

Utilisation de la spectroscopie infrarouge comme élément d'aide à la décision pour la gestion du risque fongique et mycotoxique

Cécile Levasseur-Garcia
Didier Kleiber
Olivier Surel

Université de Toulouse
INPT
École d'ingénieurs de Purpan
Département sciences agronomiques
et agroalimentaires
UPSP/DGER115
75, voie du TOEC
BP 57611
31076 Toulouse cedex 3
France
<cecile.levasseur@purpan.fr>
<didier.kleiber@purpan.fr>
<olivier.surel@purpan.fr>

Résumé

Les champignons (ou moisissures) et certains de leurs métabolites secondaires appelés mycotoxines ont des impacts économiques et sanitaires importants lorsqu'ils se trouvent dans les céréales. Par conséquent, un contrôle de ces matières premières se met progressivement en place au niveau mondial, *via* une réglementation pour l'alimentation humaine et de recommandations pour l'alimentation animale. Les techniques de dosage classiques sont longues et coûteuses, et nécessitent une expertise. *A contrario*, les méthodes analytiques alternatives permettent une évaluation rapide, simple et peu coûteuse du risque de présence de mycotoxines dans les produits. La spectroscopie infrarouge fait partie de ces outils. Elle traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique et exploite le fait que les molécules absorbent les fréquences spécifiques qui sont caractéristiques de leur structure. Cette technique est donc très utilisée en caractérisation, mais également en quantification. La première partie de cette synthèse en aborde les principes généraux. La seconde partie fait le point sur les travaux menés pour son utilisation dans la gestion du risque fongique et mycotoxique.

Mots clés : moisissure ; mycotoxine ; prédiction ; spectroscopie infrarouge.

Thèmes : méthodes et outils ; pathologie ; productions végétales.

Abstract

Infrared spectroscopy used as a decision-making support for the determination of fungal and mycotoxic risk

In cereals, fungi and some of their secondary metabolites, so-called mycotoxins, are health concerns and cause important economic impacts. Consequently, a control of these raw materials is gradually being set up internationally, with the implementation of regulations for food and recommendations for feed. Classical techniques of quantification are long and expensive, and require expertise. On the contrary, the alternative analytical methods allow a fast, simple and inexpensive evaluation of the risks of presence of mycotoxins in products. Infrared spectroscopy is one such method. It uses the infrared region of the electromagnetic spectrum and exploits the fact that molecules absorb the specific frequencies which are characteristic of their structure. Hence, this technique is usually used in both characterization and quantification. The first part of this synthesis will present the general principles. The second part will review the studies on its use in management of fungal and mycotoxic risks.

Key words: mold contamination; mycotoxins; prediction; spectroscopy.

Subjects: pathology; tools and methods; vegetal productions.

En France, pour l'année 2010, les céréales ont couvert 9,3 millions d'hectares, pour une production récoltée de 65,7 millions de tonnes (Agreste, 2011). Pour être commercialisés, les grains doivent respecter des spécifications qui concernent notamment leur qualité. Le terme « qualité » englobe la qualité nutritionnelle (teneur en protéines, en amidon...), les caractéristiques technologiques (poids de 1 000 grains, poids spécifique...), ainsi que la qualité sanitaire (présence d'insectes, de moisissures...). C'est cette dernière qui fait l'objet de cette revue de littérature.

Les mycotoxines, métabolites secondaires toxiques produits par certaines espèces de moisissures présentes sur les céréales, et les champignons eux-mêmes, ont des impacts économiques et sanitaires importants. Des diminutions de rendement en productions végétale et animale, des problèmes de santé publique, ou bien encore des dévalorisations sur le marché international des céréales illustrent parfaitement ces effets. En 2001, l'Organisation pour l'agriculture et l'alimentation (FAO) estimait les pertes mondiales dues aux mycotoxines à 1 000 millions de tonnes de denrées alimentaires par an (FAO, 2001).

Face à l'importance des conséquences de la contamination par les toxines, un cadre juridique se met progressivement en place au niveau mondial. Il définit des limites supérieures de teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires et notamment dans les céréales. La Commission européenne a ainsi édité un règlement en vigueur depuis 2002, règlement que les agriculteurs et les industriels doivent respecter sous peine de voir leurs denrées non commercialisées. En consommation humaine, la teneur maximale autorisée en déoxynivalénol est de 1 750 µg/kg (ou parties par milliard [ppb]), elle est de 2 000 µg/kg pour les fumonisines dans le maïs brut (Commission européenne, 2007). Les recommandations de teneurs maximales contenues dans les matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux sont moins sévères. En effet, la teneur limite en déoxynivalénol est de 8 000 µg/kg pour les céréales. Le seuil est de 60 000 µg/kg pour les fumonisines dans ces mêmes matières premières

(Commission européenne, 2006). La mise en place de ces seuils a engendré un besoin de méthodes de détection et de quantification des mycotoxines.

Les techniques de dosage sont principalement des méthodes chromatographiques. Bien que très performantes, elles restent relativement longues et coûteuses pour une application dans un cadre purement industriel qui exige simplicité et rapidité. De plus, le principal problème rencontré pour leur mise en place est l'échantillonnage. En effet, ces techniques nécessitent par exemple de prélever un échantillon de quelques centaines de grammes dans un silo de plusieurs tonnes de céréales. Or, les mycotoxines sont des métabolites fongiques et tout comme les moisissures par lesquelles elles sont synthétisées, leur répartition au sein du silo est très hétérogène. La qualité sanitaire de l'échantillon prélevé n'est donc pas forcément représentative de la qualité sanitaire du silo entier.

Les agriculteurs et les industriels sont donc à la recherche de méthodes analytiques alternatives permettant une évaluation rapide, simple et peu coûteuse du risque de présence de mycotoxines dans leurs produits. Les tests immuno-enzymatiques sont de loin les plus utilisés en industrie. Ces méthodes de détection sont basées sur des tests Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (Elisa). Ces tests, bien que rapides, sont employés dans des laboratoires spécialisés et ont un coût élevé. De plus, leur utilisation nécessite beaucoup de rigueur en laboratoire et un personnel formé afin d'assurer des résultats convenables. Une technique

alternative à l'Elisa est l'immunochromatographie pour laquelle différents produits commerciaux existent pour la détermination des teneurs en mycotoxines. Cette méthode donne de meilleurs résultats que les tests Elisa, à condition d'avoir un technicien très bien formé à la technique. Une dernière méthode alternative, la spectroscopie infrarouge, est utilisée depuis de nombreuses années lors de contrôles qualité au sein des industries agroalimentaires. Cette dernière pourrait peut-être répondre aux attentes du terrain pour la détection du risque fongique et mycotoxique.

Les espèces cibles de cet article sont le maïs, le blé et l'orge, et les mycotoxines étudiées le déoxynivalénol et les fumonisines.

Le déoxynivalénol est produit au champ par *Fusarium graminearum* ou par *Fusarium culmorum*. La figure 1 présente sa structure chimique.

Au champ, les agents producteurs de fumonisines sont *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatum*. La structure chimique de la fumonisine B1 est représentée sur la figure 2.

Levasseur-Garcia (2010) indique les teneurs en mycotoxines rencontrées dans des échantillons de maïs naturellement contaminés, récoltés en Europe, durant les années 2003 à 2009 :

- déoxynivalénol (1 165 échantillons) : 50 à 87 000 ppb, avec respectivement 380 et 3 300 ppb en moyenne pour les années à faible et forte contamination ;
- fumonisines (1 160 échantillons) : 50 à 114 600 ppb, avec en moyenne

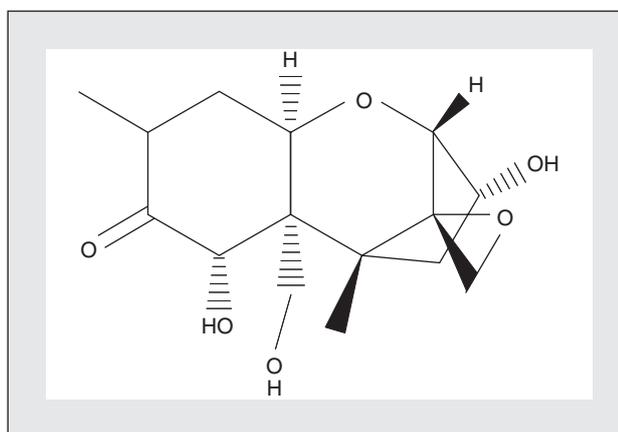


Figure 1. Structure chimique du déoxynivalénol.

Figure 1. Chemical structure of deoxynivalenol.

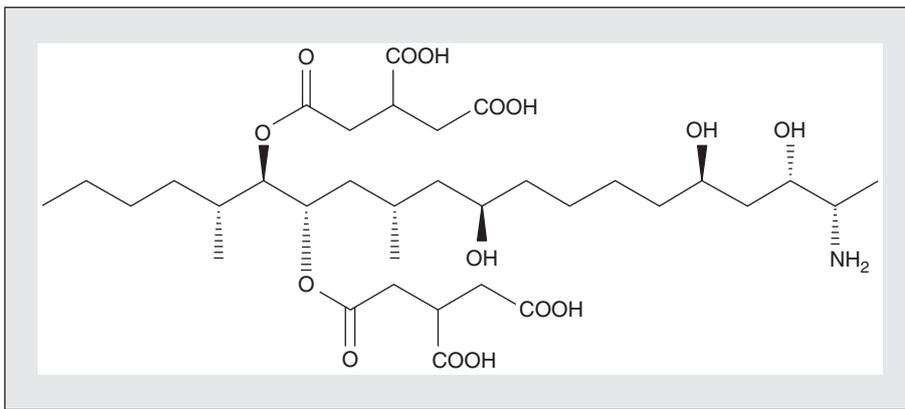


Figure 2. Structure chimique de la fumonisine B1.

Figure 2. Chemical structure of fumonisin B1.

6 800 ppb lors des années de forte contamination et 2 000 ppb pour les années à faible contamination.

La spectroscopie infrarouge : principes généraux

La spectroscopie infrarouge est une méthode analytique qui permet d'identifier la nature des liaisons chimiques d'une molécule ou bien de quantifier les composants d'un produit. Cette spectroscopie repose sur l'étude de spectres d'absorption créés lors de l'interaction de rayonnements infrarouges avec les molécules de l'échantillon étudié. Celui-ci est soumis à un rayonnement électromagnétique qui correspond à la partie du spectre de la lumière comprise entre 800 et 25 000 nm, où nous pouvons distinguer le « proche » (800 à 2 500 nm) et le « moyen » infrarouge (2 500 à 25 000 nm). L'absorption des rayonnements infrarouge par l'échantillon est due aux mouvements de vibration et de rotation des molécules qui le composent. Certaines fréquences de vibration et de rotation sont caractéristiques d'un groupement chimique. Un spectre infrarouge est donc constitué de pics d'absorption qui correspondent aux fréquences de l'onde que les molécules peuvent absorber. Cette fréquence d'onde est reliée à la longueur d'onde par une constante. En effet, un spectre infrarouge représente l'absorbance de l'échantillon, en fonction de la longueur d'onde. En spectroscopie proche

infrarouge, l'unité couramment utilisée est le nanomètre (nm).

Un spectre infrarouge peut être assimilé à une empreinte digitale, caractéristique de l'échantillon analysé, au même titre qu'un ensemble de grandeurs caractéristiques telles que sa teneur en protéines, sa teneur en eau, etc. Son interprétation directe est complexe, il est donc indispensable de procéder à un calibrage avec des valeurs de référence chimiques. Ces données (teneurs en protéines et en eau, etc.), propres à l'échantillon, seront mises en corrélation avec le spectre infrarouge de ce même échantillon afin d'obtenir un modèle de prédiction mathématique, une calibration.

Les performances du modèle développé sont principalement évaluées par les critères suivants : le coefficient de détermination r^2 et l'erreur standard (*standard error* [SE]). L'erreur standard est basée sur les résidus, c'est-à-dire les différences entre les valeurs prédites et les valeurs réelles des n échantillons du set de calibration. Le critère r^2 représente la part d'information contenue dans les données de référence, qui est expliquée par le modèle. Dans les articles scientifiques, plusieurs termes peuvent être employés pour parler de cette erreur standard : *standard error of calibration* (SEC), SECV (*standard error of cross validation*), *standard error of prediction* (SEP), *root mean square error of prediction* (RMSEP) ou bien encore le *residual predictive deviation* (RPD). Le SEC est l'erreur standard de calibrage, elle est calculée sur les échantillons ayant servi à développer le modèle. Plus la valeur du SEC se rapproche de la répétabilité

de l'analyse de référence, meilleur est le modèle. Les autres termes sont des critères de validation du modèle utilisés pour évaluer la qualité prédictive du modèle sur de nouveaux échantillons. Le SECV valide le modèle en validation croisée, c'est-à-dire que la population des échantillons du set de calibrage est divisée en t sous-groupes. Une équation de prédiction est développée sur $(t-1)$ groupes puis validée sur le groupe restant. Cette opération est reprise par permutation sur les autres sous-groupes. L'erreur standard calculée est le SECV. Le SEP est l'erreur standard de prédiction, calculée sur un set de nouveaux échantillons, non utilisés pour développer le modèle. Comme pour le SEC, plus leur valeur se rapproche de la répétabilité de l'analyse de référence, meilleur est le modèle. Le RMSEP est une indication similaire au SEP. Le dernier indice, RPD, est le rapport entre l'écart-type de la population qui sert à développer le modèle, et la précision de la calibration (SECV ou SEP).

Les caractéristiques d'absorption du déoxynivalénol dans l'infrarouge sont les suivantes (Fremy et Afssa, 2009) : 1 720/cm et 1 259/cm (groupes acétyles), 1 580/cm et 825/cm (présence d'une double liaison bi-substituée) et 3 400/cm et 3 480/cm (présence des groupements hydroxyles). En ce qui concerne les fumonisines ou bien encore l'ergostérol ou la chitine, Levasseur-Garcia (2012) détaille les bandes spectrales d'intérêt, plus nombreuses, que ce soit en proche infrarouge ou bien en moyen infrarouge.

Application de la spectroscopie infrarouge à la détection des contaminations fongiques via les composés fongiques

Les premières applications de l'infrarouge sur les microorganismes datent des années 1950 (Miguel Gomez *et al.*,

2003). Dans ces applications, les spectromètres sont calibrés en fonction des méthodes de dosage des champignons ou des mycotoxines. Dans les années 1980, Fraenkel *et al.* (1980) et Davies *et al.* (1987) publient leurs premiers travaux concernant la détection de contamination fongique par spectroscopie proche infrarouge (*Botrytis cinerea* et *Alternaria tenuissima*), mais cet outil appliqué à la détection de moisissures connaît son essor dans les années 1990. Cela s'explique par le fait que les modèles agronomiques existant alors requièrent un nombre très important d'informations à collecter au champ et sont de ce fait difficilement utilisables en routine. De plus, les industriels ont besoin de techniques non destructives afin d'assurer une évaluation sanitaire des récoltes. Plusieurs équipes de recherche ont alors utilisé la spectroscopie infrarouge pour détecter les moisissures et les mycotoxines sur céréales, cela pouvant être réalisé en même temps que la quantification d'autres paramètres tels que les protéines, la teneur en eau, etc.

Le champignon peut être détecté par des méthodes microbiologiques associées à des méthodes visuelles, microscopiques et culturales. Les méthodes classiques de détection des moisissures sont basées sur l'observation directe des thalles à l'œil nu ou au microscope, sur denrées contaminées ou sur milieu de culture. Ces méthodes sont longues ; elles nécessitent des éléments viables et une bonne expertise. Grâce aux progrès des techniques microbiologiques, la détection et le dénombrement se font également par des techniques biochimiques, immunologiques et moléculaires.

D'autres approches reposent sur la détection des constituants et des métabolites fongiques. En effet, les moisissures ont des spécificités qui les distinguent des autres eucaryotes. La régulation de certaines enzymes, la synthèse de l'acide aminé lysine par une voie métabolique particulière ou bien encore des caractéristiques ultra-structurales (appareil de Golgi) et génétiques (haploïdie) en font partie. Parmi ces attributs, des composés structuraux des moisissures peuvent être utilisés comme témoins d'une contamination fongique : la chitine (Cousin, 1996) dans la paroi cellulaire

ou l'ergostérol dans la membrane cellulaire.

La chitine peut être responsable de l'absorption de la lumière en spectroscopie infrarouge (Roberts *et al.*, 1991 ; Nilsson *et al.*, 1994). L'inconvénient principal de l'utilisation de ce constituant en tant que témoin de contamination fongique réside dans le fait que la chitine n'est pas propre aux champignons ; elle est présente chez les insectes, les diatomées, les arachnides, les nématodes, les crustacés et quelques autres êtres vivants (Muzzarelli, 1977). De plus, elle peut se présenter sous différentes formes, chacune d'entre elles possédant des caractéristiques propres de détection. L'ergostérol est quant à lui plus spécifique des champignons. Cette molécule, encore appelée provitamine D2, est un stérol de base méthylée en C24 (faisant partie du sous-groupe de composés organiques solubles dans les lipides), présent dans les membranes cellulaires des mycètes filamenteux et des levures. Cette molécule est absente des cellules animales (Verscheure *et al.*, 2002) et est minoritaire parmi les stérols des végétaux supérieurs (Pitt et Hocking, 1997) et des insectes (Weete, 1980). Griffiths *et al.* (2003) ont démontré que l'ergostérol est le stérol majoritaire des moisissures : il représente 95 % des stérols totaux, les 5 % restants étant des précurseurs de l'ergostérol chez *Leptosphaeria maculans*. Cette spécificité fait de cette molécule un traceur potentiel de l'activité fongique. En effet, différents travaux ont justifié l'utilisation de ce métabolite en tant que témoin d'une contamination fongique (Seitz *et al.*, 1977 ; Cahagnier *et al.*, 1983 ; Seitz et Pomeranz, 1983 ; Frisvad *et al.*, 1998 ; Dowell *et al.*, 1999). On estime qu'un grain a une qualité microbiologique convenable si l'on dénombre au maximum 10 000 germes de la flore de stockage par gramme de grain. De plus, il est communément admis que la teneur en ergostérol doit être inférieure à un certain seuil, la limite étant de 8 µg/g pour le maïs (Cahagnier et Fleurat-Lessard, 1996). Des travaux utilisant la spectroscopie proche infrarouge ont été réalisés pour quantifier l'ergostérol (Dowell *et al.*, 1999 ; Kos *et al.*, 2003 ; Kos *et al.*, 2004 ; Berardo *et al.*, 2005 ; Börjesson *et al.*, 2007). L'ergostérol peut être utilisé en tant que marqueur

fongique (Seitz *et al.*, 1977 ; Seitz *et al.*, 1979 ; Saxena *et al.*, 2001 ; Castro *et al.*, 2002) et peut donc servir de signal de prévention d'une éventuelle synthèse de mycotoxines.

Le *tableau 1* récapitule les travaux portant sur la détection de la chitine ou de l'ergostérol par infrarouge. Si l'on compare les gammes de teneur en ergostérol utilisées, avec le seuil de 8 µg/g (ou 8 parties par million [ppm]), seuls les travaux de Berardo *et al.* (2005) (0,78 à 41,52 ppm) et de Börjesson *et al.* (2007) (2,88 à 60,66 ppm) intègrent ce seuil. Le nombre d'échantillons utilisés est raisonnable pour donner une idée des performances (respectivement 160 et 110 échantillons). L'erreur SEP du modèle de Berardo *et al.* (2005) est de 1,74 ppm en validation externe, alors que l'erreur SECV de Börjesson *et al.* (2007) est de 6,3 ppm sur org. L'erreur SECV de Börjesson *et al.* (2007) est élevée par rapport à ce seuil de 8 ppm, mais celle de Berardo *et al.* (2005) est intéressante. Le modèle serait utilisable pour quantifier l'ergostérol dans le maïs.

Application de la spectroscopie infrarouge à la détection globale des contaminations fongique et mycotoxique

Lien entre contamination fongique et mycotoxique

La détection des mycotoxines sur les céréales peut être réalisée de deux manières principales : l'auteur cherche à quantifier directement la teneur en toxines, ou bien il se sert de la présence fongique pour approcher le risque toxique. Différents auteurs ont étudié le lien entre la teneur en ergostérol, la teneur en mycotoxines et les unités fongiques (unités formant colonies [UFC]). Le lien entre la quantité de champignons et la quantité de mycotoxines n'est pas

Tableau 1. Spectroscopie infrarouge appliquée à la quantification de la chitine et de l'ergostérol dans les céréales.

Table 1. Infrared spectroscopy applied to chitine and ergosterol quantification in cereals.

CA ^a	GT ^b	IM ^c	NE ^d	PE ^e	Cont ^f	Outils statistiques		Performances						Auteurs		
						Reg ^g	PT ^h	Calibrage		Validation croisée		Test				
								NE	r ²	SEC	r ²	SECV	NE		r ²	SEP
Chitine	0,55 à 6,74 g/kg MS	O	116	NR	N, A	Régression multiple standard	D2	96	0,94	0,31 g/kg	NR	NR	20	0,92	0,22 g/kg	Roberts <i>et al.</i> , 1991
Ergostérol	50 à 1 497 ppm	B	46	MG	N	PLS	CR	46	0,64	108 ppm	NR	NR	NR	NR	NR	Dowell <i>et al.</i> , 1999
Ergostérol	880 à 3 600 µg/kg	M	14	GB	N	PLS	CR + D1	14	0,88	445,1 µg/kg	0,72	691,9 µg/kg	NR	NR	NR	Kos <i>et al.</i> , 2003
Ergostérol	880 à 3 600 µg/kg	M	14	GB	N	PLS	CR	14	0,8	593 µg/kg	0,6	864,7 µg/kg	NR	NR	NR	Kos <i>et al.</i> , 2004
Ergostérol	0,78 à 41,52 mg/kg	M	160	NR	N, A	MPLS	MSC + D	NR	NR	NR	NR	NR	41	0,81	1,74 mg/kg	Berardo <i>et al.</i> , 2005
Ergostérol	2,88 à 60,66 mg/kg	O	34 et 110	GE	N	PLS	SNVD + lissage	34	NR	NR	0,83	4,5 mg/kg	NR	NR	NR	Börjesson <i>et al.</i> , 2007
								110	NR	NR	0,5	6,3 mg/kg	NR	NR	NR	

NR : non renseigné ; SEC : standard error of calibration ; SECV : standard error of cross validation ; SEP : standard error of prediction.

^a Composé analysé.

^b Gamme de teneurs.

^c Matrice : B : blé ; M : maïs ; O : orge.

^d Nombre d'échantillons.

^e Présentation de l'échantillon : GB : grains broyés ; GE : grains entiers ; MG : monograines.

^f Nature de la contamination : A : artificielle ; N : naturelle.

^g Nature de la régression : PLS : régression linéaire des moindres carrés partiels ; MPLS : PLS modifiée.

^h Prétraitement mathématique appliqué aux spectres : CR : centré-réduit ; D1 : 1^{er} dérivée ; D2 : 2^e dérivée ; MSC : multiplicative scatter correction ; SNVD : standard normal variate and detrend.

proportionnel. En effet, il est possible d'avoir peu de champignons et beaucoup de mycotoxines, et inversement. En effet, la moisissure peut avoir disparu après avoir sécrété des toxines, de par l'évolution de la mycoflore, ou l'application de traitements chimiques. De plus, certaines souches sont plus toxigènes que d'autres. Certaines études ont abordé ce sujet. Deux conclusions existent. Des auteurs trouvent une corrélation entre la teneur en mycotoxines, la teneur en ergostérol et/ou les unités fongiques. Lamper *et al.* (2000) indiquent un coefficient de corrélation de 0,87 entre les teneurs en déoxynivalénol et les teneurs en ergostérol dans des échantillons de blé. Pour Miedaner *et al.* (2000), ce même coefficient dépasse 0,8. Enfin, Wanyoike *et al.* (2002) relèvent une corrélation positive « modérée » entre eux. À l'opposé, d'autres auteurs ne trouvent aucune corrélation ou ne peuvent pas conclure catégoriquement (Diener et Davis, 1982 ; Perkowski *et al.*, 1995 ; Gilbert *et al.*, 2002 ; Penteado Moretzsohn de Castro *et al.*, 2002 ; Beyer *et al.*, 2007 ; Nowicki, 2007).

Discrimination de souches fongiques

Plusieurs études portent sur la discrimination ou l'identification de *Fusarium*, *Aspergillus* ou *Penicillium*, au niveau des genres, des espèces ou bien encore des souches. La grande majorité des travaux ciblent *Fusarium*. En 2007, Nie *et al.* (2007) ont analysé 16 isolats appartenant à cinq espèces de *Fusarium* par spectroscopie infrarouge. Grâce à l'utilisation d'un réseau de neurones (ANN), 100 % des isolats ont été bien reconnus, que ce soit dans le set de calibrage (neuf souches) ou bien dans le set de test (les sept souches restantes). En 2010, les travaux de Levasseur *et al.* (2010) ont permis de discriminer *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* et *F. verticillioïdes*, avec un taux de bon classement supérieur à 98,8 % en validation externe. En 2012, Salman *et al.* (2012) ont correctement identifié 75 % des dix souches de *Fusarium oxysporum* mises en culture sur le milieu Potato Dextrose Agar [PDA], en utilisant la spectroscopie. La même année, Williams *et al.* (2012) ont utilisé

cet outil pour discriminer trois souches appartenant aux trois espèces *F. subglutinans*, *F. proliferatum* et *F. verticillioïdes*, sur PDA. *F. verticillioïdes* a été le moins facilement identifié par le modèle.

En ce qui concerne *Aspergillus*, les essais de Garon *et al.* (2010) avaient pour objectif de discriminer des souches toxigènes et atoxigènes. Soixante-quinze pour cent des souches d'*Aspergillus flavus* et 100 % des souches d'*Aspergillus parasiticus* ont été correctement classées par infrarouge.

Enfin, l'étude de Fischer *et al.* (2006), portant sur l'identification de dix espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, indique un taux d'espèces bien classées de 80 %.

En conclusion, la caractérisation de souches fongiques par spectroscopie infrarouge semble être très prometteuse.

Quantification des degrés d'atteinte des grains par la fusariose et des teneurs en déoxynivalénol et en fumonisines dans le blé et le maïs

Balcerowska *et al.* (2009) et Berardo *et al.* (2005) présentent des essais de quantification des degrés d'atteinte des grains par la fusariose (tableau 2) sur le blé et sur le maïs. En validation externe, les valeurs de r^2 sont bonnes (0,78 au minimum).

Les paragraphes suivants mettent plus l'accent sur des travaux de quantification des mycotoxines sur blé et maïs. Les toxines ciblées sont le déoxynivalénol et les fumonisines, dont la teneur dans ces céréales est réglementée en alimentation humaine par la Commission européenne. Dans le maïs brut, la limite européenne réglementaire est de 4 000 ppb pour les fumonisines et de 1 750 ppb pour le déoxynivalénol. Pour le blé brut, la limite en déoxynivalénol est de 1 250 ppb (Commission européenne, 2007).

Différents auteurs présentent leurs modèles de prédiction des teneurs en déoxynivalénol : Dowell *et al.* (1999), Kos *et al.* (2003, 2004), Ruan *et al.* (2002), Pettersson et Aberg (2003), Roumet *et al.* (2007),

Abramovic *et al.* (2007), De Girolamo *et al.* (2009), Bolduan *et al.* (2009) et Beyer *et al.* (2010). Les caractéristiques ainsi que les performances des modèles sont récapitulées dans le tableau 3. Jusqu'ici, seuls quelques travaux infrarouges ont porté sur la prédiction de la teneur en fumonisines par spectroscopie infrarouge : Berardo *et al.* (2005), Bolduan *et al.* (2009), Firrao *et al.* (2010) et Gaspardo *et al.* (2012) (tableau 4).

Afin d'interpréter les performances, il est important de regarder la nature de la contamination, la gamme de teneurs et le nombre d'échantillons utilisés, le mode de présentation des grains, ainsi que l'approche statistique choisie.

En effet, selon que la contamination est naturelle ou bien artificielle, la souche est plus ou moins concurrente. Or, la présence d'autres souches fongiques est de nature à modifier le spectre infrarouge, qui lui, tient compte de l'ensemble « grain et contamination globale ». De plus, une moisissure consomme du grain pour sa propre croissance. Les teneurs en glucides ou lipides sont donc modifiées régulièrement au fur et à mesure de l'augmentation de la masse fongique, modifications détectables en spectroscopie. Les dilutions de grains contaminés dans du grain sain sont donc à proscrire. La gamme de teneurs est également très importante. Le modèle peut présenter de bonnes performances en termes de SE, alors qu'il a été développé sur une gamme de teneurs très étroite. C'est pour cela que les spécialistes calculent le rapport performances sur déviation (RPD), le rapport entre l'écart-type des concentrations du jeu de données et l'erreur du modèle infrarouge (SECV ou SEP). Un RPD supérieur à 2,4 permet de conclure à la possibilité d'utiliser le modèle infrarouge en routine (Williams, 2007). Par ailleurs, cette gamme de teneurs doit être représentative de la réalité du terrain. Il est communément admis en spectroscopie infrarouge qu'un set d'au moins 80 échantillons est nécessaire pour réaliser une étude. De plus, le mode de présentation compte beaucoup lorsque l'on envisage une application sur le terrain de ces études. En effet, l'industriel aura besoin de mesurer des lots de grains, et non pas des monograins, et si possible en grains entiers et non broyés, afin de gagner

Tableau 2. Spectroscopie infrarouge appliquée à la quantification de grains fusariés.

Table 2. Infrared spectroscopy applied to the quantification of fusarium-damaged grains.

GC ^a	M ^b	NE ^c	PE ^d	Cont ^e	Outils statistiques		Performances							Auteurs	
					Reg ^f	PT ^g	Calibrage		Validation croisée		Test				
							NE	r ²	SEC	r ²	SECV	NE	r ²		SEP
0 à 100 %	B	30	GB	A + dilution	PLS	C + D1	30	> 0,9	2,64 %	> 0,9	8,63 %	NR	NR	NR	Balcerowska <i>et al.</i> , 2009
28 à 100 % (contamination fongique totale)	M	220	NR	N, A	MPLS	MSC + D	NR	NR	NR	NR	NR	41	0,8	6,34 %	Berardo <i>et al.</i> , 2005
2 à 100 % (<i>Fusarium verticillioides</i>)	M	217	NR	N, A	MPLS	MSC + D	NR	NR	NR	NR	NR	85	0,78	9,64 %	Berardo <i>et al.</i> , 2005

NR : non renseigné ; SEC : *standard error of calibration* ; SECV : *standard error of cross validation* ; SEP : *standard error of prediction*.

^a Gamme de contamination.

^b Matrice : B : blé ; M : maïs.

^c Nombre d'échantillons.

^d Présentation de l'échantillon : GB : grains broyés.

^e Nature de la contamination : A : artificielle ; N : naturelle.

^f Nature de la régression : PLS : régression linéaire des moindres carrés partiels ; MPLS : PLS modifiée.

^g Prétraitement mathématique appliqué aux spectres : C : centré ; D1 : 1^{re} dérivée ; D2 : 2^e dérivée ; D : dérivée.

en efficacité. Enfin, le choix de faire une validation croisée ou externe impacte fortement la lecture des résultats. En effet, les performances en validation externe (sur un set de données nouveau) sont toujours moindres que celles en validation croisée.

Parmi les trois travaux répertoriés dans le *tableau 2*, travaux portant sur la quantification des grains fusariés, seuls les travaux de Berardo *et al.* (2005) utilisent, pour partie, des grains contaminés naturellement. Parmi les essais portant sur la quantification du déoxynivalénol répertoriés dans le *tableau 3*, cinq utilisent des échantillons contaminés naturellement, deux artificiellement, un avec dilution de grains, enfin, pour deux d'entre eux, l'information n'est pas donnée. La moitié des essais se font sur grains broyés. Seuls deux auteurs, Dowell *et al.* (1999) et Ruan *et al.* (2002), font une validation externe. Enfin, la moitié seulement des essais comporte un nombre d'échantillons représentatifs. Parmi les cinq études sur grains naturellement contaminés, trois ont un nombre d'échantillons très faible (14 pour Kos *et al.* [2003 et 2004] et 23 pour Beyer *et al.* [2010]). Parmi les deux études restantes, la gamme de teneurs utilisée par Dowell *et al.*

(2002) semble très importante (5 à 789 ppm). En plus de cela, ces auteurs travaillent sur des monograines. Ruan *et al.* (2002) sont donc les seuls auteurs à présenter des essais sur grains entiers, naturellement contaminés, avec un nombre d'échantillons intéressant. La gamme de teneurs va de 0,3 à 50,8 ppm. L'outil statistique utilisé est un réseau de neurones artificiels. Par rapport à la réglementation ou aux recommandations européennes (1 750 ppb ou 1,75 ppm pour l'alimentation humaine et 8 000 ppb ou 8 ppm pour l'alimentation animale), l'erreur du modèle SEP, soit 3,097 ppm, est trop élevée. En effet, dans 95 % des prédictions, la teneur en déoxynivalénol sera prédite à $\pm 2 \times 3,097$ ppm, soit un peu plus de ± 6 ppm.

Parmi les quatre articles ciblant les fumonisines (*tableau 4*), ceux de Firrao *et al.* (2010) et de Gaspardo *et al.* (2012) portent sur des contaminations naturelles, avec un nombre d'échantillons élevé. Gaspardo *et al.* (2012) travaillent sur des grains broyés, alors que Firrao *et al.* (2010) utilisent des monograines. Gaspardo *et al.* (2012) utilisent des grains de maïs contaminés à des niveaux allant de 0,417 à 11,845 ppm, avec une teneur moyenne de 3,537 ppm.

En validation sur un jeu de données externe, l'erreur SEP est de 0,839 ppm pour un r² de 0,77. La réglementation européenne indique un niveau de 2 ppm pour l'alimentation humaine et de 60 ppm pour l'alimentation animale. Dans 95 % des prédictions, la teneur en fumonisines sera bien prédite à $\pm 2 \times 0,8$ ppm, soit $\pm 1,6$ ppm. Le RPD est de 1,2. Le modèle n'est pas assez précis pour être utilisé en routine, mais l'auteur indique qu'il peut être employé pour discriminer des échantillons ayant des teneurs supérieures à 4 ppm. Parmi toutes les études citées, cette étude est la seule qui indique une possibilité d'utiliser la spectroscopie infrarouge en routine pour la quantification de fumonisines. Elle doit donc être confirmée par d'autres équipes de recherche.

La partie suivante traite de travaux de classement des échantillons par des modèles de spectroscopie infrarouge.

Approche du risque de contamination par classes

Le *tableau 5* synthétise les principaux travaux de classement d'échantillons contaminés, en ciblant soit le champignon, soit la mycotoxine, soit les deux.

Tableau 3. Spectroscopie infrarouge appliquée à la quantification du déoxynivalénol.

Table 3. Infrared spectroscopy applied to the quantification of deoxynivalenol.

GT ^a	M ^b	NE ^c	PE ^d	Cont ^e	Outils statistiques		Performances						Auteurs		
					Reg ^f	PT ^g	Calibrage			Validation croisée				Test	
							NE	r ²	SEC	r ²	SECV	NE		r ²	SEP
5 à 789 ppm	B	114	MG	N	PLS	CR	88	0,64	44 ppm	NR	NR	26	0,66	52 ppm	Dowell et al., 1999
310 à 2 596 µg/kg	M	14	GB	N	PLS	CR	14	0,99	98,6 µg/kg	0,66	NR	NR	NR	NR	Kos et al., 2003
310 à 2 596 µg/kg	M	14	GB	N	PLS	CR	14	0,94	178,8 µg/kg	0,65	NR	NR	NR	NR	Kos et al., 2004
0,3 à 50,8 ppm	O	188	GE	N	ANN	NR	NR	NR	NR	NR	NR	27	0,93	3,1 ppm	Ruan et al., 2002
0 à 13 700 ppb	B	50	GE	N + dilutions	ACP + PLS	NR	NR	NR	NR	0,98	NR	NR	NR	NR	Pettersson et Aberg, 2003
70 à 11 000 ppb	B	340	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Différents essais : r ² entre 0,33 et 0,801	NR	NR	NR	NR	Roumet et al., 2007
2,51 à 12,14 mg/kg	B	17	GB	A	PLS + MLR	CR	17	0,88	1,4 mg/kg	0,85	NR	NR	NR	NR	Abramovic et al., 2007
0 à 3 000 µg/kg	B	197	GB	NR	PLS	NR	149	0,71	386 µg/kg	0,58	NR	NR	NR	NR	De Girolamo et al., 2009
0 à 100,75 mg/kg	B	23	GE	N	PLS	D1	NR	NR	NR	0,84	NR	NR	NR	NR	Beyer et al., 2010
1,04 à 8,68 ln mg/kg	M	539	GB	A	MPLS	NR	539	0,90	0,44 ln mg/kg	0,88	NR	NR	NR	NR	Bolduan et al., 2009

NR : non renseigné ; SEC : standard error of calibration ; SECV : standard error of cross validation ; SEP : standard error of prediction ; ln : logarithme.

^a Gamme de teneur.

^b Matrice : B : blé ; M : maïs ; O : orge.

^c Nombre d'échantillons.

^d Présentation de l'échantillon : GB : grains broyés ; GE : grains entiers ; MG : monograines.

^e Nature de la contamination : A : artificielle ; N : naturelle.

^f Nature de la régression : ACP : analyse en composantes principales ; ANN : réseau de neurones artificiels ; MLR : régression linéaire multiple ; PLS : régression linéaire des moindres carrés partiels ; MPLS : PLS modifiée.

^g Prétraitement mathématique appliqué aux spectres : CR : centré-réduit ; D1 : 1^{re} dérivée.

Tableau 4. Spectroscopie infrarouge appliquée à la quantification des fumonisines.

Table 4. Infrared spectroscopy applied to the quantification of fumonisins.

GT ^a	M ^b	NE ^c	PE ^d	Cont ^e	Outils statistiques		Performances									Auteurs
					Reg ^f	PT ^g	Calibrage			Validation croisée		Test				
							NE	r ²	SEC	r ²	SECV	NE	r ²	SEP		
0,01 à 19,6 mg/kg	M	180	NR	N, A	MPLS	MSC + D	NR	NR	NR	NR	NR	37	0,78	1,3 mg/kg	Berardo <i>et al.</i> , 2005	
0,14 à 6,43 ln mg/kg	M	198	GB	A	MPLS	NR	198	0,68	0,80 ln mg/kg	0,46	1,04 ln mg/kg	NR	NR	NR	Bolduan <i>et al.</i> , 2009	
211 à 3 663 ppb	M	528	MG	N	ANN	NR	423	0,68	NR	NR	NR	105	0,68	NR	Firrao <i>et al.</i> , 2010	
0,41 à 11,85 mg/kg	M	168	GB	N	PLS	CR	168	0,93	0,6 mg/kg	NR	NR	25	0,77	0,84 mg/kg	Gaspardo <i>et al.</i> , 2012	

NR : non renseigné ; SEC : *standard error of calibration* ; SECV : *standard error of cross validation* ; SEP : *standard error of prediction* ; ln : logarithme.

^a Gamme de teneur.

^b Matrice : M : maïs.

^c Nombre d'échantillons.

^d Présentation de l'échantillon : GB : grains broyés ; MG : monograines.

^e Nature de la contamination : A : artificielle ; N : naturelle.

^f Nature de la régression : ANN : réseau de neurones artificiels ; PLS : régression linéaire des moindres carrés partiels ; MPLS : PLS modifiée.

^g Prétraitement mathématique appliqué aux spectres : CR : centré-réduit ; D : dérivée ; MSC : *multiplicative scatter correction*.

La première partie du tableau traite des contaminations par *Aspergillus*, *Fusarium* ou *Penicillium*. La seconde partie du tableau cible les travaux qui permettent de discriminer les grains en se basant non plus sur les champignons, mais directement sur les teneurs en fumonisines. Les pourcentages de bon classement sont bons, voire excellents. Notons cependant que la plupart des travaux ont été réalisés sur des monograines (10 sur 14), après contaminations artificielles (8 sur 14) et sur un nombre d'échantillons limité (moins de 80 échantillons : sept sur 14). La sensibilité des méthodes (capacité à donner un résultat positif lorsqu'une hypothèse est vérifiée) est donnée par le ratio suivant :

$$\frac{\%VP}{\%VP + \%FN}$$

La spécificité est, elle, renseignée par le ratio ci-dessous :

$$\frac{\%VN}{\%VN + \%FP}$$

La seule étude nous permettant ce calcul est celle de Gordon *et al.* (1998), dans laquelle la sensibilité vaut 0,96 et la spécificité vaut 0,84.

Conclusion

La spectroscopie infrarouge présente de multiples avantages. Cet outil ne nécessite aucune préparation ni emploi de produits toxiques. Il permet une analyse non destructive des échantillons. Par ailleurs, cette technique est rapide, utilisable en ligne à un coût peu élevé. La cellule de mesure est résistante et assez bon marché (verre ou quartz). Enfin, la spectroscopie proche infrarouge offre la possibilité d'analyses multiparamétriques et l'on dispose aujourd'hui d'une gamme importante d'appareils robustes. La principale difficulté est l'expertise nécessaire au développement des modèles.

Cette revue des principales approches qualitatives et quantitatives du risque fongique et mycotoxique nous a permis de relever quelques biais méthodologiques, par rapport à une utilisation de ces modèles sur le terrain : une collecte des spectres sur des monograines, des contaminations artificielles, une gamme de teneurs en déoxynivalénol et en fumonisines parfois étroite, ou au contraire, trop grande, ou encore, un faible nombre d'échantillons. Pour les essais basés sur

des contaminations naturelles, avec une gamme de teneurs qui reflète la réalité du terrain, la forte erreur standard SECV ou SEP indique que la précision de ces modèles est insuffisante pour quantifier le déoxynivalénol et les fumonisines dans le blé ou le maïs, pour des niveaux de contamination équivalents à la limite réglementaire européenne. Une seule étude semblerait proposer un modèle de quantification exploitable, cependant, cela demande validation compte tenu de toutes les autres études concluant négativement. Des améliorations technologiques pourront probablement améliorer la précision : utilisation de l'hyperspectral, ou d'un couplage de différents systèmes optiques par exemple, mais la précision des modèles ne sera probablement pas suffisante vis-à-vis de la réglementation. En effet, un des challenges à relever tient au fait que la spectroscopie infrarouge est généralement utilisée pour quantifier des composés à des teneurs au moins 100 fois plus élevées que celles des toxines (Delwiche *et al.*, 2011). L'utilisation de méthodes de régression non linéaires (réseaux de neurones, support vecteur machine) devrait également permettre d'améliorer les

Tableau 5. Spectroscopie infrarouge appliquée à la discrimination de blé, de maïs ou d'orge, contaminés par des champignons toxigènes, ou des mycotoxines.

Table 5. Infrared spectroscopy applied to the discrimination of wheat, maize barley contaminated by toxinogenic mushrooms or mycotoxins.

Contamination par	M ^a	NE ^b	PE ^c	Cont ^d	Outils statistiques		Calibrage ^e						Test				Auteurs	
					Modèle ^e	PT ^f	NE	%VP	%FN	%VN	%FP	NE	%VP	%FN	%VN	%FP		
<i>Aspergillus flavus</i>	M	20	MG	A	NR	CR	20	100	0	100	0	0	0	NR	NR	NR	NR	Gordon et al., 1997
<i>Aspergillus flavus</i>	M	112	MG	A	ANN	CR	112	100	0	100	0	0	CV	96	4	84	16	Gordon et al., 1998
<i>Fusarium</i>	M	52	GB	A	ACP	D1		Au moins 75 % bien classés				NR	NR	NR	NR	NR	Kos et al., 2002	
<i>Fusarium</i>	M	14	GB	N	CA, KNN	CR		100 % de bien classés				CV	100 % de bien classés				Kos et al., 2003	
<i>Fusarium</i>	M	14	GB	N	CA, KNN	CR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Kos et al., 2004
<i>Fusarium</i>	B	4 800	MG	N	LDA	LISS	NR	NR	NR	NR	NR	NR	CV	97 % de bien classés				Delwiche et Hareland, 2004
<i>Fusarium</i>	B	8	MG	N	LDA	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	CV	95 % de bien classés				Delwiche et al., 2011
<i>Fusarium</i>	B	800	MG	N	LDA	NR	400	93 % de bien classés				400	92 % de bien classés				Shahin et Symons, 2011	
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Diplodia maydis</i> , <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i> , <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i> ou <i>Trichoderma viride</i>	M	946	MG	A	LDA	CR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Plusieurs résultats maïs	> 85 % de bien classés				Pearson et Wicklow, 2006
<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	B	NR	MG	A	Différents modèles de discrimination	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Plusieurs résultats maïs	> 88,7 % de bien classés				Singh et al., 2012
<i>Fusarium</i>	B	17	GB	A	CA	CR	17	100 % de bien classés				CR	NR				Abramovic et al., 2007	
<i>Fusarium verticillioides</i>	M	21	MG	A	PLS	CR	21	> 97 % de bien classés				CR	NR				Williams et al., 2010	
<i>Fumonisines</i>	M	330	MG	A	PLS	CR	NR	NR				CR	Plusieurs résultats : entre 80 et 91 % de bien classés				Dowell et al., 2002	
<i>Fumonisines</i>	M	105	MG	N	ANN	NR	NR	NR				NR	71 % de bien classés				Firrao et al., 2010	

NR : non renseigné ; CV : validation croisée.

^a Matrice : B : blé ; M : maïs ; O : orge.

^b Nombre d'échantillons.

^c Présentation de l'échantillon : GB : grains broyés ; GE : grains entiers ; MG : monograines.

^d Nature de la contamination : A : artificielle ; N : naturelle.

^e Nature de la régression : ACP : analyse en composantes principales ; ANN : réseau de neurones artificiels ; CA : classification ; KNN : classification k-means ; LDA : analyse discriminante linéaire ; PLS : régression linéaire des moindres carrés partiels.

^f Prétraitement mathématique appliqué aux spectres : CR : centré-réduit ; D1 : 1^{er} dérivée ; D2 : 2^e dérivée ; LISS : lissage ; MSC : *multiplicative scatter correction* ; SNVD : *standard normal variate and detrend*.

^g Classement des échantillons : NE : nombre d'échantillons ; %VP : pourcentage de vrais positifs ; %FN : pourcentage de faux négatifs ; %VN : pourcentage de vrais positifs ; %FP : pourcentage de faux positifs.

modèles, mais ces méthodes nécessitent un grand nombre d'échantillons. En l'état des choses, l'approche qualitative « sain » *versus* « contaminé » semble être une voie plus prometteuse pour une utilisation en routine de la spectroscopie infrarouge. Cependant, un classement des échantillons à « teneur en mycotoxines inférieure à la limite européenne » *versus* « teneur en mycotoxines supérieure à la limite européenne » serait plus approprié, bien qu'aucune publication, à notre connaissance, ne fasse part de ce système. ■

Références

- Abramovic B, Jajic I, Cosic J, Juric V, 2007. Detection of deoxynivalenol in wheat by Fourier transform infrared spectroscopy. *Acta Chimica Slovenica* 54 : 859-67.
- Agreste, 2011. *Site du ministère de l'Agriculture et de la Pêche*. <http://agreste.agriculture.gouv.fr>
- Balcerowska G, Siuda R, Skrzypczak J, Lukanowski A, Sadowski C, 2009. Effect of particle size and spectral sub-range within the UV-VIS-NIR range using diffuse reflectance spectra on multivariate models in evaluating the severity of fusariosis in ground wheat. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 26 : 726-32.
- Berardo N, Pisacane V, Battilani P, Scandolara A, Pierri A, Marocco A, 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 : 8128-34.
- Beyer M, Klix MB, Verreet JA, 2007. Estimating mycotoxin contents of Fusarium-damaged winter wheat kernels. *International Journal of Food Microbiology* 119 : 153-8.
- Beyer M, Pogoda F, Ronellenfisch FK, Hoffmann L, Udelhoven T, 2010. Estimating deoxynivalenol contents of wheat samples containing different levels of Fusarium-damaged kernels by diffuse reflectance spectrometry and partial least square regression. *International Journal of Food Microbiology* 142 : 370-4.
- Bolduan C, Montes JM, Dhillon BS, Mirdita V, Melchinger AE, 2009. Determination of mycotoxin concentration by ELISA and near-infrared spectroscopy in Fusarium-inoculated maize. *Cereal Research Communications* 37 : 521-9.
- Börjesson T, Stenberg B, Schnurer J, 2007. Near-infrared spectroscopy for estimation of ergosterol content in barley: a comparison between reflectance and transmittance techniques. *Cereal Chemistry* 84 : 231-6.
- Cahagnier B, Fleurat-Lessard F, 1996. Bonnes conditions du grain à l'entreposage (et moyens de maîtrise des altérations en cours de stockage). *Guide des bonnes pratiques du GLCG : stockage à plat des céréales pour une durée indéterminée*. La Rochelle : GLCG ;7-14.
- Cahagnier B, Richard-Molard D, Poisson J, 1983. Evolution of the ergosterol content of cereal-grains during storage – a possibility for a rapid test of fungal development in grains. *Sciences des Aliments* 3 : 219-44.
- Castro MFPMD, Bragagnolo N, Valentini SRDT, 2002. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. *Brazilian Journal of Microbiology* 33 : 22-6. doi: 10.1590/S1517-83822002000100004.
- Commission européenne, 2006. *Recommandation de la commission du 17 août 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* (recommandation CE/576/2006).
- Commission européenne, 2007. 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 de *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. *Journal Officiel de l'Union Européenne* 255 : 14-7.
- Cousin MA, 1996. Chitin as a measure of mold contamination of agricultural commodities and foods. *Journal of Food Protection* 59 : 73-81.
- Davies AMC, Dennis C, Grant A, 1987. Screening of tomato puree for excessive mould content by near-infrared spectroscopy: a preliminary evaluation. *Journal of Science and Food Agriculture* 39 : 349-55.
- De Girolamo A, Lippolis V, Nordkvist E, Visconti A, 2009. Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 26 : 907-17. doi: 10.1080/02652030902788946.
- Delwiche SR, Hareland GA, 2004. Detection of scab-damaged hard red spring wheat kernels by near-infrared reflectance. *Cereal Chemistry* 81 : 643-9. doi: 10.1094/CHEM.2004.81.5.643.
- Delwiche SR, Kim MS, Dong Y, 2011. Fusarium damage assessment in wheat kernels by Vis/NIR hyperspectral imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 5 : 63-71.
- Diener UL, Davis ND, 1982. Aflatoxins in corn. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 184 (SEP) : 86.
- Dowell FE, Ram MS, Seitz LM, 1999. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry* 76 : 573-6. doi: 10.1094/cchem.1999.76.4.573.
- Dowell FE, Pearson TC, Maghirang EB, Xie F, Wicklow DT, 2002. Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. *Cereal Chemistry* 79 : 222-6. doi: 10.1094/CHEM.2002.79.2.222.
- FAO, 2001. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Document préparé par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) à sa 56^e réunion. Étude FAO : alimentation et nutrition n° 74. Rome, Italie : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Firrao G, Torelli E, Gobbi E, Raranciu S, Bianchi G, Locci R, 2010. Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. *Journal of Cereal Science* 52 : 327-30.
- Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W, 2006. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 64 : 63-77.
- Fraenkel H, Gough PB, Maughan WS, 1980. *Method and apparatus for sorting agricultural products*. US Patent 4203522.
- Fremy JM, Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), 2009. *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. Rapport final de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), 308 pp.
- Frisvad JC, Bridge PD, Arora DK, 1998. *Chemical fungal taxonomy*. New York : Marcel Dekker.
- Garon D, El Kaddoumi A, Carayon A, Amiel C, 2010. FT-IR spectroscopy for rapid differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and characterization of aflatoxigenic isolates collected from agricultural environments. *Mycopathologia* 170 : 131-42.
- Gaspardo B, Del Zotto S, Torelli E, Cividino SR, Firrao G, Della Riccia G, et al., 2012. A rapid method for detection of fumonisins B-1 and B-2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chemistry* 135 : 1608-12.
- Gilbert J, Abramson D, McCallum B, Clear R, 2002. Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia* 153 : 209-15. doi: 10.1023/A:1014940523921.
- Gordon SH, Schudy RB, Wheeler BC, Wicklow DT, Greene RV, 1997. Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. *International Journal of Food Microbiology* 35 : 179-86. doi: 10.1016/S0168-1605(96)01217-2.
- Gordon SH, Wheeler BC, Schudy RB, Wicklow DT, Greene RV, 1998. Neural network pattern recognition of photoacoustic FTIR spectra and knowledge-based techniques for detection of mycotoxigenic fungi in food grains. *Journal of Food Protection* 61 : 221-30.
- Griffiths KM, Bacic A, Howlett BJ, 2003. Sterol composition of mycelia of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Phytochemistry* 62 : 147-53. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00505-8.
- Kos G, Lohninger H, Krska R, 2002. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of Fusarium fungi on maize. *Vibrational Spectroscopy* 29 : 115-9. doi: 10.1016/S0924-2031(01)00196-5.
- Kos G, Lohninger H, Krska R, 2003. Development of a method for the determination of Fusarium fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics. *Analytical Chemistry* 75 : 1211-7. doi: 10.1021/ac0260903.
- Kos G, Krska R, Lohninger H, Griffiths PR, 2004. A comparative study of mid-infrared diffuse reflection (DR) and attenuated total reflection (ATR) spectroscopy for the detection of fungal infection on RWA2-corn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 : 159-66. doi: 10.1007/s00216-003-2245-y.
- Lamper C, Teren J, Bartok T, Komorocsy R, Mesterhazy A, Sagi F, 2000. Predicting DON contamination in Fusarium-infected wheat grains via determination of the ergosterol content. *Cereal Research Communications* 28 : 337-44.
- Levasseur C, Pinson-Gadais L, Kleiber D, Surel O, 2010. Near infrared spectroscopy used as a support

- to the diagnostic of *Fusarium* species. *Revue de Médecine Vétérinaire* 161 : 438-44.
- Levasseur-Garcia C, 2010. *Stratégie de classement des lots de maïs en fonction de leurs teneurs en fusariotoxines par spectroscopie infrarouge*. PhD thesis, université Paul-Sabatier (Toulouse), 157 pp.
- Levasseur-Garcia C, 2012. Infrared spectroscopy applied to identification and detection of microorganisms and their metabolites on cereals (corn, wheat, and barley). In : Aflakpui G, ed. *Agricultural Science*. New York : Intech.
- Miedaner T, Reinbrecht C, Schilling AG, 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107 : 124-34.
- Miguel Gomez MA, Bratos Perez MA, Martin Gil FJ, Duenas Diez A, Martin Rodriguez JF, Gutierrez Rodriguez P, et al., 2003. Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 55 : 121-31. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00120-9.
- Muzzarelli RAA, 1977. *Chitin*. N.Y. London : Pergamon Press.
- Nie M, Zhang WQ, Xiao M, Luo JL, Bao K, Chen JK, et al., 2007. FT-IR spectroscopy and artificial neural network identification of *Fusarium* species. *Journal of Phytopathology* 155 : 364-7.
- Nilsson M, Elmqvist T, Carlsson U, 1994. Use of near-infrared reflectance spectrometry and multivariate data analysis to detect anther smut disease (*Microbotryum violaceum*) in *Silene dioica*. *Phytopathology* 84 : 764-70. doi: 10.1094/Phyto-84-764.
- Nowicki T, 2007. *CCF/CWFHB : session 2 – Toxicologie, qualité du grain et impact sur l'industrie*. http://sci.agr.ca.ecorc/fusarium01/session2b_f.htm
- Pearson TC, Wicklow DT, 2006. Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASABE* 49 : 1235-45.
- Penteado Moretzsohn de Castro MF, Bragagnolo N, de Toledo Valentini SR, 2002. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. *Brazilian Journal of Microbiology* 33 : 22-6. doi: 10.1590/S1517-83822002000100004.
- Perkowski J, Miedaner T, Geiger HH, Muller HM, Chelkowski J, 1995. Occurrence of deoxynivalenol (DON), 3-acetyl-DON, zearalenone, and ergosterol in winter rye inoculated with *Fusarium culmorum*. *Cereal Chemistry* 72 : 205-9.
- Pettersson H, Aberg L, 2003. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control* 14 : 229-32.
- Pitt JI, Hocking AD, 1997. *Fungi and food spoilage*. London : Blackie Academic & Professional.
- Roberts CA, Marquardt RR, Frohlich AA, McGraw RL, Rotter RG, Henning JC, 1991. Chemical and spectral quantification of mold in contaminated barley. *Cereal Chemistry* 68 : 272-5.
- Roumet P, Boinot N, Boudra H, Compan F, Hais X, Mahaut B, et al., 2007. *Potentialités de la spectroscopie proche infrarouge pour le développement de prédictions de la teneur en DON de grains de blé tendre mycotoxines fusariennes des céréales*. 11-13 septembre 2007. Arcachon, France.
- Ruan R, Li Y, Lin X, Chen P, 2002. Non-destructive determination of deoxynivalenol levels in barley using near-infrared spectroscopy. *Applied Engineering in Agriculture* 18 : 549-53.
- Salman A, Lapidot I, Pomerantz A, Tsror L, Hammody Z, Moreh R, et al., 2012. Detection of *Fusarium oxysporum* fungal isolates using ATR spectroscopy. *Spectroscopy: an International Journal* 27 : 551-6.
- Saxena J, Munimbazi C, Bullerman LB, 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *International Journal of Food Microbiology* 71 : 29-34. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00584-0.
- Seitz LM, Pomeranz Y, 1983. Ergosterol, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one ergosterol peroxide, and chitin in ergoty barley, rye, and other grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31 : 1036-8.
- Seitz LM, Mohr HE, Burroughs HE, Sauer DB, 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry* 54 : 1207-17.
- Seitz LM, Sauer DB, Burroughs HE, Mohr HE, Hubbard JD, 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69 : 1202-3.
- Shahin MA, Symons SJ, 2011. Detection of *Fusarium* damaged kernels in Canada Western Red Spring wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging and principal component analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* 75 : 107-12.
- Singh CB, Jayas DS, Paliwal J, White NDG, 2012. Fungal damage detection in wheat using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging. *International Journal of Food Properties* 15 : 11-24.
- Verscheure M, Lognay G, Marlier M, 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 6 : 131-42.
- Wanyoike MW, Walker F, Buchenauer H, 2002. Relationship between virulence, fungal biomass and mycotoxin production by *Fusarium graminearum* in winter wheat head blight. *Journal of Plant Diseases and Protection* 109 : 589-600.
- Weete JD, 1980. *Lipid biochemistry of fungi and other organisms*. New York and London : Plenum Press.
- Williams PC, 2007. *Near-infrared technology – Getting the best out of light*, 5.1 ed, Canada : PDK Projects, Inc., Nanaimo B.C.
- Williams PJ, Manley M, Fox G, Geladi P, 2010. Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) kernels by near infrared hyperspectral imaging. *Journal of Near-Infrared Spectroscopy* 18 : 49-58.
- Williams PJ, Geladi P, Britz TJ, Manley M, 2012. Near-infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus *Fusarium*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 : 1759-69.