

# Pour des aliments sains :

## Savoir maîtriser les risques en alimentation

► Mercredi 28 novembre 2012



# Mycotoxines: Quelles avancées scientifiques pour une meilleure maîtrise des risques?

**Florence FORGET-RICHARD**, UR INRA 1264  
fforget@bordeaux.inra.fr



33883 Villenave d'Ornon cedex

**Isabelle OSWALD**, UMR INRA/INP 1331  
ioswald@inra.toulouse.fr



31027 Toulouse cedex3



**Substances chimiques toxiques produites par certaines moisissures qui se développent sur les denrées alimentaires, et en particulier les céréales**



Fusarium

Ochratoxine A

riz, haricots, lait, ensilage, denrées d'origine animale, raisin



Trichothécènes,  
Zéaralénone,  
Fumonisines

Blé, maïs, orge, riz, seigle,  
avoine, noix, tomate



Penicillium

Patuline,  
Ochratoxine A

Fruits, jus de fruits, blé, riz,  
fromage, noix, tissus d'animaux,  
ensilage, fromage, orange, citron,  
pain, cantal



Byssochlamys

Patuline

Fruits et jus de fruits, ensilage



Claviceps

Alcaloïdes de l'ergot

Seigle, blé et dérivés



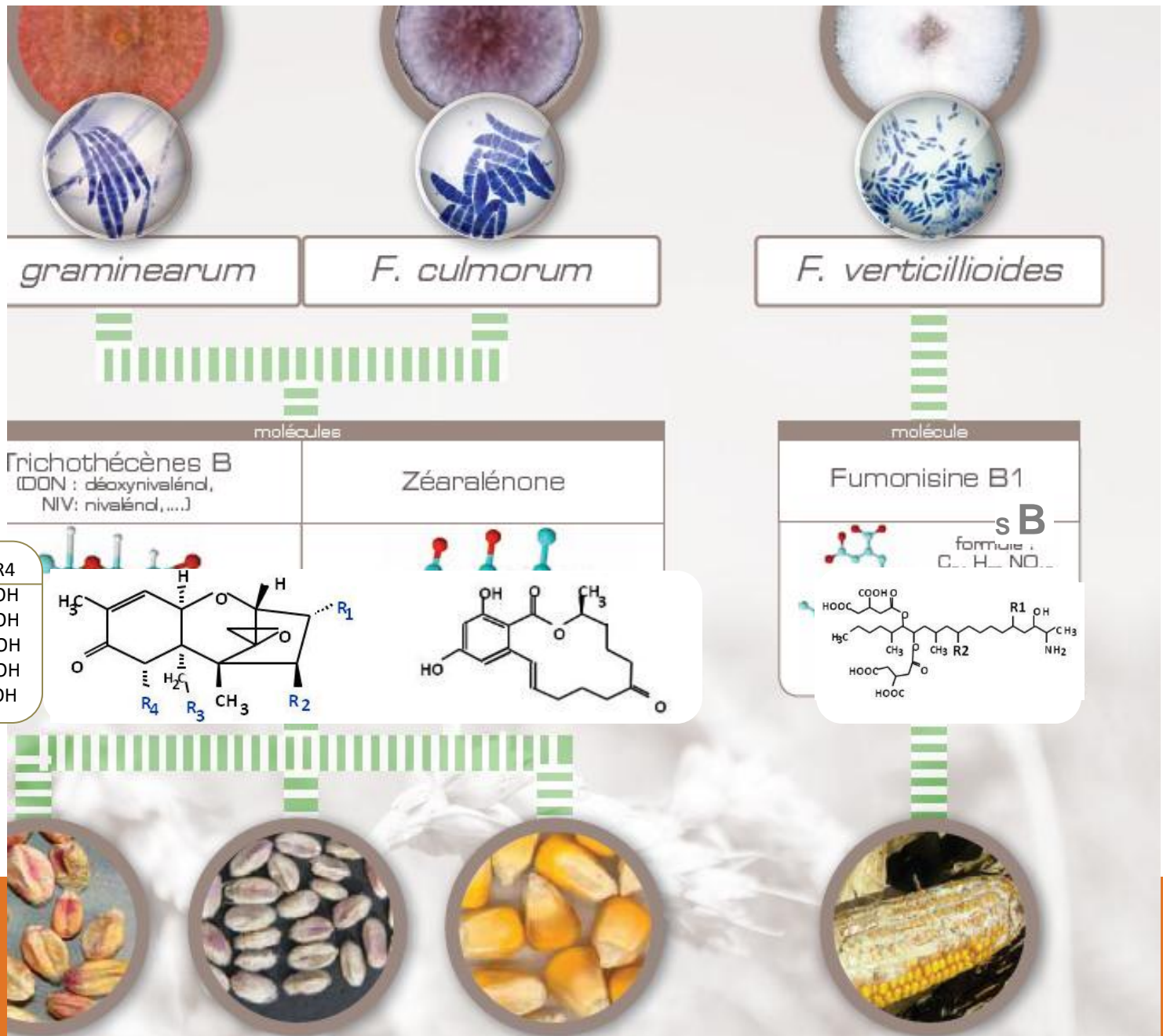
Alternaria

Alternariol

Fruits, légumes et produits dérivés  
de pommes et tomates, colza,  
pomme de terre



# Les mycotoxines produites par le genre Fusarium ou Fusariotoxines



	R1	R2	R3	R4
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
3 Acetyl DON	OAc	H	OH	OH
15 Acetyl DON	OH	H	OAc	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
FusarenoneX	OH	OAc	OH	OH

# Les fusariotoxines et en particulier les trichothécènes :

1 / Une présence dans



## Mycotoxines

Ochratoxine A, Aflatoxines, Patuline, Nivalénol, Fumonisines, Zéaralénone

**Déoxynivalénol et ses dérivés acétylés (3-Ac-DON+15-Ac-DON)**

Toxines T-2 et HT-2

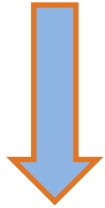
### Exemples des concentrations maximales autorisées des mycotoxines dans les produits alimentaires dans l'Union Européenne (CE n°1881/2006 modifié n°1126/2007)

Arachides, fruits à coque, fruits séchés et produits dérivés de leur transformation destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	AFB1	2
	AFB1+AFB2+AFG1+AFG2	4
Toutes les céréales et produits dérivés des céréales destinés à la consommation humaine directe (adultes)	AFB1	2
	AFB1+AFB2+AFG1+AFG2	4
Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits laitiers	AFM1	0,05
Céréales brutes	OTA	5
Grains de café torréfié et café torréfié moulu	OTA	5
Café soluble	OTA	5
Toutes les produits dérivés des céréales destinés à la consommation humaine directe	OTA	2
Vins, boissons aromatisées à base de vin, jus de raisin	OTA	2
Jus de fruits, jus de fruits concentrés reconstitués et nectars	Patuline	2
Céréales brutes autres que le blé dur, avoines et le maïs	DON	1250
Blé dur et avoine bruts	DON	1750
Maïs brut	DON	1750
Pains	DON	500
Pâtes (sèches)	DON	750
Céréales brutes autres que le maïs	ZEA	100
Maïs brut	ZEA	350
Maïs brut	FB1+FB2	4000
Céréales petits déjeuners à base de maïs	FB1+FB2	800
Alimentation à base de maïs pour nourissons	FB1+FB2	200

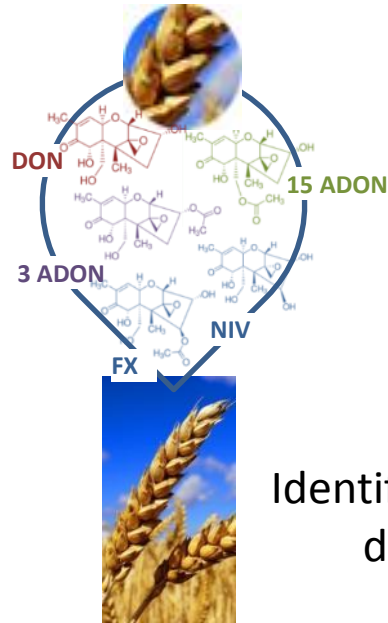
4/ Une évaluation incomplète de la toxicité et une réglementation qui ne répond pas à la complexité de la problématique

# Améliorer la maîtrise du risque « fusariotoxines » implique...

Décrypter les mécanismes et évènements conduisant à la contamination des grains?



Stratégies de maîtrise



Mieux appréhender la toxicité



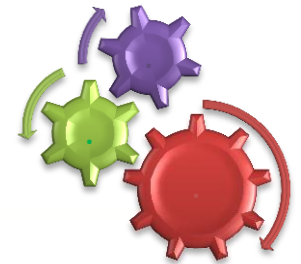
Pour une meilleure évaluation du risque



Identifier des mécanismes de détoxification



Maîtrise du risque



floraison

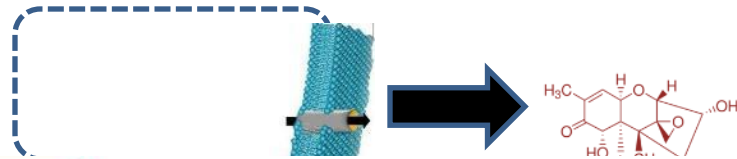


Maturité

# Pour répondre à ces enjeux, la recherche s'organise

(avec des collaborations européennes, internationales et un partenariat privé)

## La genèse des contaminations



Effets toxiques

FUSATOX

Climat

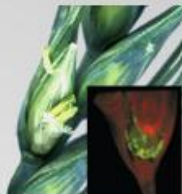
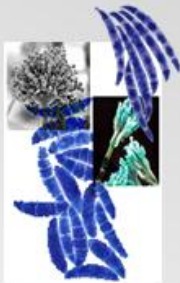
Réseau FUSATOX

INRA-ENVL MTCX,  
ESMISAB-LUBEM  
INRA-INP Toxalim  
ANSES

Inoculum

Epis à floraison

Grain mature



Cinétique d'infection et  
toxinogénèse

Detoxification in planta

Marqueurs génétiques et  
biochimiques de résistance

IBP

GDEC  
MycSA

Transformation  
detoxification

Disponibilité

Nature de l'inoculum

MSE, BIOGER, Arvalis  
IFBM, Toxalim, ANSES,  
MycSA, Univ Caen

Mécanisme d'infection  
et toxinogénèse

Sensibilité variétale

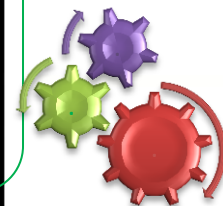
Interactions microflore

GDEC, MycSA

Arvalis, AGAP, GEVES


BIOGER

INRA-INP Toxalim,  
UMR INRA IATE  
INRA URH,  
INRA MycSA



# Des avancées prometteuses pour une meilleure évaluation de la toxicité des grains

## Une meilleure connaissance des effets chroniques associés aux mycotoxines

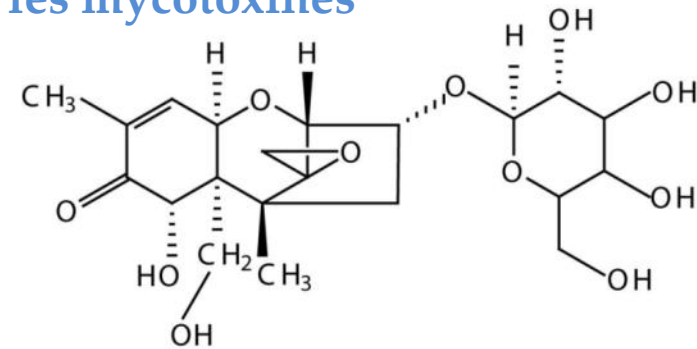
 Toxicité aiguë = effet à court terme (de forte dose)

 Toxicité chronique = effet à long terme (faibles doses)

## Vers une détermination des effets toxiques de toutes les mycotoxines

Et en particulier

- Les formes acétylées
- Les formes glycosylées
- Les formes hydrolysées

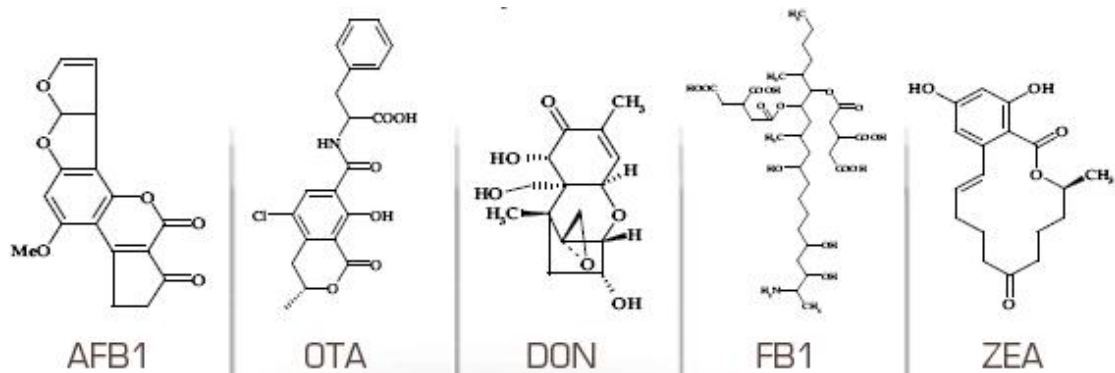


Deoxynivalenol 3-glucoside

## Vers une prédiction des effets des mélanges



# Les mycotoxines ont de multiples effets chroniques



## Symptômes

Atteinte des performances  
(croissance, anorexie)

Atteintes hépatiques

Atteintes rénales

Trouble de la reproduction  
(avortement, infertilité)

Oedème pulmonaire

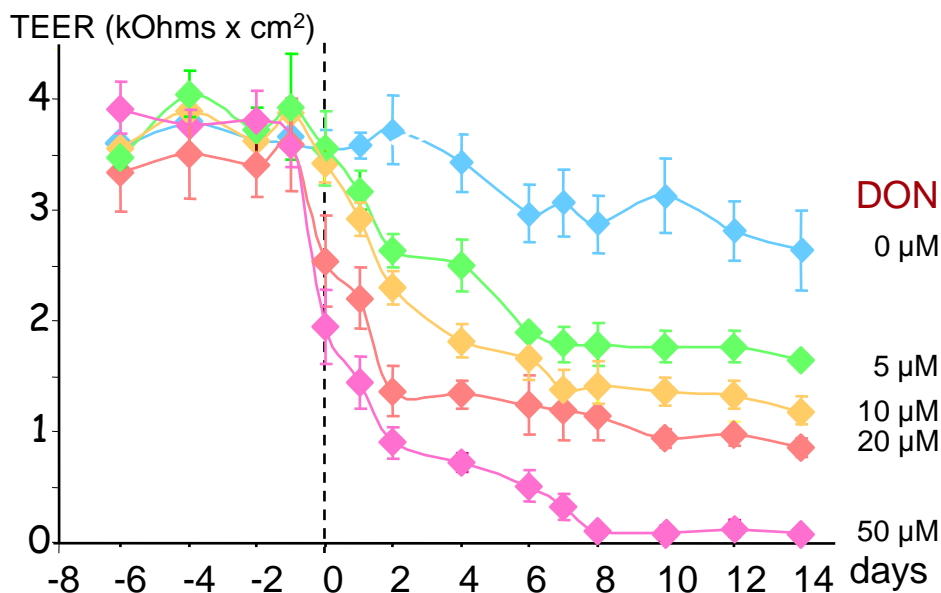
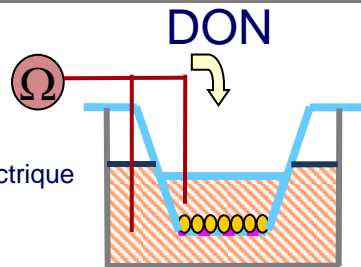
Atteintes du système  
immunitaire

Et l'intestin ??

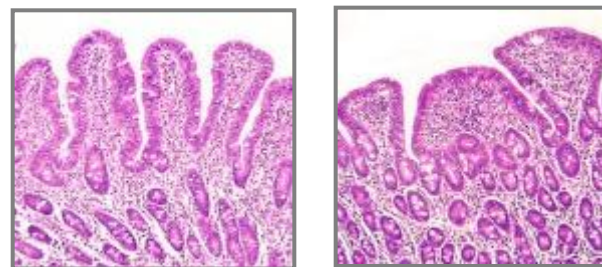
Le tractus gastro-intestinal est la première  
barrière contre les contaminants alimentaires

# Le DON altère l'intestin

3 niveaux d'approche : *in vitro* - cultures de cellules de l'épithélium intestinal, *ex vivo* - explants intestinaux, *in vivo* - animaux nourris avec aliments contaminés.

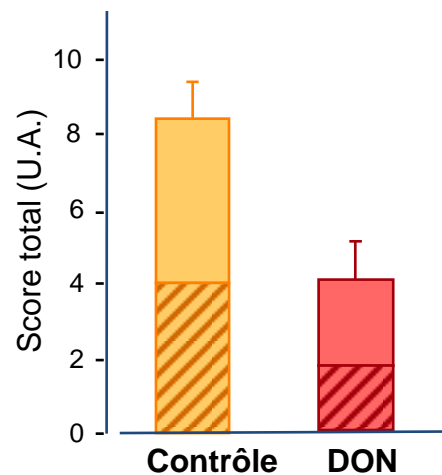


## • Intoxication Porcelets, 2.3 ppm, 4 semaines



Control

DON



Contrôle

DON

# Effets comparés du DON et de ses dérivés acétylés

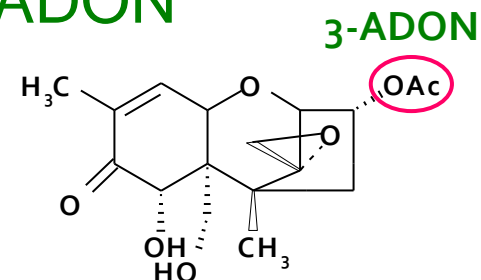
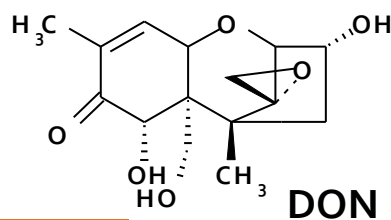
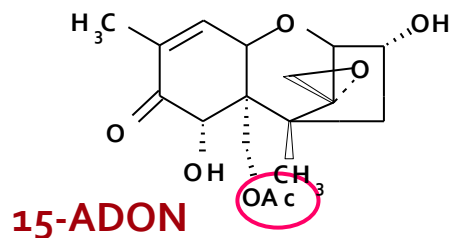
Le DON est produit avec deux dérivés acétylés 3-ADON et 15-ADON, pouvant correspondre à 10 à 20 % du contenu en DON

(Pinton *et al.*, 2012)

	in vivo	ex vivo	in vitro
Prolifération cellulaire	15-ADON>DON>>3-ADON	Non évaluée	15-ADON>DON
Structure intestinale / Fct° barrière	15-ADON>>DON>3-ADON	15-ADON>>DON=3-ADON	15-ADON>DON
Protéines de jonction	15-ADON>>DON=3-ADON	Non évaluées	Non évaluées
MAP Kinases	15-ADON>>DON=3-ADON	15-ADON>DON=3-ADON	15-ADON>DON

DON et A-DONs → toxicité ≠ sur l'intestin

15-ADON > DON > 3-ADON



# Recherches futures

## Mieux évaluer les conséquences d'une fonction barrière intestinale altérée

Susceptibilité accrue aux  
infections entériques



Absorption des  
nutriments entravée  
(croissance réduite)



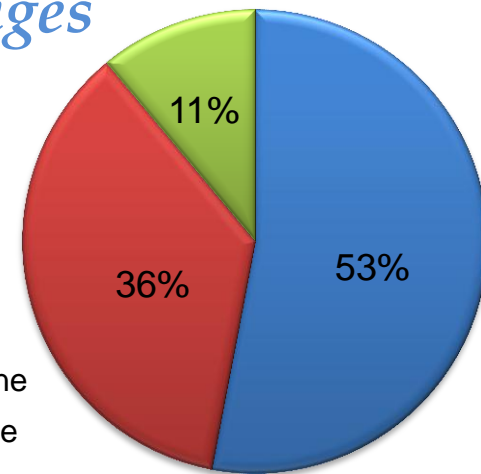
Passage accru de xénobiotiques  
(incluant d'autres mycotoxines)



Prédisposition à des  
maladies inflammatoires  
intestinales chroniques

# Vers une prédiction des effets des mélanges

- Les champignons produisent plusieurs mycotoxines simultanément
- Les aliments peuvent être contaminés par plusieurs champignons
- Les repas sont composés de plusieurs matières premières



- >1 mycotoxine
- 1 mycotoxine
- Inf. LOD

Co-occurrence globale des mycotoxines

Source: Biomin's mycotoxin survey 2<sup>nd</sup> Quarter report 2011

Nbre d'échantillons 2727

Nature des échs: céréales, sous-produits et produits finis

**Co-contamination**  
par plusieurs mycotoxines  
est la **REGLE**, pas  
l'exception

**La plupart des études**  
→ Effets des **mycotoxines**  
**individuellement**

**Important d'étudier**  
→ Effets des **co-contamination**  
**mycotoxiques**  
↳ **réglementation**

**La démonstration de synergie entre les mycotoxines pourrait conduire à la révision des réglementations et /ou des recommandations en vigueur.**

# Effet des co-contaminations *in vivo*

PRINCIPALES INTERACTIONS ETUDIES	NOMBRE D'ETUDES
AFLATOXINE – OCHRATOXINE	21
TRICHOTHÈNE – FUSARIOUM	16
✗ Limite : Le plupart des expériences ont été réalisées avec des très fortes doses de toxines.	
FUMONISINE – MONILIFORMINE	13
OCHRATOXINE – CITRININE	8
✓ En cours au sein de l'UMR Toxalim: Etudes avec des doses de DON et dérivés compatibles avec celles présentes dans les récoltes	
TOXINES DE FUSARIUM	30

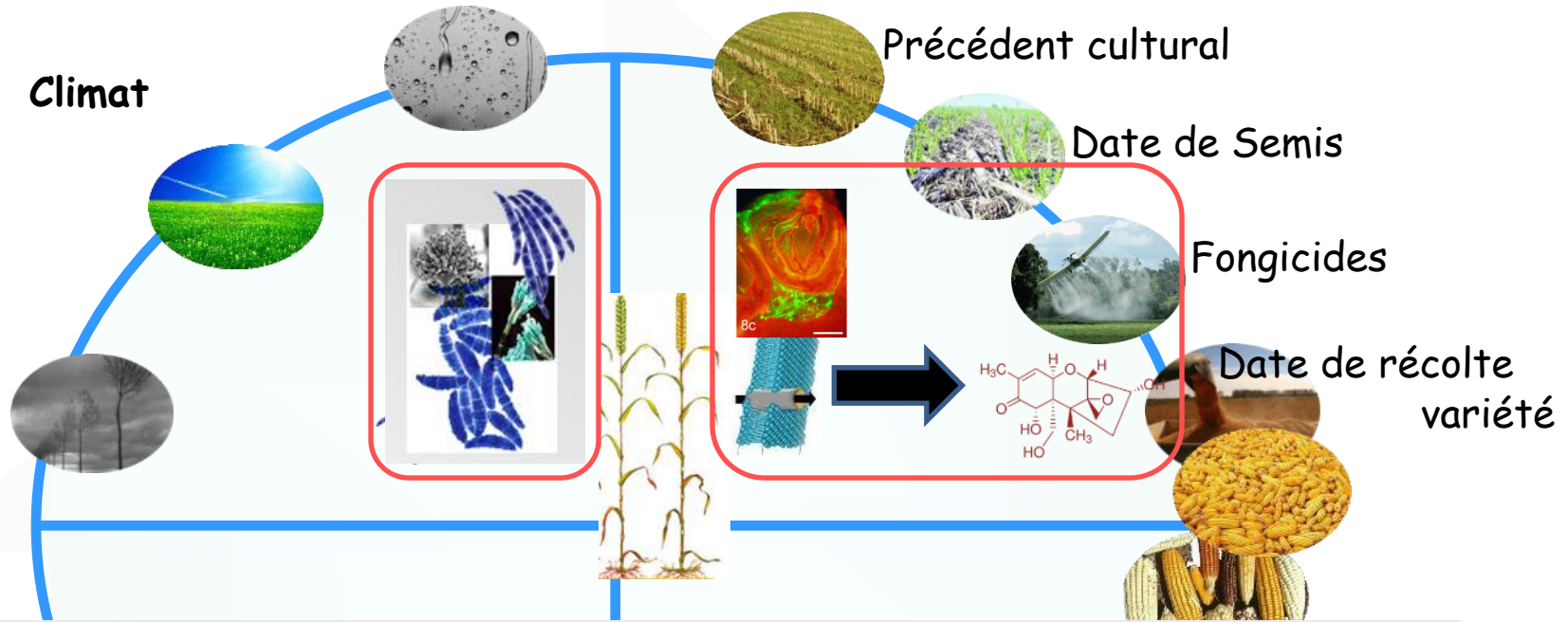
*Synthèse bibliographique (120 études)*

## Complexité pour caractériser l'interaction

- pour les mêmes toxines, le type d'interaction diffère en fonction de l'espèce, de la dose, et du paramètre étudié
- peu d'études montrent une **SYNERGIE**, la plupart montrent des effets **ADDITIFS** ou **MOINS QU'ADDITIF**

# Les avancées scientifiques les plus prometteuses pour une maîtrise des niveaux de contamination des grains

*La bonne connaissance des facteurs climatiques et agronomiques favorisant la contamination des grains n'est pas suffisante ...*



× Deux orientations prometteuses, principales cibles des chercheurs:

× Ecologie microbienne

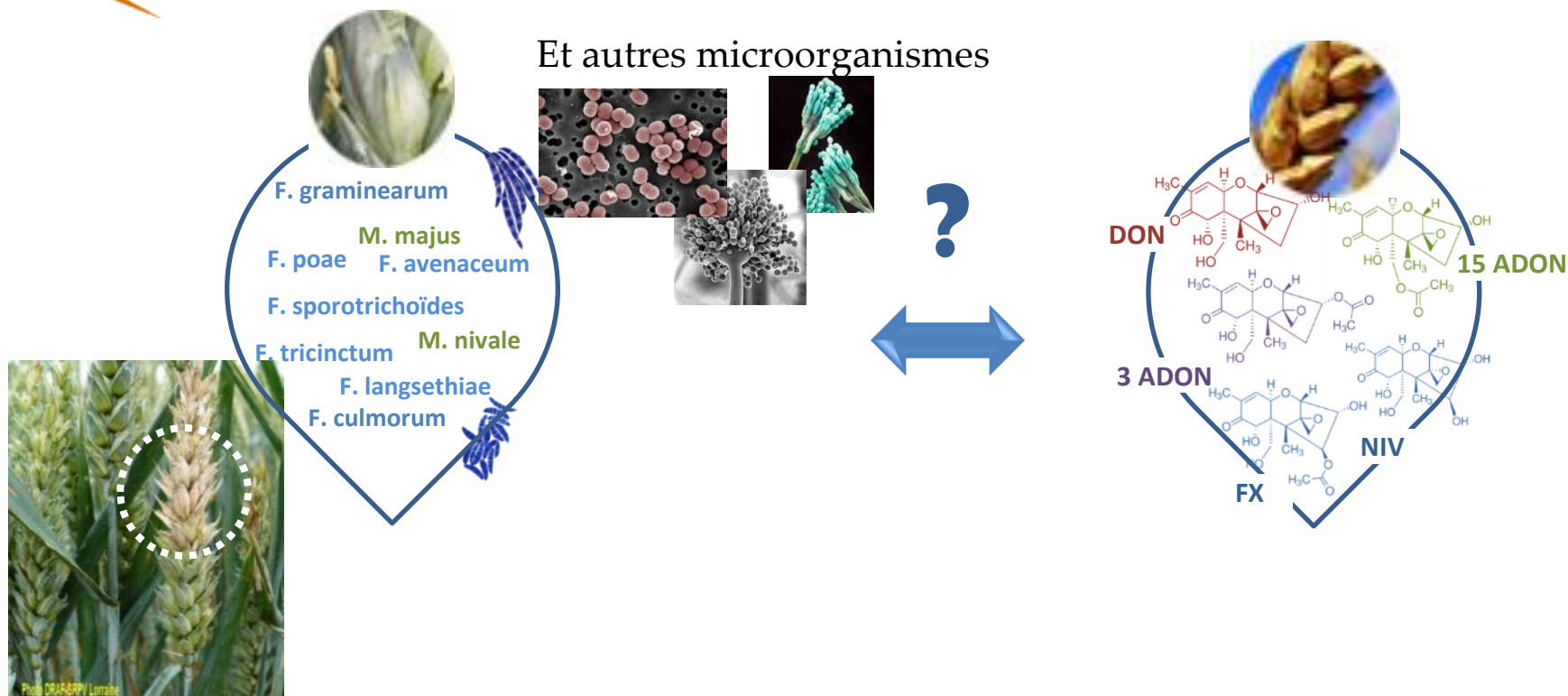
× Régulation de la biosynthèse de toxines lors de l'infection



*Une connaissance approfondie des agents toxinogènes  
et  
de leurs interactions avec la microflore du grain*



# L'accumulation de toxines dans les grains est fortement modulée par la composition de la microflore de l'épi

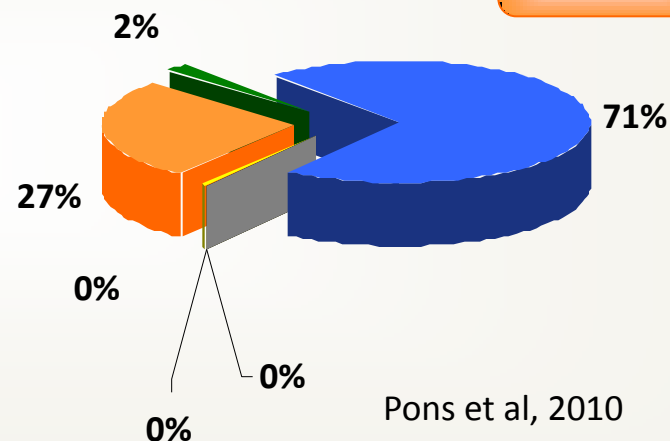
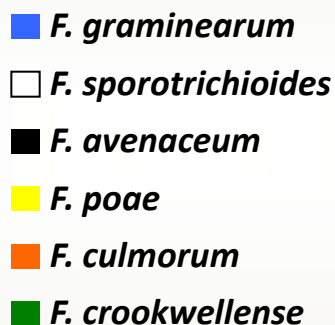
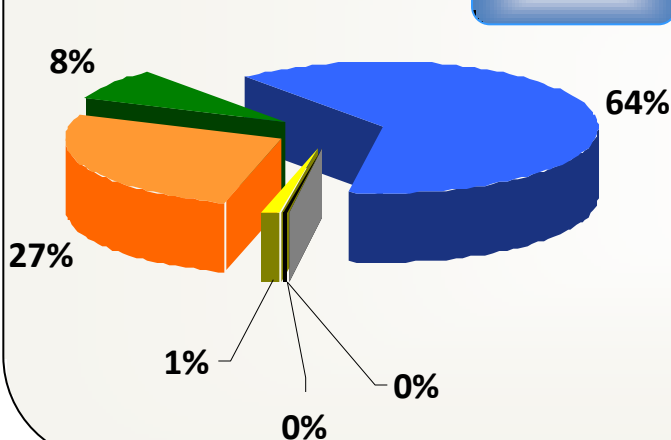


- Des outils moléculaires de prédiction du risque de contamination
- Une optimisation des modèles de prédiction de risque
- Identification d'antagonistes biologiques

# Caractérisation quantitative de la flore fusarienne toxigène présente sur les maïs français

2006

2007

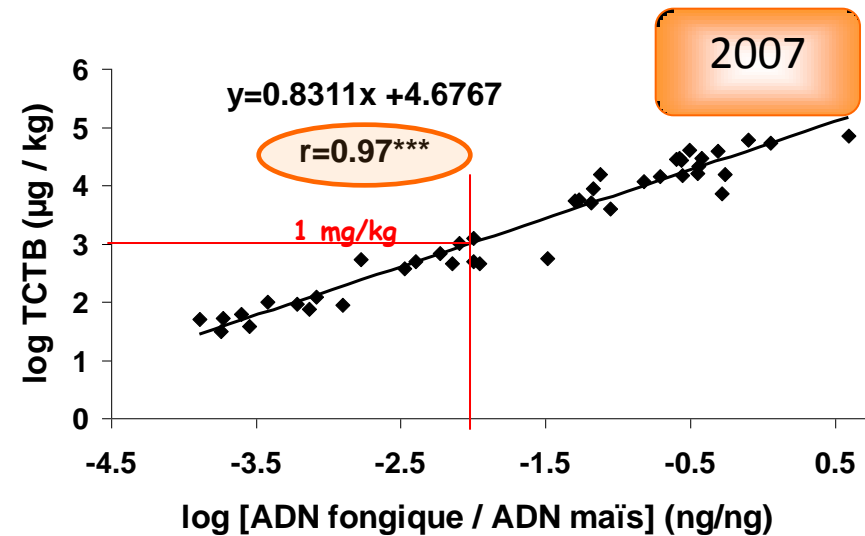
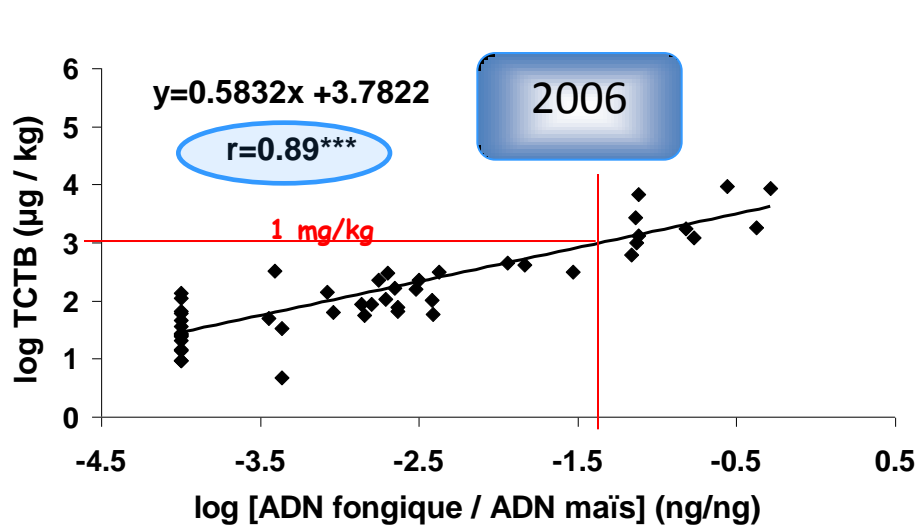


Pons et al, 2010

Identifier les espèces déterminantes dans la contamination en mycotoxines :

- Choix de l'inoculum pour cribler la sensibilité des génotypes
- Outils moléculaires pour classer les lots de céréales

# Corrélations entre l'abondance des producteurs de trichothécènes et les teneurs en toxines des maïs



Pons et al, 2010

## Excellentes corrélations



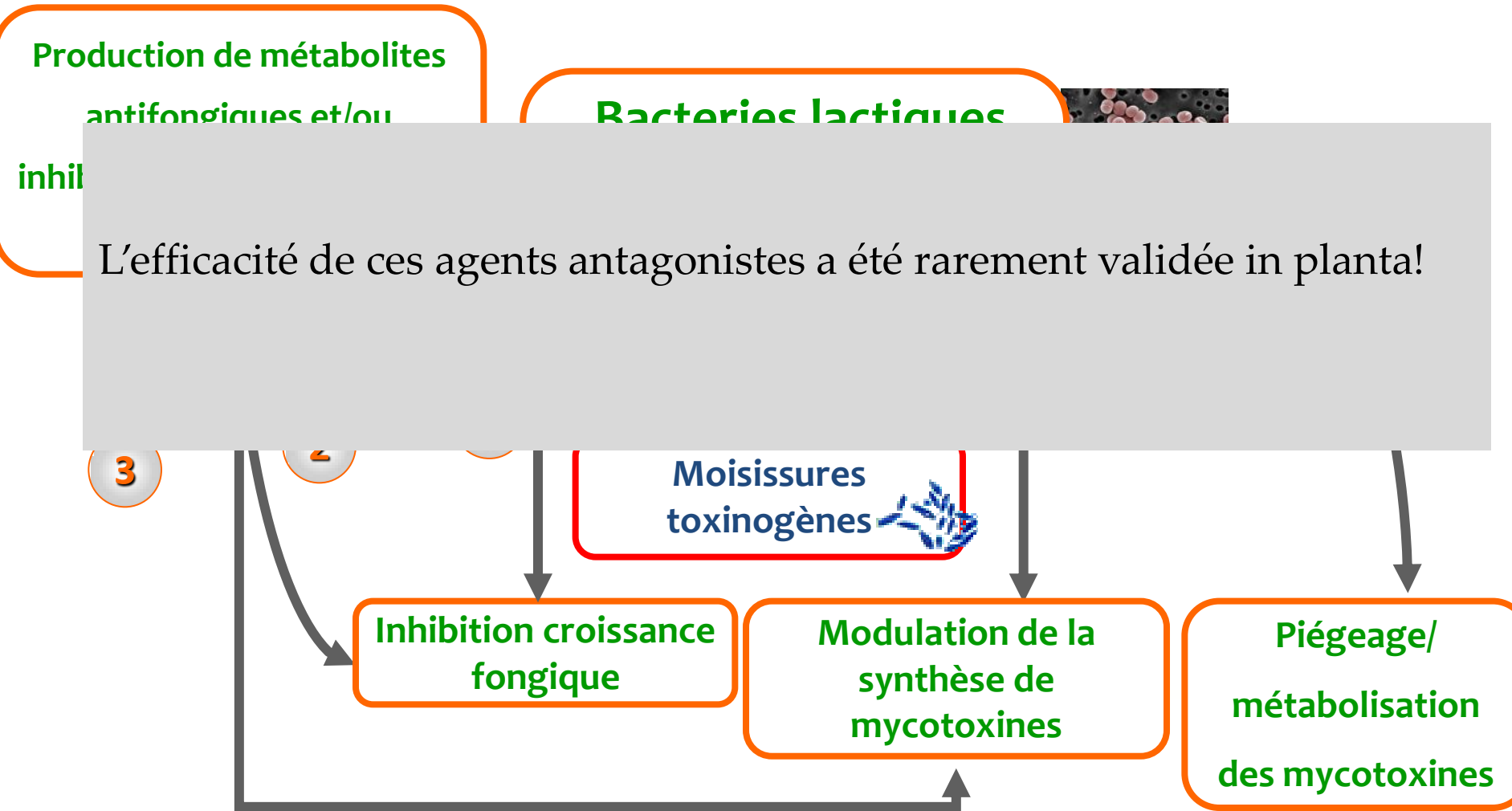
La quantification de l'ADN des agents toxigènes permet de prédire le niveau de toxines présent dans des lots de maïs.



Une corrélation qui dépend du type de mycotoxine,,,

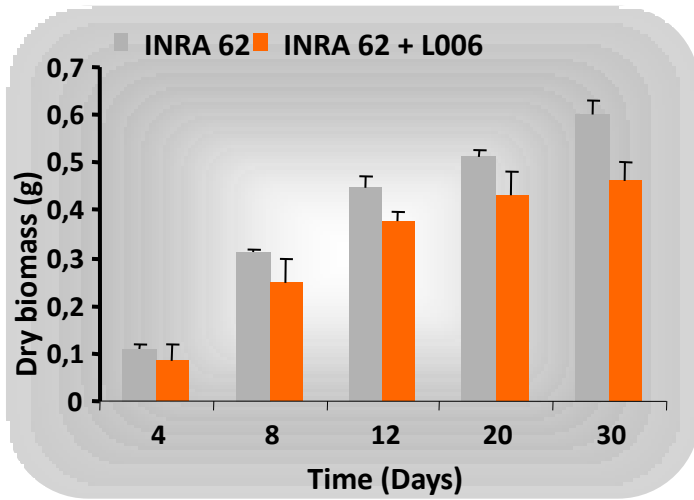
# Vers l'identification d'agents microbiens antagonistes : agents fongiques non toxigènes, bactéries, levures....

Les bactéries lactiques: d'excellents candidats avec un mécanisme d'action complet!



# Le biocontrôle, une voie prometteuse mais attention aux effets indirects !

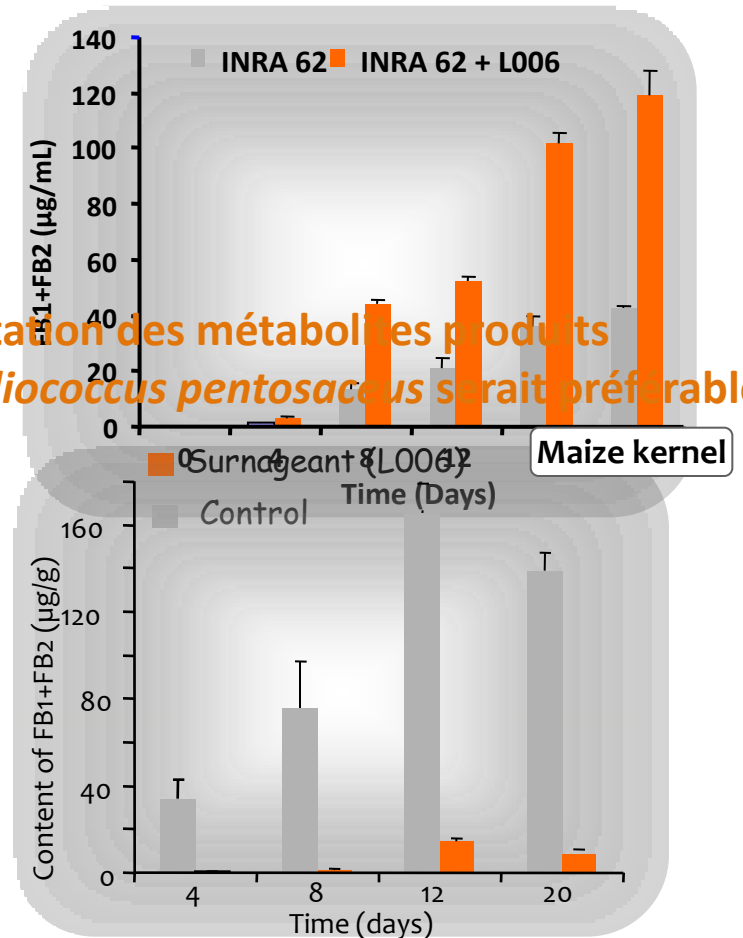
***Pediococcus pentosaceus* L006**  
inhibe significativement la croissance  
de *F. verticillioides*



**Mais induit une augmentation des niveaux  
de fumonisines...**

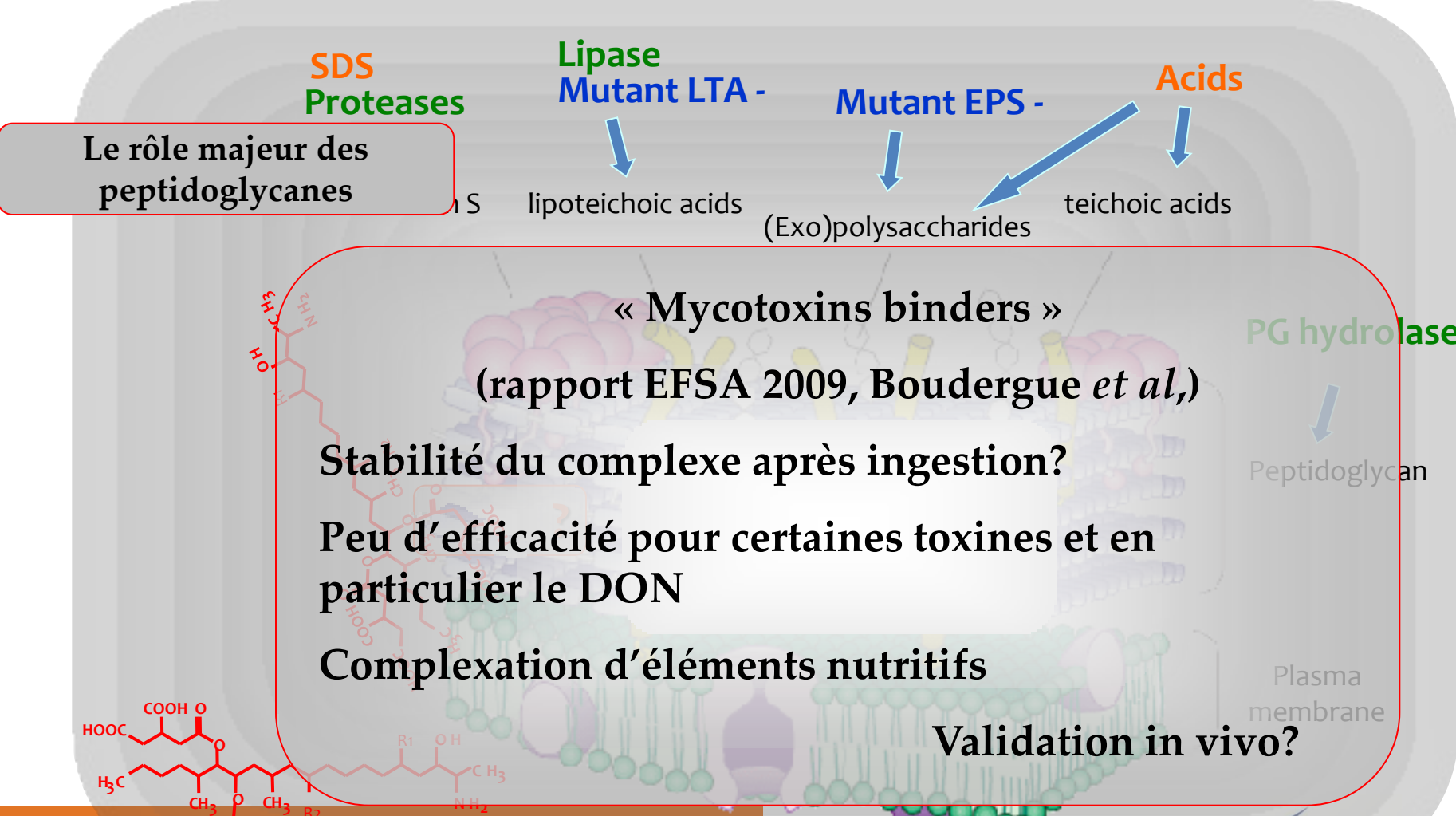


**L'exploitation des métabolites produits  
par *Pediococcus pentosaceus* serait préférable**



# Pour aller plus loin dans le piégeage des mycotoxines

(Nieder Korn et al., J. appl. Microbiol., 2009)



# Certaines levures et bactéries sont capables de métaboliser les mycotoxines...

## DON

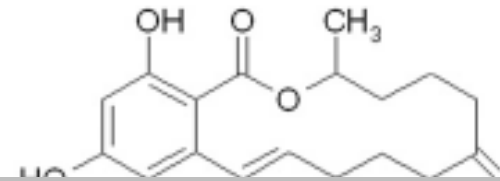
Karlovsky, 2011

Minéralisation

*Curtobacterium sp, 114-2,*  
*pseudotaphrina kochii*

## ZEA

Vekuri et al., 2010

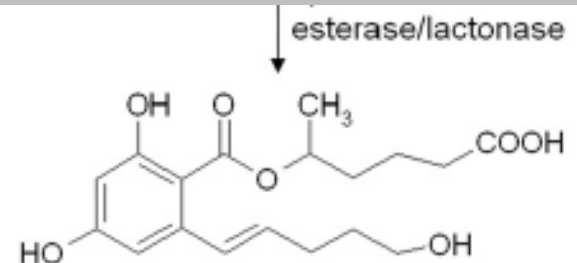


Des activités souvent instables chez des bactéries, levures isolées de sol ou compartiments intestinaux...

Comment les exploiter?

Deepoxidation

*Eubacterium sp, BBSH 797*





*Une connaissance approfondie des mécanismes de  
production et des évènements de régulation*



De nombreux facteurs sont susceptibles de moduler la toxino-génèse.

## DES SUBSTANCES NATURELLES ANTAGONISTES

Sources de carbone  
Glucose  $\ominus$  , saccharose  $\oplus$

Stress oxydatif (Pons et al., 2006,2007)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\oplus$  , diamide  $\oplus$  , ROOH  $\oplus$

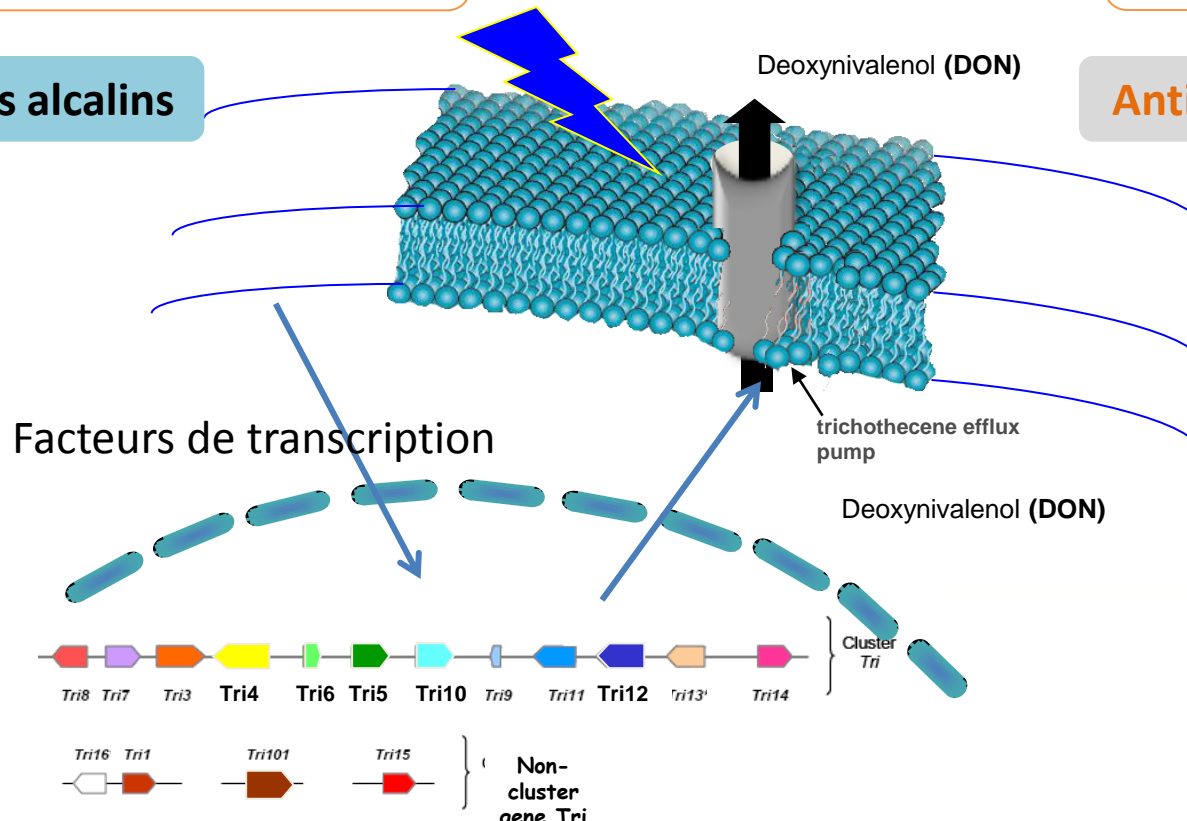
pH extérieur (Merhej et al, 2011,2012)  
(acide  $\oplus$ , neutre et alcalin  $\ominus$ )

Lumière  $\ominus$   
(Merhej et al, 2011, 2012)

Sources d'azote  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup>  $\oplus$  , agmatine  $\oplus$ , NO<sub>3</sub><sup>-</sup>  $\ominus$

Sels alcalins

Antioxydants naturels.....



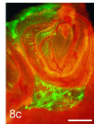
# La recherche de marqueurs biochimiques de résistance implique une analyse précise des cinétiques d'infection et toxinogénèse.

Exemple: Cinétiques associées à *F. graminearum* sur épis de maïs

**Entités modulatrices**

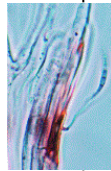
- Chlorogénique O=C(O)/C=C/c1ccc(O)c(OC)c1
- Ferulique ?
- DiFA

Accélération de l'infection



Infection du grain par *F. graminearum*

Passage par le canal des soies



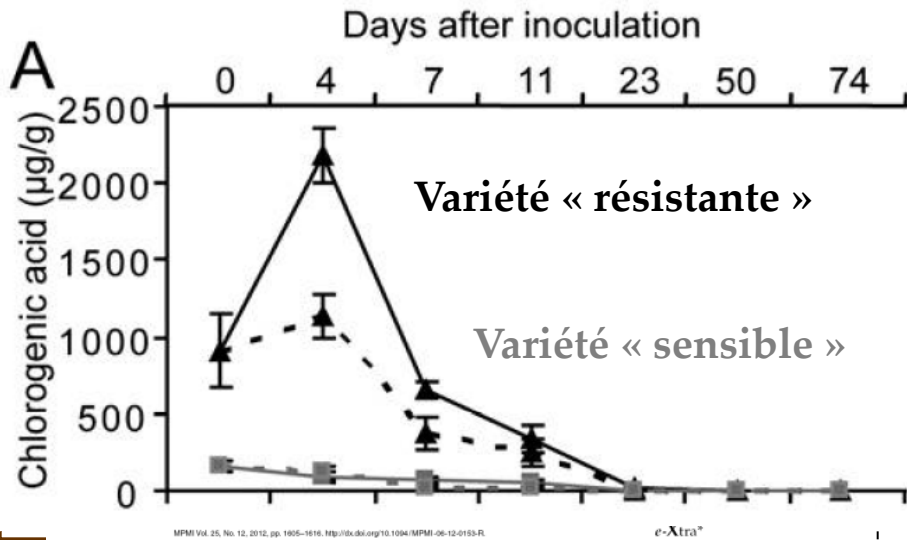
Apparition de toxine d'agr



inoculation

7 jai / 70 djai

25 jai / 250 djai

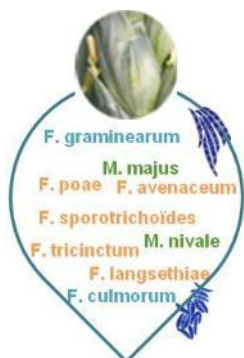


**d'agr** Chlorogenic Acid and Maize Ear Rot Resistance: A Dynamic Study Investigating *Fusarium graminearum* Development, Deoxynivalenol Production, and Phenolic Acid Accumulation

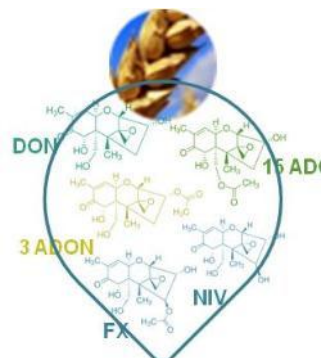
Vessela Atanasova-Penichon,<sup>1</sup> Sébastien Pons,<sup>1,2,3</sup> Laetitia Pinson-Gadais,<sup>1</sup> Adeline Picot,<sup>1</sup> Gisèle Marchegay,<sup>1</sup> Marie-Noëlle Bonnin-Verdal,<sup>1</sup> Christine Ducos,<sup>1</sup> Christian Barreau,<sup>1</sup> Joel Roucolle,<sup>2</sup> Pierre Sebahigue,<sup>2</sup> Pierre Caroto,<sup>2</sup> and Florence Richard-Forget<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1264 MycSA, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33 883 Villenave d'Ornon, France; <sup>2</sup>Monsanto SAS Peyrehorade, Croix de Pardies, 40300 Peyrehorade, France; <sup>3</sup>Euralis Semences, 41000 Bois, France; <sup>4</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, INRA UR1264 MycSA, France

# Quels outils dans un avenir proche!



**Comprendre les mécanismes de contamination**



**Mieux évaluer la toxicité**



- Modèles de prédiction + précis + fiables
- Perspectives de biocontrôles
- Identification de biofongicides
- Sélection de variétés résistantes

■ Outils pour orienter les lots de grains

■ Réglementation + "protectrice"

■ Bactéries, levures, adsorbants:  
■ Voies de détoxification

# Une problématique en constante évolution

**Une réglementation en évolution avec la prise en considération de nouvelles familles de toxines.**

- Trichothécènes de type A
- Fusariotoxines "émergentes "

**Les résistances végétales se contournent et les agents pathogènes deviennent résistants aux fongicides.**



**Tout changement (climatique, pratiques agronomiques) est susceptible de modifier les équilibres de flore et en conséquence les toxines potentiellement produites.**

- Aflatoxine en pré-récolte?
- Alcaloïdes d'ergot

Merci pour votre attention!

Et pour en savoir plus!



Mai 2013

12TH EUROPEAN FUSARIUM SEMINAR



**EFs12**

**BORDEAUX, FRANCE**

<https://colloque.inra.fr/efs2013/Registration-information>



CARREFOURS  
DE L'INNOVATION AGRONOMIQUE