Traitement des échantillons destinés à l'analyses des contaminants des céréales. Méthode de dosage des mycotoxines.

Mireille **Barbaste**, INRA USRAVE (mbarbast@bordeaux.inra.fr)

Vessela **Atanasova-Penichon,** INRA MYCSA (vatanaso@bordeaux.inra.fr)

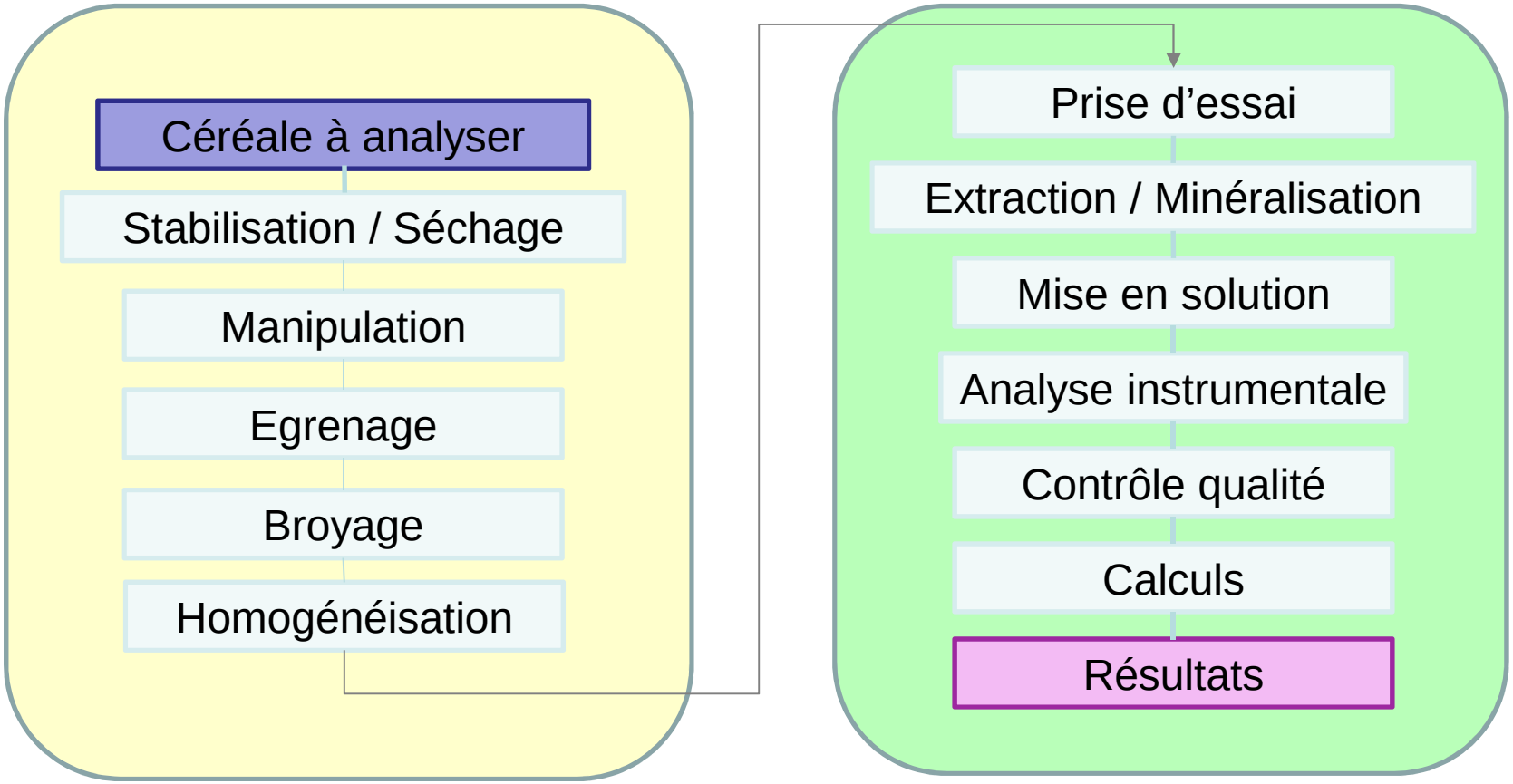
Florence **Forget-Richard,** INRA MYCSA (fforget@bordeaux.inra.fr)

L'analyse : un processus qui commence au champ …

- Précautions au cours du prélèvement :
  - outils adaptés
  - représentativité de l'échantillon

→ Méthode concernant les éléments traces métalliques présentée cet après midi par Stéphane Faucher

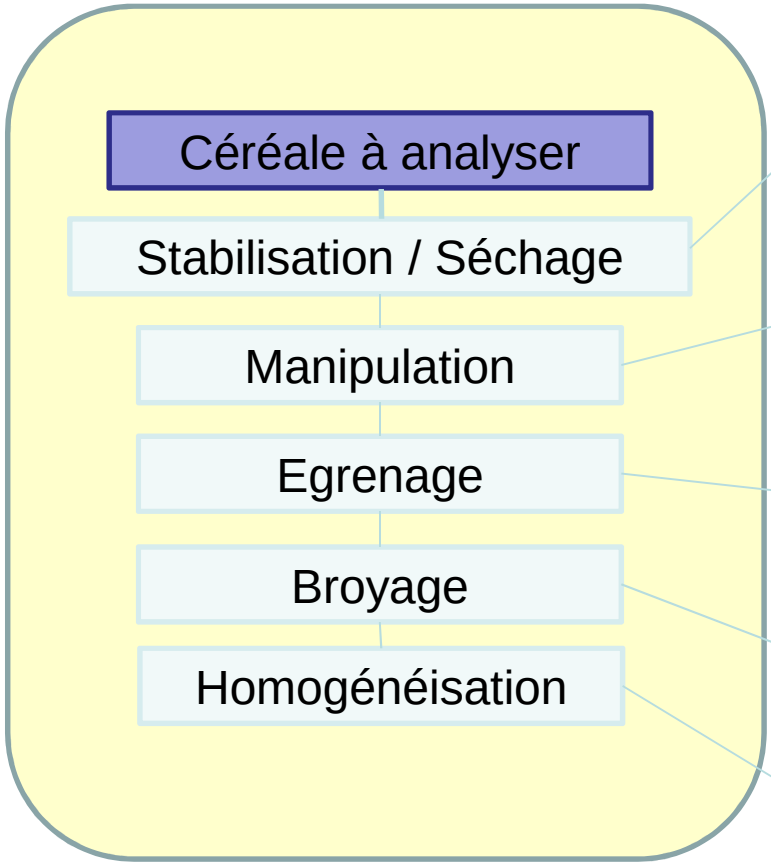
…et qui se termine au laboratoire



Etapes à risque :
Contaminations/pertes

Etapes sous contrôle :
échantillon de référence certifié

Quelles précautions pour l'analyse des ETM



Contrôler la température pour éviter les pertes (Hg par exemple)

Utiliser des gants non contaminants : vinyle non poudrés par exemple (1)

A la main ou avec une batteuse non contaminant

Avec des broyeurs non contaminant (2)

Efficace afin de maintenir la représentativité de l'échantillon

*1) Orignac, D. Masson, P. Barbaste, M. (2011) Cahier des techniques de l'INRA **72**: 07-12.*

*2) Desalme, S., Dalix, T., et al. (2011) Cahier des techniques de l'INRA **72**: 19-30.*

L’égrenage à la batteuse

L’égrenage manuel est long et fastidieux surtout pour une multiplicité de petits échantillons

De nombreux dispositifs commerciaux existent, mais souvent, les parties en contact avec l’échantillon sont métalliques (acier, inox, aluminium …)

L'égrenage à la batteuse

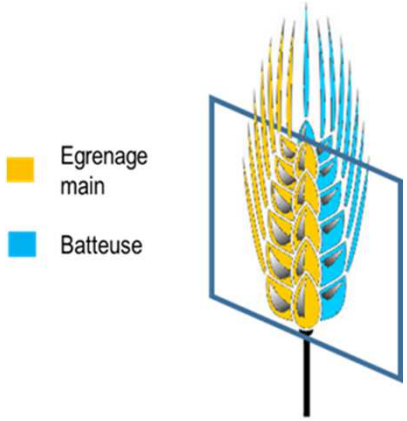
Une batteuse avec un nombre réduit de parties métalliques en contact avec l'échantillon a été trouvée auprès de la société Precision Machine USA

Les matériaux des parties en contact avec l'échantillons sont :

- L'acrylique
- Le néoprène
- L'aluminium 319

Les éléments à risque sont : Al (90%), Cu (3-4%), Mg (0,1%), Fe (1%), Mn (0,5%), Zn (0,1%), Ni (0,35%)

L'égrenage à la batteuse



Test de la contamination : 10 épis de blé prélevés dans le cadre de l'essai « prélèvement » sur l'unité expérimentale d'Auzeville

Eléments testés : Al, Cu, Mg, Fe, Mn, Zn, Ni
et aussi : P, K, Ca, Cr, Co, Mo, Pb, Cd, As

Al, As, Cr, Co, Pb < LQ

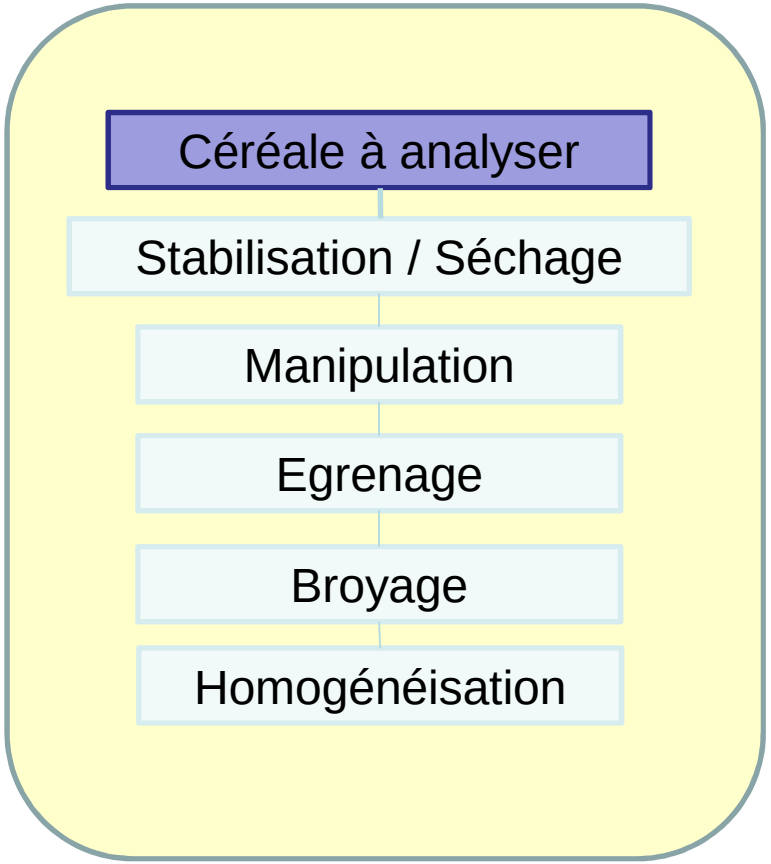
Autres éléments = résultats équivalents

Exception deux anomalies pour Fe et Ni

Essai répété pour confirmation

				Cd	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Ni	P	K	Zn
	nb grains	Masse	masse/g	mg/kg	mg/g	µg/g	µg/g	mg/g	µg/g	mg/kg	mg/kg	mg/g	mg/g	µg/g
Epi11m	26	1.28	0.049	0.138	0.505	5.81	23.9	1.23	21.1	0.395	0.136	4.29	4.58	25.1
Epi12m	41	1.9	0.046	0.212	0.526	4.94	25.6	1.15	19.2	0.383	0.085	3.97	5.16	21.4
Epi13m	27	1.23	0.046	0.162	0.488	5.13	25.6	1.19	22.7	0.386	0.103	4.2	4.99	23.3
Epi14m	33	1.19	0.036	0.166	0.513	4.87	23.2	1.08	18.9	0.353	0.12	3.74	4.7	21.6
Epi15m	32	1.39	0.043	0.186	0.517	4.86	24.7	1.16	19.6	0.34	0.097	3.89	4.58	22.9
Epi16m	26	1.09	0.042	0.156	0.446	4.4	47.5	1.08	17.8	0.278	0.11	3.27	4.24	17.1
Epi17m	43	2.08	0.048	0.234	0.567	5.25	28	1.16	20.6	0.405	0.103	3.82	5.06	22.3
Epi18m	33	1.43	0.043	0.19	0.466	5.05	24.8	1.1	17.7	0.622	0.145	3.6	4.79	23.4
Epi19m	28	1.4	0.050	0.376	0.479	5.52	26.3	1.14	31.6	0.225	0.305	3.46	4.44	28.4
Epi20m	24	1.15	0.048	0.433	0.499	5.05	31.2	1.13	35.2	0.209	0.21	3.43	4.19	28.7
Epi11b	28	1.4	0.050	0.145	0.481	5.31	25.9	1.24	20.3	0.433	0.139	4.43	4.5	25.2
Epi12b	40	1.82	0.046	0.212	0.572	4.8	33.7	1.15	18.1	0.371	0.125	3.92	4.83	20.9
Epi13b	33	1.44	0.044	0.153	0.486	5.06	47	1.16	22	0.36	0.224	4.08	4.8	22.8
Epi14b	33	1.58	0.048	0.172	0.511	5.33	25.2	1.12	19.6	0.343	0.136	3.85	4.76	22.1
Epi15b	31	1.41	0.045	0.181	0.513	4.86	26.2	1.16	18.8	0.34	0.099	3.89	4.47	22.2
Epi16b	26	1.11	0.043	0.156	0.48	4.86	27.2	1.09	17.8	0.28	0.085	3.37	4.22	20.5
Epi17b	38	1.82	0.048	0.215	0.577	5.39	25.5	1.16	19.5	0.388	0.067	3.83	4.95	21.8
Epi18b	33	1.48	0.045	0.2	0.414	5.4	24	1.08	18.5	0.631	0.115	3.53	4.77	23.5
Epi19b	25	1.31	0.052	0.372	0.471	5.64	27.1	1.13	29.6	0.222	0.274	3.45	4.41	27.7
Epi20b	/	1.23	0	0.448	0.516	5.44	31	1.16	35.3	0.218	0.186	3.5	4.3	29.4

Conclusion

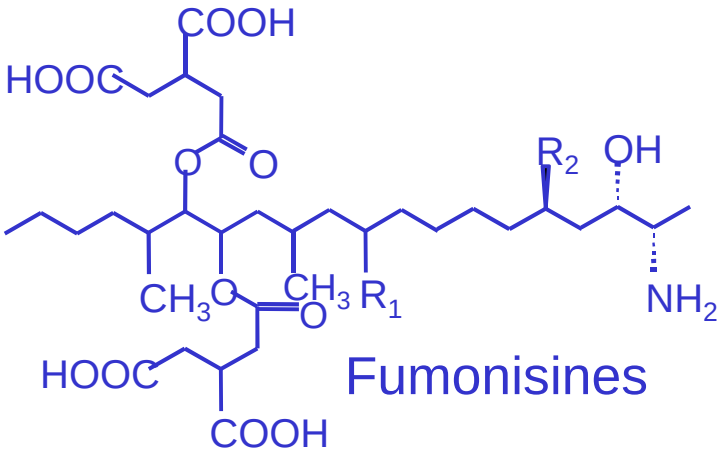


Risques maîtrisés sur les étapes de préparation

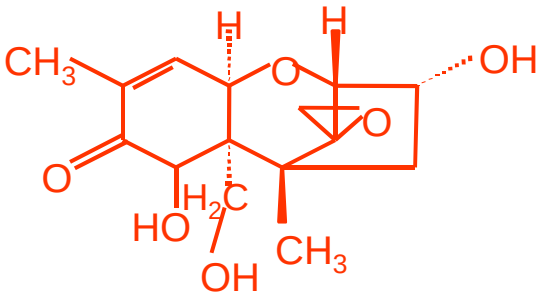
Egrenage mécanique possible avec des risques de contamination limités
(à confirmer pour Ni et Fe)

Principales mycotoxines et propriétés chimiques

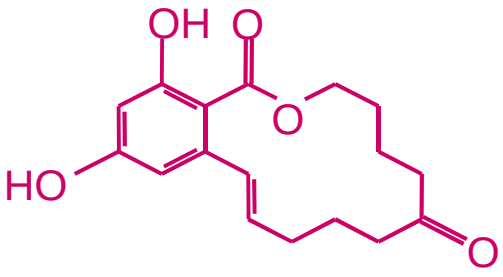
Mycotoxines s'accumulant au court du remplissage des grains



Fumonisines

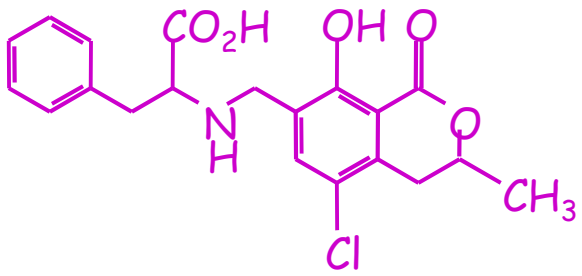


Trichothécènes

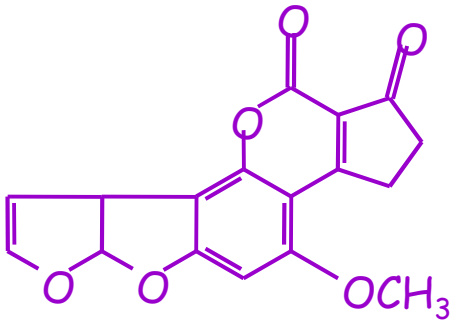


Zéaralénone

Mycotoxines de "stockage"



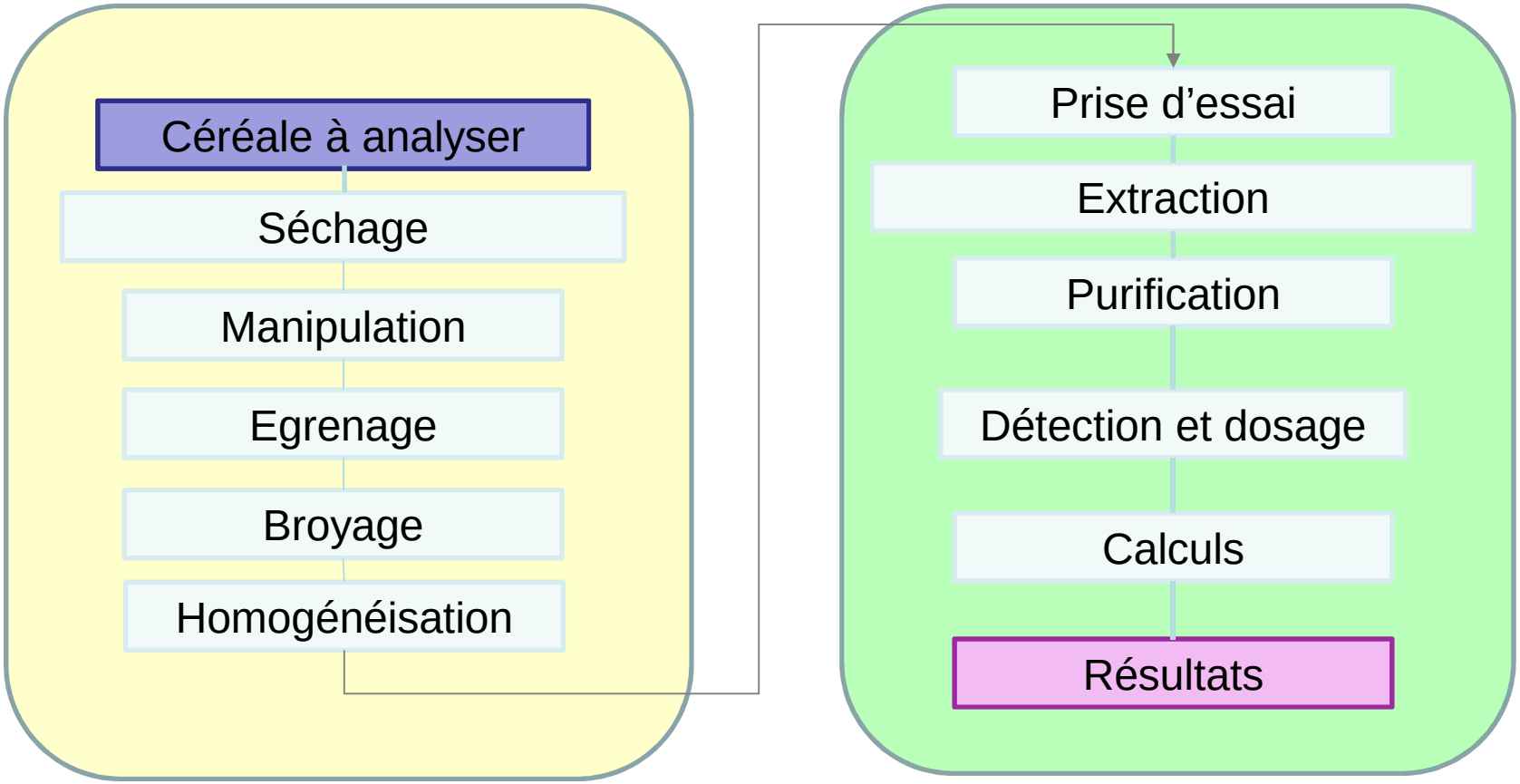
Ochratoxines



Aflatoxines

- Difficultés concernant la quantification dues à :
  - Faibles concentrations dans les céréales
  - Absence de caractéristiques physico-chimiques spécifiques
  - Absence de propriétés antigéniques

Schéma général d'une analyse



Etapes à risque :
Contaminations/pertes

Techniques d'analyse des mycotoxines

Techniques semi-quantitatives

- Technologies immunochimiques

(gamme de quantification compatible avec la réglementation, µg/kg)

  - ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)
  - ELIFA (Enzyme Linked Immuno-Filtration Assay)
    - Principe analogue à la CCM

- Spectroscopie dans le Proche Infra-Rouge (NIR)

- Non spécifique
- Surévaluation des concentrations des toxines

Dédiées aux "Screening"

Inadaptées pour la quantification fine

Nouvelles techniques d'analyse des mycotoxines

- Biocapteurs
  - Aptamères

- Les aptamères sont des séquences spécifiques d'acides oligonucléiques qui sont capable de se lier à des molécules cibles

  - Exemple: Ochratoxine (Rhouati et al.Toxins. 2013, 5, 1988-2008)

  - Utilisation de Polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

- Matériaux de synthèse obtenus par polymérisation de monomères autour d'une molécule patron

  - Exemple: Zéaralénone (Navarro-Villoslada et al., Sensors and actuators, 2007, 121, 67-73)

  - Résonance plasmonique de surface (SPR)

- Phénomène physique qui mesure la liaison d'un ligand sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche de carbone

  - Exemple: Aflatoxine, Ochratoxine, Fumonisines, DON, Zéaralénone (Gaag et al., Food control, 2003, 14, 251-254)

    - Avantages

- Les polymères sont synthétisés chimiquement
- Plus stable que les anticorps
- Moins chers que les anticorps

Techniques d'analyse des mycotoxines

Techniques quantitatives

- Techniques chromatographiques

Séparation des composés avant leur détection

- Chromatographie liquide (HPLC)

  Composés polaires et non-volatils

  - Détecteur : fluorimètre
  - Détecteur : DAD
  - Détecteur : spectromètre de masse

- Chromatographie gazeuse (GC)

  Composés apolaires et/ou volatils

} Nécessité de dérivatisation

Comparaison des techniques d'analyse des mycotoxines

	Sensibilité	Spécificité	Avantage	Inconvénient
NIR	+	+	rapide coût	peu sensible Interprétation
Immunochimie	+++	+	sensible rapide	peu spécifique
Biocapteurs	sensibilité, reproductibilité et répétabilité en cours d'optimisation			Interférences matrice
CPG/ECD **CPG/SM**	+++	++ +++	sensible spécifique	dérivation purification coût
HPLC/FLUO	++++	++	sensible	dérivation purification
HPLC/UV-VIS	++	++	pas de dérivation	peu spécifique purification
HPLC/MS/MS	++++	++++	sensible spécifique	coût appareil

Techniques mono et multi-résidus

CCM Immunochimie CPG/ECD ou SM HPLC/UV ou FLUO

Méthodes mono-résidu

Une molécule

Une famille de molécules

coûts !!!

Méthode multi-résidus !!!

Plusieurs molécules de différentes familles en une analyse

HPLC/MS/MS

Références bibliographiques

- Huybrechts et al., 2013. Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles :une revue. Cahiers Agricultures, 22, 202-215.

- Derrien et Bayoudh, 2008. Huybrechts et al., 2013. Polymères à empreintes moléculaires, intérêt et applications pour l'analyse. Specrta Analyse, 260, 30-34.

- Rapid Methods for Mycotoxin Detection. World Mycotoxin Journal., Editor: Hans P. van Egmond. 2014, 7, 4,