

## Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles : une revue

Bart Huybrechts  
Emmanuel Kossi Tangni  
Philippe Debongnie  
Jorina Geys  
Alfons Callebaut

Centre d'étude et de recherches  
vétérinaires et agrochimiques  
(CODA-CERVA)  
Direction opérationnelle sécurité chimique  
de la chaîne alimentaire  
Unité toxines et substances naturelles  
Leuvensesteenweg 17  
3080 Tervuren  
Belgique  
<bahuy@coda-cerva.be>  
<emtan@coda-cerva.be>  
<phdeb@coda-cerva.be>  
<jogey@coda-cerva.be>  
<alcal@coda-cerva.be>

### Résumé

En raison de la présence inévitable des mycotoxines dans les produits agricoles et de leurs toxicités potentielles pour l'homme et les animaux, il s'avère impératif qu'elles soient détectées et éliminées de la chaîne alimentaire. Cette revue discute des méthodes analytiques conventionnelles et émergentes reposant sur les avancées technologiques récentes dans l'analyse de mycotoxines. Bien que la plupart des méthodes analytiques officielles soient chromatographiques (avec détecteur ultraviolet ou fluorescence), des stratégies alternatives comme les méthodes immunochimiques et le recours à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont connu une percée importante sur le marché et sont de plus en plus utilisées de par la relative simplicité de l'extraction et la multidétection des mycotoxines avec une sensibilité plus élevée. Le défi des technologies naissantes est de démontrer des avantages par rapport aux méthodes conventionnelles souvent utilisées comme méthodes officielles.

**Mots clés :** chromatographie ; criblage ; méthodes analytiques ; mycotoxines ; produits agricoles.

**Thèmes :** méthodes et outils ; pathologie ; productions végétales ; qualité et sécurité des produits.

### Abstract

#### A review of analytical methods for determining mycotoxins in agricultural products

Due to their unavoidable presence in agricultural products and their potential risk for human and animal health, it is imperative that mycotoxins be detected and removed from the food chain. This review reports both established conventional and emerging methods based on recent advances in mycotoxin analyses. Although most official detection methods are chromatographic (coupled with an ultraviolet or fluorescence detector), alternative strategies such as immunochemical methods and liquid chromatography coupled with mass spectrometry have seen a major breakthrough on the commercial market. They comport the advantages of making simple extraction possible along with high sensitivity multidetection. Emerging technologies are of potential application in the analysis of mycotoxins and may demonstrate advantages over the more conventional and well established techniques used as official analytical methods.

**Key words:** agricultural products; analytical method; chromatography; mycotoxins; screening.

**Subjects:** pathology; product quality and security; tools and methods; vegetal productions.

Tirés à part : E.K. Tangni

Pour citer cet article : Huybrechts B, Tangni EK, Debongnie P, Geys J, Callebaut A, 2013. Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles : une revue. *Cah Agric* 22 : 202-15. doi : 10.1684/agr.2013.0616

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de champignons microscopiques qui peuvent se développer sur la plante au champ ou en cours de récolte, transport ou stockage. Ces toxines se trouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées végétales, notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, graines, fourrages ainsi que les aliments composés ou manufacturés provenant de ces matières premières et destinés à l'alimentation humaine ou animale. En conséquence, les produits tels que les œufs, lait, abats (reins, foie) provenant d'animaux préalablement exposés sont aussi contaminés par les mycotoxines. La production de ces molécules est directement liée au développement fongique et peut grandement varier en fonction des paramètres environnementaux qui influent sur la croissance fongique. Les mycotoxines les plus connues sont les aflatoxines, déoxynivalénol, ochratoxine A, fumonisines, zéaralénone, patuline, toxines T2 et HT2. D'autres mycotoxines moins fréquemment détectées, selon les produits agricoles, sont les nivalénol, moniliformine, citrinine, acide pénicillique, roquefortine, acide mycophénolique, stérigmatocystine, acide cyclopiazonique, verruculogène, griséofulvine, citréoviridine, gliotoxine, monacolone ou mévinoline, sporidesmines, satratoxines, enniatines, beauvéricine, les alcaloïdes d'ergot, etc. Leur diversité structurale se traduit par une grande variété de mécanismes d'actions et d'effets toxiques aigus et surtout chroniques sur la santé animale et humaine (Sweeney et Dobson, 1998). En plus des effets néfastes sur la santé, la contamination inévitable par les mycotoxines occasionne d'importantes pertes économiques. Pour la Hongrie, les pertes directes et indirectes occasionnées par la contamination du blé en 1998 sont estimées à 100 millions d'euros (Miličević *et al.*, 2009). Selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), plus de 25 % de la production agricole mondiale est contaminée par des mycotoxines (FAO, 2003). Face à cette situation, la plupart des pays ont adopté des règlements pour limiter les risques pour l'alimentation animale et humaine. En Europe, les règlements de la Commission européenne (CE 1881/2006, 1126/2007, 105/2010) couvrent les aflatoxi-

nes, l'ochratoxine A, la patuline et les mycotoxines de *Fusarium* telles que le déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines dans les aliments destinés à la consommation humaine et animale. Les limites pour les toxines T2 et HT2 sont actuellement à l'étude. Il s'avère donc nécessaire de veiller à l'occurrence des mycotoxines dans les denrées alimentaires. Des efforts sont déployés par les analystes pour développer et valider les méthodes et fiabiliser les résultats analytiques puisque d'importantes décisions de retrait ou d'interdiction d'utilisation de matières premières ou de denrées alimentaires peuvent reposer sur ces résultats. La présente revue vise à présenter la situation des méthodes analytiques conventionnelles et émergentes incluant les techniques de dépistage rapide des mycotoxines dans les matrices agricoles. Un accent particulier est mis sur l'importance que revêt la préparation des échantillons et sur les pièges que présente l'analyse de mycotoxine.

## Approches analytiques

Pour l'analyse des mycotoxines habituellement présentes à l'état de traces, il existe une panoplie de méthodes catégorisées en deux groupes : les méthodes rapides de criblages comme les méthodes immunologiques et la chromatographie sur couche mince (CCM) et les méthodes quantitatives comme les chromatographies liquides ou gazeuses (HPLC et GC), basées essentiellement sur la séparation chromatographique des molécules puis leur détection par fluorimétrie ou spectrométrie. Avant leur quantification, les mycotoxines présentes dans les produits agricoles sont d'abord extraites et parfois purifiées avant d'être détectées.

## Préparation d'échantillons et préconcentrations

L'une des étapes cruciales pour la détermination qualitative ou quantitative de différentes mycotoxines est la préparation d'échantillons et la préconcentration d'analytes. Les mycotoxines

sont généralement extraites d'échantillons moulus (cas des solides), soumis à une agitation ou trituration par homogénéiseur disperseur ultraturrax après ajout de solvants organiques polaires ou apolaires purs ou en mélange (eau, acétonitrile, méthanol, éthanol, chloroforme, acétate d'éthyle, dichlorométhane) (Langseth et Rundberget, 1998 ; Krska et Josephs, 2001). La tendance de ces dernières années pour la préparation d'échantillons réside dans la minimisation de l'utilisation de solvants, particulièrement les solvants chlorés et ceux qui sont nocifs à l'environnement et à la santé. Aussi, la miniaturisation des procédures analytiques est-elle envisagée de manière à réduire à une plus petite dimension la prise d'échantillon et les solvants tout en maintenant l'efficacité de l'approche analytique. La purification de l'extrait est souvent une étape inévitable dans l'analyse des mycotoxines. Elle repose sur les techniques d'extraction liquide-liquide (LLE), sur l'utilisation des colonnes à phase solide (*solid-phase extraction* [SPE]) ou des colonnes d'immunoaffinité (*immuno-affinity column* [IAC]).

### Extraction liquide-liquide

Cette vieille technique reste encore utilisée pour la préparation d'échantillons à l'aide de solvants comme l'acétonitrile, le chloroforme, le méthanol, l'acétate éthylique, etc. Elle s'applique aussi bien aux échantillons liquides que solides. Pour ces derniers, une préétape d'extraction est nécessaire. Différents modes peuvent être utilisés, comme l'extraction conventionnelle de Soxhlet ou l'extraction ultrasonique. Les composés thermiquement moins stables présentent un inconvénient quant à l'utilisation de Soxhlet. Des techniques plus récentes incluent l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction par liquide pressurisé (PLE), également connue sous le nom d'extraction par solvant accélérée (ASE) et l'extraction assistée par micro-ondes (MAE). Elles exigent moins de solvant et présentent habituellement une meilleure efficacité d'extraction (en termes de rendement).

### Extraction en phase solide

Pour les trichothécènes, les principales colonnes utilisées pour la

purification des extraits sont les colonnes MycoSep, SPE silice et SPE Florisil (Omurtag et Yazicioglu, 2001 ; Mateo *et al.*, 2001). Elles contiennent différents adsorbants comme le charbon, la célite et une résine échangeuse ionique (Langseth et Rundberget, 1998). Les colonnes MycoSep sont les plus utilisées et les plus disponibles dans le commerce, capables d'éliminer rapidement des extraits crus, les interférences provenant des matrices. Les composés interférents adhèrent aux adsorbants de la colonne et laissent passer ainsi l'extrait purifié par un fritté. Ces colonnes permettent la purification simultanée et rapide de plusieurs types de mycotoxines.

Des colonnes d'immunoaffinité (IAC) basées sur des anticorps sont également utilisées (Cahill *et al.*, 1999 ; Pascale *et al.*, 2003). Elles constituent un alternatif plus spécifique de purification des mycotoxines à l'aide d'anticorps de mycotoxines fixés sur une surface, le tout conditionné dans une colonne. L'extrait dilué est appliqué à la colonne. Les toxines adhèrent aux anticorps et la majeure partie de l'extrait potentiellement non ciblée est éliminée par une étape de lavage. La toxine est alors éluée en perturbant le complexe anticorps-mycotoxine par sa dénaturation à l'aide d'un solvant. La spécificité des anticorps fournit des extraits plus propres comparés à d'autres méthodes de purification et confère bonne précision, exactitude et sensibilité aux méthodes analytiques. Les colonnes disponibles dans le commerce sont dédiées aux analyses des aflatoxines, de l'ochratoxine A, des fumonisines, zéaralénone, déoxynivalénol, toxines T2/HT-2. Toutefois, l'IAC n'est pas entièrement sélective vis-à-vis des analogues de mycotoxines (3AcDON, 15AcDON) ou d'autres métabolites comme le déépoxyDON (Valenta et Danicke, 2005). Le problème principal concernant la purification par IAC réside dans une éventuelle dénaturation des anticorps en présence même de basses concentrations de solvants organiques, ce qui augmente les dépenses. Une forte dilution de l'extrait peut permettre de surmonter ce problème, bien qu'elle puisse causer une perte de sensibilité. La capacité d'IAC peut également constituer un facteur limitant son utilisation dans une méthode préparative et même analytique (pour les fortes concentrations).

Des phases stationnaires reposant sur le principe des polymères à empreinte moléculaire (MIP) émergent actuellement, leur sélectivité est équivalente à celle des IAC à anticorps polyclonaux. Un intérêt croissant est observé et découle de leurs faibles coûts, d'une préparation facile, d'une stabilité chimique élevée et d'une longue durée de conservation. Les MIP sont les polymères réticulés synthétisés par la réaction d'un monomère et d'un éditeur absolu en présence de l'analyte concerné. Après polymérisation, l'analyte est éliminé quittant les emplacements d'identification spécifiques à l'intérieur des polymères (Ali *et al.*, 2010).

### Autres alternatives

Comme alternative à l'utilisation des SPE, la micro-extraction en phase solide (*solid phase microextraction* [SPME]) est rapportée et repose sur l'utilisation des fibres enduites de différentes phases stationnaires sur lesquelles les analytes provenant d'extraits liquides ou gazeux sont adsorbés. La désorption peut être effectuée thermiquement en combinaison avec l'analyse par chromatographie gazeuse ou avec différents solvants suivis d'analyse par HPLC, comme c'est le cas avec l'ochratoxine A, l'acide cyclopiazonique et l'acide mycophénolique (Cigic et Prosen, 2009).

L'extraction par dialyse diphasique pour la détermination de patuline et l'utilisation de colonnes capillaires de silice fondue comme piège de la toxine T2 d'extraits aqueux ont été aussi rapportées, de même que la purification d'extraits avec l'addition de produits chimiques spécifiques, comme l'acétate de zinc, le carbonate d'hydrogène et le polyéthylène glycol (PEG), l'hydroxy-acétate de plomb. La plupart du temps, ces techniques visent à précipiter certaines substances de matrice, comme les acides gras. La majorité de ces procédures a été décrite pour la détermination de l'ochratoxine A dans différentes matrices.

Le choix d'une méthode analytique appropriée dépend de son usage, de facteurs tels que sa rapidité, sa sensibilité, son exactitude, du niveau de compétence exigée pour l'analyse et du coût. Les méthodes se rangent fondamentalement dans deux catégo-

ries importantes : celles qui peuvent être conduites avec une formation minimale dans les laboratoires (analyses de dépistage rapide) et celles qui doivent être conduites par un personnel qualifié de laboratoires d'analyses.

## Méthodes de dépistage rapide (criblage)

Eu égard aux diversités d'échantillons, à leur grand nombre, aussi bien qu'à la diversité chimique et l'occurrence simultanée des mycotoxines dans les échantillons, un besoin de méthodes rapides de multi-analytes adaptées aux diverses matrices s'avère nécessaire. Ces méthodes devraient être assez sensibles pour détecter les mycotoxines au-dessous des limites légalement imposées.

### Méthodes immunochimiques

Les tests immunochimiques sont basés sur les interactions entre les anticorps et les antigènes que constituent les mycotoxines. Les anticorps doivent être fortement spécifiques pour identifier les composés structurellement très différents. Les analyses immunochimiques telles que l'*enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) sont devenues très populaires dans le criblage de mycotoxines (Zheng *et al.*, 2006). Plusieurs études ont développé et utilisé les méthodes immunochimiques pour l'analyse des trichothécènes, l'ochratoxine A, la zéaralénone et la fumonisine B<sub>1</sub> dans les céréales (De Saeger et van Peteghem, 1999 ; Krška et Josephs, 2001). Généralement, l'ELISA n'exige pas de procédures de nettoyage des extraits contenant la mycotoxine qui est directement analysée. En dépit de leur manque d'exactitude aux concentrations très basses et des fixations de concentrations maximales au-delà desquelles une confirmation chromatographique est nécessaire, l'ELISA fournit des analyses rapides et peu coûteuses lors des criblages. Cependant, l'interférence de matrice ou la présence des mycotoxines structurellement connexes (réactions croisées) peut interférer dans la liaison du conjugué et de l'anticorps (Tangni

*et al.*, 2010), menant à des erreurs dans des mesures quantitatives des mycotoxines. Les kits ELISA devraient être habituellement utilisés en routine lors des criblages d'un grand nombre d'échantillons. Des analyses de confirmation par des méthodes plus robustes, par exemple la chromatographie liquide sous haute pression avec la purification par IAC ou avec la MS sont exigées pour les niveaux de contamination qui approchent les limites légales CE 1881/2006, 1126/2007, 105/2010. Plusieurs kits d'ELISA ont été développés et commercialisés pour des analyses qualitatives, semi-quantitatives ou quantitatives des mycotoxines par les sociétés Romerlabs, Neogen Corporation, Charm, AOKIN, EuroProxima, R-Biopharm, Transia, LCTech, TecnaLabs, Vicam, etc. Les méthodes immunochimiques peuvent créer des faux positifs qui entraînent une surestimation des résultats. Les limites de détection sont en général élevées (Milićević *et al.*, 2009).

## Chromatographie sur couche mince

La CCM permet une détection qualitative et semi-quantitative des mycotoxines. Elle a l'avantage d'être rapide et peut traiter plusieurs échantillons en parallèle. Mais elle est peu sensible. La CCM a été la première technique utilisée pour l'analyse des mycotoxines. Cette technique est simple et peu coûteuse mais fournit des résultats plus fluctuants que les techniques chromatographiques liquides et gazeuses. Néanmoins, la CCM reste encore d'application dans beaucoup de laboratoires et la CCM haute performance peut être utilisée comme méthode de criblage (Krska et Josephs, 2001). Plusieurs auteurs, et notamment Omurtag et Yazicioglu (2001), ont utilisé les techniques CCM pour l'analyse des mycotoxines dans les céréales.

## Cas des technologies immunochimiques émergentes

La détection rapide de plusieurs toxines constitue un créneau porteur pour les nouvelles technologies de détec-

tion de mycotoxines. Il est envisageable d'utiliser les technologies immunochimiques basées sur les anticorps pour les détections multiples. La miniaturisation de ces méthodes immunochimiques favorise également la fabrication de kits portatifs.

Des « tiges » immunochimiques (*lateral flow devices* [LFD]) permettent une détection rapide basée sur l'interaction entre les anticorps spécifiques, immobilisés sur une bande de membrane et des récepteurs anticorps coâtés (latex ou colloïdal), qui réagissent avec l'analyte pour former un complexe d'analyte-récepteur. Les LFD ont été développés et sont disponibles dans le commerce pour la détermination des aflatoxines, des fumonisines, du déoxynivalénol, de l'ochratoxine A, des toxines T2 et HT2 dans les céréales, les produits céréaliers et le vin. Les lecteurs de bande photométriques portatifs permettent l'analyse quantitative, semi-quantitative ou qualitative des concentrations de ces toxines (Goryacheva *et al.*, 2009).

Le test *enzyme-linked immuno filtration assay* (ELIFA) est un outil jetable (après emploi) basé sur l'utilisation d'une membrane au travers de laquelle l'écoulement est dirigé parallèlement (à l'opposé des LFD avec écoulement perpendiculaire), analogue à la CCM. Le procédé immunologique de polarisation par fluorescence (*fluorescence polarisation immunoassay* [FPIA]) est une technique simple qui mesure des interactions entre un antigène en solution fluorescent marqué (marqueur, traceur ou label) et un anticorps spécifique. Le marqueur peut être radioactif dans le cas du test radio-immunos dosage (rarement utilisé) ou une réaction composée chromogène ou fluorogénique. Les FPIA sont développés pour la détermination rapide d'aflatoxines, zéaralénone, fumonisines ou déoxynivalénol. À la différence de la plupart des techniques déjà citées, le test FPIA se développe en solution et ne nécessite pas la fixation de l'anticorps ou de l'antigène à un support solide (Maragos, 2004).

Des biodétecteurs immunochimiques qui utilisent la résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance* [SPR]) ou des biocapteurs de surfaces d'électrodes de carbone (*screen-printed carbon electrodes*) ont été décrits pour la détection des mycotoxines dans les céréales (Prieto-Simon *et al.*,

2007). Des tests compétitifs basés sur la SPR ont été récemment décrits pour la détermination de déoxynivalénol dans le blé, avec ou sans nettoyage d'extrait. Une bonne corrélation existe entre la concentration de déoxynivalénol mesurée avec ce biodétecteur et les méthodes de référence. Des ELISA basés sur les électrodes de *screen-printed carbon electrodes* (SPCE) ont été aussi utilisés pour la détermination quantitative de l'ochratoxine A dans le blé. Les résultats confirmés par HPLC/IAC révèlent une bonne concordance pour les échantillons de blé naturellement contaminés.

Récemment, les *enzyme-linked aptamer assays* (ELAA) basés sur les molécules aptamères ont été utilisés pour une détection rapide de l'ochratoxine A dans le vin. Les aptamères sont des oligonucléotides (ADN ou ARN) sélectionnés à partir d'une banque aléatoire de séquences selon leur aptitude à reconnaître une cible. Ces aptamères présentent des affinités et spécificités comparables à celles des anticorps pour des molécules variées telles que les mycotoxines. Comparés aux anticorps, ils ont l'avantage d'être synthétisés chimiquement et ne nécessitent pas l'utilisation d'animaux. Moins chers, ils peuvent être choisis de manière spécifique contre les cibles toxiques ou peu immunogènes. En outre, la fonction des aptamères immobilisés peut être facilement régénérée, ce qui permet leur réutilisation. En raison de ces avantages, les aptamères constituent une alternative plausible aux anticorps ou autres biorécepteurs dans le développement des techniques analytiques (Barthelmebs *et al.*, 2011).

## Méthodes de séparation et de quantification

Les méthodes de chromatographie gazeuse couplée aux détecteurs à ionisation de flamme (*flamme ionization detector* [FID]), *electron capture detector* (ECD) et spectrométrie de masse (MS) étaient les méthodes les plus couramment employées pour la détermination quantitative simultanée des trichothécènes dans les céréales et les produits dérivés. La chromatographie gazeuse couplée à un détecteur

MS (GC/MS) offre l'avantage de la confirmation de l'identité des pics chromatographiques et peut être aussi utilisée pour détecter plusieurs mycotoxines simultanément (Tanaka *et al.*, 2000). Comme la plupart des mycotoxines ne sont pas volatiles, la dérivation est une étape obligatoire avant les analyses par GC (Langseth et Rundberget, 1998 ; Krska *et al.*, 2001), ce qui complique davantage l'étape de préparation des échantillons et augmente le coût des analyses. Les trichothécènes doivent être normalement dérivés afin d'atteindre la volatilité et la sensibilité voulue par l'analyse GC. Elle est donc réservée à l'étude de mycotoxines qui peuvent être volatilisées par dérivation comme les trichothécènes principalement de type A. La dérivation des trichothécènes est généralement basée sur celle des groupements hydroxyles afin de former des dérivés triméthylsilyl (TMS), trifluoroacétyl (TFA), pentafluoropropionyl (PFP) ou heptafluorobutyryl (HFB) (Langseth et Rundberget, 1998). Le *tableau 1* décrit

quelques méthodes d'analyse des trichothécènes par GC.

La chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) couplée aux détecteurs à ultraviolet (UV), à barrette diode (*photo diode array* [PDA]) ou à fluorescence (FD) est actuellement la technique de référence la plus couramment employée pour l'analyse des mycotoxines des produits agricoles. Des réactifs spécifiques de dérivation des mycotoxines non fluorescentes ont été développés pour former les dérivés fluorescents. La détection par fluorescence est la meilleure alternative face au manque de sensibilité de la détection UV. Grâce au couplage avec la fluorimétrie, elle peut atteindre des limites de détection très faibles (de l'ordre de 10 ng/kg). Elle est combinée à une étape préalable de purification (SPE, IAC). Le *tableau 2* décrit quelques méthodes d'analyse des trichothécènes par HPLC.

À côté de ces techniques chromatographiques traditionnelles, les analystes ont recours à la MS qui s'est principalement développée comme

une technique de confirmation des mycotoxines. De nos jours, la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS et surtout LC-MS/MS) est de plus en plus utilisée pour quantifier plusieurs mycotoxines ou métabolites associés (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2002 ; Spanjer *et al.*, 2008 ; Monbaliu *et al.*, 2010) car elle permet une détection simultanée de plusieurs composés. La LC-MS/MS peut quantifier un ensemble de molécules contenues dans un échantillon, vu sa spécificité. Les différentes mycotoxines sont séparées sur une échelle de temps par leur élution différentielle, ce qui permet l'évaluation dans l'espace de l'ensemble des entités moléculaires présentes dans un échantillon (*figure 1*). La LC-MS/MS s'est également avérée être une technique puissante pour la détermination des mycotoxines masquées (par exemple déoxynivalénol-glucoside) ou conjuguées à des substances plus polaires (par exemple l'acide glucuronique) (Zöllner et Mayer-Helm, 2006 ; Berthiller *et al.*, 2009). Les toxines conjuguées ne sont

**Tableau 1. Quelques méthodes utilisées pour l'analyse par chromatographie gazeuse des trichothécènes dans les céréales.**

Table 1. Some analytical methods used for determining trichothecenes in cereal by gas chromatography.

Toxines analysées	Extraction	Purification	Dérivation	Séparation, détection	Références
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON, FusX, T2, HT2, DAS, SCT, VER	ACN-eau	Charbon/alumine	HFBA	GC-ECD	Croteau <i>et al.</i> (1994)
DON	ACN-eau	C18-alumine	TMSI-TMCS	GC-ECD	Tacke et Casper (1996)
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON, FusX	ACN-eau	MycoSep	Sylon BTZ	GC-ECD	Weingaertner <i>et al.</i> (1997)
DON, NIV, DAS, T2, HT2, FusX	ACN-eau	Florisol/C18 ou MycoSep	TFAA	GC-ECD	Radova <i>et al.</i> (1998)
NIV, DON, 3AcDON, T2, HT2, 15AcDON, FusX	ACN-eau	Florisol et échange cationique	TFAA	GC-MS	Schollenberger <i>et al.</i> (1998)
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON	ACN-eau	MycoSep	HFBA	GC-ECD	Walker et Meier (1998)
NIV, DON, 3AcDON, FusX, T2, NEO, DAS, ZEN	ACN-eau	Florisol	TMSI-TMCS-acétate d'éthyle	GC-MS	Tanaka <i>et al.</i> (2000)

DAS : diacétoxyscirpénol ; SCT : scirpentriol ; VER : verrucarol ; ACN : acétonitrile ; NIV : nivalénol ; DON : déoxynivalénol ; 3AcDON : 3-acétyl DON ; 15AcDON : 15-acétyl DON ; FusX : fusarénone X ; T2 : toxine T2 ; HT2 : toxine HT2 ; NEO : néosolaniol ; ZEN : zéaralénone.

**Tableau 2. Description des méthodes habituellement utilisées pour l'analyse des mycotoxines dans les céréales par chromatographie liquide.**

Table 2. Analytical methods usually used for determining mycotoxins in cereal by HPLC.

Toxines analysées	Extraction	Purification	Phase mobile	Séparation, détection	Références
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON	ACN-eau	MycoSep	ACN-eau	HPLC-DAD	Walker et Meier (1998)
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON, FusX, T2, HT2, DAS, NEO	ACN-eau	MycoSep	MeOH-eau	LC-MS	Berger <i>et al.</i> (1999)
DON	ACN-eau	IAC (DONTTest)	ACN-eau	HPLC-UV	Cahill <i>et al.</i> (1999)
NIV, DON	ACN-eau	MycoSep	ACN-MeOH-eau	LC-MS (APCI)	Razzazi-Fazeli <i>et al.</i> (1999)
T2, HT2, NEO, DAS	ACN-eau	Florisil	ACN-eau-acide acétique	HPLC-Fluo	Jimenez <i>et al.</i> (2000)
T2, HT2	ACN-eau	C18	MeOH-eau	HPLC-UV	Omurtag et Yazicioglu (2001)
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON	MeOH-eau ACN-eau	Florisil ou silice MycoSep	ACN-eau-acide acétique	HPLC-UV-Fluo	Mateo <i>et al.</i> (2001)
DON, T2	-	-	MeOH-eau	LC-MS (ESI)	Moncur (2002)
T2, HT2, DAS, MAS, NEO, acetyl T2	ACN-eau	MycoSep	ACN-acétate d'ammonium	LC-MS (APCI)	Razzazi-Fazeli <i>et al.</i> (2002)
T-2	MeOH-eau	IAC (T-2Test)	ACN-eau	HPLC-Fluo	Pascale <i>et al.</i> (2003)
NIV, DON	ACN-eau	MycoSep	MeOH-eau-acide acétique	LC-MS/MS (APCI-ESI)	Plattner et Maragos (2003)
NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON, FusX, T2, HT2, DAS	ACN-eau	MycoSep	MeOH-eau	HPLC-Fluo	Dall'Asta <i>et al.</i> (2004)
OTA	ACN-3 % CH <sub>3</sub> COOH	SPE-SAX	ACN-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HPLC-Fluo	Biancardi et Riberzani (1996)
OTA	Dichlorométhane- EtOH-eau- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Extraction liquide-liquide	ACN-eau-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HPLC-Fluo	Jorgensen <i>et al.</i> (1996)
OTA	Chloroforme- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	IAC	ACN-eau-acide acétique	HPLC-Fluo	Solfrizzo <i>et al.</i> (1998)
OTA	ACN-eau	IAC	ACN-eau-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HPLC-Fluo	Scudamore et MacDonald (1998)
ZEN	ACN	IAC	ACN-eau	HPLC-Fluo	Schuhmacher <i>et al.</i> (1998)
ZEN	ACN-eau	IAC	ACN-eau-MeOH	HPLC-Fluo	Visconti et Pascale (1998)

Tableau 2. (Suite)

Toxines analysées	Extraction	Purification	Phase mobile	Séparation, détection	Références
ZEN	ACN-eau	MycoSep 224	MeOH-eau	HPLC-Fluo	Silva et Vargas (2001)
FB <sub>1</sub> et FB <sub>2</sub>	ACN-eau	SAX	ACN-eau-acide acétique	HPLC-Fluo	Bennett et Richard (1994)
FB <sub>1</sub> et FB <sub>2</sub>	ACN-MeOH-eau	IAC	MeOH-tampon phosphate	HPLC-Fluo	Visconti <i>et al.</i> (2001)

Pour fumonisines, dérivatisant : O-phthaldialdéhyde (OPA), naphthalène-2,3 dicarboxaldéhyde ou 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidyl carbamate. MeOH : méthanol ; ACN : acétonitrile ; GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse ; GC-FID : chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme ; HPLC-UV : chromatographie liquide à haute performance avec détection ultraviolette ; HPLC-Fluo : chromatographie liquide à haute performance avec détection par fluorescence ; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse du type triple quadropole « en tandem ».

pas détectées par des méthodes analytiques habituelles mais sont capables de libérer leurs précurseurs toxiques (les toxines natives) après digestion. Les avantages de cette méthode résident aussi dans la relative simplicité de la préparation des échantillons des mycotoxines et dans son coût de plus en plus abordable. Les limites de détection sont très basses (ng/kg). La spécificité, la possibilité de quantifier plusieurs mycotoxines en une fois, la sensibilité et la simplification de la préparation de l'échantillon font que la

LC-MS/MS est pour le moment la technique la plus prometteuse en analyse de mycotoxines. Néanmoins, il faut dire que l'effet matrice est un désavantage de cette technique, qui fait que le développement d'une méthode prend du temps et nécessite une certaine expertise. Le développement d'une méthode LC-MS/MS normalisée n'a pas encore débuté. L'effet matrice ou interférence matricielle est dû au fait que des composants inconnus influencent l'ionisation des mycotoxines, étape nécessaire pour la quantification.

Van Quekelberghe *et al.* (2003) ont développé une méthode LC-MS/MS pour la détermination simultanée de 12 mycotoxines et métabolites (aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>, ochratoxine A, zéaralanone (ZEN),  $\alpha$ -zéaralénol,  $\beta$ -zéaralénol,  $\alpha$ -zéaralanol,  $\beta$ -zéaralanol et DON) en utilisant une extraction commune. La méthode LC-MS/MS développée par Cowles *et al.* (2003) a permis la détermination simultanée des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>, ochratoxine A, zéaralénone, acide cyclopiazonique, stérigmatocystine,

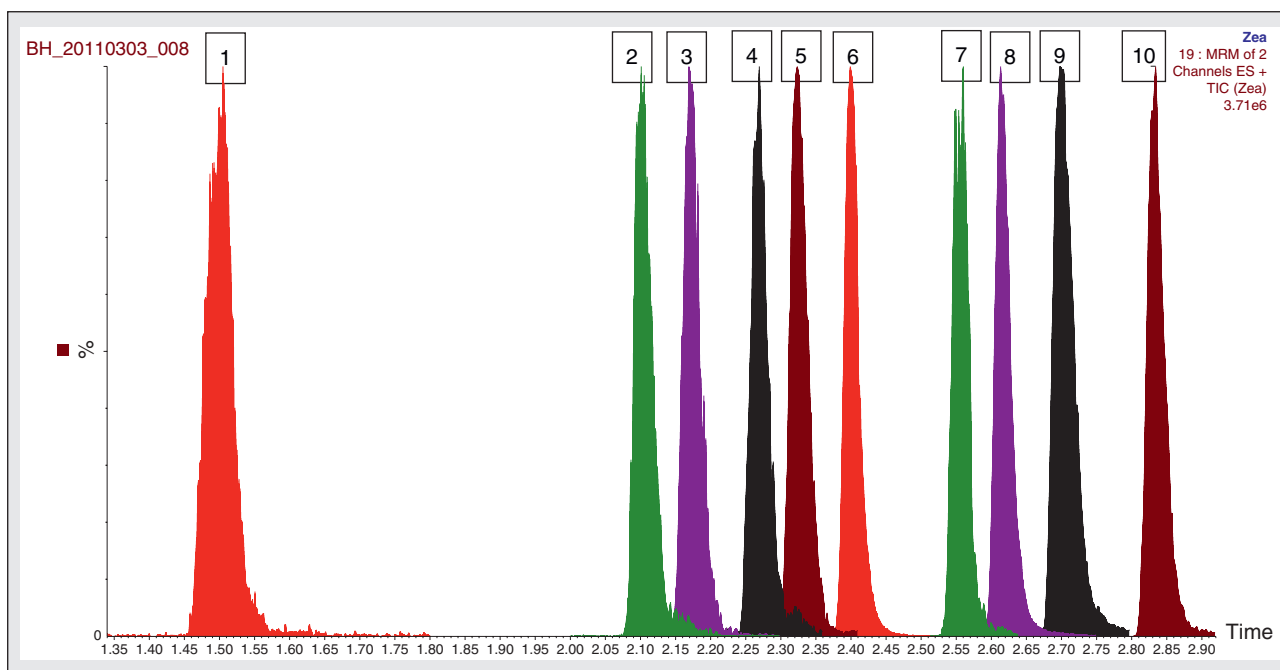


Figure 1. Exemple de chromatogramme montrant la répartition spatiale des entités moléculaires présentes dans un échantillon.

Figure 1. Example of a chromatogram showing the spatial distribution of molecular entities present in a sample.

1 : DON ; 2 : AFLA G<sub>2</sub> ; 3 : AFLA G<sub>1</sub> ; 4 : AFLA B<sub>2</sub> ; 5 : AFLA B<sub>1</sub> ; 6 : FB<sub>1</sub> ; 7 : HT2 ; 8 : FB<sub>2</sub> ; 9 : T2 ; 10 : ZEN.

fumonisines (FB<sub>1</sub> et FB<sub>2</sub>). Sulyok *et al.* (2007) ont développé une méthode LC-MS pour la quantification de 87 analytes dans des aliments.

## **Autres technologies alternatives**

L'application de la spectroscopie infrarouge (Fourier *transform mid-infrared spectroscopy* [FT-MIRS]) est une méthode de dépistage viable de détection de la présence de déoxynivalénol. La transmittance proche infrarouge (*near infrared transmittance* [NIT]) est utilisée dans l'estimation rapide de la présence de déoxynivalénol dans des grains entiers d'orge et de blé. Une limitation importante des techniques spectroscopiques est leur dépendance élevée de la matrice et un manque de matériel approprié de calibration. Par conséquent, cette méthode est plus appropriée pour la surveillance rapide des matières premières que pour l'analyse des aliments complexes. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour démontrer le vrai potentiel de la spectroscopie infrarouge pour la détermination des mycotoxines dans le grain (Cigic et Prosen, 2009).

Davantage de progrès peuvent être envisagés en ce qui concerne les technologies de détection des champignons filamenteux par l'intermédiaire de la détection des changements physiques occasionnés aux produits (couleur, fluorescence, aspects visuels ou mesurés par la méthode infrarouge) ou des changements chimiques (composés volatils mesurables par GC-MS, nez électroniques ou méthodes optiques). En outre, la détection de l'ADN des champignons filamenteux est possible par l'amplification génomique par *polymerase chain reaction* (PCR).

Le *tableau 3* présente une comparaison synoptique des méthodes traditionnelles et émergentes pour les analyses des mycotoxines dans les produits agricoles et alimentaires.

## **Pièges possibles dans les analyses de mycotoxines**

Les analyses de mycotoxines posent plusieurs problèmes en chimie analy-

tique essentiellement dus à la diversité de leurs structures chimiques, à leurs propriétés physico-chimiques associées, à leur présence sous forme de traces dans la plupart des produits agricoles et aux substances parasites qui peuvent interférer avec les analytes ciblés. L'exactitude d'une méthode dépend donc de l'efficacité des mesures prises pour contourner ces problèmes (Brera *et al.*, 1998). Les analyses sont très souvent orientées vers les mycotoxines libres. Aussi les métabolites (conjugués) et les produits de transformation échappent-ils à ces analyses. Mais ces métabolites conjugués sont identifiés et montrent leur capacité après ingestion à induire des effets physiologiques semblables à la molécule libre (Berthiller *et al.*, 2009). L'échantillonnage est une étape importante qui précède les analyses de mycotoxines. Pour être sûr de dépister une contamination d'un lot pouvant parfois contenir des points chauds (*hot spots*), il faut un plan d'échantillonnage le plus représentatif possible qui nécessite la multiplication du nombre d'échantillons à prélever et donc l'augmentation du coût d'analyse. L'homogénéisation des échantillons permet aussi de corriger l'hétérogénéité des lots de produits agricoles. Le procédé d'échantillonnage doit tenir compte des facteurs qu'il convient de maîtriser afin d'assurer la validité des résultats d'essai et d'étalonnage. Le règlement CE n° 401/2006 (EC, 2006) précise la procédure d'échantillonnage pour les analyses officielles de détermination des mycotoxines dans les produits alimentaires.

## **Méthodes normalisées et réglementations**

Divers organismes de normalisation ont vocation à sélectionner puis proposer à la normalisation, c'est-à-dire à l'écriture sous un format standardisé, des protocoles d'analyse qui ont reçu le consensus d'experts ou de spécialistes du domaine. La fiabilité des données d'analyse de mycotoxines peut être améliorée au moyen des méthodes d'analyse interlaboratoires validées par

l'*Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC) qui dispose actuellement de 45 méthodes analytiques pour la détermination des mycotoxines (FAO, 2003). Ces méthodes ont été utilisées pour les études de validation interlaboratoires. En outre, l'Association française de normalisation, secteur agroalimentaire (Afnor), le Comité européen de normalisation (CEN) et l'*International Standard Organization* (ISO) ont procédé à la normalisation de plusieurs méthodes d'analyse (*tableau 4*). Suite à un accord de reconnaissance mutuelle au niveau européen, les normes publiées par le CEN (normes EN) doivent être reprises par chaque État membre de l'Union européenne et toute norme nationale existant dans le même champ d'analyse cède le pas devant une norme EN publiée. Les normes ISO bénéficient d'une reconnaissance internationale mais leur aboutissement est nécessairement plus long (consultation des experts au niveau mondial). Des règlements ou des recommandations ont été édictés au niveau national (références nationales) puis européen (*tableau 5*), et des valeurs guides existent au niveau mondial pour fiabiliser les échanges commerciaux des denrées alimentaires du point de vue de la sécurité sanitaire. Les normes doivent permettre aux professionnels de mettre sur le marché des denrées alimentaires respectant la réglementation et aux autorités publiques de vérifier de façon équitable que les denrées commercialisées sont conformes aux réglementations. En cas de non-conformités suspectées (particulièrement pour des valeurs autour des teneurs maximales autorisées (CE, 2006 ; CE, 2007 ; CE, 2010), les résultats devraient être vérifiés par une méthode analytique de confirmation. Mais, avant d'appliquer une méthode analytique en routine, celle-ci doit être validée conformément aux modalités d'application de la directive 96/22/CE portant sur les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. La procédure classique de validation d'une méthode analytique prend en compte la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la spécificité, le rendement, la limite de détection, la limite de quantification et la robustesse (CE, 2002). Les laboratoires chargés du contrôle officiel doivent être accrédités conformément à la norme ISO 17025 (ISO, 1999).



**Tableau 3. Avantages et inconvénients des méthodes traditionnelles et émergentes de détection des mycotoxines dans les produits agricoles.**

Table 3. Advantages and disadvantages of traditional and emerging methods for mycotoxin analysis.

Méthodes	Avantages	Inconvénients
<b>Chromatographie gazeuse</b>	Analyses multimycotoxines Bonne sensibilité Automatisable ( <i>auto sampler</i> ) Confirmation (détecteur MS)	Équipement très coûteux Nécessité d'une expertise spéciale, Nécessité de dérivation Problèmes d'interférences matricielles Courbe de calibration non linéaire, Décalage des réponses <i>drifting</i> Effets résiduels ( <i>carry-over</i> ) provenant d'échantillons précédent Reproductibilité variable Répétabilité variable
<b>Chromatographie liquide sous haute pression</b>	Bonne sensibilité Bonne sélectivité, Bonne répétabilité Confirmation Automatisable ( <i>auto sampler</i> ) Courte durée d'analyse Méthodes officielles disponibles	Équipement très coûteux Nécessité d'une expertise spéciale Nécessité de dérivation Nécessite la purification de l'échantillon
<b>Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS/MS)</b>	Analyses multimycotoxines Bonne sélectivité Bonne sensibilité Confirmation Pas de dérivation Courte durée d'analyse Automatisable ( <i>auto sampler</i> )	Très coûteux Nécessité d'une expertise spéciale, la sensibilité dépendant de la technique d'ionisation Effet matrice Standards internes nécessaires
<b>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</b>	Simple préparation d'échantillon Équipements moins coûteux Sensibilité élevée Analyses simultanées d'échantillons Utilisation pour criblage Utilisation limitée de solvants organiques	Réactions croisées avec d'autres composés analogues Problèmes d'interférences matricielles Possibilité de faux positifs et/ou de faux négatifs Nécessité de confirmation par analyses LC
<b>Tigettes Lateral flow device/dipstick</b>	Rapide Pas de purification Pas d'équipement coûteux Facile à utiliser Pas de formation spécifique	Semi-quantitative (évaluation visuelle) Réactions croisées avec d'autres composés analogues Nécessité de validation pour des matrices additionnelles Nécessité de confirmation par analyses LC
<b>Fluorescence polarization immunoassay</b>	Rapide Pas de purification Méthode validée pour DON dans le blé	Réactions croisées avec d'autres composés analogues Problème d'interférences Nécessité de confirmation par analyses LC
<b>Spectroscopie infrarouge (IR)</b>	Rapide Mesures non destructives des analytes Pas d'extraction Pas de purification Opération facile	Équipements coûteux Nécessité de validation de modèle de calibration Connaissance des méthodes statistiques Faible sensibilité
<b>Biodétecteurs (Biosensors)</b>	Rapide Pas de purification	Réactions croisées avec d'autres composés analogues Nécessité de purification pour améliorer la sensibilité Reproductibilité et répétabilité variables

**Tableau 4. Méthodes officielles (CEN) de détermination de mycotoxines dans différentes matrices alimentaires.**

Table 4. Official EN methods for determining mycotoxins in food and feedstuffs.

Références	Matrices	Intitulés
EN 12955 : 1999	Produits alimentaires	Dosage de l'aflatoxine B1 et de la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés - Méthode de chromatographie en phase liquide haute performance avec dérivation post-colonne et purification en colonne d'immunoaffinité
EN 14123 : 2007	Produits alimentaires	Dosage de l'aflatoxine B1 et de la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les noisettes, les cacahuètes, les pistaches, les figues et le paprika en poudre : méthode par purification sur colonne d'immunoaffinité suivie d'une chromatographie liquide à haute performance avec dérivation post-colonne
EN ISO 15141- 1 : 1998	Produits alimentaires	Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés - Partie 1 : méthode par chromatographie liquide à haute performance comprenant une étape d'extraction par chromatographie sur gel de silice
EN ISO 15141- 2 : 1998	Produits alimentaires	Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés - Partie 2 : méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par une solution de bicarbonate
EN 14133 : 2009	Produits alimentaires	Dosage de l'ochratoxine A dans le vin et la bière - Méthode par purification sur colonne d'immunoaffinité suivie d'une analyse par chromatographie liquide haute performance
EN 14132 : 2009	Produits alimentaires	Dosage de l'ochratoxine A dans l'orge et le café torréfié - Méthode par purification sur colonne d'immunoaffinité suivie d'une analyse par chromatographie liquide haute performance
EN 14177 : 2003	Produits alimentaires	Détermination de la teneur en patuline dans le jus de pommes clarifié et trouble et dans la compote de pommes - Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification par partage liquide/liquide
EN 14352 : 2004	Produits alimentaires	Dosage des fumonisines B1 et B2 dans des aliments à base de maïs - Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification par colonne d'immunoaffinité
EN 15829 : 2010	Produits alimentaires	Dosage de l'ochratoxine A dans les raisins de Corinthe, les raisins secs, les raisins secs de Smyrne, les mélanges de fruits secs et les figues sèches. Méthode CLHP avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection par fluorescence
EN 15835 : 2010	Produits alimentaires	Dosage de l'ochratoxine A dans les aliments à base de céréales pour nourrissons et jeunes enfants - Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection par fluorescence
EN 15850 : 2010	Produits alimentaires	Dosage de la zéaralénone dans la farine d'orge, de maïs et de blé, la polenta et les produits pour nourrissons et jeunes enfants à base de céréales. Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection par fluorescence
EN 15851 : 2010	Produits alimentaires	Dosage de l'aflatoxine B1 dans les produits pour nourrissons et jeunes enfants à base de céréales. Méthode de chromatographie liquide haute performance avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection par fluorescence

Tableau 4. (Suite)

Références	Matrices	Intitulés
EN 15890 : 2010	Produits alimentaires	Dosage de la patuline dans le jus de fruits et la compote de fruits en alimentation infantile. Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification par partition liquide-liquide et extraction en phase solide et détection ultraviolet
EN 15891 : 2010	Produits alimentaires	Dosage du déoxynivalénol dans les céréales, les produits céréaliers, et céréales pour déjeuner en alimentation infantile. Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection ultraviolet
CEN/TR 15298 : 2006	Produits alimentaires	Préparation d'échantillons gros volume pour l'analyse des mycotoxines - Comparaison entre broyage à sec et broyage par voie humide
BS EN 13585 : 2002	Produits alimentaires	Dosage des fumonisines B1 et B2 dans le maïs - Méthode par chromatographie liquide haute performance avec purification par extraction en phase solide
EN ISO 14675 : 2003	Lait	Lignes directrices pour une description normalisée des tests immuno-enzymatiques – Détermination de la teneur en aflatoxine M1
EN ISO 14501 : 2007	Lait	Détermination de la teneur en aflatoxine M1- Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance
EN ISO 17375 : 2006	Aliments des animaux	Dosage de l'aflatoxine B1
EN 15792 : 2009	Aliments des animaux	Dosage de la zéaralénone dans les aliments des animaux - Méthode de chromatographie liquide haute performance avec détection par fluorescence et purification sur colonne d'immunoaffinité
EN 15791 : 2009	Produits alimentaires	Dosage du déoxynivalénol dans les aliments pour animaux - Méthode de chromatographie liquide haute performance avec détection UV et purification sur colonne d'immunoaffinité

CEN : Comité européen de normalisation (norme EN).

Tableau 5. Teneurs maximales pour certaines mycotoxines dans des denrées alimentaires selon les réglementations de la commission européenne (CE105/2010, 1126/2007, 1881/2006).

Table 5. Maximum residue levels for certain mycotoxins in food according to EU regulations (EC105/2010, 1126/2007, 1881/2006).

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Teneurs maximales (µg/kg)	
		B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>
Aflatoxines	Fruits séchés et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4
	Toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés	2	4
	Maïs destiné à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5	10

Tableau 5. (Suite)

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Teneurs maximales (µg/kg)	
	Arachides destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	8	15
	Arachides, fruits à coque et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4
<b>Ochratoxine A</b>	Céréales brutes	5	
	Tous les produits dérivés de céréales brutes, y compris les produits de céréales transformés et les céréales destinées à la consommation humaine directe	3	
	Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10	
	Grains de café torréfié et café torréfié moulu, à l'exception du café soluble	5	
	Épices (CE 105/2010)	30 jusqu'au 30/06/2012 15 à partir du 1/07/2012	
<b>Patuline</b>	Jus de fruits, jus de fruits concentrés reconstitués et nectars de fruits	50	
	Boissons spiritueuses, cidre et autres boissons fermentées produites à partir de pommes ou contenant du jus de pomme	50	
	Produits à base de morceaux de pomme, tels que la compote de pommes et la purée de pommes, destinés à la consommation directe à l'exception des denrées alimentaires figurant aux points	25	
	Jus de pomme et produits à base de morceaux de pomme, tels que la compote de pommes et la purée de pommes, destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (16), et étiquetés et vendus comme tels	10	
	Aliments pour bébés, autres que les préparations à base de céréales, destinés aux nourrissons	10	
<b>Déoxynivalénol</b>	Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1 250	
	Blé dur, avoine brut et maïs brut	1 750	
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales (y compris la farine de maïs, le maïs moulu et le gruau de maïs)	750	
	Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500	
<b>Zéaralénone</b>	Céréales brutes autres que le maïs	100	
	Maïs brut	200	
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son en tant que produit final mis sur le marché pour la consommation humaine directe et germe	75	
	Maïs destiné à la consommation humaine directe, farine de maïs, maïs moulu, gruau de maïs, germe de maïs et huile de maïs raffinée	200	

Tableau 5. (Suite)

Mycotoxines	Denrées alimentaires	Teneurs maximales (µg/kg)
	Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner, à l'exclusion des collations au maïs et des céréales pour petit déjeuner à base de maïs	50
<b>Fumonisines</b>		FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>
	Maïs brut	2 000
	Farine de maïs, maïs moulu, gruau de maïs, germe de maïs et huile de maïs raffinée	1 000
	Aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe	400
	Préparations à base de maïs et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200

En conclusion, les technologies émergentes pour la détection de mycotoxines constituent de potentiels outils analytiques utiles à la détermination simultanée de plusieurs mycotoxines dans des produits agroalimentaires, souvent complexes. En dépit des obstacles, les technologies de détection des mycotoxines avancent et les perspectives de voir émerger d'autres améliorations méthodologiques sont excellentes. ■

## Références

- Ali WH, Derrien D, Alix F, Pérollier C, Lépine O, Bayouhd S, *et al.*, 2010. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *Journal of Chromatography A* 1217 : 6668-73. doi: 10.1016/j.chroma.2010.04.071.
- Barthelmebs L, Jonca J, Hayat A, Prieto-Simon B, Marty JL, 2011. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs) based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* 22 : 737-43. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.005.
- Bennett GA, Richard JL, 1994. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *Journal of AOAC International* 77 : 501-6.
- Berger U, Oehme M, Khun F, 1999. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/Ion trap multiple mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47 : 4240-5. doi: 10.1021/jf9904012.
- Berthiller F, Hametner C, Krenn P, Schweiger W, Ludwig R, Adam G, *et al.*, 2009. Preparation and characterization of the conjugated *Fusarium* mycotoxins zearalenone-4O-β-D-glucopyranoside, α-zearalenol-4O-β-D-glucopyranoside and β-zearalenol 4O-β-D-glucopyranoside by LC-MS/MS and two-dimensional NMR. *Food Additives and Contaminants* 26 : 201-6. doi: 10.1080/02652030802399034.
- Biancardi A, Riberzani A, 1996. Determination of ochratoxin A in cereals and feed by SAX-SPE clean up and LC fluorimetric detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 19 : 2395-407. doi: 10.1080/10826079608014025.
- Brera C, Miraglia M, Colatosti M, 1998. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: sources of errors. *Microchemical Journal* 59 : 45-9. doi: 10.1006/mchj.1998.1583.
- Cahill LM, Kruger SC, McAlice BT, Ramsey CS, Prioli R, Kohn B, 1999. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 859 : 23-8. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00846-8.
- Cigic IK, Prosen H, 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Science* 10 : 65-115. doi: 10.3390/ijms10010062.
- Commission européenne, 2002. Décision de la Commission N° 2002/657/CE du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. *Journal Officiel de la Communauté Européenne* L221 : 8-36.
- Commission européenne, 2006. Règlement (CE) N° 1881/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). *Journal Officiel de la Communauté Européenne* L364 : 05-24.
- Commission européenne, 2007. Règlement (CE) N° 1126/2007 de la Commission du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. *Journal Officiel de la Communauté Européenne* L255 : 14-7.
- Commission européenne, 2010. Règlement N° 105/2010 du 5 février 2010 modifiant le règlement (CE) N° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne l'ochratoxine A. *Journal Officiel de l'Union Européenne* ; L35/7.
- Cowles J, Gray K, Lee F, Stokes P, 2003. The simultaneous determination of a range of mycotoxins using LC/MS/MS. In : Eklund T, *et al.*, eds. *Strategies for sage food*. Vol. 2. Euro food Chem XII. Brugge (Belgium) : KVCV.
- Croteau SM, Prelusky DB, Trenholm HL, 1994. Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42 : 928-33. doi: 10.1021/jf00040a018.
- Dall'Asta C, Galaverna G, Biancardi A, Gasparini M, Sforza S, Dossena A, *et al.*, 2004. Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. *Journal of Chromatography A* 1047 : 241-7. doi: 10.1016/j.chroma.2004.07.002.
- De Saeger S, van Peteghem C, 1999. Flow-through membran-based enzyme immunoassay for rapid detection of ochratoxin A in wheat. *Journal of Food Protection* 62 : 65-9.
- European Commission, 2006. Commission Regulation EC No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of European Union* L70 : 12-34.
- FAO, 2003. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. FAO, Food and Nutrition Papers-81. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations. 170 p ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf
- Goryacheva IY, Rusanova TY, Burmistrova NA, De Saeger S, 2009. Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *Journal of Analytical Chemistry* 64 : 768-85. doi: 10.1134/S1061934809080024.
- International Organization for Standardization (ISO), 1999. *ISO/IEC 17025: general requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva (Switzerland) : ISO.

- Jimenez M, Mateo JJ, Mateo R, 2000. Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 870 : 473-81. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00890-0.
- Jorgensen K, Rasmussen G, Thorup I, 1996. Ochratoxin A in Danish cereals in 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives and Contaminants* 13 : 95-104. doi: 10.1080/02652039609374384.
- Krska R, Baumgartner S, Josephs R, 2001. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 : 285-99. doi: 10.1007/s002160100992.
- Krska R, Josephs R, 2001. The state of the art in the analysis of oestrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369 : 469-76. doi: 10.1007/s002160100715.
- Langseth W, Rundberget T, 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A* 815 : 103-21. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00388-4.
- Maragos CM, 2004. Emerging technologies for mycotoxin detection. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 23 : 317-44. doi: 10.1080/10439870410001600000.
- Mateo JJ, Llorens A, Mateo R, Jimenez M, 2001. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A* 918 : 99-112. doi: 10.1016/S0021-9673(01)00704-X.
- Miličević DR, Škrinjar M, Baltić T, 2009. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins* 2 : 572-92. doi: 10.3390/toxins2040572.
- Monbalieu S, Van Poucke C, Detavernier C, Dumoulin F, Van De Velde M, Schoeters E, et al., 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58 : 66-71. doi: 10.1021/jf903859z.
- Moncur JH, 2002. Analysis of Vomitoxin (DON) and T-2 Toxin by LC/MS. *Application note, Thermo Finnigan*.
- Omurtag GZ, Yazicioglu D, 2001. Occurrence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey by HPLC and TLC. *Food Additives and Contaminants* 18 : 844-9. doi: 10.1080/026520301118172.
- Pascale M, Haidukowski M, Visconti A, 2003. Determination of T-2 toxin in cereals grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. *Journal of Chromatography A* 989 : 257-64. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00081-5.
- Plattner RD, Maragos CM, 2003. Determination of deoxynivalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 86 : 61-5.
- Prieto-Simon B, Noguer T, Campas M, 2007. Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. *Trends in Analytical Chemistry* 26 : 689-702. doi: 10.1016/j.trac.2007.05.012.
- Radova Z, Holadova K, Hajšlova J, 1998. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *Journal of Chromatography A* 829 : 259-67. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00868-1.
- Razzazi-Fazeli E, Bohm J, Luf W, 1999. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography A* 854 : 45-55. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00616-0.
- Razzazi-Fazeli E, Rabus B, Cecon B, Bohm J, 2002. Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 968 : 129-42. doi: 10.1016/S0021-9673(02)00957-3.
- Schollenberger M, Lauber U, Jara HT, Suchy S, Drocher W, Müller HM, 1998. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 815 : 123-32. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00454-3.
- Schuhmacher R, Krska R, Grasserbauer M, Edinger W, Lew H, Müller HM, 1998. Immuno-affinity columns versus conventional clean-up: a method-comparison study for the determination of zearalenone in corn. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 360 : 241-5. doi: 10.1007/s002160050682.
- Scudamore KA, MacDonald SJ, 1998. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminants* 15 : 401-10. doi: 10.1080/02652039809374659.
- Silva CMG, Vargas EA, 2001. A survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep 224 column and high performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants* 18 : 39-45. doi: 10.1080/02652030010002649.
- Solfrizzo M, Avantiaggiato G, Visconti A, 1998. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. *Journal of Chromatography A* 815 : 67-73. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00271-4.
- Spanjer MC, Rensen PM, Scholten JM, 2008. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives and Contaminants* 25 : 472-89. doi: 10.1080/02652030701552964.
- Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R, 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 : 1505-23. doi: 10.1007/s00216-007-1542-2.
- Sweeney MJ, Dobson ADW, 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43 : 141-58. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00112-3.
- Tacke BH, Casper HH, 1996. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 79 : 472-5.
- Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y, 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 882 : 23-8. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00063-7.
- Tangni EK, Motte JC, Callebaut A, Pussemier L, 2010. Cross reactivity of antibodies in some commercial deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58 : 12625-33. doi: 10.1021/jf103025e.
- Valenta H, Danicke S, 2005. Study on the transmission of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity. *Molecular Nutrition & Food Research* 49 : 779-85. doi: 10.1002/mnfr.200500012.
- Van Quekelberghe S, De Graeve K, Cordonnier J, 2003. Simultaneous screening of 12 mycotoxins by liquid chromatography tandem mass spectrometry. In: Eklund T, et al., eds. *Strategies for safe food*. Vol. 2. Euro food Chem XII. Brugge (Belgium) : KVCV.
- Visconti A, Pascale M, 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 815 : 133-40. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00296-9.
- Visconti A, Solfrizzo M, De Girolamo A, 2001. Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. *Journal of AOAC International* 84 : 1828-37.
- Walker F, Meier B, 1998. Determination of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and 15-O-acetyl-4-deoxynivalenol in contaminated whole wheat flour by liquid chromatography with diode array detection and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 81 : 741-8.
- Weingaertner J, Krska R, Prasnik W, Grasserbauer M, Lew H, 1997. Use of MycoSep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron-capture gas chromatography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357 : 1206-10. doi: 10.1007/s002160050332.
- Zheng M, Richard JL, Binder J, 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161 : 261-73. doi: 10.1007/s11046-006-0215-6.
- Zöllner P, Mayer-Helm B, 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136 : 123-69. doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.031.