination par diverses mycotoxines. Selon une étude récente analysant des données du Système rapide d'alerte pour les aliments et l'alimentation animale (RASFF) de 1979 à 2020, le plus grand nombre de notifications est associé aux fruits à coque, aux produits à base de fruits à coque et aux graines, ainsi qu'aux fruits et légumes, avec en particulier des aflatoxines dans des pistaches et autres fruits à coque et de l'OTA dans des raisins secs d'importation (Pigłowski et Niewczas-Dobrowolska, 2023). Or, la tendance est à l'augmentation de la consommation de ces denrées. Ainsi, dans l'étude d'Eygue *et al.* (2020), la consommation régulière de fruits à coque a le score de risque pour la santé le plus élevé, en raison de l'occurrence de la contamination par les aflatoxines.

Les Études de l'alimentation totale (EAT) sont des études nationales de surveillance de la contamination des aliments et de l'exposition de la population à des substances d'intérêt en santé publique. EAT2 (Anses, 2011) montre que les produits à base de céréales sont souvent contaminés par DON, ZEN, OTA, même si aucun dépassement des limites maximales réglementaires n'est constaté. Une augmentation des teneurs de DON et de ses dérivés a cependant été notée entre EAT1 (2000-2004) et EAT2 (2006). Pains, produits de panification, pâtisseries et gâteaux contribuent aux trois quarts de l'exposition moyenne en DON des adultes.

La contamination par les toxines T2/HT2 non encore réglementées est également à surveiller. Avec une plus grande consommation de graines et de laits végétaux issus de céréales, les quantités journalières de ces mycotoxines ingérées pourraient augmenter. Par ailleurs, des messages de nutritionnistes mettent en avant l'intérêt des produits issus de farines complètes. Or des études sur le fractionnement des céréales par broyage à sec ont montré que des concentrations plus élevées de mycotoxines sont généralement présentes dans les sous-produits contenant du son, tandis que des concentrations plus faibles sont observées dans les produits dérivés de l'endosperme, c'est-à-dire la farine blanche et la semoule. Cependant, l'ampleur de la réduction des mycotoxines par le fractionnement des grains varie généralement en fonction de la mycotoxine et de sa concentration, du type et du cultivar de blé, de l'année de récolte et du processus de mouture (Schaarschmidt *et al.*, 2018).

De plus en plus de consommateurs se tournent vers des produits sans gluten qui sont obtenus à partir de céréales (avoine, millet, riz) dont la susceptibilité à la contamination par des mycotoxines est au moins aussi importante que celle du blé tendre (Giannioti *et al.*, 2023), quand ce ne sont pas des produits tirés du maïs qui est non seulement fortement susceptible d'être contaminé par les TCTB, mais aussi par des FUM et des AF. Des pseudo-céréales telles que sarrasin, amarante, quinoa ou

sorgho sont également utilisées ; le risque de contamination en mycotoxines de ces denrées reste insuffisamment documenté. Enfin, la consommation des farines de soja et autres légumineuses est aussi en expansion, alors que ces matrices peuvent aussi être contaminées par les AF, OTA, FUM, T2/HT2 (Acuña-Gutiérrez *et al.*, 2022). Tous ces grains entrent, par ailleurs, dans la composition de différents laits végétaux.

Finalement, l'utilisation croissante de farines sans gluten en remplacement de la farine de blé ne diminuera probablement pas le niveau d'exposition des consommateurs aux mycotoxines ; cette tendance pourrait même conduire à des modifications de composition des mélanges aux mycotoxines auxquels ils sont exposés. Globalement et paradoxalement, pour les meilleurs modèles alimentaires prônés par les experts en nutrition et les pouvoirs publics, les risques potentiels pour la santé dus aux contaminations en mycotoxines pourraient être amplifiés.

Dans le cadre des réglementations relatives à la sécurité sanitaire des aliments, les exploitants du secteur alimentaire et du secteur de l'alimentation animale ont l'obligation de veiller, à toutes les étapes de la production, de la commercialisation, de la transformation et de la distribution, à ce que les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux répondent aux prescriptions de la législation alimentaire. Pour cela, ils doivent vérifier le respect de ces prescriptions à tous les stades de la filière.

Cette notion de culture de la sécurité sanitaire a été introduite par le règlement UE 2021/382. Dans le cadre d'une filière fractionnée, chaque maillon de la chaîne est enclin à contrôler la qualité de ses approvisionnements et des plans de surveillance avec analyses de mycotoxines sont généralement mis en place. Dans le cadre des circuits courts, ces plans sont majoritairement inexistant, du fait des coûts d'analyse et d'une méconnaissance de la problématique des mycotoxines par les producteurs. Dans les faits, le circuit court se développe surtout à l'échelle locale, voire régionale, et entend se différencier de la grande distribution par la qualité des produits vendus. Il est présenté comme un choix gagnant-gagnant qui permet aux consommateurs de bénéficier des produits de saison tout en soutenant les producteurs de leurs territoires<sup>15</sup>. Or l'occurrence de produits présentant des taux significatifs de contamination en mycotoxines pourrait potentiellement être plus élevée dans les circuits courts que dans les filières traditionnelles, dans lesquelles les matières premières agricoles et aliments identifiés comme contaminés sont en principe non commercialisés. Cependant, l'augmentation supposée de ce risque pour les consommateurs n'est pas documentée à ce jour. Dans les exploitations agricoles pratiquant le stockage et la transformation de leur production à la ferme, il existe une diversité de pratiques qui se distinguent de celles d'exploitations intégrées dans des filières structurées. L'acquisition de données objectives et leur utilisation pour créer des outils de sensibilisation des agriculteurs en circuit court sont nécessaires.

---

15. <https://agriculture.gouv.fr/circuit-court> (consulté le 01/12/2023).

## ►► Conclusion

Les changements climatiques et les pratiques agricoles mises en œuvre pour répondre à la nécessité d'une production bas intrants et bas carbone affecteront le risque mycotoxique alimentaire. Les changements attendus concernent la distribution des mycotoxines et des émergences, avec des variations locales difficiles à prédire. Les leviers techniques connus de modulation des contaminations devront être affinés et adaptés simultanément à l'acquisition de nouvelles connaissances basées sur des approches holistiques. L'intégration de la problématique mycotoxines par tous les acteurs de la chaîne alimentaire devra être renforcée pour éviter que des pratiques, *a priori* environnementalement et nutritionnellement vertueuses, affectent négativement la sécurité sanitaire des aliments.

## ►► Références

- Acuña-Gutiérrez C., Jiménez V.M., Müller J., 2022. Occurrence of mycotoxins in pulses. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 21, 4002, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13008>.
- Anses, 2011. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) <https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER2006sa0361Ra1.pdf>.
- Battilani P., Toscano P., Van der Fels-Klerx H.J. *et al.*, 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 1, <https://doi.org/10.1038/srep24328>.
- Brodal G., Hofgaard I.S., Eriksen G.S. *et al.*, 2016. Mycotoxins in organically versus conventionally produced cereal grains and some other crops in temperate regions. *World Mycotoxin Journal*, 9, 755, <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2040>.
- Eygue M., Richard-Forget F., Cappelletti J.M. *et al.*, 2020. Development of a risk-ranking framework to evaluate simultaneously biological and chemical hazards related to food safety: Application to emerging dietary practices in France. *Food Control*, 115, 107279, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107279>.
- Giannioti Z., Albero B., Hernando M.D. *et al.*, 2023. Determination of regulated and emerging mycotoxins in organic and conventional gluten-free flours by LC-MS/MS. *Toxins*, 15, 155, <https://doi.org/10.3390/toxins15020155>.
- Giorni P.A., Pietrib A., Bertuzzi T. *et al.*, 2018. Fate of mycotoxins and related fungi in the anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 265, 554-557, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.077>.
- Infantino A., Belocchi A., Quaranta F. *et al.*, 2023. Effects of climate change on the distribution of *Fusarium* spp. in Italy. *Science of the Total Environment*, 882, 163640, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163640>.
- Inoue T., Nagatomi Y., Uyama A. *et al.*, 2013. Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77, 1410, <https://doi.org/10.1271/bbb.130027>.
- Leggieri M.C., Toscano P., Battilani P., 2021. Predicted Aflatoxin B1 increase in Europe due to climate change: actions and reactions at global level. *Toxins*, 13, 292, <https://doi.org/10.3390/toxins13040292>.
- Magan N., Aldred D., Mylona K. *et al.*, 2010. Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Additives and Contaminants*, 27, 644, <https://doi.org/10.1080/19440040903514523>.
- Magan N., Aldred D., Baxter E.S., 2014. Good postharvest storage practices for wheat grain, in Leslie J.F., Logrieco A.F. (éd.), *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, Oxford, Royaume-Uni, Blackwell, 309-326.

- Orlando B., Grignon G., Vitry C. *et al.*, 2019. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Research*, 35, 369, <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00363-x>.
- Pigłowski M., Niewczas-Dobrowolska M., 2023. Hazards in products of plant origin reported in the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) from 1998 to 2020. *Sustainability*, 15, 8091, <https://doi.org/10.3390/su15108091>.
- Schaarschmidt S., Fahl-Hassek C., 2018. The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 17, 556, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12338>.
- Tanguy A., Cabeza-Orcel P., 2023. Stockage à la ferme : les clés pour bien conserver les grains. *Perspectives agricoles*, 512, 50, <https://www.perspectives-agricoles.com/archives/512-07-2023>.
- Van der Fels-Klerx H.J., Liu C., Battilani P., 2016. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 95, 717, <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066>.
- Van der Lee T., Zhang H., Van Diepeningen A. *et al.*, 2015. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Additives and Contaminants Part A*, 32, 453, <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.984244>.
- Váry Z., Mullins E., McElwain J.C. *et al.*, 2015. The severity of wheat diseases increases when plants and pathogens are acclimatised to elevated carbon dioxide. *Global Change Biology*, 21, 2661-2669, <https://doi.org/10.1111/gcb.12899>.
- Vaughan M.M., Huffaker A., Schmelz E.A. *et al.*, 2014. Effects of elevated [CO<sub>2</sub>] on maize defence against mycotoxigenic *Fusarium verticillioides*. *Plant Cell and Environment*, 37, 2691, <https://doi.org/10.1111/pce.12337>.

## Liste des auteurs

---

**El Hassan Ajandouz**, Aix-Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, iSm2, 13013 Marseille, hassan.ajandouz@univ-amu.fr

**Imourane Alassane-Kpembé**, Centre de recherche en reproduction et fertilité, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, imourana.alassane-kpembé@umontreal.ca

**Nathalie Arnich**, Anses, Direction de l'évaluation des risques, 14 rue Pierre-et-Marie-Curie, 94701 Maisons-Alfort, nathalie.arnich@anses.fr

**Vessela Atanasova**, UR1264 MycSA, INRAE, 71 avenue Édouard-Bourlaux, 33883 Villenave-d'Ornon, vessela.atanasova@inrae.fr

**Jean-Denis Bailly**, LCA, ENVT, Université de Toulouse, INRAE, INPT, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, jean-denis.bailly@envt.fr

**Sylviane Bailly**, Mycoscopia, 3 rue Jean-Monnet, 31470 Fonsorbes, mycoscopia@gmail.com

**Stéphane Bernillon**, UR1264 MycSA, INRAE, 71 avenue Édouard-Bourlaux, 33883 Villenave-d'Ornon, stephane.bernillon@inrae.fr

**David Caron**, UR ABTE, ToxEMAC, Bioaérosols, biodiversité fongique, santé (BBS), Université de Caen Normandie, 14000 Caen, david.caron@unicaen.fr

**Monika Coton**, Lubem, Université de Brest, INRAE, 29280 Plouzané, monika.coton@univ-brest.fr

**Léna Dole**, Qualisud, Université de Montpellier, Cirad, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, lena.dole@umontpellier.fr

**Francis Fleurat-Lessard**, consultant, 376 route des anciens moulins, 24800 Saint-Pierre-de-Côle, francis.fl@orange.fr

**Angélique Fontana**, Qualisud, Université de Montpellier, Cirad, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, angelique.fontana@umontpellier.fr

**Florence Forget**, UR1264 MycSA, INRAE, 33883 Villenave-d'Ornon, France, florence.forget@inrae.fr

**David Garon**, UR ABTE, ToxEMAC, Bioaérosols, biodiversité fongique, santé (BBS), Université de Caen Normandie, 14032 Caen, david.garon@unicaen.fr

**Thierry Gauthier**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, thierry.gauthier@inrae.fr

**Philippe Guerre**, UMR IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, Toulouse, philippe.guerre@envt.fr

**Nolwenn Hymery**, UR 3882 LUBEM, Université de Brest, INRAE, 29280 Plouzané, nolwenn.hymery@univ-brest.fr

**Gwenaëlle Jard**, Food Science and Nutrition Department, INP EI Purpan, Université de Toulouse, 31076 Toulouse, gwenaëlle.jard@purpan.fr

**Claudia López Rodríguez**, Applied Mycology Group, Environment and AgriFood Theme, Cranfield University, Cranfield, Angleterre, Claudia.Lopez@cranfield.ac.uk

**Sophie Lorber**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, sophie.lorber@inrae.fr

**Marc Maresca**, Aix-Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, iSm2, 13013 Marseille, m.maresca@univ-amu.fr

**Florence Mathieu**, Laboratoire de Génie chimique, Ensat, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 31326 Toulouse, florence.mathieu@ensat.fr

**Atika Meklat**, LBSM, Laboratoire de Biologie des systèmes microbiens, École normale supérieure de Kouba, Algiers, Algérie, atika.meklat@g.ens-kouba.dz

**Benoît Méléard**, Arvalis, Institut du Végétal, station expérimentale, 91720 Boigneville, b.meleard@arvalis.fr

**Béatrice Orlando**, Institut du végétal, Arvalis, 91720 Boigneville, b.orlando@arvalis.fr

**Isabelle Oswald**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, isabelle.oswald@inrae.fr

**Philippe Pinton**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, philippe.pinton@inrae.fr

**Olivier Puel**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, olivier.puel@inrae.fr

**Graziella Rigal**, FranceAgriMer, Laboratoire de La Rochelle, 34 rue Chef de Baie, 17006 La Rochelle, graziella.rigal@franceagrimer.fr

**Marie-Hélène Robin**, UMR Agir, INRAE Agro-physio agroécologie, 31076 Toulouse, mh.robin@purpan.fr

**Jean-Michel Savoie**, UR1264 MycSA, INRAE, 33883 Villenave-d'Ornon, jean-michel.savoie@inrae.fr

**Sabine Schorr-Galindo**, Qualisud, Université de Montpellier, Cirad, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, sabine.galindo@umontpellier.fr

**Virginie Séguin**, UR ABTE, ToxEMAC, Bioaérosols, biodiversité fongique, santé (BBS), Université de Caen Normandie, 14032 Caen, virginie.seguin@unicaen.fr

**Selma Snini**, Laboratoire de génie chimique, Ensat, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 31326 Toulouse, selma.snini@ensat.fr

**Laura Soler-Vasco**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, laura.soler-vasco@inrae.fr

**Caroline Strub**, Qualisud, Université de Montpellier, Cirad, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, caroline.strub@umontpellier.fr

**Carole Verheecke-Vaessen**, Applied Mycology Group, Environment and AgriFood Theme, Cranfield University, Cranfield, Angleterre, C.Verheecke@cranfield.ac.uk

**Chrystian Zetina-Serrano**, UMR1331 Toxalim, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, Chrystian-Del-Carmen.Zetina-Serrano@inrae.fr



En couverture : Épis de maïs colonisés par *Fusarium graminearum* © MYCSA/INRAE.

**Édition**

Mickaël Legrand

**Mise en page**

 EliLoCom

Dépôt légal en novembre 2024



Les mycotoxines sont des métabolites qui peuvent s'avérer toxiques pour l'humain et l'animal. Produites et excrétées par des champignons microscopiques, elles contaminent les cultures au champ ou lors du stockage.

Les mycotoxines peuvent engendrer des problèmes de santé publique, mais aussi animale et environnementale, ainsi que des pertes économiques importantes pour les filières. Face au danger qu'elles représentent, les agences publiques ont entrepris d'évaluer le risque lié à leur présence dans les chaînes alimentaires humaine et animale, et les pouvoirs publics ont instauré des réglementations et recommandations régissant leurs teneurs dans les denrées.

De plus, certains facteurs modifient les profils de contamination des aliments. C'est le cas du dérèglement climatique, avec en particulier l'émergence d'espèces fongiques productrices de mycotoxines qui, jusqu'alors, contaminaient des denrées d'origine tropicale. Les changements de pratiques, du champ au stockage, notamment avec le développement de l'agroécologie, peuvent également favoriser le développement de certaines mycotoxines. Par ailleurs, de nouvelles habitudes alimentaires, dont la réduction des protéines animales au bénéfice de protéines végétales, impactent aussi le profil d'exposition des consommateurs. Toutes ces évolutions constituent des défis majeurs pour la communauté scientifique, les filières et les pouvoirs publics.

Cet ouvrage destiné aux étudiants, aux chercheurs et enseignants, aux acteurs des filières agricoles et agro-industrielles, ainsi qu'aux agences sanitaires, synthétise les connaissances sur cette classe de contaminants naturels des aliments, et s'attache à définir les enjeux de leur présence dans un monde en perpétuel changement.

**Isabelle Oswald** est directrice de recherche à INRAE au sein de l'UMR Toxicologie alimentaire (Toxalim) à Toulouse, et experte auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), et du Comité mixte FAO-OMS d'experts des additifs alimentaires (Jecfa).

Directrice de recherche à INRAE Bordeaux, **Florence Forget** dirige l'unité Mycologie et sécurité des aliments (MycSA), dont les travaux visent à décrypter les mécanismes de contamination par les mycotoxines afin d'en maîtriser le risque.

Ingénieur de recherche à INRAE au sein de l'UMR Toxalim, **Olivier Puel** est responsable d'une équipe qui étudie la biosynthèse et la toxicité des mycotoxines.

éditions  
**Quæ**

Éditions Cirad, Ifremer, INRAE  
[www.quae.com](http://www.quae.com)

**INRAE**

35 €

ISBN: 978-2-7592-3975-7



9 782759 239757

ISSN : 1777-4624

Réf. commerciale: 02969