

LES TRICHOHECENES : NATURE ET ORIGINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Alexandre, Paul, Emile BALZER
Né, le 29 avril 1975 à COLMAR (Haut-Rhin)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Philippe GUERRE

JURY

PRESIDENT :
M. Jean-Louis FONVIEILLE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Philippe GUERRE
M. Jean-Denis BAILLY

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Didier TARDIEU

Docteur de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur FONVIEILLE

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Zoologie – Parasitologie

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur GUERRE

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pharmacie -Toxicologie

Qui nous a aidé et dirigé dans notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur le Docteur BAILLY

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

Monsieur le Docteur TARDIEU

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Qui participe à notre jury en tant que membre invité.

Tous mes remerciements.

**A mes parents,
A ma grand-mère,**

Pour l'amour que vous me portez, pour votre soutien et tous les efforts consentis.
Que cet humble travail représente l'accomplissement de tous vos sacrifices et le reflet de mon immense reconnaissance et amour.

A Annabelle,

Pour tout l'amour que tu me portes et tous ces moments de bonheurs partagés.
Qu'ils durent éternellement.

A Jean-Luc,

Pour ton amitié, nos fous rires et surtout pour m'avoir donné envie de faire cette thèse.

A Nicolas,

Que les mycotoxines soient avec nous !

A mes amis, et par ordre d'ancienneté sur l'école, Anne, Juju, Dom, Speedy, Benoît, Marmotte, Vin's, Nat, Evie, Hélène et son homme, Sandrine, Julien, Caro, Jeff ... et tous les autres,

Pour tous les excellents souvenirs et tous les bons moments à venir.

A Op'tracken,

Pour que durent les concours d'agility. A fond, à fond, à fond...

« Tous les hommes rêvent : mais tous ne sont pas égaux dans leurs rêves. Ceux qui rêvent la nuit dans les recoins poussiéreux de leur esprit s'éveillent en découvrant que leurs rêves n'étaient que pure vanité ; mais ceux qui rêvent le jour sont des hommes dangereux, car ils peuvent vivre leurs rêves les yeux ouverts, ils peuvent les réaliser »

T.E. Lawrence

Les Sept Piliers de la Sagesse

TABLE DES MATIERES

PARTIE 1. LES TOXINES : NATURE, PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES ET MOYENS DE DECONTAMINATION

1.1. Structures et propriétés communes	p 25
1.1.1. Structure générale	p 25
1.1.2. Propriétés physiques et chimique	p 27
1.1.2.1. Propriétés physiques	p 27
1.1.2.2. Propriétés chimiques	p 27
1.1.3. Stabilité et toxicité	p 29
1.2. Trichothécènes du groupe A	p 30
1.2.1. Généralités	p 30
1.2.2. La toxine T-2	p 32
1.2.3. Le diacétoxyscirpénol	p 33
1.2.4. La toxine HT-2	p 34
1.3. Trichothécènes du groupe B	p 35
1.3.1. Généralités	p 35
1.3.2. Le déoxynivalénol	p 36
1.3.3. Le nivalénol	p 37
1.3.4. La fusarénone X	p 38
1.4. Techniques d'analyse	p 39
1.4.1 Extraction, purification	p 40
1.4.1.1. Extraction	p 40
1.4.1.2. Purification	p 40
1.4.2. Dosages par des méthodes physico-chimiques	p 41
1.4.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	p 41
1.4.2.2. Chromatographie liquide haute pression (CLHP)	p 42
1.4.2.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	p 42

1.4.2.4. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrographie de masse (CPG/SM)	p 43
1.4.2.5. Chromatographie liquide couplée à la spectrographie de masse (CL/SM)	p 43
1.4.3. Dosages par des méthodes immunologiques	p 43
1.4.3.1. Dosage radio immunologique	p 44
1.4.3.2. Dosage immuno- enzymologique	p 44
1.4.4. Dosages par des méthodes biologiques	p 44
1.4.4.1. Test de toxicité cutanée	p 45
1.4.4.2. Inhibition de la synthèse protéique	p 45
1.4.4.3. Mise en évidence d'une activité antifongique, phytotoxique et cytotoxique	p 46
1.4.5. Méthodes d'analyses des toxines les plus courantes	p 46
1.5. Lutte contre les toxines	p 52
1.5.1. Séparation physique des toxines des denrées	p 52
1.5.2. Lutte chimique	p 53
1.5.3. Adsorption des toxines	p 53
1.5.4. Lutte biologique	p 54

PARTIE 2. LES MOISSURES : NATURE, CROISSANCE ET MOYENS DE CONTROLE

2.1. Les moisissures	p 58
2.1.1. Généralités	p 58
2.1.2. Culture	p 58
2.1.3. Taxonomie et identification	p 59
2.1.3.1. Taxonomie générale	p 59
2.1.3.2. Identification	p 61
2.1.4. Espèces présentes et morphologies	p 63
2.1.4.1. Le genre <i>Fusarium</i>	p 63
2.1.4.2. Le genre <i>Trichothecium</i>	p 66
2.1.4.3. Le genre <i>Trichoderma</i>	p 66
2.1.4.4. Le genre <i>Myrothecium</i>	p 69

2.1.5. Types de trichothécènes produits par espèce de moisissure	p 70
2.2. Facteurs de croissance et toxinogénèse	p 73
2.2.1. Facteurs intrinsèques	p 73
2.2.1.1. Nature des espèces présentes	p 73
2.2.1.2. Propriété et intensité de la pollution	p 74
2.2.2. Facteurs extrinsèques	p 75
2.2.2.1. Influence du substrat	p 75
2.2.2.2. Disponibilité en eau	p 76
2.2.2.3. Température	p 77
2.2.2.4. Composition gazeuse	p 79
2.2.2.5. pH	p 79
2.2.3. Facteurs favorisants	p 80
2.2.4. Dissémination et évolution de la flore dans le temps	p 80
2.3. Voie de synthèse	p 81
2.3.1 Généralités	p 81
2.3.2. Biosynthèse des trichothécènes	p 83
2.4. Lutte contre les moisissures	p 85
2.4.1. Méthodes physiques	p 85
2.4.2. Méthodes chimiques	p 85
2.4.3. Méthodes biologiques	p 88
2.5. Nature et niveau de contamination des aliments	p 90
2.5.1. Contamination des matières premières	p 90
2.5.1.1. Le déoxynivalénol	p 90
2.5.1.2. Les toxines T-2 et HT-2	p 93
2.5.1.3. Le diacétoxycirpénol	p 95
2.5.1.4. Le nivalénol	p 95
2.5.1.5. La fusarénone X	p 96
2.5.2. Contamination des produits transformés	p 97
2.5.2.1. Le déoxynivalénol	p 97
2.5.2.2. Les toxines T-2 et HT-2	p 98

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure n° 1 : Structure générale semi développée des trichothécènes	p 25
Figure n° 2 : Conformation spatiale des trichothécènes par l'exemple du diacétoxyscirpénol ..	p 26
Figure n° 3 : Réactivité chimique des trichothécènes	p 28
Figure n° 4 : Structure des trichothécènes du groupe A	p 31
Figure n° 5 : Formule semi développée de la toxine T-2	p 32
Figure n° 6 : Formule semi développée du diacétoxyscirpénol	p 33
Figure n° 7 : Formule semi développée de la toxine HT-2	p 34
Figure n° 8 : Structure des trichothécènes du groupe B	p 35
Figure n° 9 : Formule semi développée du déoxynivalénol	p 37
Figure n° 10 : Formule semi développée du nivalénol	p 38
Figure n° 11 : Formule semi développée de la fusarénone X	p 39
Figure n° 12 : Classification des champignons producteurs de trichothécènes	p 60
Figure n° 13 : <i>Fusarium graminearum</i>	p 64
Figure n° 14 : <i>Fusarium equiseti</i>	p 65
Figure n° 15 : <i>Trichothecium roseum</i>	p 67
Figure n° 16 : <i>Trichoderma viridae</i>	p 68
Figure n° 17 : <i>Myrothecium verrucaria</i>	p 69
Figure n° 18 : Taux d'humidité minimal en fonction du type de graines	p 75
Figure n° 19 : A_w des principaux genres de moisissures	p 77
Figure n° 20 : Températures optimales de croissances pour les espèces productrices de trichothécènes	p 78
Figure n° 21 : Evolution de la mycoflore dans le temps	p 81
Figure n° 22 : Biosynthèse des principales mycotoxines	p 82
Figure n° 23 : Biosynthèse des trichothécènes	p 84
Figure n° 24 : Variations annuelles dans la concentration en déoxynivalénol sur le blé en Argentine	p 91

Tableaux

Tableau n° 1 : Propriétés physiques de quelques trichothécènes du groupe A	p 32
Tableau n° 2 : Propriétés physiques de quelques trichothécènes du groupe B	p 36
Tableau n° 3 : Principales méthodes de dosage de la toxine T-2	p 47
Tableau n° 4 : Principales méthodes de dosage du diacétoxyscirpénol	p 48
Tableau n° 5 : Principales méthodes de dosage de la toxine HT-2	p 49
Tableau n° 6 : Principales méthodes de dosage du déoxynivalénol	p 50
Tableau n° 7 : Principales méthodes de dosage du nivalénol	p 51
Tableau n° 8 : Principales méthodes de dosage de la fusarénone X	p 51
Tableau n° 9 : Critères d'identification des principaux <i>Fusarium</i>	p 62
Tableau n° 10 : Principales moisissures productrices de trichothécènes	p 71
Tableau n° 11 : Origine des principaux trichothécènes	p 72
Tableau n° 12 : Influence de la température sur la proportion de déoxynivalénol et de zéaralénone par <i>Fusarium graminearum</i> en culture	p 79
Tableau n° 13 : Effets de trois fongicides sur le développement de <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> et <i>F. nivale</i> après inoculation du blé	p 86
Tableau n° 14 : Plan d'intervention contre les fusarioses	p 89
Tableau n° 15 : Contamination moyenne des céréales par le déoxynivalénol dans le monde	p 90
Tableau n° 16 : Contamination moyenne des grains par le déoxynivalénol par régions du globe	p 92
Tableau n° 17 : Contamination ponctuelle par le DON	p 92
Tableau n° 18 : Contamination moyenne des grains par la toxine T-2	p 93
Tableau n° 19 : Contamination ponctuelle par la toxine T-2	p 94
Tableau n° 20 : Contamination ponctuelle par la toxine HT-2	p 94
Tableau n° 21 : Contamination ponctuelle par le diacétoxyscirpénol	p 95
Tableau n° 22 : Contamination ponctuelle par le nivalénol	p 96
Tableau n° 23 : Contamination ponctuelle des produits transformés par le déoxynivalénol	p 97

LISTE DES ABREVIATIONS

DAS : Diacétoxyscirpénol

DON : Déoxynivalénol

NIV : Nivalénol

FX : Fusarénone X

a_w : Activité en eau

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Pression

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CL : Chromatographie Liquide

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

UV : Ultra-Violet

SM : Spectrographie de Masse

ECD : Détection par capture d'électrons

INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, l'étude des mycotoxicoses a connu un grand développement, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Les mycotoxines ne constituent pas une classe chimique. La plupart ont un poids moléculaire relativement faible, leur structure est assez diversifiée et leurs propriétés physiques et chimiques sont différentes, acides comme les fumonisines ou neutres comme les trichothécènes. Elles sont synthétisées par des moisissures qualifiées de toxigènes, c'est à dire susceptibles d'élaborer ou de provoquer l'apparition d'un ou plusieurs métabolites toxiques. Elles font le plus souvent partie des métabolites qui ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du micro-organisme, contrairement au métabolisme primaire fournissant de l'énergie ou des composés intermédiaires pour les synthèses. Pour une espèce donnée, seules certaines souches se révèlent toxigènes. La biosynthèse de toxine par une souche toxigène n'est pas systématique et va dépendre des conditions du milieu.

Bien que les mycotoxines soient connues depuis des siècles (l'intoxication de l'homme par les farines ergotées était connue sous la Haute Antiquité), les premiers travaux consacrés aux trichothécènes remontent à la fin de la seconde guerre mondiale. En 1949, FREEMAN va isoler la trychothécine, en recherchant des composés antifongiques dans les filtrats de culture de *Trichothecium roseum* [FREEMAN G.G., 1949]. Puis a été découvert le diacétoxyscirpénol, en étudiant les composés phytotoxiques produits par *Fusarium scirpi*. En 1968, ce fut la découverte de la toxine T-2 à l'occasion des recherches sur les mycotoxicoses du bétail aux Etats Unis, engendrés par la consommation de maïs contaminé par *Fusarium tricinctum* [IARC, 1983].

Dès 1950, on associa les « épidémies » meurtrières d'aleucie toxique alimentaire chez l'homme, survenues en URSS au début du XXe siècle, à la consommation de grains de céréales moisiss par *Fusarium poae* et *Fusarium sporotrichioides*. Mais c'est seulement en 1972 que l'on montra que les moisissures responsables de cette affection étaient capables de produire de la toxine T-2 [VIDAL D.R., 1990].

Actuellement, le nombre de références sur les trichothécènes et les moisissures responsables de leur synthèse est très important. Le sujet étant extrêmement vaste, allant de l'agronomie, avec les effets phytopathogènes des *Fusarium*, à la toxicologie, avec les effets délétères des trichothécènes, nous nous limiterons à l'étude de la nature et de l'origine des trichothécènes. Une seconde thèse traitera du mode d'action et de la toxicité de ces composés [GREVET N., 2003]. Notre travail sera séparé en deux parties. La première partie concerne les toxines, leur nature, leurs propriétés physiques et chimiques et les moyens de décontamination. Dans la seconde partie, nous nous intéresserons aux moisissures. Nous

présenterons les divers genres producteurs de trichothécènes, leur modalité de croissance et les moyens de lutte contre ces champignons.

PARTIE 1.

LES TOXINES : NATURE, PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES ET MOYENS DE DECONTAMINATION

1.1. Structures et propriétés communes

1.1.1. Structure générale

Les trichothécènes sont composés exclusivement d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène [IARC, 1983]. Ces mycotoxines dérivent d'un système de trois cycles appelé trichothécane [UENO Y., 1980]. A ce squelette trichothécane s'ajoutent une double liaison en position 9-10 ainsi qu'un groupement époxyde en position 12-13. On obtient ainsi les 12-13 époxytrichothécènes [IPCS, 1990]. La structure, la stéréochimie et la numérotation des atomes de carbone sont mises en évidence dans la figure 1.

Sur ce squelette peuvent figurer cinq substituants plus ou moins complexes en position C_3 , C_4 , C_7 , C_8 et C_{15} , tels que des groupements hydroxyles, acyles ou époxydes. La position C_8 peut également comporter une fonction cétone [UENO Y., 1980].

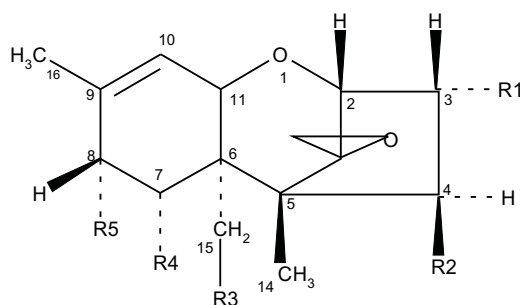


Figure n° 1 : Structure générale semi développée des trichothécènes [IPCS, 1990].

Les trichothécènes possèdent six centres de chiralité en C_2 , C_4 , C_5 , C_6 , C_{11} et C_{12} . Pour élucider la configuration spatiale des trichothécènes, le carbone 14 a été pris comme centre de référence de manière arbitraire. Puis la molécule a été analysée par cristallographie aux rayons X. La figure 2 représente la configuration spatiale du diacétoxyscirpénol [UENO Y., 1980].

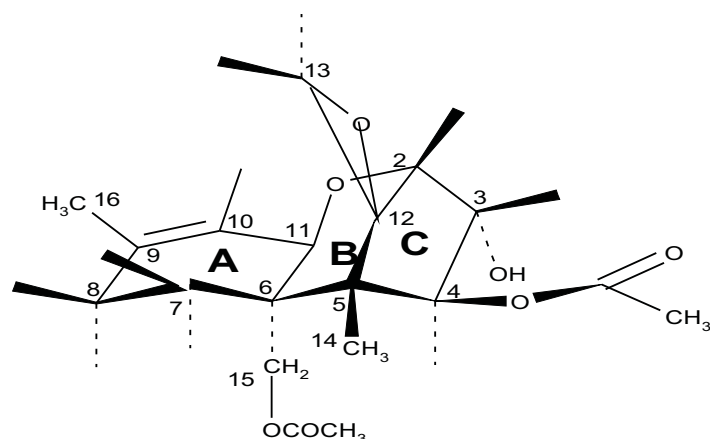


Figure n° 2 : Conformation spatiale des trichothécènes par l'exemple du diacétoxyscirpénol [UENO Y., 1980].

La présence de la double liaison entre les atomes C₉ et C₁₀ oblige les six atomes membre du cycle A à une conformation plane [UENO Y., 1980]. Le cycle B est en conformation chaise ce qui provoque l'émergence du groupement époxyde hors de la molécule [JANCENELLE, 1990]. Les cinq atomes membres du cycle C sont dans une configuration enveloppe [UENO Y., 1980].

Dans les années soixante-dix, plus de quarante trichothécènes sont isolés et classés. Ils sont séparés en quatre groupes en 1977, en fonction des substituants qui se trouvent sur la molécule [UENO Y., 1980] :

- * Le groupe A est constitué par les trichothécènes qui n'ont pas de fonction cétone en C₈. Les plus importants sont la toxine T-2, le diacétoxyscirpénol et la toxine HT-2.

- * Le groupe B est constitué par les trichothécènes ayant une fonction cétone C₈. Les plus importants sont le nivalénol, le déoxynivalénol et la fusarénone-X.

- * Le groupe C regroupe les trichothécènes ayant un époxyde supplémentaire entre C₇ et C₈ tels que la crotocine.

- * Le groupe D regroupe les trichothécènes ayant un macrocycle entre C₄ et C₁₅ tels que les verrucarines et les roridines.

1.1.2. Propriétés physiques et chimiques

1.1.2.1. Propriétés physiques

Les trichothécènes se présentent en général sous la forme de poudres incolores, cristallisables [UENO, 1980 ; IPCS, 1990].

Leur poids moléculaire varie de 154 à 697 daltons, mais le plus souvent se situe entre 300 et 600 daltons [IARC, 1983].

Ils sont optiquement actifs (lévogyres ou dextrogyres).

Les trichothécènes n'absorbent pas les radiations ultraviolettes ou visibles, excepté les trichothécènes macrocycliques qui présentent des doubles liaisons conjuguées et absorbent à 260 nm (groupe D) [IPCS, 1990].

Le spectre infrarouge est caractérisé par la présence de bandes d'absorption : à 1 720 cm^{-1} et 1 259 cm^{-1} , correspondant à la vibration de valence des C = O et C – O des groupes acétyles ; à 1 580 cm^{-1} et 825 cm^{-1} , dues à la présence d'une double liaison bi substituée en 9-10 ; à 3 400 cm^{-1} et à 3 480 cm^{-1} , dues à la présence des groupements hydroxyles [IARC, 1993 ; The Merk Index, 1996].

Le spectre de résonance magnétique nucléaire présente les pics caractéristiques de l'époxyde mais le spectre de masse n'offre aucune fragmentation caractéristique [IARC, 1993].

1.1.2.2. Propriétés chimiques

Les trichothécènes sont des composés neutres. Ils sont généralement solubles dans les solvants modérément polaires tels que les alcool, les solvants chlorés, l'acétate d'éthyle ou l'éther éthylique et parfois légèrement solubles dans l'eau [UENO, 1980 ; IPCS, 1990]. Les dérivés alcooliques ont une solubilité dans l'eau supérieure à celle des dérivés estérifiés (nivalénol et diacétylnivalénol) et sont plus difficile à obtenir sous forme cristalline [IPCS, 1990 ; UENO Y, 1980].

La toxicité des trichothécènes provient essentiellement du groupe époxyde [PENG S., 1996]. Ce groupe, en position C₁₂- C₁₃, est extrêmement stable vis-à-vis des attaques nucléophiles [JECFA, 2003a].

In vitro, l'insaturation de la double liaison en C₉ – C₁₀ permet des réactions d'addition ainsi que diverses substitutions des hydrogènes labiles en α du groupe carbonyle (alkylation,

halogénéation) [ARNAUD, 1997]. L'hydrogénation catalytique donne des dérivés 9-10 dihydro, biologiquement moins actifs [UENO Y., 1980].

Le groupement OH est oxydable en aldéhyde ou cétone par $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ dans l'acétone, $\text{CrO}_3/\text{pyridine}$ et $\text{CrO}_3/\text{acide acétique}$ [IPCS, 1990].

Les trichothécènes acétylés sont hydrolysables en milieu alcalin en leur alcool parent. L'hydrolyse des esters s'effectue en milieu alcalin [UENO Y., 1980]. L'hydrolyse de la toxine T-2 donne deux molécules d'acide acétique, une molécule d'acide isovalérique, et du T-2 tétraol. Celle du diacétoxyscirpénol donne deux molécules d'acide acétique et du scirpentriol [IPCS, 1990]. Par ailleurs, les composés hydroxylés peuvent également être acétylés [IPCS, 1990] (Figure 3).

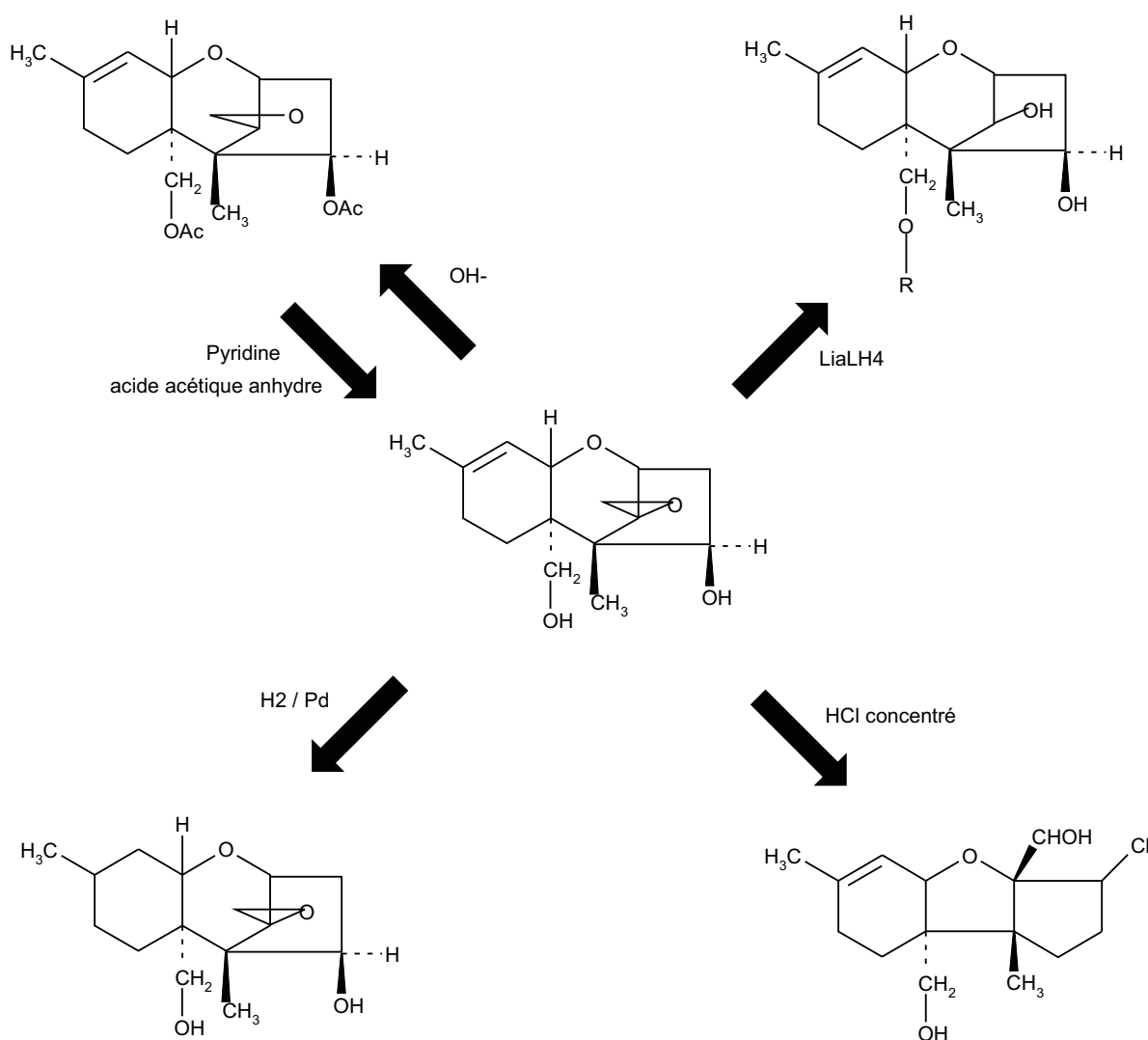


Figure n° 3 : Réactivité chimique des trichothécènes [JANCENELLE D., 1990].

1.1.3. Stabilité et toxicité

Les trichothécènes sont remarquablement stables même lorsqu'ils sont conservés longtemps à température ambiante [IPCS, 1990 ; JECFA, 2003b]. Lors de l'étude de la stabilité de quatre trichothécènes, la toxine T-2, la toxine HT-2, le déoxynivalénol et le nivalénol, il a été montré que l'acétonitrile était le solvant dans lequel ils étaient les plus stables et qu'il y avait peu de dégradation des toxines même après 24 mois de stockage à 25 °C. Le résultat est le même pour un stockage pendant 3 mois à 40 °C [WIDESTRAND, 2001].

Le nivalénol et le deoxynivalénol sont également relativement stables pour des pH de 1 à 10. La destruction de ces toxines n'a pu être réalisée qu'à un pH de 12 à 80 °C [LAUREN DR., 2001 ; SMITH WA., 2001].

La stabilité des toxines T-2, HT-2 et T-2 tétraol a été étudiée dans le sang et l'urine à -70 °C, 4 °C et +23 °C pendant 6 mois. Les échantillons étaient sur EDTA ou NaF. Les résultats montraient une stabilité plus grande du T-2 tétraol, venait ensuite la toxine T-2 puis la toxine HT-2. Les toxines étaient les plus stables lorsqu'elles étaient conservées à -70 °C en présence de NaF et d'urine (pH 6). Elles étaient moins stables en solution saline (pH7) et encore moins stables dans le sang (pH 8) [PACE JG., 1988].

Les trichothécènes ne sont pas détruits lors de la cuisson des aliments ni dans les conditions de stérilisation comme celles du lait (environ 15 minutes à 118°C) [VIDAL 1985].

Le trichothécane résiste à un traitement par les alcalis concentrés.

L'ouverture du cycle 12-13 époxyde conduit à la formation de dérivés totalement inactifs. Elle peut se faire par deux voies différentes [UENO Y., 1980] :

* une réduction par l'hydrure de lithium et d'aluminium ; cette réaction donne un hydroxyle tertiaire sans réarrangement du cycle tricothécane (Figure 3).

* La destruction de l'époxyde par les acides forts (acide chlorhydrique concentré, acide trifluoroacétique, acide sulfurique) ; Cette réaction s'accompagne d'un réarrangement du cycle tricothécane en apotrichothécane (Figure 3).

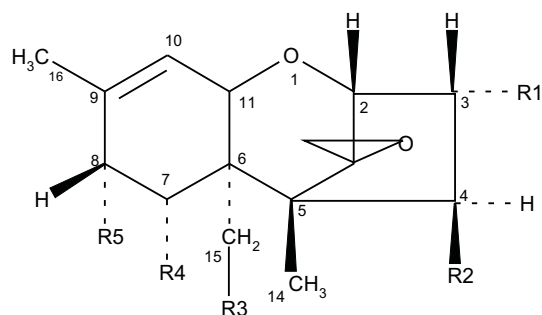
1.2. Trichothécènes du groupe A

Nous présenterons successivement leur structure générale et leur classification, puis nous envisagerons les particularités des composés les plus importants de ce groupe.

1.2.1. Généralités

Les trichothécènes du groupe A n'ont pas de fonction cétone en C8. Suivant la nature des substituants, on a différents trichothécènes regroupés dans la figure 4.

Les principales propriétés physiques des trichothécènes du groupe A sont présentées dans le tableau 1.



Nom	R1	R2	R3	R4	R5
Trichodermol (= roridine C)	H	OH	H	H	H
Dihydrotrichothécène	H	H	OH	H	OH
Scirpen-4,8-diol	H	OH	H	H	OH
Verrucarol	H	OH	OH	H	H
Scirpentriol	OH	OH	OH	H	H
T-2 tetraol	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Pentahydroxyscirpène	OH	OH	OH	OH	OH
Trichodermine	H	OAc	H	H	H
15-Diacetylcalonecitrine (=deacetylcalonecitrine)	OAc	H	OH	H	H
Calonecitrine	OAc	H	OAc	H	H
Diacétylverrucarol	H	OAc	OAc	H	H
4-Acetoxy-scirpendiol	OH	OAc	OH	H	H
4-Monoacetoxy-scirpénol	OH	OAc	OH	H	H
4,15-Diacetoxy-scirpénol (=DAS)	OH	OAc	OAc	H	H
7-hydroxy-DAS	OH	OAc	OAc	OH	H
8-hydroxy-DAS (=Neosolaniol)	OH	OAc	OAc	H	OH
7,8-hydroxy-DAS (=Diacetoxy-scirpentriol)	OH	OAc	OAc	OH	OH
Triacétoxy-scirpentriol	OH	OAc	OAc	OH	OAc
8-Acetylneosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OAc
NT-1	OH	OAc	OH	H	OAc
NT-2	OH	OAc	OH	H	OH
8-Acetyl-DAS	OH	OAc	OAc	H	OAc
Toxine HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxine T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Acétyle T-2 toxine	OAc	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂

OAc = OCOCH₃

DAS = anguidine ou diacétoxy-scirpénol

Figure n° 4 : Structure des trichothécènes du groupe A [VIDAL D., 1990 ; JANCENELLE C., 1990 ; IPCS, 1990 ; IARC, 1993 ; UENO Y., 1980].

Trichothécènes		Formule moléculaire	Masse moléculaire	Point de fusion (°C)	(α)20D
Type A	Toxine T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466,5	151-152	+15
	Diacetoxy-scirpénol	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,4	-	-
	Toxine HT-2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424,5	-	-

Tableau n° 1 : Propriétés physiques de quelques trichothécènes du groupe A [The Merk Index, 1996 ; IARC, 1993 ; JECFA, 2003a].

1.2.2. La toxine T-2

La toxine T-2 ou 12,13-époxytrichothéc-9-ène-3 α ,4 β ,8 α ,15-tétraol,4,15-diacétate 8-isovalérate est également connue sous le nom de fusariotoxine T2, 8-isovalérate, isariotoxin ou encore mycotoxine T-2 (Figure 5). Sa formule brute est C₂₄H₃₄O₉. Son poids moléculaire est de 466,50 g/mol. Sa composition est 62,33 % de carbone, 6,54 % d'hydrogène et 31,13 % d'oxygène.

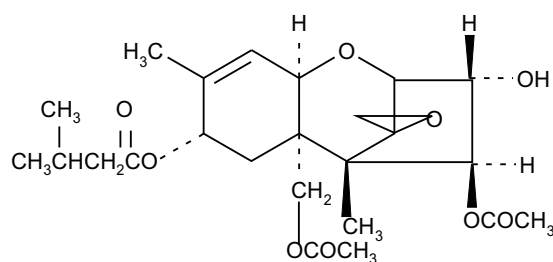


Figure n° 5 : Formule semi développée de la toxine T-2.

Ce produit est cristallisable, le point de fusion est de 151-152 °C [The Merk Index, 1996]. La toxine T-2 est soluble dans les solvants organiques polaires comme l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, le diéyle éther, l'éthyle d'acétate ou le dichlorométhane.

La toxine T-2 est stable, au moins 24 mois, dans différents solvants comme l'éthyle acétate et quelles que soient les conditions de stockage, de -18 °C à +40 °C [WIDESTRAND, 2001].

La toxine T-2 fut isolée pour la première fois en 1968 à partir de production de *Fusarium tricinctum* [IARC, 1983]. Par la suite, on a constaté la présence de cette toxine sur de nombreuses matières premières comme le blé, le maïs, l'avoine, l'orge, le riz, les fèves ou le soja. Elle est produite par de nombreuses espèces de *Fusarium*, en particulier *Fusarium sporotrichioides*. Cette moisissure pousse entre -2 °C et +35 °C et dans des milieux à haute activité en eau (environ 0,88). En conséquence, la toxine T2 se retrouve principalement sur

des aliments moissonnés pendant une période froide et dont les grains ont été endommagés par la pluie [JECFA, 2003a].

Sa DL 50 par voie orale chez la souris est de 4 mg/kg [IARC, 1983].

1.2.3. Le diacétoxyscirpénol

Le diacétoxyscirpénol (DAS) ou 12,13-époxytrichothec-9-ène-4 β ,15-diacétoxy-3 α -hydroxyle est également connue sous le nom de l'anguidine, trichothec-9-ène (Figure 6). Sa formule brute est C₁₉H₂₆O₇. Son poids moléculaire est de 366,41 g/mol.

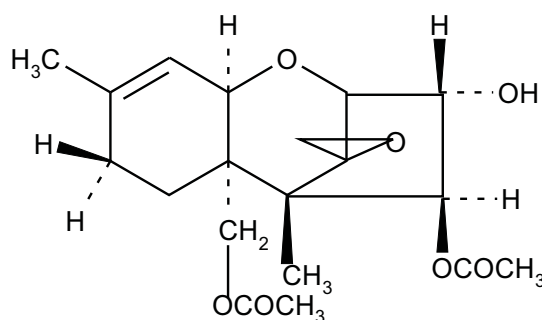


Figure n° 6 : Formule semi développée du diacétoxyscirpénol (DAS).

Le diacétoxyscirpénol est incolore, cristallisable et soluble dans les solvants polaires. Il est très peu soluble dans l'eau. [VIDAL D.R., 1990].

Il est chimiquement stable et résiste bien à la cuisson des aliments [VIDAL D.R., 1990]. Cette toxine possède un fort potentiel d'inhibition de la synthèse de protéines.

Le DAS est produit par différentes espèces de *Fusarium* dont les principales sont *F. graminearum* et *F. roseum* [JIMENEZ M., 2000].

Sa DL₅₀ par voie orale chez le rat est de 7 mg/kg [CONNER M., 1990].

1.2.4. La toxine HT-2

La toxine HT-2 ou 12,13-époxytrichothec-9-ène-3 α ,4 β ,8 α ,15-tétraol,15-acétate 8-isovalérate a pour formule brute C₂₂H₃₂O₈ (Figure 7). Son poids moléculaire est de 424,5 g/mol [JECFA, 2003a].

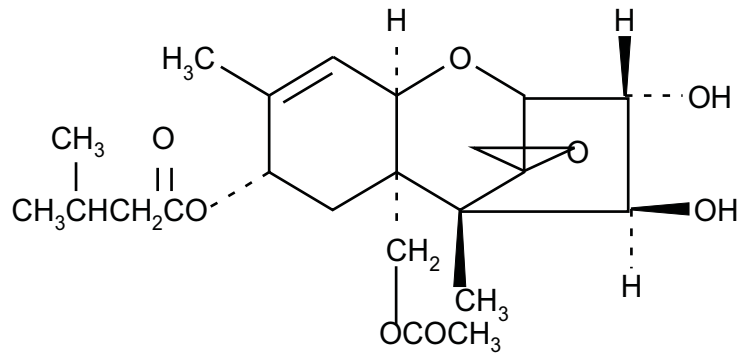


Figure n° 7 : Formule semi développée de la toxine HT-2.

Le pic d'absorption en UV est le même que celui de la toxine T-2, à savoir de 218 nm. Le cristal est soluble dans les solvants organiques polaires.

La toxine HT-2 est, elle aussi, stable dans différents solvants comme l'éthyle acétate et quelques soient les conditions de stockage, de -18 °C à +40 °C et ce pendant 24 mois [WIDESTRAND, 2001].

On a constaté la présence de cette toxine sur de nombreuses matières premières. Elle est produite par de nombreuses espèces de *Fusarium*, en particulier *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. solani*, *F. equiseti*. L'espèce la plus fréquente est *F. sporotrichioides*. Cette moisissure pousse entre -2 °C et +35 °C, dans des milieux à haute activité en eau. La toxine HT-2 se retrouve donc principalement sur des aliments moissonnés pendant une période froide et dont les grains ont été endommagés par la pluie [JECFA, 2003a].

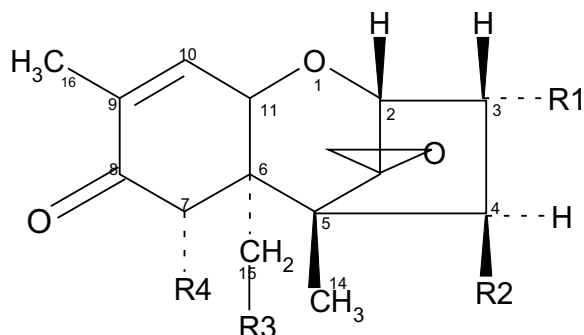
Sa DL 50 par voie orale chez la souris est de 6 mg/kg [JECFA, 2003a].

1.3. Trichothécènes du groupe B

Nous présenterons successivement leur structure générale et leur classification, puis nous envisagerons les particularités des composés les plus importants de ce groupe.

1.3.1. Généralités

Les trichothécènes du groupe B ont une fonction cétone en C₈ (Figure 8). Suivant la nature des substituants, on a différents trichothécènes.



Nom	R1	R2	R3	R4	R5
Trichothecolon	H	OH	H	H	=O
Trichotécine	H	OCOCH=CHCH ₃	H	H	
Deoxynivalenol (=DON)	OH	H	OH	OH	
3-Acetyldeoxynivalenol (=Monoacétoxydéoxynivalériol)	OAc	H	OH	OH	
7-Acetyldeoxynivalenol	OH	H	OH	OAc	
3,15-Diacétyldéoxynivalénol	OAc	H	OAc	OH	
Nivalénol	OH	OH	OH	OH	
4-Acetylnivalenol (=Fusarénone-X)	OH	OAc	OH	OH	
4,15-Diacétylnivalénol	OH	OAc	OAc	OH	

OAc = OCOCH₃

Figure n° 8 : Structure des trichothécènes du groupe B [VIDAL D.R., 1990 ; IARC, 1993 ; IPCS, 1990].

Les principales propriétés physiques des trichothécènes du groupe B sont regroupées dans le tableau 2.

Trichothécènes		Formule moléculaire	Masse moléculaire	Point de fusion (°C)	(α)20D (éthanol)
Type B	Deoxynivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296,36	151-153	+6.35
	Nivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312,32	222-223	+21.54
	Fusarénone X	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	338	91-92	+56,1

Tableau n° 2 : Propriétés physiques de quelques trichothécènes du groupe B [The Merk Index, 1996 ; IARC, 1993].

1.3.2. Le déoxynivalénol

Le déoxynivalénol ou trichothec-9-en-8-one,12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxy- est également connu sous le nom de dehydronivalénol , 4-deoxynivalénol , 12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxy-9-trichothecen-8-one, Rd toxin , spiro[2,5-methano-1-benzoxepin-10,2'-oxirane]trichothec-9-en-8-one dérivé ou encore vomitoxine (Figure 9).

Sa formule brute est C₁₅H₂₀O₆. Son poids moléculaire est de 296.36 g/mol. Sa composition est 60,80 % de carbone, 6,81 % d'hydrogène et 32,40 % d'oxygène. La déviation optique est : $[\alpha]^{25}_D + 6,35^\circ$ (c=0,07 dans l'éthanol). [IARC, 1993].

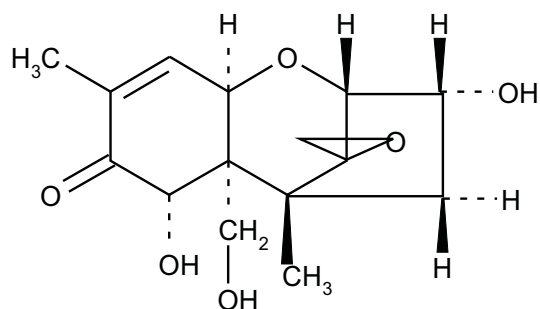


Figure n° 9 : Formule semi développée du déoxynivalénol.

Ce produit est cristallisable, le point de fusion est de 151-153 °C, le pic d'absorption au UV est de 218 nm [The Merk Index, 1996]. Le DON est soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'eau et le chloroforme [IARC, 1993].

Le DON est stable dans l'éthyle acétate pendant 24 mois à -18 °C mais on constate une décomposition significative de ce produit après 24 mois à 4 °C et après 12 mois à 25 °C. C'est pourquoi, pour un stockage au long terme, il est préférable d'utiliser comme solvant l'acétonitrile [WIDESTRAND, 2001].

Le déoxynivalénol est une des toxines les plus répandues dans le monde. Il est principalement produit par *Fusarium roseum* et *Fusarium graminearum* [The Merk Index, 1996]. Il est présent sur de nombreux continents comme l'Amérique du Nord, le Japon et l'Europe [IARC, 1993]. La contamination des aliments est donc très fréquente et pose de nombreux problèmes sanitaires [ROTTER BA., 1996]. Cette toxine peut être trouvée en France sur des cultures céréalières variées. Une étude a montré que sur soixante prélèvements, trente cinq étaient contaminés par des teneurs variant de 0,07 à 21,0 mg/kg [BAKAN B., 2001].

Sa DL 50 par voie orale chez la souris est de 46 mg/kg [JECFA, 2003b].

1.3.3. Le nivalénol

Le nivalénol, ou trichothec-9-en-8-one,12,13-époxy-3 α ,4 β ,7 α ,15-tetrahydroxy, a pour formule brute C₁₅H₂₀O₇ (Figure 10). Son poids moléculaire est de 312,32 g/mol. Sa composition est 57,69 % de carbone, 6,45 % d'hydrogène et 35,86 % d'oxygène. La déviation optique est : $[\alpha]_D^{24} + 21,54^\circ$ (c=1,3 dans l'éthanol) [IARC, 1993].

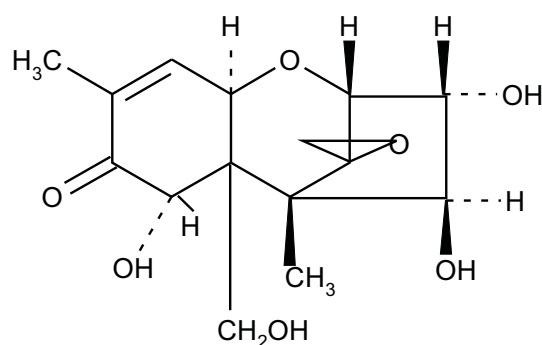


Figure n° 10 : Formule semi développée du nivalénol.

Ce produit est cristallisable, le point de fusion est de 222-223 °C, le pic d'absorption au UV est de 218 nm [The Merk Index, 1996]. Le nivalénol est soluble dans les solvants

organiques polaires comme le méthanol, l'éthanol, l'éthyle d'acétate et le chloroforme. Il est en revanche faiblement soluble dans l'eau [IARC, 1993].

Comme le déoxynivalénol, le nivalénol est stable dans l'éthyle acétate pendant 24 mois à -18 °C mais on a une décomposition significative de ce produit après 24 mois à 4 °C et après 12 mois à 25 °C. C'est pourquoi, pour un stockage à long terme, il est préférable d'utiliser comme solvant l'acétonitrile [WIDESTRAND, 2001].

Le nivalénol est principalement produit par *Fusarium nivale* [The Merk Index, 1996]. Il est très représenté au Japon et en Corée. C'est un composé mineur en Europe [IARC, 1993]. Cependant, il peut être trouvé en France : sur soixante prélèvements, dans des cultures céréalières variées et réparties sur l'ensemble du territoire, il a été détecté neuf prélèvements contaminés à des teneurs variant de 0,11 à 11,7 mg/kg [BAKAN B., 2001].

Sa DL 50 par voie orale chez la souris est de 38,9 mg/kg [IARC, 1993].

1.3.4. La fusarénone X

La fusarénone X, ou 12,13-époxy-3 α ,4 β ,7 β ,15-tetrahydroxytrichothec-9-en-8-one-4-acétate est aussi connue sous le nom de fusarenon, fusarenon X, nivalénol monoacétate, nivalenol 4-O-acétate, 3,7,15-trihydroxy-4-acetoxy-8-oxo-12-13-époxy- Δ^9 -trichothecène. Sa formule brute est C₁₇H₂₂O₈ (Figure 11). Son poids moléculaire est de 338 g/mol. La déviation optique est : $[\alpha]^{25}_D + 56,1^\circ$ (c=0,07 dans l'éthanol) et $[\alpha]^{25}_D + 58^\circ$ (c=1,0 dans le méthanol) [IARC, 1993].

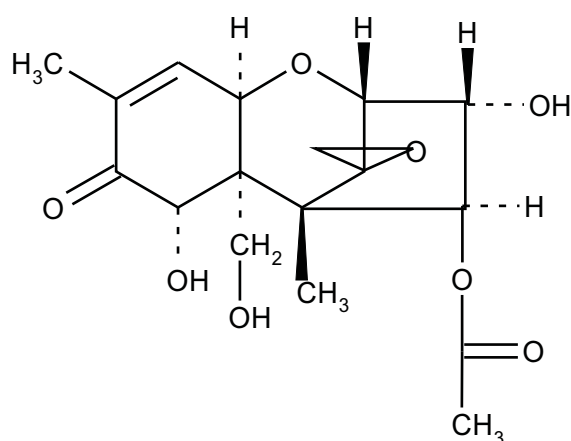


Figure n° 11 : Formule développée de la fusarénone X [IARC, 1993].

La fusarénone X est cristallisable, le point de fusion est de 91-92 °C. La fusarénone X est soluble dans le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'eau et le chloroforme mais insoluble dans le n-hexane et le n-pentane [IARC, 1993]. La fusarénone X est généralement stable mais peut être hydrolysée en nivalénol par des bases [IARC, 1993].

La fusarénone X est principalement produite par *Fusarium crookwellense* et certaines souches de *Fusarium graminearum* [IARC, 1983]. Cependant, elle peut aussi être produite par d'autres *Fusarium* (*solani*, *sporotrichiodes*, *tricinctum*) [UENO Y, 1975]. On retrouve peu de fusarénone X en Europe mais on peut en trouver en France [IARC, 1993]. Sur soixante prélèvements de céréales, il a été détecté douze prélèvements contaminés à des teneurs variant de 0,05 à 8,42 mg/kg [BAKAN B., 2001].

Sa DL 50 par voie orale chez la souris est de 3,5 mg/kg [IARC, 1993]].

1.4. Techniques d'analyse

Nous nous intéresserons dans cette partie uniquement aux techniques de dosage des trichothécènes et non aux techniques de détection et d'identification des moisissures qui seront présentées dans la deuxième partie.

L'échantillonnage est une étape essentielle dans le dosage des mycotoxines compte tenu de la très forte hétérogénéité de répartition des toxines. Nous ne détaillerons pas ce point de nombreuses revues étant disponibles sur le sujet [WHITEKER T., 1991 ; SADEF, 2003].

1.4.1 Extraction, purification

1.4.1.1 Extraction

En fonction de leur solubilité, les trichothécènes peuvent être divisés en deux groupes :

- Le groupe I comprend les composés largement solubles dans la plupart des solvants de polarité intermédiaire : toxine T-2, toxine HT-2, néosolaniol, diacétoscirpénol, monoacétoxycirpénol, verrucarines et roridines. Ces mycotoxines sont extraites avec de bons rendements par l'acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme, l'éther éthylique [IPCS, 1990]. Elles ont une solubilité limitée dans les solvants apolaires tels que l'hexane [IARC, 1993] qui

peut donc être utilisé pour éliminer les lipides des extraits. Cependant certains lipides peuvent entraîner des trichothécènes et diminuer le rendement d'extraction [IPCS, 1990].

- Le groupe II rassemble les molécules fortement hydroxylées telles que le T2 tétraol, le scirpentriol, le déoxynivalénol et le nivalénol. Elles sont extraites par des solvants polaires tels que méthanol, méthanol aqueux, acétonitrile aqueux, eau [IPCS, 1990]. En fonction des substrats (riz, blé, maïs, milieu de culture...), les extraits obtenus sont plus ou moins complexes et doivent être purifiés par chromatographie de partage ou d'absorption [TUTEL'IAN VA., 1991]. Dans ce groupe, les trichothécènes ont une solubilité presque nulle dans l'hexane. Celui-ci est donc un solvant de choix pour l'élimination des lipides lors de dosages [IPCS, 1990].

1.4.1.2. Purification

La chromatographie d'adsorption est largement utilisée pour purifier les extraits. Les phases stationnaires usuelles étant le gel de silice, le charbon actif, les silices greffées en C₁₈ [JECFA, 2003b ; IPCS, 1990].

L'emploi de mini colonnes avec du charbon activé et de l'oxyde de magnésium peut également permettre une purification partielle des échantillons [TUTEL'IAN VA., 1991 ; IPCS, 1990].

Le degré de purification nécessaire va dépendre de la méthode de dosage employée par la suite [IPCS, 1990]. L'élution est assurée par l'acétone, le chloroforme, le méthanol ou l'acétonitrile [JECFA, 2003b].

1.4.2. Dosages par des méthodes physico-chimiques

Du fait de l'absence d'absorption caractéristique des trichothécènes dans le spectre ultraviolet ou visible, les méthodes spectrophotométriques sont peu applicables aux dosages de ces mycotoxines. Rappelons que si les verrucarines et les roridines absorbent en ultraviolet, cette absorption est due à leur partie macrocyclique et non au noyau trichothécène.

1.4.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est fréquemment employée pour séparer et détecter les trichothécènes. Elle repose sur la séparation des constituants d'un mélange en fonction de leur affinité pour une phase fixe et une phase mobile. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire. Le support habituellement utilisé est le gel de silice ; les principaux systèmes solvants étant constitués de mélanges chloroforme-méthanol, benzène-acétone et acétate d'éthyle-hexane. Le principal problème pour ce genre d'analyse est la détection après migration. En effet l'absence de fluorescence ou d'absorption en UV des trichothécènes implique l'emploi d'agent de visualisation [inchem.org, 2003 ; UENO Y., 1990]. La détection s'effectue souvent par une réaction colorée suivie d'un examen visuel ou fluorométrique. L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles ont été mises au point avec des solutions très concentrées en toxines. Leur emploi sur des solutions provenant d'échantillons naturellement contaminés comme les céréales ou les aliments est plus difficile du fait de la faible teneur en toxine [IPCS, 1990]. Cependant, une coloration permet de détecter des quantités très faibles : le chlorure d'alumine, qui chauffé à 120 °C pendant 7 minutes permet d'obtenir une coloration bleue fluorescente. Cette réaction est pertinente en particulier pour le DON, le NIV et la fusarénone X [TRUCKNESS M.W., 1984 ; IPCS, 1990]. C'est d'ailleurs cette méthode qui a été reconnue par l'AOAC pour le DON dans le blé [IPCS, 1990]. On peut atteindre avec cette méthode des limites de détection de l'ordre de 20 µg/kg dans les aliments [KAMIMURA, 1981].

1.4.2.2. Chromatographie liquide haute pression (CLHP)

La chromatographie liquide haute pression met en œuvre comme phase mobile, un fluide sous pression. Le liquide traverse une colonne renfermant une phase fixe.

La détection peut ensuite être réalisée de différentes manières. Sous UV, elle est difficile à mettre en œuvre du fait de l'absence d'absorption des trichothécènes, en particulier ceux du groupe A. Cependant, pour le déoxynivalénol (DON), le dosage est possible [IPCS, 1990]. Un dosage par chromatographie liquide à haute pression avec détection UV à 218 nm autorise une détection limite de 17 µg/kg. L'analyse ayant été faite sur des grains de riz, avec une déviation standard de 0,05 à 0,1 [TUTEL'IAN VA., 1991]. On peut aussi réaliser une

chromatographie à haute pression avec une détection par fluorescence en utilisant du chlorure de coumarin-3-carbonyl. Cette méthode donnerait de très bons résultats pour les trichothécènes du groupe B mais pas pour ceux du groupe A [MATEO J.J., 2001].

1.4.2.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer des mélanges complexes par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide, ou parfois solide, placée à l'intérieur d'une colonne. La chromatographie en phase gazeuse ne s'adresse pas seulement aux composés se trouvant naturellement à l'état de gaz, mais aussi à tout composé susceptible d'être volatilisé par élévation de la température, sans destruction de celui-ci [MAHUZIER G., 1978]. Les détecteurs, placés en sortie des colonnes, sont nombreux ; on trouve des méthodes de détection par conductibilité thermique, par ionisation de flamme, par capture d'électrons...

Toutes ces méthodes sont valables pour les trichothécènes. On obtient des limites de détection pour le DON de 10 µg/kg avec une détection par capture d'électrons [SCOTT P.M., 1989 ; LANGSETH W., 1992] et de 2 µg/kg avec une détection par ionisation de flamme [KIESSLING K.H., 1984].

1.4.2.4. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Dans la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, un détecteur par spectrométrie de masse est placé à la sortie de la colonne.

Cette méthode est très utilisée pour la caractérisation de nouvelles mycotoxines et pour identifier et confirmer la présence d'une toxine dans un prélèvement, même faiblement contaminé [IPCS, 1990]. Chaque composé ayant un spectre de masse caractéristique, l'obtention de pics séparés permet une bonne sensibilité.

Cette méthode est une méthode rapide et sûre pour la détermination des trichothécènes. Elle peut aisément servir à la vérification des denrées alimentaires humaine [TANAKA T., 2000]. Elle permet de détecter de très faible quantité de toxine [IPCS, 1990]. On peut détecter ainsi pour le DON 5 à 10 µg/kg [ROOD HD., 1988 ; SCHOLLENBERGER, 1998].

1.4.2.5. Chromatographie liquide couplée à la spectrographie de masse (CL/SM)

Dans la chromatographie liquide couplée à la spectrographie de masse, les toxines sont séparées en chromatographie liquide puis dosées par spectrographie de masse. Pour les trichothécènes du groupe A, la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse permet une limite de détection comprise entre 50 et 85 µg/kg [RAZZAZI-FAZELI E., 2002]. Pour les trichothécènes du groupe B, les limites de détection sont un peu moins bonnes. Il est possible de détecter jusqu'à 6 µg/kg de DON. La chromatographie était réalisée sur avec des échantillons de farine de froment noir extrait avec de l'acétonitrile et eau puis extraits en phase solide. Cette méthode a été adoptée comme méthode de vérification par l'AOAC [TRUCKSESS MW., 1998 ; BERGER U., 1999].

1.4.3. Dosages par des méthodes immunologiques

Les dosages radioimmunologiques et immunoenzymologiques reposent sur la détection de complexes antigènes/anticorps. Ils sont parfaitement adaptés aux contrôles, sur le terrain, de la présence de mycotoxines dans les céréales et les aliments [VIDAL D.R., 1990].

Les méthodes sont alors différentes suivant le type de détection.

1.4.3.1. Dosage radio-immunologique

Le dosage radio-immunologique utilise des anticorps antitoxine et vise, en particulier la toxine T-2. On utilise alors des anticorps de lapin ou d'autre animal. Ceux-ci sont obtenus à partir d'animaux immunisés vis-à-vis de cette toxine. La toxine T-2 radioactive entre en compétition avec la toxine T-2 non radioactive de l'échantillon pour la fixation aux anticorps antitoxine T-2. Après lavage, on dose la radioactivité résiduelle [UENO Y., 1980].

Le dosage radio-immunologique autorise des limites de détection de 3 µg/kg pour la toxine T-2 [JECFA, 2003a].

1.4.3.2. Dosage immuno-enzymologique

La manipulation de produits radioactifs n'étant pas aisée et accessible à tous les laboratoires, des techniques immunologiques ont été mises au point. Dans la technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), la révélation se fait par l'intermédiaire d'un chromogène. Celui-ci est dégradé en un composé coloré en présence d'une enzyme [JECFA, 2003b].

Il existe de nombreux anticorps visant les trichothécènes. Ces anticorps sont mono- ou poly clonaux. Leur production est toutefois difficile en raison de l'activité immunosuppressive des trichothécènes [JECFA, 2003b].

Cette méthode permet la détection de 5 à 40 µg/kg pour la toxine T-2 [YANG, 2000], et de 5 à 10 µg/kg pour le DAS [LEE S., 1981]. Des kits sont commercialisés pour les trichothécènes les plus courants, en particulier pour la toxine T-2 et pour le DON.

1.4.4. Dosages par des méthodes biologiques

Possédant une structure chimique commune les trichothécènes présentent ainsi aussi des propriétés biologiques communes. Ces propriétés sont mises à profit dans différents tests divisés en plusieurs types : phytotoxicité, toxicité cutanée, cytotoxicité, inhibition de la synthèse protéique. Cependant, ces analyses restent expérimentales et n'entrent pas dans les méthodes usuelles de dosages ou de détection des mycotoxines. Dans ces méthodes, l'extraction reste standard et la purification n'est pas nécessaire.

1.4.4.1. Test de toxicité cutanée

Les dépôts de témoins et d'échantillons se font localement ou par injections intradermiques. On observe après vingt-quatre, quarante-huit ou soixante douze heures une série de réactions qui sont quantifiées et on détermine par rapport aux témoins la quantité de toxine dans l'échantillon [IPCS, 1990].

Différents animaux ont été employés (rat, lapin, cochons...) [IPCS, 1990] mais c'est le lapin qui est le plus utilisé. En effet, sa taille permet un grand nombre de dépôts et sa peau

est très sensible au pouvoir dermo-nécrosant des trichothécènes [IARC, 1983]. Le rat permet les mêmes évaluations mais sur des surfaces plus réduites [HASSANIN N., 1990].

De nombreux trichothécènes peuvent être mis en évidence par ce test [LUCIA GE., 1984]. Lors de comparaisons, il a été remarqué que la toxine T-2 est la plus toxique, viennent ensuite le diacétoxyscirpénol et enfin la fusarénone X [BHAVANISHANKAR TN., 1988 ; FAIRHUST S., 1987].

La limite de détection par ces méthodes, pour la toxine T2 et le DAS, est de 200 µg/kg [IPCS, 1990].

1.4.4.2. Inhibition de la synthèse protéique

Les trichothécènes sont capables d'inhiber la synthèse protéique. Ils inhibent la production d'ADN, d'ARN et inhibent les fonctions des mitochondries. Ils ont, de plus, des effets néfastes sur la division cellulaire [KHACHATOURIANS GG., 1990]. On peut quantifier cette baisse de synthèse en mesurant l'inhibition de l'incorporation de la leucine marquée au carbone 14 chez le réticulocyte du lapin [VIDAL D.R., 1990]. Il est possible de détecter des défauts de synthèse d'ADN et d'ARN lors de contact avec le nivalénol, le déoxynivalénol et la toxine T-2 [UENO Y., 1977 ; ROSENSTEIN Y., 1983]. Cette méthode autorise des détections de 30 µg/kg de toxine T2 ou HT-2, de DAS ou de néosolaniol [UENO Y., 1977]. En utilisant des fibroblastes de hamster ou humain, on obtient alors une sensibilité limite de 1 µg/kg pour la toxine T2 [IARC, 1983].

1.4.4.3. Mise en évidence d'une activité antifongique, phytotoxique et cytotoxique

- Activité antifongique :

Les solutions des composés à tester sont adsorbées sur des disques. Après évaporation du solvant, les disques sont disposés sur un milieu PDA (Pomme de terre-Dextrose-Agar) sur lequel on coule une suspension mycélienne. L'activité antifongique est évaluée par la taille du halo d'inhibition de la croissance fongique [UENO Y., 1980].

- Phytotoxicité :

Les dosages phytotoxiques sont basés sur le fait que les trichothécènes inhibent la croissance et la germination de certaines plantes [ALEXANDER N., 2000]. On utilise très souvent les lentilles d'eau (*Lemna pausicostata L.*), le kudzu (*Pueraria montana* et *Pueraria lobata L.*), le cresson ou les tomates. On compare alors la croissance des plantes exposées et non exposées [ABBAS H.K., 2001 ; ABBAS H.K., 2002]. Avec des graines de tomates, on pratique de la manière suivante : leur surface est stérilisée avec 4% de NaClO pendant dix minutes et elles sont laissées dans l'obscurité, trois jours, à température ambiante sur un papier filtre imbibé d'eau. Dix semis germés sont sélectionnés et disposés dans les boîtes de pétri avec les extraits à tester. On mesure l'inhibition de la croissance après quatre jours d'incubation à température ambiante [JANCENELLE C., 1990].

- Cytotoxicité :

La cytotoxicité des trichothécènes a également été explorée sur différentes cultures cellulaires : des cellules de rein de jeunes hamsters chinois [SENDER, 1991], des fibroblastes humains ou murins ou des lymphocytes de souris [IARC, 1983].

1.4.5. Méthodes d'analyses des toxines les plus courantes

Dans les tableaux ci-après sont réunies les méthodes les plus utilisées pour les toxines les plus couramment rencontrées sur les aliments :

- Pour le groupe A : la toxine T-2, le diacétoxyscirpénol, la toxine HT-2
- Pour le groupe B : le déoxynivalénol, le nivalénol, la fusarénone X

(Tableau 3-8).

Matrice		Procédure d'analyse	Préparation de l'échantillon	Limites de détection	Références
Aliments	Céréales, farines	CCM/UV	Extraction ; purification (colonne au charbon activé, oxyde d'aluminium)	100 µg/kg	CZERWIECKI L., 1989
		CLHP/fluorescence	Extraction (acétonitrile / eau), purification (chloroforme / méthanol), évaporation, extraction sur phase solide	1 µg/kg	JIMENEZ M., 2000
		CPG/ECD	Extraction (méthanol /	0,1 µg/kg	COHEN H., 1984

			eau) ; purification gel de silice et colonne à l'heptafluoro - butyrylimidazole		
		CG/SM	Extraction (acétonitrile) ; nettoyage ; florisil	2 µg/kg	SCHOLLENBERGER M., 1998
		CL/SM	Extraction (acétonitrile / eau)	0,5 µg/kg	BERGER U., 1999
		ELISA	Extraction (méthanol / eau)	40 µg/kg	VRABCHEVA T., 1996
Echantillons biologiques	Lait, sérum, urine	CCM	Extraction (acétonitrile) ; nettoyage ; CCM (gel de silice) ; pulvérisation acide sulfurique à 20%	1-5 µg/kg	MIROCHA C.J., 1983
		CLHP/SM	Extraction (acétonitrile / eau), purification	5 µg/kg	VOYKSNER RD., 1987
		CG/SM	Extraction (acétonitrile)	0,7 µg/kg	D'AGOSTINO P.A., 1986
		CL/SM	Extraction (acétate d'éthyle) ; évaporation ; dissolution (acétonitrile) ; évaporation ; dissolution (acétate d'éthyle) ; purification sur CCM	3 µg/kg	COLLINS G.J., 1979
		ELISA	Extraction (acétate d'éthyle) ; lavage (eau) ; concentration ; dissolution (méthanol) ; dilution (eau) ; purification (colonne au C18)	5 µg/kg (sérum) 25 µg/kg (urine et lait)	LEE S., 1981b

Tableau n° 3 : Principales méthodes de dosage de la toxine T2.

Matrice		Procédure d'analyse	Préparation de l'échantillon	Limites de détection	Références
Aliments	Céréales, farines	CCM/UV	Extraction ; purification (colonne au charbon activé,	50 µg/kg	CZERWIECKI L., 1989

			oxyde d'aluminium)		
		CLHP/fluorescence	Extraction (acétonitrile / eau), purification (chloroforme / méthanol), évaporation, extraction sur phase solide	1,5 µg/kg	JIMENEZ M., 2000
		CPG/ECD	Extraction (méthanol / eau) ; purification gel de silice et colonne à l'heptafluoro – butyrylimidazole	0,1µg/kg	COHEN H., 1984
		CG/SM	Extraction (acétonitrile)	5 µg/kg	BLACK R. M., 1986
		ELISA	Extraction (méthanol) ; purification (colonne au C18)	10 µg/kg	LEE S., 1981
Echantillons biologiques	Lait, sérum, urine	CLHP/SM	Extraction (acétonitrile / eau), purification	1 µg/kg	VOYKSNER RD., 1987
		CPG/ECD	Extraction (benzène) ; purification (florisil)	2 µg/kg	SWANSON S.P., 1986
		CG/SM	Extraction (acétonitrile)	3,6 µg/kg	D'AGOSTINO P.A., 1986
		CL/SM	Extraction (acétonitrile)	5 µg/kg	BLACK R. M., 1986
		ELISA	Extraction (acétonitrile)	5 µg/kg	XU Y.C., 1988

Tableau n° 4 : Principales méthodes de dosage du diacétoxyscirpénol (DAS).

Matrice		Procédure d'analyse	Préparation de l'échantillon	Limites de détection	Références
Aliments	Céréales,	CCM	Extraction (éthanol /	100 µg/kg	KAMIMURA H.,

	farines		eau); purification (colonne au fluorisil)		1981
		CLHP/UV	Extraction (acétonitrile / eau) ; purification (par extraction sur colonne)	120 µg/kg	STRATTON G.W., 1993
		CPG/ECD	Extraction (acétonitrile / eau) ; purification (charbon / alumine)	50 µg/kg	CROTEAU M., 1994
		CG/SM	Extraction (méthanol); purification (colonne au gel de silice)	5 µg/kg	SCHOLLENBERGER M., 1998
		CL/SM	Extraction (acétonitrile / eau)	1 µg/kg	BERGER U., 1999
Echantillons biologiques	Lait, sérum, urine	CCM	Extraction (acétonitrile) ; nettoyage ; CCM (gel de silice) ; pulvérisation acide sulfurique à 20%	10 µg/kg	MIROCHA C.J., 1983
		CLHP/SM	Extraction (acétonitrile / eau), purification	5 µg/kg	VOYKSNER RD., 1987
		CG/SM	Extraction (acétonitrile)	5 µg/kg	D'AGOSTINO P.A., 1986
		ELISA	Extraction (méthanol) ; pas de purification	50 µg/kg	MARTLBAUER M., 1991

Tableau n° 5 : Principales méthodes de dosage de la toxine HT-2

Matrice		Procédure d'analyse	Préparation de l'échantillon	Limites de détection	Références
Aliments	Céréales, farines	CCM/UV	Extraction ; purification (colonne au charbon activé, oxyde d'aluminium)	20 -37 µg/kg	KAMIMURA, 1981 CZERWIECKI L., 1989
		CLHP/UV	Extraction (acétonitrile / eau) ; purification (par extraction liquide/liquide sur	15 µg/kg	RAZZAZI -FAZELI E., 1999

			colonne)		
		CPG/ECD	Extraction (acétonitrile / eau) ; purification (résine échangeuse d'ions, charbon)	10 µg/kg	LANGSETH W., 1992
		CG/SM	Extraction (hexane) ; purification (colonne échangeuse d'ion)	7 µg/kg	SCHOLLENBERGER M., 1998
		CL/SM	Extraction (acétonitrile / eau) ; mycosep 227	6 µg/kg	BERGER U., 1999
		ELISA	Extraction (eau) ; pas de purification	20 µg/kg	ABOUZIED M., 2000
Echantillons biologiques	Lait, sérum, urine	HPLC/UV	Extraction ; purification (charbon activé / oxyde d'aluminium)	50 µg/kg	TUTEL'IAN V.A., 1991
		CPG/ECD	Extraction (acétate d'éthyle)	50 µg/kg	DAHLEM A.M., 1986
		CG/SM	Extraction (colonne Clin Elut) ; purification (colonne au C18)	5 µg/kg	BLACK R.M., 1986
		CL/SM	Extraction (méthanol) ; purification (florisil)	2 µg/kg	TIEBACH R., 1985
		ELISA	Extraction (acétonitrile)	10 µg/kg	XU Y.C., 1988

Tableau n° 6 : Principales méthodes de dosage du déoxynivalénol.

Matrice		Procédure d'analyse	Préparation de l'échantillon	Limites de détection	Références
Aliments	Céréales, farines	CCM	Extraction ; purification (colonne au charbon activé, oxyde d'aluminium)	100 µg/kg	CZERWIECKI L., 1989
		CLHP/UV	Extraction (acétonitrile / eau) ; purification (extraction liquide/liquide sur colonne)	50 µg/kg	RAZZAZI -FAZELI E., 1999
		CPG/ECD	Extraction (acétonitrile / méthanol) ; purification (sur résine)	40 µg/kg	KOTAL F., 1999

		CPG/SM	Extraction (acétonitrile, KCl 4%); purification (colonne au charbon activé, oxyde d'aluminium)	10 µg/kg	SCUDAMORE K.A., 1998
		ELISA	Extraction (acétonitrile / méthanol)	50 µg/kg	VRABCHEVA T., 1996
Echantillons biologiques	Lait, sérum, urine	CHLP/UV	Extraction (acétonitrile : eau) ; purification (charbon : aluminium)	50 µg/kg	LAUREN D.R., 1987
		CG/SM	Extraction (colonne Clin Elut) ; purification (colonne au C18)	10 µg/kg	BLACK R.M., 1986
		CL/SM	Extraction (méthanol) ; purification (florisil)	2 µg/kg	TIEBACH R., 1985
		ELISA	Extraction (acétonitrile)	10 µg/kg	XU Y.C., 1988

Tableau n° 7 : Principales méthodes de dosage du nivaléol.

Matrice		Procédure d'analyse	Préparation de l'échantillon	Limites de détection	Références
Aliments	Céréales, farines	CCM	Extraction (éthanol, eau); purification (au florisil))	20 µg/kg	KAMIMURA H., 1981
		CPG/ECD	Extraction (acétonitrile / eau) ; mycosep 227	35 µg/kg	WEINGARTNER, J., 1997
		CG/SM	Extraction (acétonitrile, eau); purification (colonne au gel de florisil))	5 µg/kg	RYU J.C., 1996

Tableau n° 8 : Principales méthodes de dosage de la fusarénone X

1.5. Lutte contre les toxines

Comme de très nombreuses denrées sont contaminées par les trichothécènes, différentes procédures de décontamination ont été explorées. On peut les diviser en méthodes physiques, chimiques et biologiques. Idéalement, ces méthodes doivent diminuer la concentration en toxine sans produire des substances de dégradation encore plus toxiques et sans diminuer les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments.

1.5.1. Séparation physique des toxines des denrées

Les méthodes physiques comprennent le tri sélectif, la chaleur et les irradiations.

Lorsque le grain est passé à la meunerie, il n'est pas réellement décontaminé en DON. Le bran est simplement plus concentré que la farine. Après moulage, il ne reste plus que 25% de toxines dans la farine, le reste étant dans le bran [D'MELLO J.P.F., 1999 ; PLACINTA C.M., 1999].

Certaines toxines peuvent être partiellement détruites par la chaleur. Si à l'état pur, les toxines sont assez résistantes, elles peuvent subir des dégradations dans les aliments à des températures plus faibles car elles interagissent avec d'autres molécules. En particulier, le cycle époxyde des trichothécènes est hydraté après 6 heures dans de l'eau bouillante. Le site est alors inactivé et la toxine perd de sa toxicité [SAMARAJEEWA U., 1991]. Lors de la cuisson de la farine de blé, entre 90 et 120 °C, on peut obtenir une dégradation de l'ordre de 16 à 69 % du déoxynivalénol. Il n'est pas encore bien établi si la chaleur détruit la toxine ou si la molécule est simplement inactivée [ABBAS H.K., 1985]. Ainsi, pour les produits transformés industriellement et les plats cuisinés, il est très difficile de prévoir le taux de dégradation des trichothécènes même s'il apparaît qu'on trouve une réduction [SAMARAJEEWA U., 1991].

Les radiations ionisantes peuvent permettre de réduire certaines contaminations en mycotoxines. Peu d'études montrent cependant une réelle application aux trichothécènes [SAMARAJEEWA U., 1991]. Les micro-ondes ne détruisent les trichothécènes que lorsqu'ils sont utilisés à très fortes doses, ce qui rend leur utilisation inapplicable dans les conditions normales de préparation des aliments [RILEY R.T., 2003]. De même, les radiations ultraviolettes n'ont aucun effet sur les trichothécènes des groupes A et B [SAMARAJEEWA U., 1991 ; CREPPY E.E., 2002].

1.5.2. Lutte chimique

La lutte chimique contre les mycotoxines a principalement été développée vis-à-vis des aflatoxines. Le nombre de références concernant les trichothécènes est insuffisant. Néanmoins, ces méthodes ne semblent pas présenter un intérêt majeur pour ces toxines.

Le lavage des aliments avec de l'hydroxyde de calcium monométhylamine (2%), du sodium bisulfite et de l'ammoniaque (1,5%) entraîne une diminution des teneurs en

trichothécènes de 5 à 15 %. Ces produits n'ont cependant été testés qu'en laboratoire. Aucune application pratique n'en a encore découlé [D'MELLO J.P.F., 1999 ; RILEY R.T., 2003].

Bien qu'il soit possible de décontaminer la peau du diacétoxyscirpénol par une application d'eau de Javel (hypochlorite de sodium), cette méthode semble difficilement applicable aux aliments. La toxicité cutanée de ce composé est supprimée par une application pendant 15 minutes avec de l'eau de Javel à 1% [VIDAL D., 1985].

Les anti-oxydants comme la vitamine E permet de diminuer les effets nocifs de la toxine T-2 lorsqu'elle est distribuée comme supplément alimentaire (200 mg/kg de nourriture). On voit alors in vivo, une diminution des peroxydations lipidiques chez le poulet. La vitamine C n'apporte, quant à elle, aucun effet tangible [HOELHER D., 1996 ; D'MELLO J.P.F., 1999]. Certaines études ont montré que les mycotoxines pouvaient interagir avec des vitamines et devenir inactives. Ces études se sont particulièrement intéressées aux aflatoxines mais très peu aux trichothécènes [SCHAEFFER J.L., 1991 ; MARQUARDT R.R., 1991 ; HUSSEIN H.S., 2001 ; ATROSHI F., 2002].

1.5.3. Adsorption des toxines

Le charbon actif peut permettre la réduction des lésions de la sphère buccale lors d'ingestion de grains contaminés par la toxine T-2, s'il est distribué en même temps que la ration contaminée [GUTZWILLER A., 2000 ; MARQUARDT R.R., 1996]. Ainsi, le charbon activé permet d'adsorber 9,9 mg de trichothécènes (DON et toxine T-2 particulièrement) par g de charbon. Mais ce résultat semble être du au fait que le charbon est un adsorbant non spécifique. Il peut en effet permettre de réduire le taux de nombreuses toxines, avec d'ailleurs un pouvoir adsorbant bien plus important pour certaines mycotoxines de stockage (aflatoxines : 120 mg/g ; ochratoxine 124 mg/g) [GALVANO F, 1998 ; HUWIG A., 2001 ; BIEHL M.L., 1989].

Les argiles peuvent être aussi utilisées : les aluminosilicates, la bentonite, les zéolites... Cela fait une vingtaine d'années que des études s'intéressent à ces produits contre les mycotoxines. Malheureusement, la plupart des études concernent les aflatoxines ; très rares sont celles concernant les trichothécènes. Parmi elles, une étude a montré que la terre de diatomée a une capacité d'adsorption des trichothécènes de 0,5 à 1,5 mg/g [NATOUR R.M., 1998]. Un autre exemple montre que les bentonites adsorbent la toxine T-2 du fait de l'interchangeabilité des cations positionnés sur les différentes couches mais pas les autres trichothécènes [YIANNIKOURIS A., 2002 ; E.M.A.N., 2003]. Les zéolites permettent aussi

une adsorption du DON, en revanche, d'autres argiles comme la kaolinite, la sépiolite et la montmorillonite ne fixent que très médiocrement les trichothécènes [YIANNIKOURIS A., 2002]. Pour d'autres encore, les aluminosilicates seraient totalement inefficaces contre les toxines telles que le DAS, le DON et la toxine T-2 [E.M.A.N., 2003].

Il faut de plus être vigilant concernant certaines études. Les concentrations d'adsorbant sont parfois incompatibles avec des applications pratiques.

1.5.4. Lutte biologique

La décontamination biologique des denrées vis-à-vis des trichothécènes n'est pas encore à l'ordre du jour. Tout au plus, on commence à apercevoir des pistes permettant l'inactivation de certaines toxines. Les procédés de décontamination biologique ne sont pas encore applicables à l'échelle commerciale [KUIPER-GOODMAN T., 2002]. Les voies principales de recherche concernent la fermentation des aliments, l'ajout d'enzymes et la sélection génique.

La fermentation peut permettre de réduire la concentration en toxines dans une denrée. En effet, une étude a montré que du maïs contaminé par la toxine T-2 ayant subi une fermentation par *Candida intermedia* perd 10 fois sa toxicité. Toutes les toxines étaient dans le liquide de fermentation [BATA A., 1999]. Rappelons que la fabrication de la bière n'est en aucun cas un processus de décontamination de l'orge. On retrouve les trichothécènes dans le produit fini (cf. partie 2.5.2).

En ce qui concerne les animaux, il a été remarqué que les hôtes de la panse des ruminants inactivent certains trichothécènes. On est ainsi à la recherche d'enzymes qui inactiveront des mycotoxines de manière comparable aux microbes de la panse [GUTZWILLER A., 2000]. Pour les enzymes elles-mêmes, il a été montré que l'époxide hydrase ou la glutathion S-epoxide hydrase réduisent la toxicité de la toxine T-2 et du déoxynivalénol. De même, la carboxyestérase du foie semble détoxifier la toxine HT-2, la fusarénone X, le diacétoxycirpénol [BHATNAGAR D., 1991]. Ces découvertes permettent d'envisager de nouvelles voies de décontamination, mais les recherches sur ce sujet sont encore en cours.

Une dernière piste est celle de la génétique. Si on arrive à isoler et cloner les gènes de bactéries responsables de la production d'enzymes détoxifiantes, il sera alors possible d'incorporer ce gène au sein d'une plante [BHATNAGAR D., 1991]. Des travaux sont en cours en ce qui concerne l'inhibition ou la dégradation du DON, mais nous ne savons

pas quels sont les gènes qui sont impliqués. En effet, parmi les permis d'exploitations déposés les plus récents, la plupart des institutions privées développant ces produits ne dévoilent pas les gènes utilisés [DION Y., 2002d]. D'autres recherches essaient d'insérer le site actif d'un anticorps développé pour le DON en espérant que cet anticorps, qui sera produit par la plante, se liera au DON et le rendra inactif dans le végétal [DION Y., 2002d].

PARTIE 2.

LES MOISSURES : NATURE, CROISSANCE ET MOYENS DE CONTROLE

Les moisissures sont des champignons microscopiques pluricellulaires capables de se développer sur la matière organique. Les moisissures sont hétérotrophes pour le carbone. Elles peuvent vivre en parasite, se nourrissant ainsi aux dépens d'autres organismes vivants mais également à l'état saprophyte en colonisant des substrats morts ou inertes. Certaines peuvent élaborer les métabolites secondaires que sont les mycotoxines, les plus connues d'entre elles sont l'aflatoxine, l'ochratoxine, la zéaralénone, les fumonisines et les trichothécènes. Il a été recensé plus de 182 types de trichothécènes, produites par différents genres de moisissures [UENO Y., 1990]. Dans ce travail, nous ne nous intéresserons qu'aux

moisissures produisant des trichothécènes des groupes A et B : *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Trichothecium*. Les moisissures les plus courantes et les plus représentées comme productrices de toxines de ces groupes appartiennent au genre *Fusarium*.

2.1. Les moisissures

2.1.1. Généralités

La colonisation du substrat s'effectue par extension et ramification des hyphes. La croissance est centrifuge et s'effectue par l'apex. Les parties terminales des hyphes sont les parties actives où s'effectue l'essentiel des activités de synthèse. Au fur et à mesure que l'hyphe s'accroît, des cloisons se forment, délimitant des cellules à plusieurs noyaux. Dans une culture ; il y a donc toujours une zone de croissance fongique, limitée aux apex, une zone d'intense activité métabolique où se produisent l'absorption et les synthèses , et une zone de sénescence [JANCENELLE C., 1990].

2.1.2. Culture

La culture des moisissures *in vitro* nécessite plusieurs étapes : l'isolement et la croissance [PECQUERY M., 1997].

- Isolement

Les *Fusarium* sont très répandus et peuvent être isolés de la plupart des sols, des insectes, de l'eau courante, des racines, graines et autres tissus d'une grande variété de plantes herbacées et ligneuses, tant sauvages que cultivées [PECQUERY M., 1997].

L'échantillon prélevé est broyé et mis en suspension dans une solution aqueuse de chlorure mercurique (1 : 1000) ou dans une solution d'hypochlorite de sodium, puis rincé à l'eau distillée. Après étalement sur milieu gélosé et incubation à température ambiante, les thalles sont prélevés,ensemencés sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar), incubés à nouveau puis identifiés [WILLIE T.D., 1977].

- Croissance

Pour croître et se multiplier, les moisissures doivent puiser dans le milieu des matières organiques structurales et énergétiques. La paroi rigide, épaisse et pluristratifiée des cellules fongiques les empêchent de phagocyter leur nourriture. Seuls les nutriments simples et solubles peuvent être absorbés, ce qui implique une hydrolyse préalable des macromolécules.

Cette exigence est satisfaite grâce à un potentiel enzymatique exceptionnel : les cellules fongiques sont particulièrement riches en dépolymérasés. Sous l'action de ces enzymes, des polymères complexes comme la cellulose, la lignine et les composés pectiques peuvent être digérés et utilisés [BERTHIER J., 2002].

Cependant, il y a un risque de dégénérescence de la souche si le milieu de culture est trop riche. Beaucoup de souches produisant des toxines perdent cette capacité après un long séjour en laboratoire. La toxinogénicité des moisissures est influencée par les facteurs écologiques et climatiques, tels que humidité, température, composition et pH du milieu [FUSKEY, 2002].

Le milieu de culture le plus favorable à la croissance et la sporulation des *Fusarium* est un milieu à base d'avoine (Oat-Agar) ou de pomme de terre (PDA). L'examen d'une culture porte sur une période d'environ trois semaines afin de voir successivement : les microconidies, les macroconidies puis les chlamydospores [FUSKEY, 2002].

Les conditions de croissance optimales *in vitro* sont les mêmes que celles *in vivo* et seront présentées par la suite.

2.1.3. Taxonomie et identification

2.1.3.1. Taxonomie générale

Les principales espèces productrices de trichothécènes appartiennent aux « *Fungi imperfecti* », soit aux champignons dits imparfaits. Ces champignons possèdent un thalle dont les cellules sont délimitées par une paroi squelettique. Le thalle étant filamenteux ou levuriforme, ces espèces dépendent de l'embranchement des *Eucomycètes*. Le thalle étant septé, la reproduction sexuée n'étant pas possible, elles sont rangées dans le sous-embranchement des *Deuteromycètes*, aussi appelé *Fungi imperfecti*. Leur reproduction s'effectue par des spores appelées conidies. (Figure 12)

Le mode de regroupement des appareils conidiens détermine des ordres puis des genres:

- *spores contenues dans des asques : ordre des Ascomycètes
- * conidies formées par des cellules conidiogènes libres : ordre des Hyphomycètes
 - conidiophores dispersés : famille des Hyphomycétales
 - conidiophores agrégés en sporodochies : famille des Tuberculariales
- * spores contenues dans une cellule renflée, le sporange : ordre des Zygomycètes

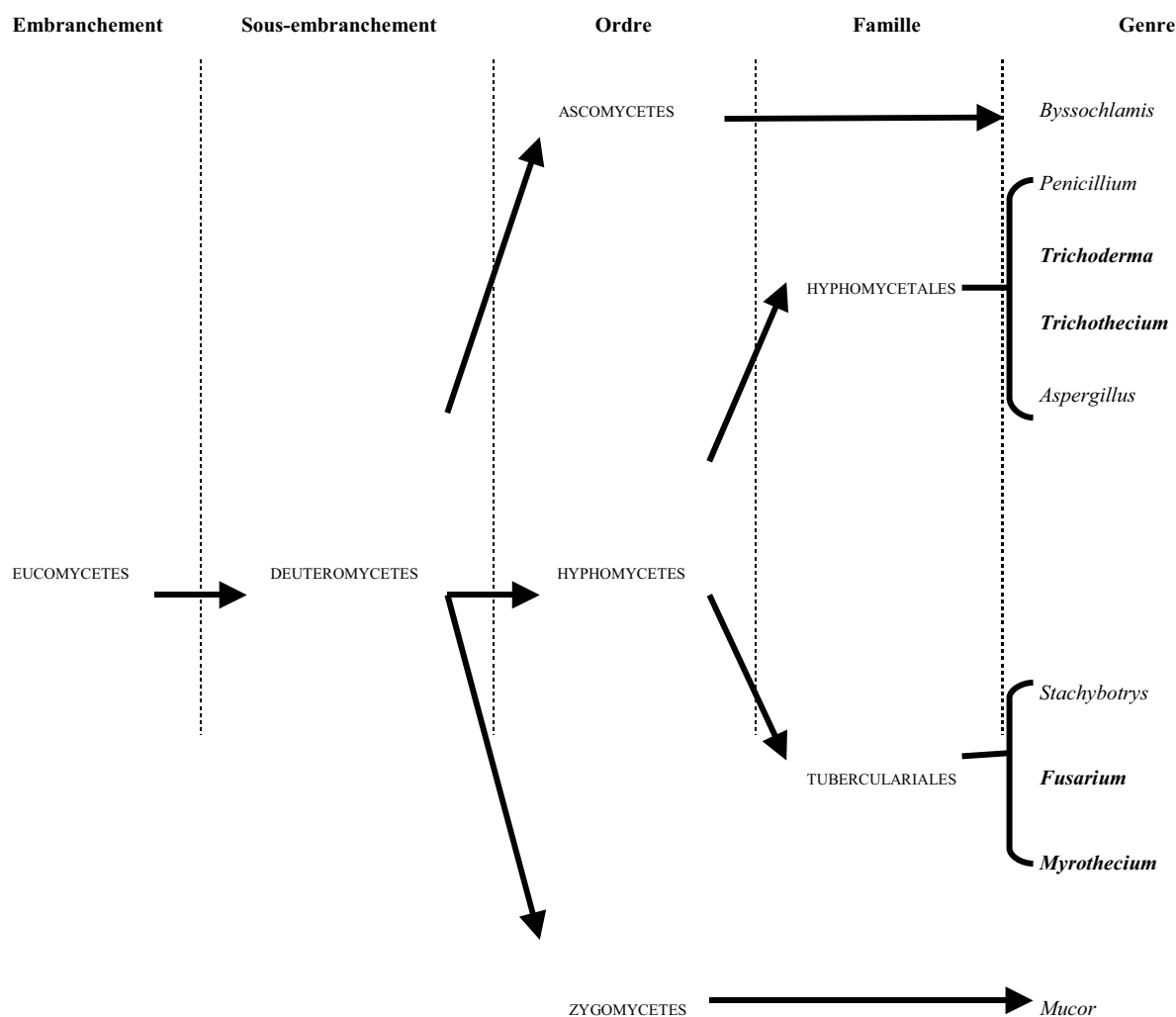


Figure n° 12 : Classification des champignons producteurs de trichothécènes (les espèces productrices figurent en gras)

2.1.3.2. Identification

La taxonomie des espèces produisant des trichothécènes est complexe en raison d'une grande variabilité dans leurs caractères morphologiques [WILLIE T.D., 1977]. La différenciation des genres s'effectue sur l'aspect du conidiophore. Les *Fusarium* ont des thalles à croissance rapide avec des conidiophores parfois très ramifiés. Les *Myrothecium* ont des cellules conidiogènes cylindriques agrégées en sporodochies. Les *Trichoderma* ont des conidiophores très ramifiés et des phialides courtes en forme de quilles. Les *Trichothecium* ont des conidiophores érigés [BOTTON B., 1990].

Au sein des *Fusarium*, la différenciation est encore plus complexe. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues ; la plupart vivent dans le sol, certaines sont phytopathogènes, d'autres sont des parasites de l'homme et des animaux [BOTTON B., 1990]. On utilise les critères suivants (tableau 9) [FUSKEY, 2002] :

- la présence ou l'absence de microconidies : quand elles existent, elles peuvent être unicellulaires, de petites tailles, de formes variables ou encore groupées en tête ou en chaîne ;
- la présence ou l'absence de chlamydiospores* ;
- la forme et la dimension des macroconidies ;
- l'aspect et la couleur de la culture ainsi que la production et la diffusion de pigments dans le milieu ;

chlamydiospores* : ce sont de grosses cellules de résistance, formées à partir du mycélium ou à partir d'une conidie ; elles apparaissent après privation de nourriture, pH bas, présence de contaminants ou de microorganismes dans le sol. Elles peuvent se présenter isolées, en chaîne ou en grappe.

	<i>F. monoliforme</i>	<i>F. rigidiusculum</i>	<i>F. oxysporum</i> *	<i>F. solani</i> *	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. espiphaeria</i>	<i>F. nivale</i> *	<i>F. lateritium</i>	<i>F. roseum</i> *
MICROCONIDIES	Normalement présentes, ovoïdes, en forme de rein, en forme de poire					Absente ou si elles existent, quelques unes sont en forme de rein, de virgule ou de fuseau			
	Ovoïdes ou en forme de rein				En forme de poire				
	* Phialides allongées, minces sur courts conidiophores * conidies en longues chaînettes	Conidies en chaîne	Phialides en forme d'amphores Conidies cylindriques ou ellipsoïdales	Phialides longues et cylindriques					

			, droites ou courbées						
CHLAMYDOSPORES	absentes	absentes	* terminales ou intercalaires *seules ou par chaîne *paroi lisse ou visqueuse	* terminales ou intercalaires *seules ou par paire *paroi lisse ou visqueuse	présente	absentes	absentes	Peuvent être présentes	Peuvent être présentes
MACROCONIDIES	* rares voire absentes *fines	Relativement larges	* falciformes *paroi lisse et fine	* base arrondie * apex en forme de bec		Sans cellules basales caractéristiques		Cellules basales caractéristiques	
MYCELIUM COULEUR PIGMENT	Blanc à saumon violet	Jaune Jaune ou rouge vin	Crème à saumon violet	Crème, vert, bleu variable	Blanc à brun rouge rouge	Orange	Orange T° : 40-50 °C	Blanc à jaune Sclérote bleu	Brun à rouge Rouge à saumon

* : espèces productrices de trichothécènes

Tableau n° 9 : Critères d'identification des principaux *Fusarium* [BADILLET G., 1987 ; JANCENELLE C., 1990].

2.1.4. Espèces présentes et morphologies

2.1.4.1. Le genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* appartient à l'ordre des Hyphomycètes et à la famille des Tuberculariales. On rencontre les *Fusarium* dans le sol, pour lequel ils sont bien adaptés puisque possédant les spores en forme de fuseau. Celles-ci sont facilement dispersées par l'eau, les particules de terre et sur les graines [DAVID A., 2001]. Le genre *Fusarium* comprend de nombreuses espèces différentes dont les plus représentées sont *F.*

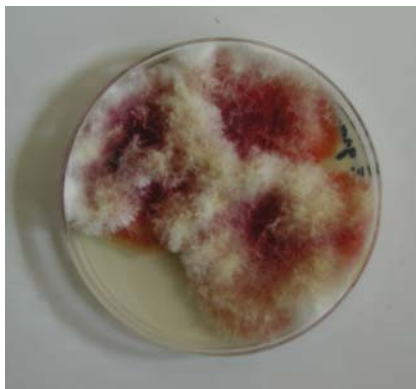
sporotrichioides, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. graminearum* et *F. moniliforme* [MARASAS W., 1991]. Mais seules certaines produisent des trichothécènes :

groupe A : *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. poe*, *F. solani*, *F. semitectum*, *F. roseum*,
F. sulphureum

groupe B : *F. nivale*, *F. crookwellense*, *F. episphaeria*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*,
F. solani, *F. avenaceum*

groupes A et B : *F. lateritium*, *F. culmorum*, *F. equiseti*

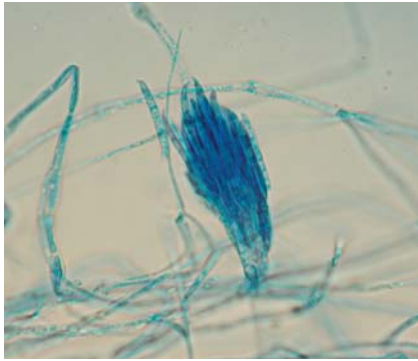
En culture, les *Fusarium* produisent un mycélium extensif et cotonneux, avec souvent des teintes roses, pourpres ou jaunes, pouvant diffuser dans le milieu [FUSKEY, 2002]. Les conidies sont visqueuses, hyalines, cloisonnées, en forme de canot (connue sous le nom de macroconidies). Elles sont formées dans des structures fructifères appelées sporodochies [FUSKEY, 2002].



En culture



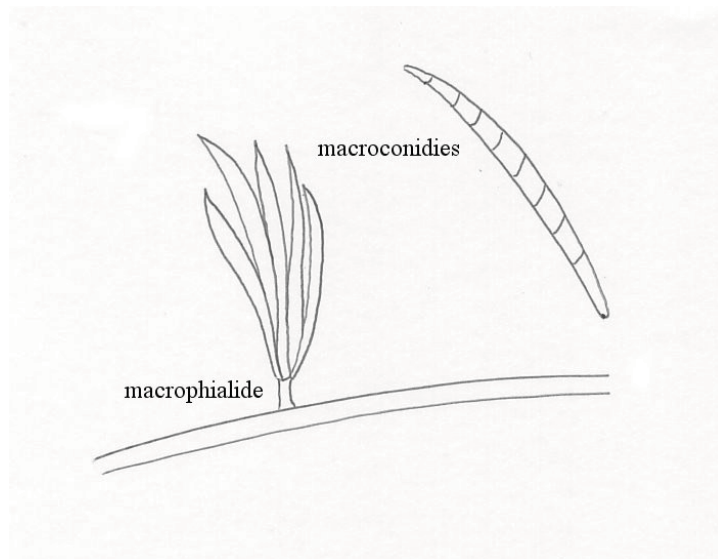
Sous loupe binoculaire (Gx50)



Sous microscope (Gx400) : macrophialides



Sous microscope (Gx1000) : macroconidie



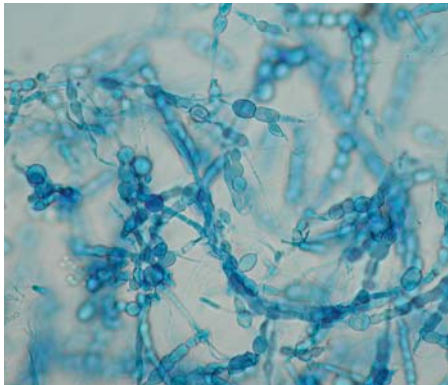
Schéma

Figure n° 13 : *Fusarium graminearum*



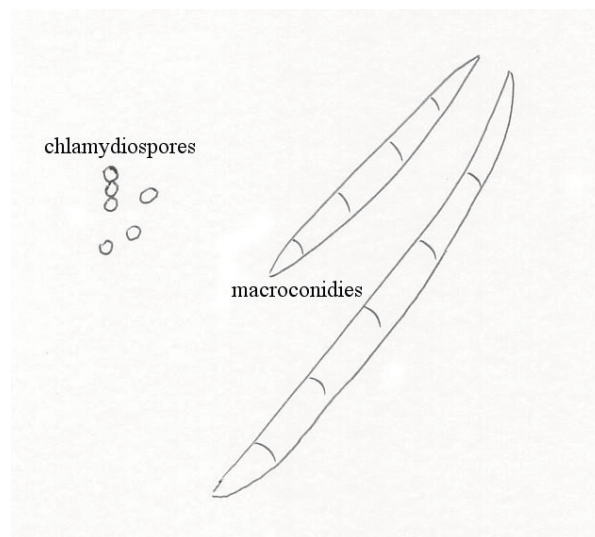
En culture

Sous loupe binoculaire (Gx50)



Sous microscope (Gx400) : chlamydiospores

Sous microscope (Gx400) : macroconidies



Schéma

Figure n° 14 : *Fusarium equiseti*

2.1.4.2. Le genre *Trichothecium*

Le genre *Trichothecium* appartient à l'ordre des Hyphomycètes et à la famille des Hyphomycétales. On retrouve souvent cette moisissure sur des échantillons déjà contaminés par *Fusarium sp.* Les conditions de croissance et les substrats sont à peu près identiques [MANTLE P., 1991].

La principale espèce produisant de trichothécènes est *Trichothecium roseum*. Elle produit principalement des toxines du groupe B.

Le mycélium hyalin de ce champignon buissonnant donne un aspect velouté en raison des conidiophores érigés, qui sont longs, minces, flexueux, isolés et septés. Ils portent des conidies hyalines ou légèrement colorées, bicellulaires, ovoïdes à elliptiques. Celles-ci peuvent être isolées ou produites successivement par une légère croissance de l'apex du conidiophore, formant alors une chaîne ou un groupe. La couleur de la culture passe au rose lors de la sporulation.

2.1.4.3. Le genre *Trichoderma*

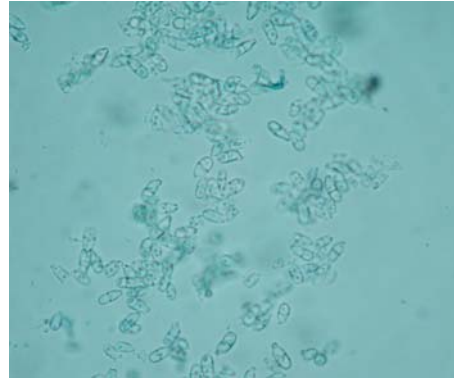
Le genre *Trichoderma* appartient à l'ordre des Hyphomycètes et à la famille des Hyphomycétales. Ces champignons sont très communs. Ils sont saprophytes dans le sol ou sur le bois. Quelques espèces sont rapportées comme étant parasites d'autres champignons. Ils participent dans le sol aux phénomènes de lyse de la cellulose et de la lignine des végétaux.

Les principales espèces produisant des trichothécènes sont *Trichoderma viridae*, *T. lignorum*, *T. polysporum*. Elles produisent principalement des toxines du groupe A.

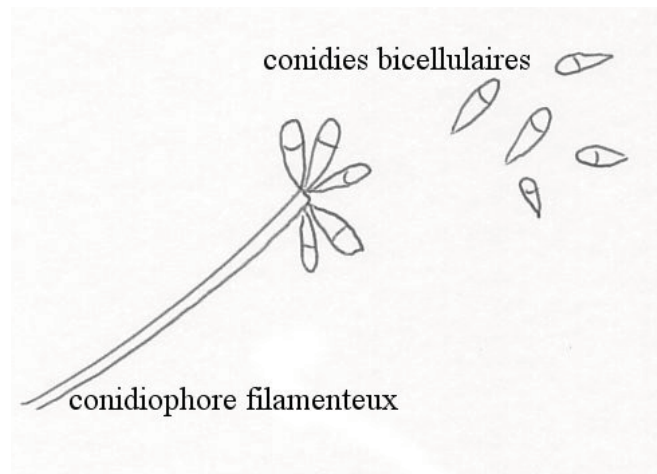
Ces champignons présentent des conidiophores hyalins, ramifiés, non verticillés, portant des phialides isolées ou en groupe, ayant la forme d'une quille. Les conidies naissent successivement et forment alors de petits groupes terminaux visqueux de 10 à 20 µm de diamètre qui se désagrègent facilement. Elles sont unicellulaires et de forme ovoïde. La masse sporifère, hyaline au début se teinte en vert à maturité.



Sous loupe binoculaire (Gx50)



Sous microscope (Gx400)

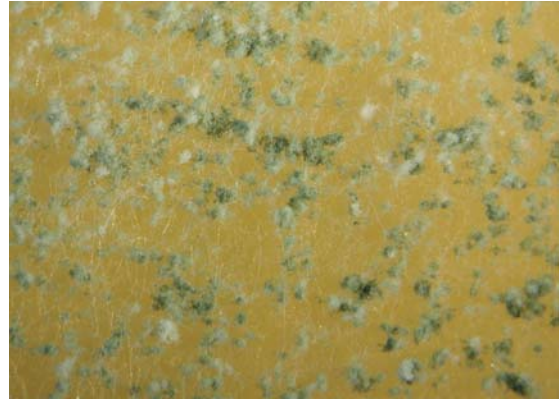


Schéma

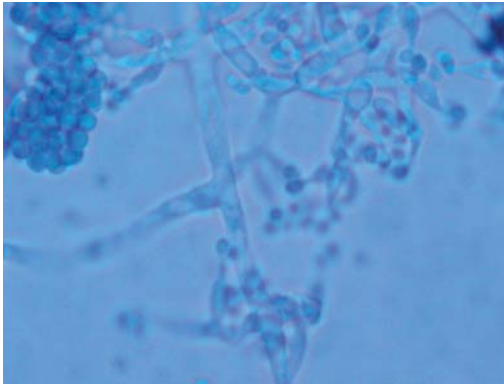
Figure n° 15 : *Trichothecium roseum*



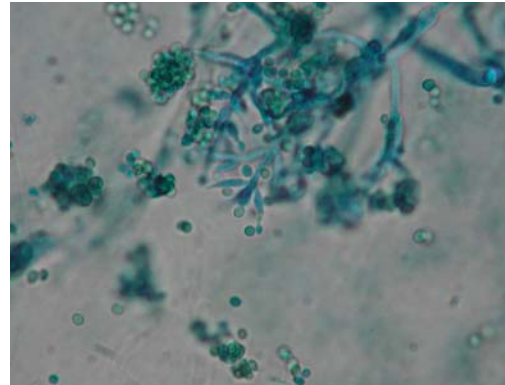
En culture



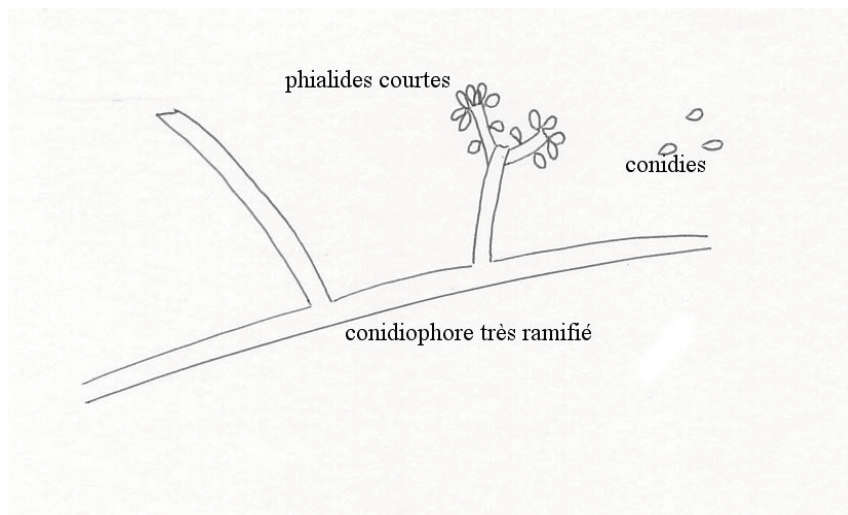
Sous loupe binoculaire (Gx50)



Sous microscope (Gx400)



Sous microscope (Gx400)



Schéma

Figure n° 16 : *Trichoderma viridae*

2.1.4.4. Le genre *Myrothecium*

Le genre *Myrothecium* appartient à l'ordre des Hyphomycètes et à la famille des Tuberculariacées. Ces moisissures se rencontrent dans les sols riches en matières organiques, sur les déchets de plantes et de feuilles mortes, sur les substrats riches en cellulose. Elles poussent dans les régions tempérées et tropicales. Les concentrations en toxines sont extrêmement variables selon les échantillons [MANTLE P., 1991].

Dans le genre *Myrothecium*, deux espèces produisent des trichothécènes : *M. roridum* et *M. verrucaria* [UENO Y., 1980]. Elles produisent principalement des toxines du groupe A.

Les *Myrothecium* présentent des conidiophores groupés, les sporodochies ressemblant à des coussinets. Les conidiophores sont subhyalins à colorés, ramifiés à plusieurs reprises et portent des conidies terminales. Ces conidies peuvent être subhyalines à sombres, ovoïdes à allongées et ne possèdent qu'une cellule. En culture, les spores sont agglomérées dans une goutte de mucus et sont dispersées dans l'eau car leurs parois sont mouillables.

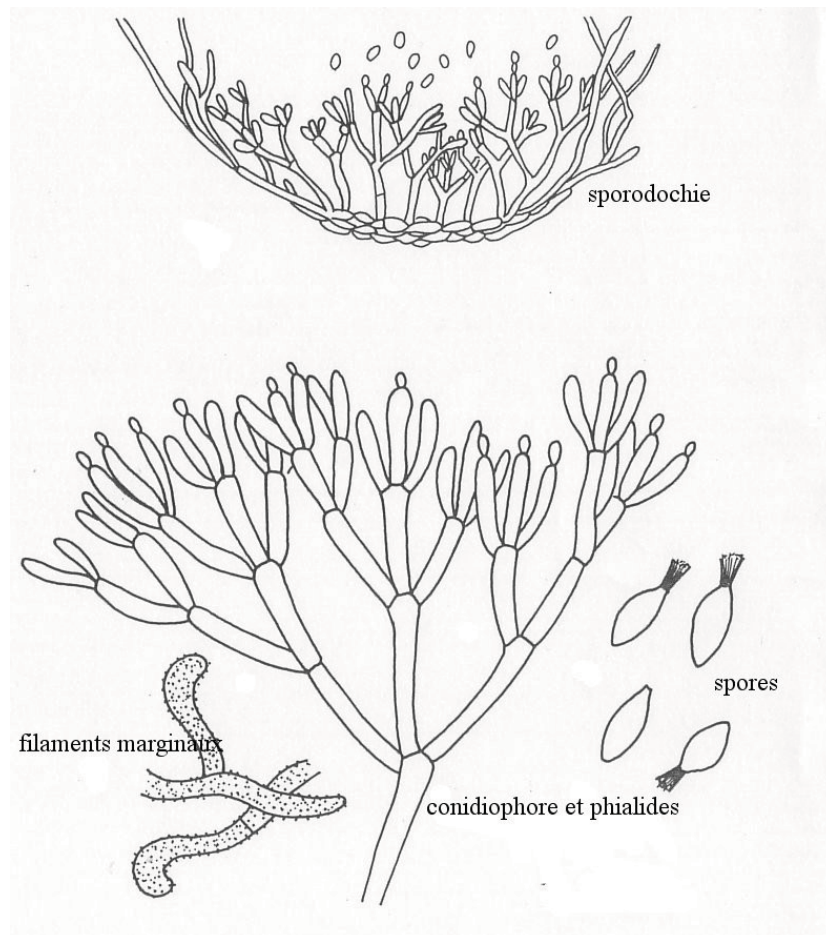


Figure n° 17 : *Myrothecium verrucaria*, schema

2.1.5. Types de trichothécènes produits par espèce de moisissure

Il est intéressant de pouvoir associer les trichothécènes et les espèces productrices. En effet, une toxine peut être produite par plusieurs espèces de moisissures et une même espèce peut produire plusieurs toxines. [SUDAKIN D., 2003].

En général, les espèces de *Fusarium* produisant des trichothécènes du type A sont souvent incapables de produire des toxines du groupe B (Tableau 10). Quelques exceptions cependant sont connues comme *Fusarium lateritium*, *Fusarium culmorum* et *Fusarium equiseti* qui peuvent produire des toxines des deux groupes [UENO Y., 1980].

Généralement, une même espèce peut, suivant les conditions produire plusieurs toxines, mais ce n'est pas obligatoire : *Fusarium crookwellense* produit uniquement la fusarénone X [NIELSEN K.F., 2001].

Genre	Groupe	Espèce de <i>Fusarium</i>	Toxines produites
Fusarium	Groupe A	<i>Fusarium tricinctum</i>	DAS, toxine T-2, HT-2 toxine, néosolaniol
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	DAS, toxine T-2, HT-2 toxine, néosolaniol
		<i>Fusarium poae</i>	DAS, toxine T-2, HT-2 toxine, acétyl T2, néosolaniol
		<i>Fusarium solani</i>	DAS, toxine T-2, HT-2 toxine, néosolaniol
		<i>Fusarium semitectum</i>	Toxine T-2
		<i>Fusarium sulphureum</i>	Monoacetoxyscirpenol
		<i>Fusarium roseum</i>	Scirpentriol, Monoacetoxyscirpenol
	Groupe B	<i>Fusarium nivale</i>	DON, Nivalénol, 4, 15-diacétylnivalénol, Fusarénone X, Calonectrine
		<i>Fusarium crookwellense</i>	DON, Fusarénone X
		<i>Fusarium episphaeria</i>	DON, Nivalénol, 4-acétylnivalénol, Fusarenone X
		<i>Fusarium oxysporum</i>	DON, 4, 15-diacétylnivalénol, Fusarenone X
		<i>Fusarium solani</i>	DON, Fusarenone X
		<i>Fusarium avenaceum</i>	DON, Fusarenone X
		<i>Fusarium graminearum</i>	DON, Fusarenone X, Monoacetoxydeoxynivalénol
	Groupe A et B	<i>Fusarium lateritium</i>	A : DAS, 7 α -dihydroDAS B : Diacétylnivalénol, Fusarenone X
		<i>Fusarium culmorum</i>	A :DAS, toxine T-2, HT-2 toxine, monoacetoxyDAS B : 4, 15-diacétylnivalénol
		<i>Fusarium equiseti</i>	A : DAS, toxine T-2, HT-2 toxine, néosolaniol, monoacétoxyscirpénol B : 4, 15-diacétylnivalénol, Fusarenone X
	Trichoderma	Groupe A	<i>Trichoderma viridae</i>
<i>Trichoderma polysporum</i>			Trichodermine, Roridine C
<i>Trichoderma sporulosum</i>			Roridine C
<i>Trichoderma lignorum</i>			Trichodermine, Toxine T-2
Myrothecium	Groupe A	<i>Myrothecium roridum</i>	Trichodermadienediol A, Roridine C
		<i>Myrothecium verrucaria</i>	Trichodermadienediol B, Trichoverrol A et B
Trichothecium	Groupe B	<i>Trichothecium roseum</i>	Trichothécine

Tableau n° 10 : Principales moisissures productrices de trichothécènes [UENO Y., 1980 ; JANCENELLE C., 1990]

Un classement des espèces de moisissures par trichothécènes produits est fourni dans le tableau 11. Ce tableau permet de retrouver les moisissures potentiellement présentes sur un échantillon lorsqu'une toxine a été détectée.

Groupe	TRICHOTHECENES	MOISSURES	
Groupe A	Toxine T2	<i>Fusarium sp.</i>	
	Toxine HT-2	<i>Fusarium sp.</i>	
	Acetyl T2 toxine	<i>Fusarium poae</i>	
	DAS ou Anguidine	<i>Fusarium sp.</i>	
	7 α hydroxydiacetoxy-scipenol		<i>Fusarium lateritium</i>
			<i>Fusarium sulfureum</i>
			<i>Fusarium roseum</i>
	Neosolaniol	<i>Fusarium sp.</i>	
	Roridine C		<i>Myrothecium roridum</i>
			<i>Trichoderma polysporum</i>
			<i>Trichoderma sporulosum</i>
	Trichodermine		<i>Trichoderma viridae</i>
			<i>Trichoderma lignorum</i>
			<i>Trichoderma polysporum</i>
	Trichodermadienediol A	<i>Myrothecium roridum</i>	
	Trichodermadienediol B	<i>Myrothecium verrucaria</i>	
	Trichoverrol A et B	<i>Myrothecium verrucaria</i>	
Diacetyl verrucarol	<i>Myrothecium sp.</i>		
Scirpentriol		<i>Fusarium roseum</i>	
		<i>Fusarium equiseti</i>	
Monoacetoxy-scirpentriol		<i>Fusarium roseum</i>	
		<i>Fusarium sulphureum</i>	
Groupe B	Deoxynivalenol	<i>Fusarium sp.</i>	
	Monoacetoxy deoxynivalenol		<i>Fusarium culmorum</i>
			<i>Fusarium graminearum</i>
	Nivalenol		<i>Fusarium nivale</i>
			<i>Fusarium episphaeria</i>
	4,15-diacetyl-nivalenol		<i>Fusarium nivale</i>
			<i>Fusarium oxysporum</i>
			<i>Fusarium culmorum</i>
	Fusarenone X		<i>Fusarium equiseti</i>
			<i>Fusarium nivale</i>
			<i>Fusarium graminearum</i>
			<i>Fusarium solani</i>
			<i>Fusarium lateritium</i>
		<i>Fusarium avenaceum</i>	
		<i>Fusarium episphaeria</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i>		
Trichothecine	<i>Trichothecium roseum</i>		

Tableau n° 11 : Origine des principaux trichothécènes [UENO Y., 1980 ; JANCENELLE C., 1990]

2.2. Facteurs de croissance et toxinogénèse

On peut distinguer deux groupes de facteurs conditionnant le développement des moisissures dans les denrées alimentaires : des facteurs intrinsèques ou biotiques et des facteurs extrinsèques ou abiotiques. Les conditions requises pour la production de mycotoxines sont plus étroites que celles autorisant simplement la croissance fongique.

2.2.1. Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques de croissance des moisissures sont la nature des espèces présentes, les propriétés particulières des souches, l'intensité de la pollution initiale [UENO Y., 1980].

2.2.1.1. Nature des espèces présentes

Selon l'origine de la contamination, on peut classer les espèces fongiques contaminantes des denrées alimentaires en trois groupes [MOREAU C., 1974] :

La flore des champs est présente avant la récolte, sur les lieux de culture. On trouve principalement les *Fusarium*. On retrouve dans ce cas *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*. Elles peuvent se développer dans le champ à deux niveaux : sur les semences et par infestation des grains et des graines. Ainsi, il existe un risque potentiel d'infestation de la plante (et plus particulièrement des grains et des graines) à partir de la semence [LE BARS, 1988].

La flore de péri récolte, que l'on peut aussi appeler la flore intermédiaire, se développe lors de récolte tardive, pré stockage en humidité. Les moisissures de péri récolte sont des moisissures hygrophiles. Elles sont typiquement représentées par *Alternaria* et certaines souches de *Fusarium* [MOREAU C., 1974]. *Fusarium tricinctum* est un contaminant habituel des céréales, du foin et de la paille lors de stockage dans des conditions froides avec une alternance de gel et de dégel [LE BARS J., 1988]. Mais c'est la seule espèces de *Fusarium* capable de se développer sur le stock, les autres ne grandissent plus voire meurent comme *F. roseum* dans de l'ensilage [LACEY J., 1991].

La flore de stockage qui contamine la denrée arrivée saine et provenant du matériel ou des divers manipulations. C'est le cas de *Trichoderma sp.* qui apparaît en fin de silo et en cas de dégradation avancée de l'ensilage. Il se reconnaît à sa couleur jaunâtre puis verte [MOREAU C., 1974].

Les facteurs de toxinogénèse sont directement liés à la souche fongique. En effet, toutes les souches d'une espèce réputée toxigène ne sont pas toxigènes. On peut avoir de nombreuses mutations génétiques qui se produisent lors de la phase de croissance et entraînent parfois une diminution ou une exacerbation du pouvoir toxigène. On peut ainsi avoir une différence d'un facteur 1000 dans la quantité de toxine produite par la même espèce de moisissure [LE BARS J., 1988].

2.2.1.2. Propriété et intensité de la pollution

L'intensité de la pollution est importante car il y a rarement une contamination par une seule moisissure. Il s'agit plutôt de cortèges floristiques, composés souvent de l'association de flore des champs et de stockage. Les conditions de développement varieront donc également en fonction de la compétition entre les souches et ainsi favoriseront ou non la toxinogénèse [JANCENELLE C., 1990]. Certaines moisissures sont plus ou moins compétitives, ainsi *Trichoderma viride* est une espèce exclusive ne permettant pas l'installation d'autres espèces [LE BARS J., 1988]. Lors de l'isolement d'une souche suspecte, il convient donc de vérifier pour chaque espèce trouvée, que la souche considérée est bien la source de toxines. En effet, pour une espèce donnée, toutes les souches ne produisent pas la toxine et une souche capable de la produire, ne le fera que si les conditions le permettent [MOREAU C., 1974].

La fréquence des souches toxigènes dépend aussi de l'espèce considérée, de la région et du substrat sur lequel elle croît (cf facteurs extrinsèques). A titre d'exemple, les *Fusarium graminearum* provenant du maïs de l'Ontario produisent tous de la zéaralénone alors que les souches provenant du froment et de l'orge produisent en plus du déoxynivalénol [PECQUERY M., 1997].

Enfin, il est exceptionnel qu'une moisissure ne synthétise qu'une seule et unique toxine. Ainsi, *F. graminearum* peut élaborer la toxine T-2, le DON mais aussi des toxines d'autres familles comme la zéaralénone (Tableau 10).

2.2.2. Facteurs extrinsèques

2.2.2.1. Influence du substrat

On distingue différents facteurs comme des facteurs physiques (fragmentation, résistance mécanique ...) et des facteurs chimiques (compositions...) [WILLIE T.D., 1977].

* La fragmentation : le substrat sera d'autant plus susceptible d'être colonisé par les moisissures qu'il sera divisé. Il en va de même pour toutes les altérations mécaniques des grains par exemples (techniques opératoires, rongeurs, parasites...)

* La résistance mécanique au tassement : elle détermine le volume résiduel des interstices et la résistance au flux d'air desséchant. Elle influe donc sur la composition gazeuse du milieu.

* La conductivité thermique : elle autorise une propagation plus importante de la chaleur ou du froid ou bien à l'inverse diminue la propagation. Le centre des denrées sera donc moins sensible aux variations de température du milieu extérieur.

* L'affinité du substrat en eau : elle déterminera la propension du substrat à attirer l'eau du milieu extérieur donc influe directement sur la proportion d'eau utilisable pour les moisissures. On voit sur la figure 18, que suivant le substrat, pour atteindre l' a_w limite, l'humidité du substrat ne sera pas la même pour les céréales que pour les graines oléagineuses [LE BARS J., 1988].

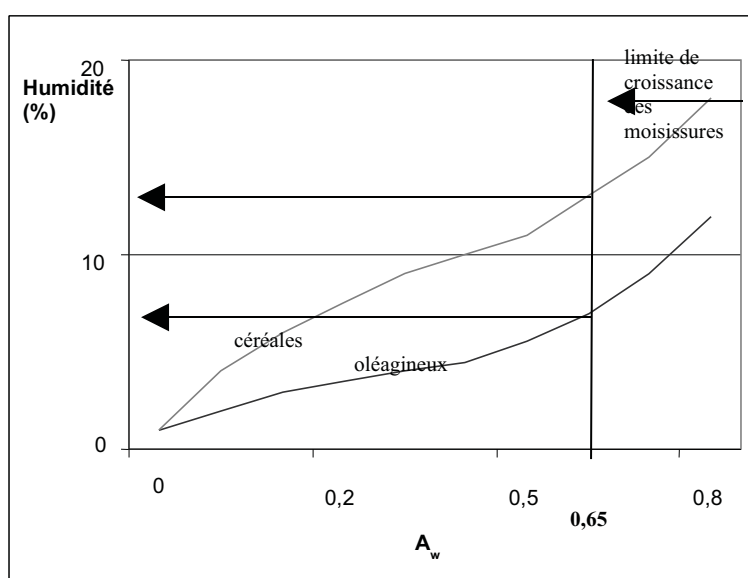


Fig. n° 18 : Taux d'humidité minimal en fonction des graines [LE BARS J., 1988].

* La composition chimique : Elle est suffisante pour permettre le développement des moisissures mais on retrouvera l'espèce dont l'équipement enzymatique est le mieux adapté à la denrée considérée.

Un substrat, pour être propice au développement des microorganismes doit non seulement renfermer des substances carbonées et azotées assimilables, mais il doit en outre les renfermer en proportions convenables. Le rapport C/N pour une croissance optimale est compris entre 8/1 et 12/1. Les champignons s'accoutument pour la plupart s'accoutument de milieu à C/N élevé (c'est-à-dire voisin de 30) ; certains tels que les *Trichoderma* et les *Fusarium* peuvent même croître sur des matériaux très déficitaires en azote comme les chaumes et les pailles (C/N > 80) [BERTHIER, 2002]. On va retrouver des substrats comme les céréales (dont les plus courantes sont le blé, le maïs, l'avoine, le seigle, le triticale, le sorgho), le riz, le foin et la paille. Par exemple, on trouve principalement *Fusarium nivale* sur les graminées et le riz [MOREAU C., 1974].

2.2.2.2. Disponibilité en eau

La relation entre la durée de conservation d'un produit alimentaire et son degré d'hydratation est connue depuis toujours, l'eau intervenant dans un très grand nombre de phénomènes d'altération. Mais une partie de l'eau contenue dans un aliment se trouve très fortement liée et ne peut être utilisée par les microorganismes. Au fur et à mesure que la teneur en eau augmente, les nouvelles fractions d'eau sont de moins en moins retenues (énergie de liaisons plus faibles) de telle sorte qu'apparaît progressivement une fraction d'eau qualifiée de libre ou disponible, dont la disponibilité beaucoup plus élevée permet le développement des microorganismes [MOREAU C., 1974].

La croissance et l'activité métabolique des moisissures dépendent essentiellement des possibilités d'échanges de la cellule avec son milieu extérieur et donc de l'eau disponible [PECQUERY M., 1997]. Les différentes espèces fongiques n'ont pas la même exigence. On peut alors schématiser la relation existant entre l' a_w et la teneur en eau du produit. Les *Fusarium* se situent dans des a_w extrêmes par rapport aux autres genres (Figure 19).

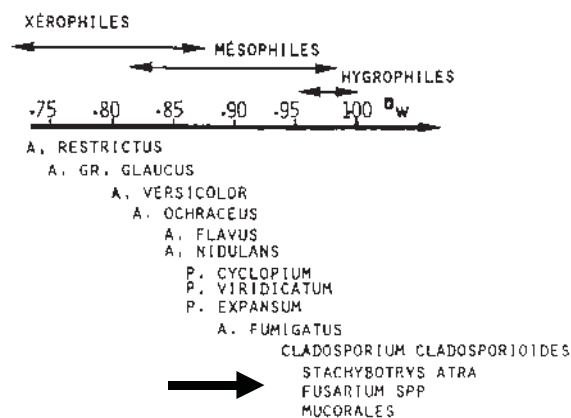


Figure n° 19 : a_w des principaux genres de moisissures [PECQUERY M., 1997]

Lors d'une diminution de l' a_w , on observe une augmentation du temps de latence et une diminution de la vitesse de croissance, principalement au niveau de la phase de croissance exponentielle. On note aussi une diminution du nombre maximum de germes obtenus en phase stationnaire. La croissance est impossible pour une a_w inférieure à 0,60 [BERTHIER J., 2002].

Mais dans la plupart des cas, les germes bien qu'inhibés, survivent parfaitement et il convient de ne pas confondre alors stabilisation et stérilisation [BERTHIER J., 2002].

D'une manière générale, la synthèse des mycotoxines demande des activités en eau un peu plus élevées que pour la croissance. La toxino-génèse est nulle au voisinage des conditions limites permettant la croissance des moisissures. Pour les teneurs en eau intermédiaires et dans la mesure où les autres facteurs ne sont pas limitants, elle est proportionnelle à l'activité en eau. Pour des teneurs en eau très élevées ($\geq 60\%$), la toxino-génèse est faible en raison du manque d'oxygénation du milieu, résultant du tassement de la denrée et de la moindre diffusion des gaz [BERTHIER J., 2002].

2.2.2.3. Température

La température conditionne la vitesse de croissance en agissant sur le métabolisme. Chaque espèce fongique a ainsi une température minimale, optimale et maximale pour sa croissance.

Elle permet de distinguer les espèces [BERTHIER J., 2002] (Figure 20) :

* Thermophiles pouvant se développer entre 20 et 60 °C que l'on retrouve dans les denrées sièges d'échauffement comme, par exemple, le foin humide ou dans les pays tropicaux et subtropicaux. Aucune espèce productrice de trichothécènes n'appartient à ce groupe.

* Mésophiles ayant pour croissance optimale des températures comprises entre 20 et 25 °C. La plupart des moisissures appartiennent à ce groupe (*Fusarium sp.*, *Myrothecium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Trichothecium sp.*).

* Psychrophiles préférant des températures plus basses voire même très basses, inférieure à 4 °C (*Fusarium tricinctum*).

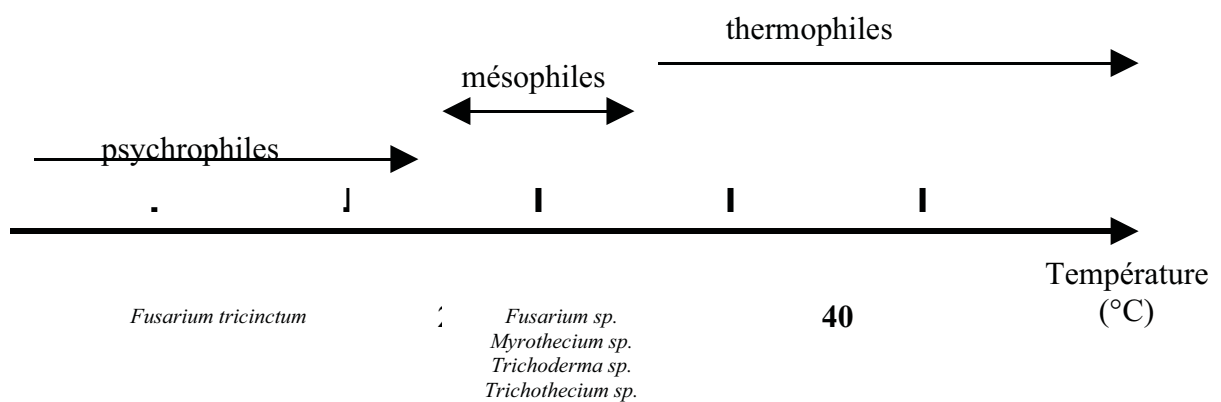


Figure n° 20 : Températures optimales de croissances pour les espèces productrices de trichothécènes.

La température optimale de toxinogénèse est en général voisine de la température optimale de croissance [FLORANT E., 1988]. Cependant certaines souches préfèrent des températures plus basses proches de la température minimale de croissance : 1 à 4 °C pour *Fusarium tricinctum* [BERTHIER J., 2002], 1,5 à 4 °C pour *F. sporotrichioides* [DAVID A., 2001]. On trouve ces deux moisissures essentiellement en URSS, entre 40 et 140 degrés de longitude Est et 50 à 60 degrés de latitude Nord, dans des régions aux sols argileux, où la température hivernale est de l'ordre de -10 à -15 °C et la température estivale de 15 à 25 °C [MOREAU C., 1974].

En culture, *Fusarium roseum* a une température optimale de toxinogénèse plus basse que la température optimale de croissance, respectivement 15 et 25 °C [LE BARS J., 1988].

Enfin, toujours en culture, une même souche peut produire plusieurs autres

toxines suivant la température : *F. tricinctum* produit la toxine T-2 et le DAS à 8 °C et la toxine HT2 à 25 °C [VIDAL D., 1984], *F. graminearum* produit du deoxynivalénol et de la zearalénone en proportions variables suivant la température du milieu (Tableau 12) [MOSS M., 1991].

Températures T (°C)	Concentration en mycotoxines (µg/kg)		deoxynivalénol / zearalénone
	deoxynivalénol	zearalénone	
19,5	6,1	57,7	0,11
25	149	120	1,24
28	367	98	3,74

Tableau n° 12 : Influence de la température sur la proportion de deoxynivalénol et de zearalénone par *Fusarium graminearum* en culture [MOSS M., 1991].

2.2.2.4. Composition gazeuse

La composition gazeuse peut faire varier la capacité d'une moisissure à produire une toxine. La réduction de la pression partielle en oxygène mais surtout l'augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone ont un effet dépresseur sur la toxinogénèse bien plus important que sur la croissance. A titre d'exemple, la production de toxine T-2 est diminuée par 20% de CO₂, et empêchée par 60% de CO₂, même en présence de 20% d'O₂. Seules quelques traces apparaissent dans les atmosphères contenant 40% de CO₂ et 5% d'O₂ [BERTHIER J., 2002]

2.2.2.5. pH

La plupart des moisissures n'ont que peu d'exigences à l'égard du pH. La majorité se développe dans un pH compris entre 4 et 8, certaines tolèrent cependant des pH beaucoup plus acides ou très alcalins [BERTHIER J., 2002]. La majorité des *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Trichothecium* ont une croissance optimale pour un pH compris entre 4 et 7. *Fusarium graminearum* produit du DON à un pH compris entre 5,2 et 6,5 alors que cette souche produit de la zearalénone à un pH de 7,0 [MOSS M., 1991].

2.2.3. Facteurs favorisants

La mécanisation peut favoriser l'apparition de fusariose. En effet, si les grains sont abîmés, l'enveloppe protectrice ne fait plus office de barrière naturelle et la contamination par les moisissures peut se faire plus facilement.

La présence d'acariens ou d'insectes favorise la dissémination des spores dans le local de stockage et fragilise les protections physiques des grains (lésions des enveloppes externes). La perforation de la bâche des ensilages par les rongeurs et les oiseaux constitue une porte d'entrée pour les insectes et les spores fongiques. Les insectes vont à leur tour causer des dégâts aux enveloppes externes des grains ce qui va favoriser leur contamination par des spores de moisissures [DAVID A., 2001]. *Fusarium sp.* se montrent extrêmement nuisibles lorsqu'ils bénéficient de telles portes d'entrée au niveau des graines [NAIBO B., 1997].

Les pratiques culturales ont aussi un impact non négligeable sur la contamination des sols. Ne pas faire de rotations des cultures (semier d'autres céréales après du maïs par exemple) contribue à la contamination des plantes aux champs. De même, laisser pourrir les restes de cultures, sans les enfouir, favorise la propagation des moisissures [STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN PRODUCTION ANIMALE, 2001a ; DION Y., 2002c].

2.2.4. Dissémination et évolution de la flore dans le temps

La dissémination des moisissures va dépendre non seulement des facteurs vus ci-dessus mais aussi du potentiel infectieux, notamment de l'intensité de la sporulation et de la longévité des spores. Pour *Fusarium* cette dissémination s'effectue préférentiellement par l'air [LE BARS J., 1988].

De plus, au niveau de l'aliment (céréales ou foin), une espèce fongique se trouve confrontée à d'autres organismes :

- moisissures plus ou moins compétitives comme *Trichoderma viride* qui est une espèce exclusive
- bactéries dont la vitesse de multiplication est plus rapide
- acariens et insectes, qui favorisent la dissémination et l'altération des enveloppes des grains.

Ainsi, il est possible d'établir un schéma d'évolution de la mycoflore d'une denrée contaminée, du développement de la plante à la récolte ou au stockage (Figure 21).

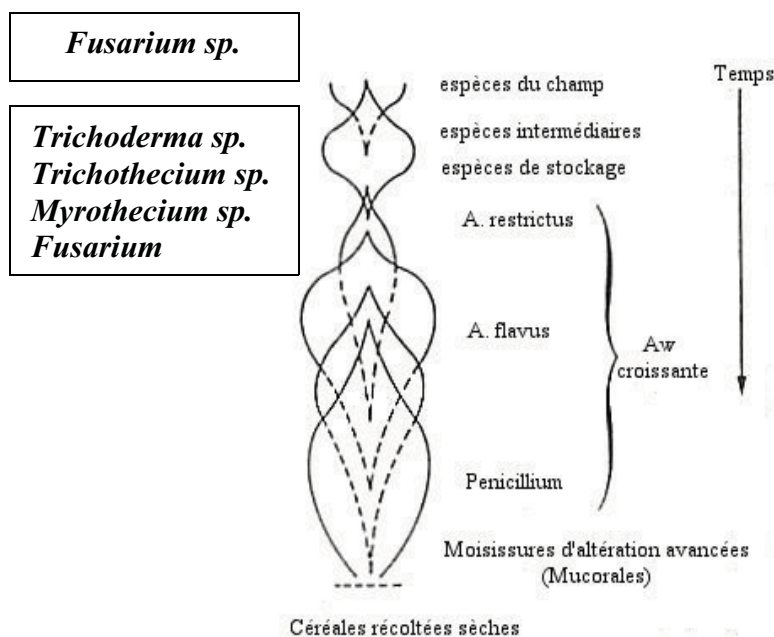


Figure n° 21 : Evolution de la mycoflore dans le temps [LE BARS J, 1988]

La majorité des *Fusarium* contaminent les plantes au champ. En revanche, *Trichoderma sp.*, *Trichothecium sp.*, *Myrothecium sp.* et *Fusarium tricinctum* contaminent essentiellement les denrées lors du stockage.

2.3. Voie de synthèse

2.3.1. Généralités

Seules certaines souches de moisissures sont capables de produire ou de provoquer l'apparition de métabolites toxiques, et différencier trois mécanismes [LE BARS J., 1988] :

- le champignon transforme un composant par bioconversion.
- le champignon entraîne une exacerbation de certains métabolismes du végétal conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant.
- la toxine est un métabolite secondaire* du champignon (cas des trichothécènes). On peut alors séparer trois groupes de composés suivant leurs voies de biosynthèse (Figure 22):

- les composés dérivés des acides aminés : les alcaloïdes de l'ergot, l'acide cyclopiazonique, la safranine, les sporidesmines...
- les composés dérivés des polycétoacides : les aflatoxines, l'acide pénicillique, les ochrotoxines, la zéaralénone...
- les composés dérivés des terpènes : les trichothécènes.

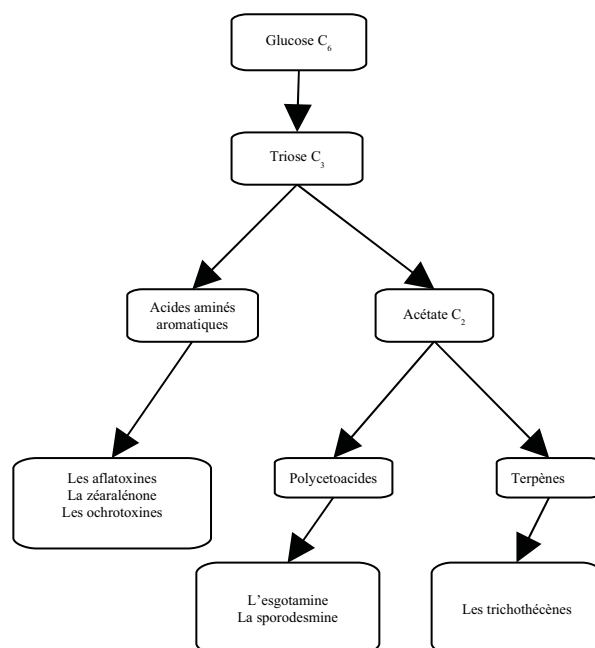


Figure n° 22 : Biosynthèse des principales mycotoxines

* Le métabolisme primaire d'un organisme est l'ensemble des réactions chimiques catalysées par des enzymes (dégradation, synthèse) qui fournit à l'organisme l'énergie, les composés intermédiaires pour les synthèses et des macromolécules clefs. Le métabolisme secondaire comprend principalement des processus de synthèse dont les produits terminaux ne jouent pas de rôles évident dans l'ergonomie de l'organisme. Le rôle des mycotoxines pour la vie du champignon n'est pas connu. Au laboratoire, en culture fermée, c'est-à-dire en milieu nutritif non renouvelé, les trichothécènes sont synthétisés et excrétés dans le milieu dès la fin de la phase exponentielle de croissance, et pendant la phase stationnaire. Ce n'est donc pas un déchet puisqu'ils ne sont pas synthétisés lorsque la croissance fongique est intensive [BERTHIER J., 2002].

2.3.2. Biosynthèse des trichothécènes

La biosynthèse des trichothécènes s'effectue dans le cytoplasme des cellules (Figure 23). Trois molécules d'acétyl CoA forment une molécule de mévalonate. A celle-ci, se rajoute une molécule d'acétyl CoA pour former le farnésyl pyrophosphate. La cyclisation nécessite alors des transferts d'hydrogène et de groupements méthyles [NGUYEN, 1992].

Par la suite, différentes substitutions sont possibles sur les fonctions oxygène par hydroxylation, oxydation, acétylations, donnant naissance aux différents composés formant les trichothécènes [JANCENELLE C., 1990].

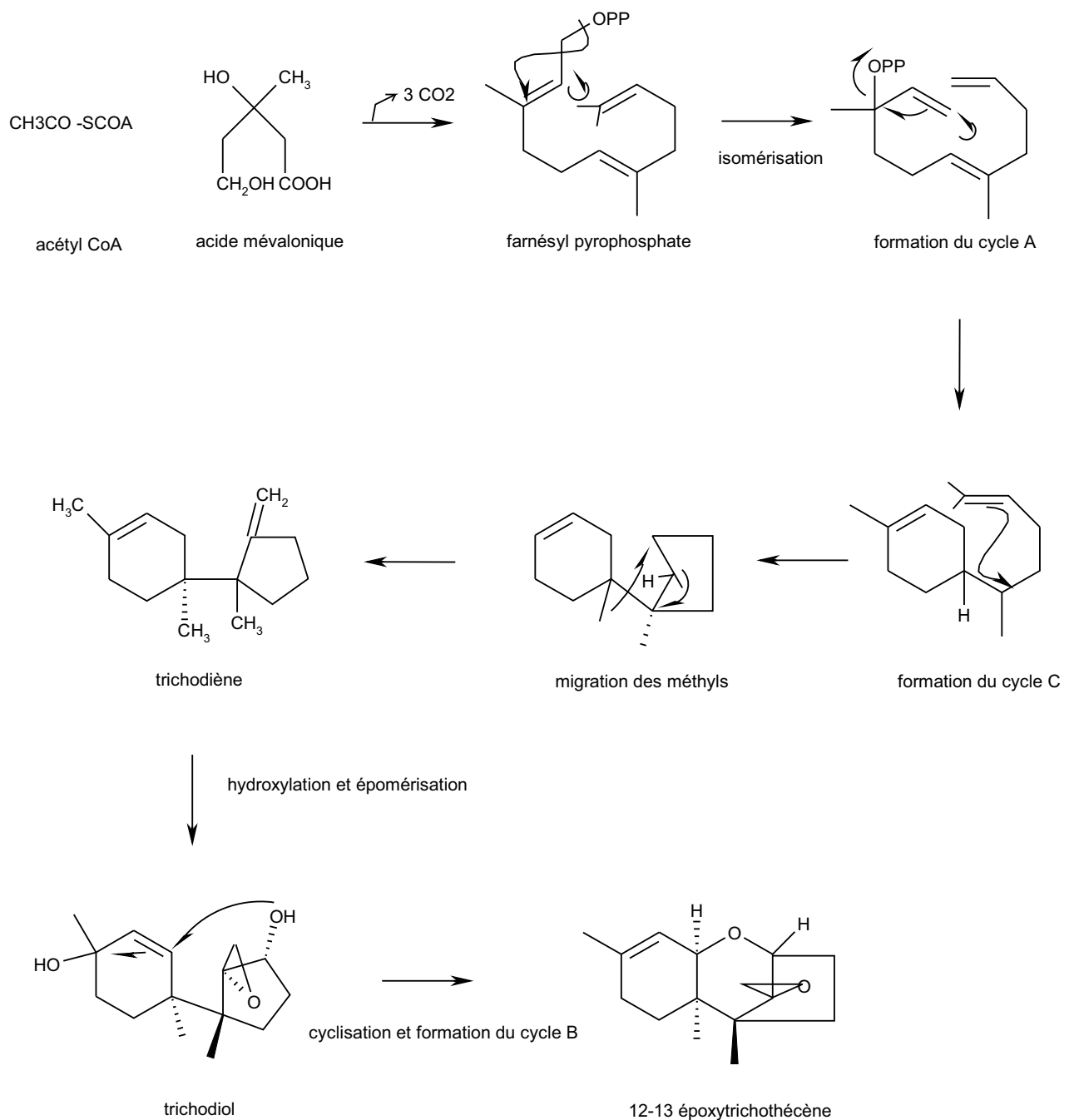


Figure n° 23 : Biosynthèse des trichothécènes [JANCENELLE C., 1990 ; NGUYEN, 1992].

2.4. Lutte contre les moisissures

La lutte contre la présence des mycotoxines dans l'alimentation passe d'abord par la mise en œuvre de tous les moyens visant à empêcher la colonisation des denrées par les champignons. Le meilleur moyen de prévenir l'installation des moisissures nuisibles sur les denrées est d'empêcher la contamination des produits par les conidies.

2.4.1. Méthodes physiques

Dans un champ de blé, la présence d'épillets décolorés sur l'ensemble des épis verts signale la présence de la fusariose. Sur ces épillets, on peut observer une coloration rose ou orangée [DION Y., 2002c]. Les grains fusariés sont petits et ridés. Ils ont souvent un aspect crayeux. La présence de grains fusariés ne signifie pas nécessairement qu'il y a présence de toxines, mais le risque est réel. Pour l'orge, la couleur est plutôt brune [DION Y., 2002c]. Ces modifications permettent un tri des parcelles contaminées. Ce tri permet de réduire d'ores et déjà la contamination de l'ensemble d'un silo.

Les blessures infligées aux grains permettent un développement plus facile des moisissures. Un bon réglage des machines agricoles est donc indispensable pour éviter de briser les enveloppes protectrices des grains. Il est possible aussi de régler les moissonneuses de manière à éliminer les grains moisissés et légers par ventilation. Les grains fusariés sont alors rejetés en terre d'où la nécessité des moyens agronomiques de lutte contre les résidus de culture.

L'hygiène des machines agricoles qui pourraient travailler sur des zones infestées est essentielle. Elle permet d'éviter la dissémination des germes vers des zones de cultures saines. Le tableau 23 représente un plan de lutte incluant ces méthodes [EVANS I., 2002].

Les stratégies de prévention des moisissures passent aussi par la réduction du stress de la plante. Cela sous entend une irrigation adaptée, une nutrition minérale optimale et une protection contre les dommages des insectes [RILEY R.T., 2003].

2.4.2. Méthodes chimiques

Pour éviter la contamination des semences par les *Fusarium*, il est possible de mener une lutte, en amont, dans le champ de production de ces semences. En effet, la qualité de celles-ci passe d'abord par la protection des porte-graines. La lutte consiste à réaliser une double application de fongicide, sur les graines en terre puis sur la plante adulte. Pour le maïs, l'application doit être faite sur les épis quelques jours après l'apparition de soies et pour le blé les fongicides sont appliqués sur les épis [NAIBO B., 1997], [DION Y., 2002a]. Les antifongiques ont certes une certaines activités vis-à-vis des moisissures mais la réduction de la contamination n'est pas totale [EDWARDS S.G., 2001]. Aucun fongicide ne permet une disparition totale de la fusariose. Les attaques des plantes par les moisissures sont assez difficiles à contrôler car elles vivent en symbiose avec la plante, d'où la difficulté de trouver des substances chimiques qui détruisent les premiers sans nuire à la seconde [MOLL M., 2000]. Les substances antifongiques lorsque leur utilisation est autorisée doivent être choisie en fonction des espèces fongiques à éliminer et appliquées en respectant les doses ainsi que les stades de la plante. Par exemple, il ne faut pas appliquer de fongicide à base de Strobilurine après le stade « gonflement » des céréales à paille [Swiss Granum, 2003]. Bien entendu, ce genre de traitement est incompatible avec une agriculture biologique.

Les fongicides généralement utilisés en agriculture sont des substances minérales traditionnelles (soufre, cuivre) utilisées soit seules, soit en association avec des substances organiques. D'autres composés organiques sont aussi utilisés contre les *Fusarium* comme les dithiocarbamates, les thiazoles, les triazines... Parmi les fongicides systémiques, citons les benzimidazoles et les imides (en particulier l'ipridione) [MOLL M., 2000]. Les résultats sont assez variables en fonction des substances utilisées. De manière générale, les fongicides classiques réduisent en moyenne la contamination de 50% (contre 70% en théorie) [PLEINCHAMP, 2003] (Tableau n° 22).

Fongicide	Quantité appliquée (g/ha)	% de plants infectés	DON (µg/kg)
Metoconazole	90	19	2000
Metoconazole	45	21	5600

Tebuconazole	250	25	10500
Tebuconazole	125	21	10000
Azoxystrobin	250	17	1900
Azoxystrobin	125	20	3800
Metconazole + azoxystrobin	45 + 125	11	6700
Témoin négatif	0	30	11000

Tableau n° 13 : Effets de trois fongicides sur le développement de *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* et *F. nivale* après du blé [EDWARDS S.G., 2001]

Il existe actuellement de nombreux produits dont l'usage est homologué contre la fusariose de l'épi de blé, par exemple le chlorothalonil (Bravo 500ND), produit non systémique, et le tébuconazole (Foliocur 436 FND), produit systémique. Dans le cas du blé, le chlorothalonil est recommandé au taux de 2 à 2,5 litres à l'hectare. Le traitement avec ce fongicide de contact présente une efficacité de courte durée et sera peu efficace si la période d'inoculation du champignon se prolonge en raison des conditions climatiques. Le tébuconazole est un produit très récent, et est recommandé à la dose de 292 ml/ha [DION Y., 2002a]. Les fongicides doivent être appliqués sur le blé avant la fin de la floraison [DION Y., 2002b].

Enfin, la distinction entre *Microdochium nivale* et *Fusarium* est importante pour comprendre et raisonner le contrôle de la fusariose sur les épis de froment par des fongicides. En effet, si les deux protagonistes causent des symptômes semblables sur les épis, ils ne sont pas contrôlés par les mêmes fongicides. *M. nivale*, décrit comme non producteur de mycotoxines est principalement contrôlé par certaines substances de la famille des Strobilurines, dont la plus efficace est l'azostrobine (Amistar). Les différentes espèces de *Fusarium* sont contrôlées par des substances de la famille des triazoles, dont les plus efficaces sont le métconazole et le tébuconazole [MOREAU J.M., 2003].

Le problème est que, lorsque l'on détruit *M. nivale*, on laisse la place libre aux *Fusarium*, non contrôlés par les Strobilurines. De plus les traitements avec ce produit diminueraient le rabougrissement des grains fusariés. Ceci limiterait leur perte lors de la récolte mais augmente la teneur en toxine [MOREAU J.M., 2003].

D'après une étude de la D.G.A.L., sur des essais en 2001, aucune des spécialités commerciales n'a eu d'effets statistiquement significatifs sur la concentration finale des grains en DON et en NIV. En 2001, seuls le tébuconazole et le métconazole ont eu un effet respectivement sur le DON et le NIV [Avertissements Agricoles Grandes Cultures, 2002].

Ainsi, il semble bien que la meilleure lutte contre les fusarioses est l'emploi précoce des Strobilurines pour contrôler *M. nivale*, suivi de l'emploi de triazoles pour contrôler les *Fusarium* [Avertissement Agricole, 2001].

Pour traiter les semences, on peut aussi utiliser des fongicides à larges spectres comme le maneb, le thiram ou le metiram. Chaque sac de semence commerciales de céréales doit porter une étiquette précisant le traitement que les semences ont subi [SUTTON J.C., 2003].

2.4.3. Méthodes biologiques

Réduire de manière biologique la contamination des grains et des plantes par les moisissures passe essentiellement par la sélection de variété de plantes résistantes aux moisissures, résistantes aux insectes et par un contrôle des rotations des cultures dans les champs [Mc EVOY J.D.G., 2002].

Le contrôle des contaminations par l'emploi de plantes résistantes aux infections par des espèces toxigènes de *Fusarium* est un objectif au long terme [D'MELLO J.P.F., 1999]. Les premiers travaux visant à obtenir des plantes résistantes aux maladies fongiques remontent au début des années 90 chez la pomme de terre et la tomate. Les gènes impliqués codent pour des enzymes impliquées dans la dégradation des parois cellulaires des champignons, soit la chitinase et la glucanase. Des études expérimentales ont mis au point du blé résistant aux contaminations de *Fusarium* avec une réduction très importante de la contamination en DON [PLACINTA C.M., 1999]. Depuis quelques années, les agriculteurs peuvent choisir des cultivars plus résistants. Chez le blé, le degré de sensibilité des cultivars vis-à-vis des fusarioses est publié. Les cultivars sont cotés, les cotations 1 et 2 sont les meilleurs choix [DION Y., 2002c]. On peut trouver des variétés de blé dont les sensibilité à *Fusarium graminearum* et *F. culmorum* sont très différentes. Par exemple, les variétés peu sensibles sont Arina, Titlis, Fiorina et Nadro, les variétés très sensibles sont Asketis, Levis, Zinal et Lona [Actualités céréalières, 2003]. Par contre, pour l'orge ces données ne sont pas encore disponibles. Mentionnons toutefois que les orges à deux rangs sont naturellement moins sensibles que les orges à six rangs [DION Y., 2002c]. En maïs-consommation, la lutte contre les fusarioses pourrait plutôt passer par la sélection d'hybrides résistants, certains hybrides possédant des spathes serrées et des épis dressés sont moins sensibles aux infections [NAIBO B., 1997].

La lutte contre les moisissures passe aussi par la lutte contre les insectes qui vont endommager les grains et donc permettre la croissance du champignon. Des maïs transgéniques permettent la diminution des contaminations en trichothécènes par la protection des plants contre les insectes [BAKAN B., 2002]. En effet, les destructions des enveloppes protectrices des grains autorisent un développement plus facile des moisissures. Le maïs Bt ou maïs *Bacillus thuringiensis* est un type de maïs génétiquement modifié à l'aide d'une bactérie ayant des propriétés insecticides. Le Bt est une bactérie naturellement présente dans le sol, produisant des protéines qui forment des cristaux tuant sélectivement la pyrale du maïs. Lorsque ce ravageur dévore les grains de maïs, il est tué. Ce mode de lutte est fréquent dans des régions humides et froides comme au Canada où certaines régions comptent environ 27% de superficie en maïs Bt.

Les agriculteurs sont informés des moyens dont ils disposent pour éviter les contaminations dans le champ (Tableau 23). Il est possible de faire une rotation des cultures (pas d'autres céréales après du maïs, ni de mauvaises herbes graminées), d'enfouir les restes de culture dans la terre, de choisir des variété de maïs résistantes à la fusariose et d'employer exclusivement des semences traitées [STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN PRODUCTION ANIMALE, 2001a ; DION Y., 2002c]. L'enfouissement des résidus de culture contaminés est de loin la plus importante pratique culturale à adopter pour réduire l'incidence des fusarioses. Les *Fusarium* survivent sur les résidus de culture et les résidus ainsi laissés à la surface constituent une grande source d'inoculum [DION Y., 2002c].

Terres non infestées	Terres infestées
Ne pas utiliser des semences provenant de régions infestées	Ne pas vendre ou utiliser des grains de ces terres comme semence
Certificat de test par un laboratoire accrédité confirmant l'absence de <i>Fusarium sp.</i>	Nettoyer les machines des résidus de culture avant d'entrer sur des terres saines
En précaution, traiter les grains destinés aux semences par un antifongique	Enfouir les résidus de culture dès l'automne
Rotation des cultures : prévoir deux années sans céréales sur les terres	Travailler la terre sur une faible profondeur après enfouissements des résidus pendant 2 ans
Traiter contre les mauvaises herbes graminées	Cultiver ensuite des espèces non hôtes

Tableau n° 14 : Plans d'intervention contre les fusarioses [EVANS I., 2002]

2.5. Nature et niveau de contamination des aliments

Les principaux trichothécènes recherchés lors de contaminations des aliments sont le DON, la toxine T-2 et HT-2, le DAS, le NIV et plus rarement la fusarénone X. L'analyse des niveaux de contamination dans les différents pays du monde semble révéler une contamination plus importante en Europe que dans le reste du monde. Signalons toutefois que ces résultats peuvent être faussés par le nombre d'analyses réalisées, plus important dans les pays développés [SUDAKIN D., 2003]. Nous verrons successivement la contamination des matières premières puis celle des aliments élaborés.

2.5.1. Contamination des matières premières

2.5.1.1. Le déoxynivalénol

La plupart des céréales peuvent être contaminées par le déoxynivalénol (tableau 13) [JECFA, 2003a ; JECFA, 2003b]. Le fourrage, de même que la paille, peuvent être contaminés [GUTZWILLER A., 2000].

céréales	Nombre de d'échantillons	% d'échantillons contaminés	Contamination moyenne	Valeurs inf.	Valeurs sup.
			(µg/kg)		
Blé	11444	57 %	92	1	9000
Maïs	5349	40 %	180	3	3700
Avoine	834	68 %	89	4	760
Orge	1662	59 %	720	13	2400
Seigle	295	49 %	65	4	9000
Riz	154	27 %	150	6	5100

Tableau n° 15 : Contamination moyenne des céréales par le déoxynivalénol dans le monde (n>23000, sur une dizaine d'années) [JECFA, 2003b].

En Europe le DON est présent sur un très grand nombre d'échantillons même si les valeurs ne sont pas forcément très élevées. 90 % des échantillons prélevés en Pologne en 2001 étaient contaminés par le DON et le NIV [KRYSSINSKA-TRACCZIK E., 2001].

Cependant, les variations annuelles peuvent être très importantes. Elles sont principalement dues aux différences de température et de précipitation durant l'année considérée. La figure 24 représente les variations du taux de contamination en Argentine. Les prélèvements ont été effectués au même endroit et à la même période de l'année. Cette hétérogénéité est, bien entendu, la même dans tous les pays [JECFA, 2003b].

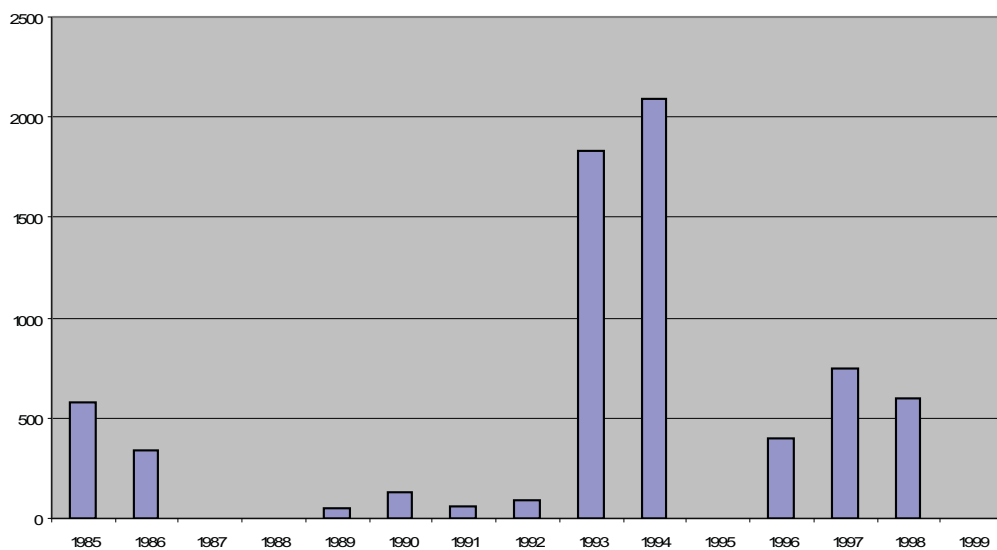


Figure n° 24 : Variations annuelles dans la concentration en deoxynivalénol (µg/kg) sur le blé en Argentine [JECFA, 2003b].

Il est donc important de travailler, pour des comparaisons entre pays, sur des moyennes annuelles prenant en compte au minimum cinq ans [MATEO J.J., 2002].

Certaines régions du globe sont particulièrement exposées, avec des degrés de contamination important, en particulier dans l'ouest de la Chine, en Afrique du Sud et en

Amérique du Sud [IARC, 1993]. Ainsi, dans certaines régions du globe et pour certaines graines, il a été possible de déterminer des moyennes plus précises (Tableau 14).

Région du monde	denrées	Contamination moyenne ($\mu\text{g} / \text{kg}$)
Afrique	Maïs	130
Amérique latine	Orge	370
	Maïs	66
	Avoine	0
	Riz	33
	Blé	490
Amérique du nord	Orge	750
	Maïs	500
	Blé	400
Asie	Orge	130
	Maïs	200
	Blé	560
Europe	Orge	860
	Maïs	640
	Avoine	140
	Riz	2600
	Seigle	39
	Triticale	92
	Blé	310

Tableau n° 16 : Contamination moyenne des grains par le déoxynivalénol par régions du globe [JECFA, 2003b].

Pour d'autres régions du monde, il n'est pas possible d'établir des moyennes fiables. On trouve alors des valeurs reflétant la contamination d'une céréale à un moment donné (Tableau 13).

Région du monde	Pays, année	Substrat	Fréquence (%)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Référence
Afrique	Egypte, NC	Sorgho	48,5	70 à 4000	ABDELHAMID,

					1990
Amérique du Sud	Argentine, 1986	Blé	100	1000 à 20000	MARPEGAN, 1988
	Argentine, 1983	Maïs	10	110 en moyenne	TANAKA, 1988
	Brésil	Blé	NC	470 à 590	FURLONG, 1995

Tableau n° 17 : Contamination ponctuelle par le DON (valeurs ponctuelles)

Signalons pour finir une particularité suisse. Sur 346 échantillons de céréales prélevés, portant sur des récoltes de 1999 et 2000, tous ne contenaient que des teneurs insignifiantes en DON. Les valeurs étaient inférieures aux limites de détections [STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN PRODUCTION ANIMALE, 2000].

2.5.1.2. Les toxines T-2 et HT-2

Les toxines T-2 et HT-2 sont aussi présentes sur les céréales en grain mais le nombre d'échantillons analysés est plus réduit. Les grains les plus contaminés sont le blé, le maïs, l'avoine, le seigle, le riz, les fèves et le soja [JECFA, 2003a]

Pour la toxine T-2, les valeurs moyennes sont inférieures, en Europe, à 35 µg/kg (Tableau 16). Dans le reste du monde, moins de données sont disponibles. On trouve cependant des valeurs de contaminations de certaines céréales à des endroits ponctuels [JECFA, 2003a].

Région du monde	denrées	Contamination moyenne (µg / kg)
Asie	Blé	22
Amérique latine	Blé	24
	Riz	27
	Maïs	39
Europe	Riz	0
	Seigle	0,01
	Blé	1,9
	Maïs	2,9
	Orge	4,4
	Avoine	35

**Tableau n° 18 : Contamination moyenne des grains par la toxine T-2 (n>10000)
[JECFA, 2003a].**

Ponctuellement, on peut trouver des valeurs pour d'autres céréales ou d'autres régions du monde. Ces valeurs sont assez différentes (Tableau 17).

Région du monde		Substrat	Fréquence (%)	Concentration (µg/kg)	Référence
Afrique	Egypte	Céréales	22	21 à 60	EL-MAGHRABY, 1995
	Canada, 1973	Orge	100	25000	PULS, 1976
Amérique du Nord	Canada, 1971	Maïs	100	2000	HSU, 1972
	Argentine	Maïs	22	-	SCOTT, 1989
Asie	Inde	Maïs	100	2000	UENO, 1986
	Inde, 1981	Riz	3	30	REDDY, 1983
Europe	Allemagne, 1999	Blé	7	12	SCHOLLENBERGER M, 2002
	Norvège, 1999	Avoine	30	60	LANGSETH, 1999
	France	Maïs	6	30	SCOTT, 1989
Moyen Orient	Arabie Saoudite, 1997 - 2000	Denrées animales	-	6	AL-JULAIFI M.Z., 2001
	Turquie	Blé	8	284	OMURTAG G.Z., 2000

Tableau n°19 : Contamination ponctuelle par la toxine T-2

Pour la toxine HT-2, les données moyennes ne sont fiables que pour l'Europe. Les valeurs moyennes sont comprises entre 0,7 et 4,6 µg/kg.

On note cependant que des valeurs très élevées peuvent être trouvées ponctuellement (Tableau 18).

Région du monde		Substrat	Fréquence (%)	Concentration (µg/kg)	Référence
Afrique	Egypte	Céréales	13	12,4 à 18,6	EL-MAGHRABY, 1995
	Niger, 1991	Maïs	-	3000 à 15000	OKOYE Z.S., 1993
Europe	Allemagne,	Blé	2	4	SCHOLLENBERGER

	1999				M, 2002
	Allemagne, 1987 - 1992	Avoine	50	18 à 67	MULLER H.M., 1998
	Norvège, 1999	Avoine	70	115	LANGSETH, 1999
Moyen Orient	Arabie Saoudite, 1997 - 2000	Denrées animales	-	3 à 13	AL-JULAIIFI M.Z., 2001

Tableau n° 20 : Contamination ponctuelle par la toxine HT-2

2.5.1.3. Le diacétoxyscirpénol

La contamination en DAS est mondiale. On retrouve cette toxine sur tous les continents avec des valeurs de contamination extrêmement variables (Tableau 19).

Région du monde		Substrat	Fréquence (%)	Concentration (µg/kg)	Référence
Afrique	Egypte	Céréales	50	98 à 130	EL-MAGHRABY, 1995
Amérique du Nord	Etats-Unis	Céréales	35	380 à 500	MIROCHA, 1976
Amérique du sud	Argentine, 1986	Céréales	1	945	QUIROGA N., 1995
Europe	Hongrie	Céréales	50	1000 à 1500	SZIGETI, 1976
	Pologne	Céréales	12	111	PERKOWSKI J., 2002
Moyen Orient	Arabie Saoudite, 1997 - 2000	Denrées animales	-	3 à 50	AL-JULAIIFI M.Z., 2001

Tableau n° 21 : Contamination ponctuelle par le diacétoxyscirpénol

2.5.1.4. Le nivalénol

Le nivalénol est courant au Japon et en Corée mais reste un contaminant mineur en Europe. Il a été rapporté quelques cas de contamination de grains en Afrique du Sud et en Australie. C'est une toxine quasi inconnue en Amérique du Nord et du Sud (Tableau 20) [IARC, 1993].

Région du monde		Substrat	Fréquence (%)	Concentration (µg/kg)	Référence
Afrique	Afrique du Sud, NC	Maïs	NC	> 370	RHEEDER, 1995
Amérique du Nord	Canada, 1980-1984	Blé	40	20	TANAKA, 1988
	Canada, 1984	maïs	100	1000	FOSTER, 1986
Amérique du Sud	Argentine, 1983	Céréales	25	30 en moyenne	TANAKA, 1988
Asie	Chine, 1984	Blé	20	6660	UENO, 1986
	Chine	maïs	100	400 à 12700	WHO, 1990
	Japon, 1970-1980	orge	82	60 à 22900	YOSHIZAWA, 1983
	Japon, 1984	Blé	39	50 à 440	TANAKA, 1985
	République de Corée, 1983	Blé	100	20 à 3000	LEE, 1985
	République de Corée, 1984	Orge	100	20 à 3000	LEE, 1986
	République de Corée, 1987	Orge	95	30 à 1110	PARK, 1990
Europe	Allemagne	Blé	12	25	SCHOLLENBERGER M, 2002
	Norvège, 1999	Avoine	10	56	LANGSETH, 1999
	Autriche	Blé	75	10 à 40	SCOTT, 1989
	France	Blé	100	20 à 60	UENO, 1985
Moyen Orient	Arabie Saoudite, 1997 - 2000	Denrées animales	-	3 à 600	AL-JULAIFI M.Z., 2001

Tableau n° 22 : Contamination ponctuelle par le nivalénol

2.5.1.5. La fusarénone X

La fusarénone X apparaît dans 10 à 20 % des prélèvements où l'on détecte du nivalénol [IARC, 1993]. En France, la fusarénone X a été trouvée sur des céréales (20 % des

échantillons) à des concentrations de 50 à 27700 µg/kg [BAKAN B., 2001]. En Allemagne, cette toxine a été recherchée sur 60 prélèvements de blé en 1999. De nombreuses toxines ont été trouvées (DON, NIV, T-2, HT-2) mais aucune trace dans aucun échantillon de fusarénone X n'a été détectée [SCHOLLENBERGER M, 2002]. Le même résultat avait été obtenu sur plus de 250 prélèvements de céréales entre 1987 et 1992 [MULLER H.M., 1998].

En Arabie Saoudite, elle a été détectée à des taux compris entre 3 et 500 µg/kg pour des denrées animales [AL-JULAIFI M.Z., 2001]. En Corée, elle a été trouvée sur un échantillon de céréales (sur 36) à un taux de 138 µg/kg [LEE U.S., 1986].

2.5.2. Contamination des produits transformés

Les trichothécènes sont des composés stables (cf. partie 1.1.3). Ils peuvent donc se retrouver dans les produits transformés. Cependant, les toxines recherchées de manières usuelles ne sont pas nombreuses. Les études ne portent que sur le DON, la toxine T-2 et la toxine HT-2.

En ce qui concerne les produits carnés, aucune étude ne semble faire état de contamination naturelle de ces produits par les trichothécènes.

2.5.2.1. Le déoxynivalénol

Le DON est probablement la plus connue et la plus répandue des toxines présentes dans les aliments transformés. On la retrouve dans un vaste nombre de produits alimentaires sur tous les continents à des concentrations plus ou moins élevées (Tableau 21).

Région du monde	Pays, année	Substrat	Fréquence (%)	Concentration (µg/kg)	Référence
Afrique	Egypte, NC	Produits alimentaires	48,5	70 à 4000	ABDELHAMID, 1990
Amérique du nord	Canada, 1982-1989	Produits alimentaires	NC	100 à 200	SCOTT, 1990
	USA, 1989	Produits alimentaires	50	120 à 19000	ABOUZIED, 1991
Amérique du Sud	Argentine, 1986	Produits alimentaires	100	1700 à 8000	MARPEGAN, 1988

Tableau n° 23 : Contamination ponctuelle des produits transformés par le déoxynivalénol

On retrouve ainsi du DON dans de nombreux produits dérivant du blé et du maïs, en particulier la farine de blé, le pain, les céréales de petit déjeuner, les pâtes, les aliments pour nourrissons et les gâteaux [JECFA, 2003b]. Au Portugal, 88 paquets de céréales pour petits déjeuners ont été pris au hasard dans des supermarchés de Lisbonne. Les analyses ont révélé des contaminations en DON pour 78 % des échantillons. Les valeurs étaient comprises entre 103 et 6040 µg/kg [MARTINS M.L., 2001]. Le Pop-corn est contaminé à une dose moyenne mondiale de 310 µg/kg [JECFA, 2003b]. L'orge étant aussi contaminé, il a été retrouvé de nombreuses fois du DON dans la bière : plus de 50 % des échantillons de bières analysés étaient contaminés [NIESSEN L., 1993 ; SCOTT P.M., 1993]. De plus les taux de contamination ne sont pas toujours négligeables, dans une autre étude, 18 % des échantillons de bières étaient contaminés à plus de 20000 µg/kg [MOLTO G., 2000].

Pour le lait, aucune trace de déoxynivalénol n'a été retrouvée dans le lait de vache recevant pendant 5 jours jusqu'à 950 mg de DON par repas (deux repas par jour) ou 100 mg/j de DON pendant 10 semaines (limite de détection de 1 µg/kg) [CHARMLEY E., 1993].

2.5.2.2. Les toxines T-2 et HT-2

Les toxines T-2 et HT-2 ont été occasionnellement retrouvées dans l'alimentation humaine. La toxine T-2 a été retrouvée sur du pain et des céréales de petit déjeuner. La toxine HT-2 a été retrouvée sur des aliments pour nourrisson, du pain, des pâtes et des céréales [PATTEL, 1996], [Inchem.org, 2003]. Sur un total de 8918 prélèvements, la toxine T-2 a été identifiée dans 64 % des cas, la toxine HT-2 dans 36 % des cas [JECFA, 2003a]. Le nombre d'échantillons pour lesquels le niveau de contamination est supérieur à 100 µg/kg est, respectivement pour la toxine T-2 et la toxine HT-2, de 37 et 77 sur 8918. Les valeurs maximales sont alors de 2400 µg/kg de maïs pour la toxine T-2 [SAUBOIS, 1992] et de 2000 µg/kg d'avoine pour la toxine HT-2 [MULLER, 1998].

Pour les produits à base de lait ou d'œufs, les données sont peu nombreuses. Il n'existe aucune information actuelle sur la présence de toxine T-2 dans le lait commercialisé [STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN PRODUCTION ANIMALE, 2000]. Pour les œufs, la quantité de toxine T-2 retrouvée dans l'œuf de poule après une administration par voie intra-gastrique est minime : au bout de 2 et 7 jours l'œuf n'en contient plus que 0.1 et 0.025% respectivement. Après une administration unique par voie intra-gastrique de toxine T-

2 , le maximum atteint dans les parties comestibles de l'œuf à 24 heures est de 1.91 µg de DON et à 7 jours seule une partie minime de la toxine se trouve sous sa forme originelle : 0-10% selon les études [EL-BANNA A.A., 1983 ; PRELUSKY D.B., 1987].

CONCLUSION

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par des moisissures des genres *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Trichothecium*. Sur la base de leur structure, ces composés peuvent être séparés en deux groupes, A et B. Les principales toxines du groupe A sont la toxine T-2, le diacétoxyscirpénol et la toxine HT-2. Les principales toxines du groupe B sont le déoxynivalénol, le nivalénol et la fusarénone X. Les composés peuvent être détectés et dosés par de nombreuses méthodes physico-chimiques et immunologiques. Bien que la CL/SM permette des seuils de détection très bas (0,5 µg/kg), les méthodes immunologiques sont de plus en plus développées, en raison de leur commodité de mise en œuvre. Les résultats positifs ou limites doivent toutefois être confirmés par des méthodes de référence.

La lutte contre les moisissures et les toxines est complexe. Elle revêt une importance considérable de par le danger et la fréquence de la contamination de très nombreuses matières premières et produits de transformation. La remarquable stabilité des toxines implique que la meilleure lutte reste la prophylaxie. La séparation physique des grains contaminés et des sains semble constituer une des rares méthodes pratique et applicable à l'industrie. Les méthodes chimiques et biologiques demeurent peu évaluées et n'ont donc que peu d'applications en pratique. La génétique est une piste prometteuse pour l'avenir. En attendant, la lutte contre les moisissures passe par une hygiène stricte, éventuellement l'emploi de substances chimiques (fongicides) et surtout par des mesures agronomiques bien appliquées.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. BALZER Alexandre, Paul, Emile
a été admis(e) sur concours en : 1997
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 3 avril 2003
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, P. GUERRE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
M. BALZER Alexandre, Paul, Emile
intitulée :
« *Les trichothécènes : nature et origine* »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Philippe GUERRE**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Louis FONVIEILLE**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu le : 21 OCT. 2003
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



BIBLIOGRAPHIE

1. **A.A.G.C.** – page consultée le 30 septembre 2003 – Plan de surveillance – Avertissement Agricoles Grandes Cultures, 2002, 24 – <http://www.srpv-centre.com/ulf/SRPVcentre/avertissements/GC02-24int2.pdf>
2. **ABBAS H.K., JOHNSON B.B., SHIER W.T., TAK H., JARVIS B.B., BOYETTE C.D.** – Phytotoxicity and mammalian cytotoxicity of macrocyclic trichothecene mycotoxins from *Myrothecium verrucaria* – *Phytochemistry*, 2002, 59(3) : 309-313
3. **ABBAS H.K., MIROCHA C.J., PAWLOSKY R.J., PUSCH D.J.** – Effect of cleaning, milling and baking on deoxynivalenol in wheat – *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985,50, 482
4. **ABBAS H.K., TAK H., BOYETTE C.D., SHIER W.T., JARVIS B.B.** – Macrocyclic trichothecenes are undetectable in kudzu (*Pueraria montana*) plants treated with a high-producing isolate of *Myrothecium verrucaria* – *Phytochemistry*, 2001, 58(2) : 269-276
5. **ABDELHAMID A.M.** – Occurrence of some mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A, citrin, zearalenone and vomitoxine) in various Egyptian feeds – *Arch. Anim. Nutr.*, 1990, 40 : 647-664
6. **ABOUZIED M.** – A very sensitive rapid ELISA test for the detection and quantification of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol – In : *Proceedings of the X International IUPAC Symposium of Mycotoxins and phytotoxins*, 2000, Sao Paulo, Bresil
7. **ABOUZIED M., AZCONA J.L., BRASELTON W.E., PESTKA J.J.** – Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grains food : evidence for deoxynivalenol contamination – *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57 : 672-677
8. **Actualité Céréalières** – page consultée le 30 septembre 2003 – Publication Périodique de la Fédération Suisse des Producteurs de Céréales, 2003, 4 – http://www.fspc.ch/pdf/fpubli_news030613.pdf
9. **ALEXANDER N., McCORNICK S., ZIEGENHORN S.** – Phytotoxicity of selected trichothecenes using *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system – *Natural Toxins*, 2000, 7(6) : 265-269
10. **AL-JULAIFI MZ., AL-FALIH AM.** – Detection of trichothecenes in animal feeds and foodstuffs during the years 1997 to 2000 in Saudi Arabia – *J Food Prot*, 2001, 10 : 1603-1606
11. **ARNAUD P.** - *Chimie organique cours*, 16^{ième} ed., ed. Dunod, Paris, 1997, 530p

12. **ATROSHI F., RIZZO A., WESTERMARCK T., ALI-VEHMAS T.** – Antioxidant nutrients and mycotoxins – *Toxicology*, 2002, 180 : 151-167
13. **Avertissement Agricole** – page consultée le 30 septembre 2003 - Fusarioses des épis et état sanitaire des grains de céréales – Bulletin Technique des Stations d’Avertissements Agricoles, 2001 – <http://www.draf.bretagne.agriculture.gouv.fr/websrvp2/aagc/aagc38.pdf>
14. **BADILLET G., DE BIEVRE C., GUEHO E.** – Champignons constituants des cultures, champignons opportunistes – Atlas clinique et biologique, Tome II, Paris, 1987, 228p
15. **BAKAN B., MALCION D., RICHARD-MOLARD D., CAHAGNIER B.** – Fungal growth and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in france and Spain – *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(4) : 728-731
16. **BAKAN B., PINSON L., CAHAGNIER B., MELCION D., SEMON E.** – Toxicogenic potential of fusarium culmorum strains isolated from french wheat - *Food Addit Contam*, 2001, 18 (11) : 998-1003
17. **BATA A., LASZTITY R.** – Detoxification of mycotoxins-contaminated food and feed by microorganisms – *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10 : 223-228
18. **BERGER U., OEHME M., KUHN F.** – Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B- trichothecenes by HPLC/ ion trap multiple mass spectrometry – *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47 : 4240-4245
19. **BERTHIER J., VALLA G.** – page consultée le 20 octobre 2002 – Moisissures, mycotoxines et aliments : du risque à la prévention – <http://handy.univ-lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html>
20. **BHATNAGAR D., LILLEHOJ E.B., BENETT J.W.** – Biological detoxification of mycotoxins - in *Mycotoxins and animal foods*, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 815-826
21. **BHAVANISHANKAR TN., RAMESH HP., SHANTHA T.** – Dermal toxicity of Fusarium in combinations – *Arch Toxicol*, 1988, 61(3) : 241-244
22. **BIEHL M.L., LAMBERT R.J., HASCHEK W.M., BUCK W.B., SCHAEFFER D.J.** – Evaluation of a superactivated charcoal paste and detergent water in prevention of T-2 toxin-induced local cutaneous efficacy in topically exposed swine – *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1989, 13 (3) : 523-532

23. **BLACK R.M., CLARK R.J., READ R.W.** – Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in human urine by gas chromatography-mass spectrometry – *J. of Chromatogr.*, 1986, 367 : 103-115
24. **BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P.** – moisissures utiles et nuisibles importances industrielles – 1990, ed Masson, 2^{ième} ed., Paris, 180 p
25. **CHARMLEY E., TRENHOLM H.L., THOMPSON B.K., VUDATHALA D., NICHOLSON J.W., PRELUSKY D.B., CHARMLEY L.L.** – Influence of level of deoxynivalenol in the diet og dairy cows on feed intake, milk production and its composition – *J. Dairy Sci.*, 1993, 76(11) : 3580-3587
26. **COHEN H., LAPOINTE M.** – Capillary gas chromatographic determination of T-2 toxin, HT-2 toxin and diacetoxyscirpenol in ceral grains – *J Assoc Off Anal Chem*, 1984, 67(6) : 1105-1107
27. **COLLINS G.J., ROSEN J.D.** – Gas-liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for T2 toxin in milk – *J Assoc Off Anal Chem*, 1979, 63(6) : 1274-1280
28. **CONNER M., CONNER B., ROGERS A., NEWBERNE P.** – Anguidine-induced testicular injury in Lewis rats – *Reproductive Toxicology*, 1990, 4(3), 215-222
29. **CREPPY E.E.** – Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe – *Toxicology letters*, 2002, 127 : 19-28
30. **CROTEAU M., PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L.** – Analysis of trichothecenes mycotoxins by gas cgromatography with electron capture detection – *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42 : 928-923
31. **CZERWIECKI L., GIRYN H.** – Determination of trichothecenes in cereals – *Rocz Panstw Hig*, 1989, 40(4-6) : 284-290
32. **D'AGOSTINO P.A., PROVOST L.R., DROVER D.R.** – Analysis of trichothecene mycotoxins in human blood by capillary column gas chromatography-ammonia chemical ionisation mass spectrometry – *J. of Chromatogr.*, 1986, 367 : 77-86
33. **D'MELLO J.P.F., PLACINTA C.M., MACDONALD A.M.C.** – Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity – *Anim. Feed Sc. and Techn.*, 1999, 80 (3-4) : 183-205
34. **DAHLEM A.M., SWANSON S.P., COTE L.M., YOSHIZAWA T., BUCK W.B.** – Quantification of deoxynivalenol and its metabolite in bovine urine and feces by gas

- chromatography with electron-capture detection – J. Chromatogr., 1986, 378 : 226-233
35. **DAVID A.** – Aliments fermiers et mycotoxines : évaluation et maîtrise des risques – Thèse : vét. Nantes : 2001, 183 p.
 36. **DION Y.** – Des plantes transgéniques résistantes aux maladies : mythe ou réalité ? – Bulletin Technique, Cerom, Canada, 2002d, n° :99.01
 37. **DION Y.** – Fusariose de l'épi du blé et de l'orge – Bulletin Technique, Cerom, Canada, 2002c, n° :2.01
 38. **DION Y.** – Fusariose de l'épi du blé, intervention avec un fongicide – Bulletin Technique, Cerom, Canada, 2002a, n° :2.03
 39. **DION Y.** – Fusariose de l'épi du blé, les stades d'intervention avec un fongicide chez le blé – Bulletin Technique, Cerom, Canada, 2002b, n° :2.04
 40. **E.M.A.N** – page consultée le 30 septembre 2003 – Fact sheets on evaluation and risk issues – European Mycotoxin Awareness Network – http://www.inra.co.uk/eman/fsheet4_3.htm
 41. **EDWARDS S.G., PIRGOZLIEV S.R., HARE M.C., JENKINSON P.** – Quantification of trichothécène-producing *Fusarium* species in harvested grain competitive PCR to determine efficacies of fungicides against Fusarium Head Blight of winter wheat – Appl. And Environm. Microbiol., 2001, 67 (4) : 1575-1580
 42. **EL-BANNA A.A., HAMILTON R.M.G., SCOTT P.M., TRENHOLM H.L.** – Non transmission of deoxynivalenol to eggs and meat in chicken feed deoxynivalenol-contaminated diets – J. Agric. Food Chem., 1983, 31 : 1381-1384
 43. **EL-MAGHRABY O.M., EL-KADY I.A., SOLIMAN S.** – Mycoflora and Fusarium toxins of three types of corn grains in Egypt with special reference to production of trichothecene-toxin – Microbiol. Res., 1995, 150(3) : 225-232
 44. **EVANS I.** – Toxicologie, qualité du grain et impact sur l'industrie ; le plan albertain d'intervention contre la fusariose – Bureau de l'innocuité des produits chimiques, direction des aliments, santé Canada, Ottawa, 2002
 45. **FAIRHUST S., MAXWELL S.A., SCAWIN J.W., SWANSTON D.W.** – Skin effects of trichothecenes and their amelioration by decontamination – Toxicology, 1987, 46(3) : 307-319
 46. **FLORANT E.** – Les mycotoxicoses du porc en France : étude bibliographique – Thèse : vét. Toulouse : 1988, 81 p.

47. **FOSTER B.C., NEISH G.A., LAUREN D.R., TRENHOLM H.L., PRELUSKY D.B., HAMILTON R.M.G.** – Fungal and mycotoxin content of slashed corn – *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1986, 4 : 199-203
48. **FREEMAN G.G., MORRISON R.** – Trichothecin : an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum* Link – *Nature (Lond.)*, 1948, 162, 30
49. **FURLONG E.B., SOARES L.M.V., LASCA C.C., KOHARA E.Y.** – Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of Sao Paulo Brazil – *Mycopathologia*, 1995, 131 : 185-190
50. **FUSKEY** – page consultée le 16 octobre 2002 – Centre de recherches de l'est sur les plantes et oléagineux – http://res.agr.ca/brd/fusarium/intro_f.html
51. **GALVANO F., PIETRI A., BERTUZZI T., BOGNANNO M., CHIES L., DE ANGELIS A., GALVANO M.** – Activated carbons. In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters – *J. Food Prot.*, 1998, 61 : 469-475
52. **GREVET N.** – Modes d'actions et toxicité des trichothécènes – Th. : Med. Vet. : Toulouse, à paraître
53. **GUTZWILLER A.** – Les mycotoxines dans les aliments – *Suissepores Information*, 2000, n°:2
54. **HASSANIN N., GABAL MA.** – Biological and chemical characterization of metabolites of *Fusarium moniliforme* isolates – *Vet Hum Toxicol*, 1990, 32(6) : 536-540
55. **HOEHLER D., MARQUARDT R.R.** – Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxine A and T-2 toxin in chicks – *Poultry Science*, 1996, 75 (12) : 1508-1515
56. **HSU I.C., SMALLEY E.B., STRONG F.M., RIBELIN W.E.** – Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle – *Appl. Microbiol.*, 1972, 24 : 684-690
57. **HUMPHREYS D.J.** – In : BAILLIERE T. : « Veterinary toxicology », 1988 : 283-312
58. **HUSSEIN H.S., BRASEL J.M.** – Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals – *Toxicology*, 2001, 167 : 101-134
59. **HUWIG A., FREIMUND S., KAPPELI O., DUTLER H.** – Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents – *Toxicol. Letters*, 2001, 122 : 179-188
60. **IARC** - *Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, 1983, 31 : 153-161
61. **IARC** - *Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, 1983, 31 : 265-278

62. **IARC** - Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum, 1993, 56 : 397-444
63. **IPCS** – Selected Mycotoxins : Ochratoxins, trichothecenes, egrot - Environmental Health Criteria 105, 1990, W.H.O., Geneve, 263
64. **JANCENELLE C.** – Les trichothécènes : des moisissures aux toxines – Thèse : Pharma. Nancy : 1990, 180p
65. **JECFA** - page consultée le 15 mars 2003a - Toxine T-2 et HT-2 - <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm>
66. **JECFA** - page consultée le 15 mars 2003b - Deoxynivalénol - <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>
67. **JIMENEZ M., MATEO J.J., MATEO R.** – Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection – J of Chromatogr, 2000, 870 : 473-481
68. **KAMIMURA H., NISHIJIMA M., YASUDA K., SAITO K., IBE A., NAGAYAMA T., USHIYAMA H., NAOI Y.** – Simultaneous detection of several Fusarium mycotoxins in cereals, grain and foodstuffs – J. Assc. Off. Anal. Chem, 1981, 64 : 1067-1073
69. **KHACHATOURIANS GG.** – Metabolic effects of trichothecene T2 toxin – Can J Physiol Pharmacol, 1990, 68(7) : 1004-1008
70. **KIESSLING K.H., PETTERSSON H., SANDHOLM K., OLSEN M.** – Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and tree trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria – Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47 : 1070-1073
71. **KOTAL F., HOLADOVA K., HAJSLOVA J., POUSTAK J., RADOVA Z.** – Determination of trichothecenes in cereals – J. Chromatogr., 1999, 830 : 219-225
72. **KRYSINSKA-TRACCCZIK E., KIECANA I., PERKOWSKI J., DUTKIEWICZ J.** – Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farm in Eastern Poland – Ann. Agric. Environ. Med., 2001, 8 (2) : 269-274
73. **KUIPER-GOODMAN T.** – Toxicologie, qualité du grain et impact sur l'industrie ; progrès récent dans l'évaluation des risques du deoxynivalénol – Bureau de l'innocuité des produits chimiques, direction des aliments, santé Canada, Ottawa, 2002
74. **LACEY J.** – Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops – in Mycotoxins and animal foods, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 37-56

75. **LANGSETH W., CLASSEN P.** – Automation of the clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using the charcoal alumina column – *J. Chromatogr.*, 1992, 603 : 290-293
76. **LANGSETH W., RUNDBERGET T.** – The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals – *Mycopathologia*, 1999, 147(3) : 157-165
77. **LAUREN D.R., GREENHALGH R.** – Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography - *J Assoc Off Anal Chem*, 1987, 70 : 479-483
78. **LAUREN DR., SMITH WA.** - Stability of the fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments - *Food Addit Contam*, 2001, 18 (11) : 1011-1016
79. **LE BARS J., LE BARS P.** – Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences – *Bull. Ass. A.E. Inst. Pasteur*, 1988, Paris, 30, 115 : 8-21
80. **LEE S., CHU F.S.** – Radioimmunoassay of T-2 toxin in biological fluids – *J Assoc Off Anal Chem*, 1981b, 64, 684-688
81. **LEE S., CHU F.S.** – Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat - *J Assoc Off Anal Chem*, 1981, 64(1) : 156-161
82. **LEE U.S., JANG H.S., TANAKA T., HASEGAWA A., OH Y.J., UENO Y.** – Further survey on the Fusarium mycotoxins in Korean cereals – *Food Addit. Contam.*, 1986, 3 : 253-261
83. **LEE U.S., JANG H.S., TANAKA T., HASEGAWA A., OH Y.J., UENO Y.** – The coexistence of the Fusarium mycotoxins nivalénol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean cereals harvested in 1983, *Food Addit. Contam.*, 1985, 2 : 185-192
84. **LEE US., JANG HS., TANAKA T., TOYASAKI N., SUGIURA Y., OH YJ., CHO.** – Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by Fusarium isolated – *Appl Environ Microbiol*, 1986, 53(6) : 1258-1260
85. **LUCIA GE., MARTIN AA., LORI G., ALIPPI HE.** – Sensitivity of the skin of the rabbit to extract of a culture of *Fusarium poae* Wollenweber – *Rev Argent Microbiol*, 1984, 16(1) : 27-32
86. **MAHUZIER G., HAMON M.** – *Abrégé de chimie analytique, méthodes de séparation* – tome 2, Ed. Masson, 1978, Paris, 425 p.
87. **MANTLE P.** – Miscellaneous toxigenic fungi – in *Mycotoxins and animal foods*, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 37-56

88. **MARASAS W.** – Toxigenic Fusaria – in Mycotoxins and animal foods, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 37-56
89. **MARPEGAN M.R., PERFUMO C.J., GODOY H.M., SALA DE MIGUEL M., DIAZ E., RISSO M.** – Feed refusal of pigs caused by Fusarium mycotoxins in Argentina – J. Vet. Med., 1988, A35 : 610-616
90. **MARQUARDT R.R.** – Effects of molds and their toxins on livestock performance : a western Canadian perspective – Animal Feed Science Technology, 1996, 58 : 77-89
91. **MARTINS M.L., MARTINS H.M.** – determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal – J. Food Prot., 2001, 64 (11) : 1848-1850
92. **MARTLBAUER M., DIETRICH R., TERPLAN G.** – Experience with immunoassays for the determination of mycotoxins in food – Arch. Lebensmittelhyg., 1991, 42 : 3-6
93. **MATEO J.J., LLORENS A., MATEO R., JIMENEZZ M.** – Critical study of an improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes - J of Chromatogr, 2001, 918 : 99-112
94. **MATEO J.J., MATEO R., JIMENEZ M.** – Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by Fusarium sporotrichioides isolates under diverse culture conditions – Intern. J. of Food Microbiol., 2002, 72, (1-2) : 115-123
95. **Mc EVOY J.D.G.** – Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food : a review of regulatory aspects, incidence and control – Analytica Chimica Acta, 2002, 473 : 3-26
96. **MIROCHA C.J.** – Analysis of T2 toxin and other trichothecenes in cereal grains – 1983, IARC, 44 : 373-383
97. **MIROCHA C.J., PATHRE S.V., SCHAUERHAMER B., CHRISTENSEN C.M.** – Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff – Appl. Environ. Microbiol., 1976, 32 : 553
98. **MOLL M., MOLL N.** – Précis des risques alimentaires – Ed. TEC & DOC, Paris, 2000, 383p
99. **MOLTO G., SAMAR M.M., RESNIK S., MARTINEZ E.J., PACIN A.** – Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer. A preliminary exposure assessment – Food Addit. Contam., 2000, 17 : 809-813
100. **MOREAU C.** - Moisissures toxiques dans l'alimentation – 1974, Masson et Cie, 2^{ème} ed., Paris, 471 p

101. **MOREAU J.M., KESTEMONT M.H.** – page consultée le 30 septembre 2003 - Les traitements fongicides – in le problème des la fusariose de l'épi et des mycotoxines en froment d'hiver : état des connaissances, centre de Recherches agronomiques de Gembloux – <http://www.fsagx.ac.be/pt/LBf%C3%A9V2003/Fusariose%20et%20mycotoxines.doc>
102. **MOSS M.** – The environmental factors controlling mycotoxin formation – in Mycotoxins and animal foods, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 37-56
103. **MULLER H.M., REIMANN J., SCHUMACHER U., SCHWADORF K.** – Natural occurrence of Fusarium toxins in oats harvested during five years in area of southern Germany – Food Addit. Contam., 1998, 15 : 801-806
104. **NAIBO B.** – Protection contre Fusarium graminearum, agent d'une fusariose des épis – Phytoma, 1997, 497 : 35-38
105. **NATOUR R.M., YOUSEF S.M.** – Adsorption efficiency of diatomaceous earth for mycotoxins, Arab Gulf J. Sci. Res., 1998, 16 : 113E-127E
106. **NGUYEN T.** – Les mycotoxines du groupes des trichothécènes : relation structure – activité biologique – Thèse : pharma. : Paris XI : 1992, 54p
107. **NIELSEN K.F., THRANE U.** – Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography and tandem mass spectrometry – J of Chromatogr, 2001, 929(1-2) : 75-87
108. **NIESSEN L., BOHM-SHRAMI M., VOGEL H., DONHAUSER S.** – Deoxynivalénol in commercial beer-Screening for the toxin with an indirect competitive ELISA – Mycotoxin Res., 1993, 9 : 99-108
109. **OKOYE Z.S.** – Fusarium mycotoxins nivalénol in mouldy maize harvested from farms in Jos District, Nigeria – Food Addit. Contam., 1993, 10(4) : 375-379
110. **OMURTAG GZ., YAZICIOGLU D.** – Determination of T-2 toxin in grain and grain products by HPLC and TLC – J Environ Sci Health, 2000, 35 (6) : 797-807
111. **PACE JG., MATSON CF.** – Stability of T-2, HT-2, T-2 tetraol in biological fluids – J Anal Toxicol, 1988, 12(1) : 48-50
112. **PARK K.J., LEE Y.W.** – Natural occurrence of Fusarium mycotoxins in Korean barley samples harvested in 1987 and 1989 – Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol., 1990, 31 : 37-41
113. **PATTEL S., HAZEL C.M., WINTERTON A.G., MORTBY E.** – Survey of ethnic foods for mycotoxins – Food Addit. Contam., 1996, 13 : 833-841

114. **PECQUERY M.** – Contamination fongique des aliments du bétail. -121 p. – Thèse : Méd. Vét. : Nantes : 1997
115. **PEMBERTON A.D., SIMPSON T.J.** – The chemical degradation of mycotoxins – in Mycotoxins and animal foods, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 797-813
116. **PENG S., DONG J., YANG J.** – Studies on relationship between toxicity of trichothecene toxic action and its structure – Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 1996, 30(3) : 141-143
117. **PERKOWSKI J., BASINSKI T.** – Natural contamination of oat with group A trichothecene mycotoxins in Poland – Food Addit Contam, 2002, 19(5) : 478-482
118. **PLACINTA C.M., D'MELLO J.P.F., MACDONALD A.M.C.** – A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins – Animal Food Sc. And Tech., 1999, 78 (1-2) : 21-37
119. **PLEINCHAMP** – page consultée le 17 septembre 2003 – Pallier l'insuffisance de la lutte chimique contre la fusariose des épis – <http://www.pleinchamp.com/verity/verRes.asp?ResultStart=1&question=0&QueryText=deoxynivalenol&txtRubSearch=0>
120. **PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., HAMILTON R.M.G., MILLER J.D.** – Transmission of [¹⁴C]deoxynivalenol to eggs following oral administration to laying hens – J. Agric. Food Chem., 1987, 35 : 182-186
121. **PULS R., GRENNWAY J.A.** – Fusariotoxocosis from barley in British Columbia. II; Analysis and toxicity of suspected barley – Can. J. Comp. Med., 1976, 40 : 16-19
122. **QUIROGA N., RESNIK S., PACIN A., MARTINEZ E., PAGANO A., RICCOBENE I., NEIRA S.** – Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat – Food control., 1995, 6(4) : 201-204
123. **RAZZAZI-FAZELI E., BOHM J., LUF W.** – Determination of nivalénol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation – J. Chromatogr., 1999, 854 : 45-55
124. **RAZZAZI-FAZELI E., RABUS B., CECON B., BOHM J.** – Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography & atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry – J of Chromatogr, 2002, 968(1-2) : 129-142

125. **REDDY B.N., NUSRATH M., KUMARI C.K., NAHDI S.** – Mycotoxin contamination in some food commodities from tribal areas of Medak district – *Indian Phytopathol.*, 1983, 36 : 683-686
126. **RHEEDER J.P., SYDENHAM E.W., MARASAS W.F.O., THIEL P.G., SHEPHARD G.S., SCLECHTER M., STOCKENSTROM S., CRONJE D.W., VILJOEN J.H.** – Fungal infestation and mycotoxins contamination of South African commercial maize harvested in 1989 and 1990, *S. Afr. J. Sci.*, 1995, 91 : 127-131
127. **RILEY R.T., NORRED W.P.** – page consultée le 17 septembre 2003 – Mycotoxin prevention and decontamination, a case study on maize – <http://www.fao.org/docrep/X2100T/x2100t05.htm>
128. **ROOD HD., BUCK WB., SWANSON SP.** – Gas chromatographic screening method for T2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol and related trichothecenes in feeds – *J Assoc Off Anal Chem*, 1988, 71(3) : 493-498
129. **ROSENSTEIN Y., LAFARGUE-FRAYSSINET C.** – Inhibitory effect of Fusarium T2-toxin on lymphoid DNA and protein synthesis, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1983, 70(2) : 283-288
130. **ROTTER BA., PRELUSKY DB., PESTKA JJ.** – Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin) – *J Toxicol Environ Health*, 1996, 48(1) : 1-34
131. **RYU J.C., YANG J.S., SONG Y.S., KWON O.S., PARK J., CHANG I.M.** – Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry – *Food Addit. Contam.*, 1996, 13 : 333-341
132. **SADEF** – page consultée le 7 octobre 2003 – Pôle d'Aspach – <http://www.sadef.fr/>
133. **SAMARAJEEWA U.** – In situ degradation of mycotoxin by physical methods – in *Mycotoxins and animal foods*, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 785-796
134. **SAUBOIS A., NEPOTE M.C., BASILICO J.C.** – Incidence of Fusarium toxins in corn and milling byproducts – *Arch. Latinoam. Nutr.*, 1992, 42 : 168-172
135. **SCHAEFFER J.L., HAMILTON P.B.** – Interactions of mycotoxins with feed ingredients. Do safe levels exist? - in *Mycotoxins and animal foods*, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 815-826
136. **SCHOLLENBERGER M., JARA H.T., SUCHY S., DROCHNER W.** – Fusarium toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany – *Intern. J. of Food Microbiol.*, 2002, 72 (1-2) : 85-89

137. **SCHOLLENBERGER M., LAUBER U., TERRY JARA H., SUCHY S., MULLER H.M.** – Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean up by two stage solid phase extraction – *J. Chromatogr.*, 1998, A, 815 : 123-132
138. **SCMIDT R., DOSE K.** – HPLC : a tool for the analysis of T2 toxin and HT-2 toxin in cereals – *J Anal Toxicol*, 1984, 8(1) : 43-45
139. **SCOTT P.M.** – The natural occurrence of trichothecenes – In : Beasley, V.R. ed., *Trichothecene mycooxicosis : Pathophysiological effects*, 1989, vol 1, Boca Raton, FL, CRC Press, 1-26
140. **SCOTT P.M.** – Trichothecenes in grains – *Cereal Food World*, 1990, 35 : 661-669
141. **SCOTT P.M., KANHERE R.S., WEBER D.** – Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry – *Food Addit. Contam.*, 1993, 10 : 381-389
142. **SCOTT P.M., LOMBAERT S.R., PELLAERS P., BACLER S., KANHERE S.R., SUN W.F., LAU P.Y., WEBER D.** – Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes – *Food Addit. Contam.*, 1989, 6 : 489-500
143. **SCUDAMORE K.A., NAWAZ S., HETMANSKI M.T.** – Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs : determination of mycotoxins in maize and maize products – *Food Addit. Contam.*, 1998, 15 : 30-55
144. **SENER LH., SANSON DR., CORLEY DG., TEMPESTA M., ROTTINGHAUS A.** – Cytotoxicity of trichothecene mycotoxins isolated from *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium sambucinum* in hamster kidney cells – *Mycopathologia*, 1991, 113(2) : 127-131
145. **STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN PRODUCTION ANIMALE** – Eviter les mycotoxicoses chez les porcs – rap actuel, 2001a, 2
146. **STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN PRODUCTION ANIMALE** – Insignifiantes teneurs en mycotoxines dans les céréales – Communiqué de presse, 2000, 2251 b
147. **STEYN PS.** – Mycotoxins, general view, chemistry and structure – *Toxicol Lett*, 1995 82-83 : 843-851
148. **STRATTON G.W., ROBINSON A.R., SMITH H.C., KITILSEN L., BARBOUR M.** – Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography – *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 1993, 24 : 399-409

149. **SUDAKIN D.** – Trichothecenes in the environment: relevance to human – Toxicology Letters, 2003, 143(2) : 97-107
150. **SUTTON J.C.** – page consultée le 17 septembre 2003 – Les maladies de l'épi du blé d'automne – <http://www.gov.on.ca/OMAFRA/french/crops/facts/97-068.htm>
151. **SWANSON S.P., DAHLEM A.M., ROOD H.D., COTE L.M., YOSHIZAWA T.** – Gas chromatographic analysis of milk for deoxynivalenol and its metabolite – J. Assoc. Off. Chem., 1986, 41-43
152. **Swiss Granum** – page consultée le 30 septembre 2003 – Recommandations de la branche pour prévenir les risques de mycotoxines sur les grains de céréales – http://www.swissgranum.ch/pdf/3abf2_F_Prev_Mycotox.pdf
153. **SZIGETI G.** – Ph. D Thesis, 1976, Miskolc, Hongrie
154. **TADDIO D.** – Les mycotoxines dans les aliments : causes, dangers, évaluations – Mémoire pour diététique et génie alimentaire – Toulouse : 1987, 62p
155. **TANAKA T., HASEGAWA A., MATSUKI Y., LEE U.S., UENO Y.** – Co-contamination of the Fusarium mycotoxins nivalénol, deoxynivalenol and zearalenone, in scabby wheat grains harvested in Hokkaido, Japan – J. Food Hyg. Jpn, 1985, 26 : 519-522
156. **TANAKA T., HASEGAWA A., YAMAMOTO S., LEE U.S., UENO Y.** – A limited survey of Fusarium mycotoxins nivalénol, deoxynivalenol and zearalenone. Survey of 19 countries – J. Agric. Food Chem., 1988, 36 : 979-983
157. **TANAKA T., YONEDA A., INOUE S., SUGIURA Y., UENO Y.** – J Chromatogr A, 2000, 882(1-2) : 23-28
158. **THE MERK INDEX** - 12^{ième} éd., 1996, Merck Research Laboratories, USA
159. **TIEBACH R., BLAAS W., KELLERT M., STEINMEYER S., WEBER R.** – Confirmation of nivalenol and deoxynivalenol by on-line liquid chromatography-mass spectrometry and gas-chromatography. Comparison of methods – J. Chromatogr., 1985, 318 : 103-111
160. **TRUCKSESS MW., NESHEIM S., EPPLEY RM.** – Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn – J Assoc Off Anal Chem, 1984, 67(1) : 40-43
161. **TRUCKSESS MW., PAGE SW., WOOD GE., CHO TH.** – Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran by solid phase extraction/liquid chromatography : interlaboratory study – J AOAC, 1998, 81(4) : 880-886

162. **TUTEL'IAN V.A., SOBOLEV V.S., KATRUSH I.R., MEDVEDEV F.A., ZAKHAROVA L.P.** – A method of determining the levels of deoxynivalenol (vomitoxine) and its metabolites – *Vopr. Pitan*, 1991, 5 : 66-69
163. **UENO Y.** – Mode of action of trichothecenes – *Ann Nutr Aliment*, 1977, 31(4-6) : 885-900
164. **UENO Y.** – The toxicology of mycotoxins – *Crit Rev Toxicol*, 1985, 14(2) : 99-132
165. **UENO Y.** – Trichothecene mycotoxins – *Advances in nutritional research*, H. DRAPER, 1980, vol 3, chap.10, 301-353
166. **UENO Y.** – Trichothecenes as environmental toxicants – *Rev. Environ. Toxicol.*, 1986, 2 : 303-341
167. **UENO Y., LEE U.S., TANAKA T., HASEGAWA A., MATSUKI Y.** – Natural occurrence of nivalénol and deoxynivalenol in Polish cereals – *Microbiol. Aliments. Nutr.*, 1985, 3 : 321-326
168. **UENO Y., SAWANO M., ISHII K.** – Production of trichothecene mycotoxins by fusarium specie shake culture – *Appl Microbiol*, 1975, 30(1) : 4-9
169. **UENO Y., TAKAI Y., BABA Y.** – Analysis of T2 toxin metabolites in tissues and excreta of rats – *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1990, 10(1-2) : 31-40
170. **VIDAL D., CHAPON P., CREACH O., FONTANGES R.** – Effect of temperature on diacetyoxyscirpenol production and sporulation in a liquid culture of *Fusarium sambucinum* – *C R Seances Soc Biol Fil*, 1984, 178(5) : 518-525
171. **VIDAL D., CREACH O., GENTON A., BEAUDRY Y., FONTANGES R.** – Destruction and cutaneous decontamination of diacétoxy-scirpénol (mycotoxins from trichothécène group) – *C R Acad. Sci. III*, 1985, 301 (5) : 183-186
172. **VIDAL D.R.** – Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes. – *Bull. Inst. Pasteur*, 1990, 88 : 159-192
173. **VOYKSNER RD., HAGLER W.M., SWANSON S.P.** – Analysis of some metabolites of T-2 toxin, diacétoxy-scirpénol and deoxynivalenol by thermospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry – *J of Chromatogr.*, 1987, 394(1) : 183-199
174. **VRABCHEVA T., GESSLER R., USLEBER E., MARTLBAUER E.** – First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat – *Mycopathologia*, 1996, 136 : 47-52
175. **WEINGARTNER J., KRŠKA R., PRAZNIK W., GRASSERBAUER M., LEW H.** – Use of mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of

- trichothecenes in wheat by electron-capture gas chromatography – Fresenius J. Anal. Chem., 1997, 357 : 1206 – 1210
176. **WHITEKER T., DICKENS J., GIESBRECHT F.** – Testing animal feedstuffs for mycotoxins : sampling, subsampling and analysis – in Mycotoxins and animal foods, SMITH J., HENDERSON R., 1991, CRC Press, Boston, 37-56
177. **WHO** – Selected Mycotoxins : Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot – Environmental Health Criteria 105, 1990, Geneva
178. **WIDESTRAND J., PETTERSSON H.** – Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants –
179. **WILLIE T.D., MOREHOUSE L.G.** – Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins - In Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses, vol 1, 1977, 538 p.
180. **XU Y.C., ZANG G.S., CHU F.S.** – Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat – J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, 71 : 945-949
181. **YANG C.H., LUO X.Y.** – Method for determination of T-2 toxin in wheat with indirect enzyme-linked immunosorbent assay – Chin. J. Oncol., 2000, 17 : 107-110
182. **YIANNIKOURIS A., JOUANY J-P** – Les mycotoxins dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l’animal – INRA, Prod. Anim., 2002, 15, 3-16
183. **YOSHIZAWA T., TADEKA H., OHI T.** – Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animal – Agric. Biol. Chem., 1983, 47 : 2133-2135

Toulouse, 2003

NOM : BALZER

PRENOM : ALEXANDRE

TITRE : LES TRICHOHECENES : NATURE ET ORIGINE

RESUME : Ce travail est consacré à l'étude des propriétés et des conditions d'apparition dans les aliments des trichothécènes des groupes A et B. Ces composés contaminent les céréales du monde entier. Les *Fusarium* qui les synthétisent se développent sur les cultures encore sur pied, lors de mauvaises conditions climatiques. Des concentrations importantes de toxines peuvent être ponctuellement trouvées ; la quasi-totalité des denrées étant contaminées avec des concentrations plus faibles. Le tri sélectif des grains contaminés et sains est une des rares méthodes applicable à l'industrie. Les méthodes chimiques et biologiques de décontamination sont insuffisamment évaluées pour avoir de réelles applications. Les principaux moyens de lutte visent donc à prévenir la contamination fongique des matières premières. Ils passent par une hygiène stricte des semis, l'emploi de fongicides et des mesures agronomiques.

MOTS CLES : Mycotoxine – Trichothécène – Fusarium – Céréale – Deoxynivalénol – Toxine T-2 – Moisissure

ENGLISH TITLE : THE TRICHOHECENES : NATURE AND ORIGIN

ABSTRACT : This review is devoted to the study of the trichothecenes (group A and B) properties and their conditions of apparition in feed. These compounds contaminate cereals in the entire world. The *Fusarium* synthesizing them expand in uncropped harvests, in bad climatic conditions. Important concentration of toxins can punctually be found; almost all feed are contaminated with low concentrations. Selective sorting of contaminated and wholesome grains is the most applicable methods to the industry. The chemical and biological decontamination methods have not been evaluated enough to have real applications. The main ways of struggle consist in the prevention of raw material contamination with fungus. They include strict seedling hygiene, fungicide employment and agronomic measures.

KEY WORDS : Mycotoxin – Trichothecene – Fusarium – Cereal – Deoxynivalenol – T-2 Toxin - Mould