

RMT

AL-CHIMIE

CONTAMINATIONS CHIMIQUES
DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE



ACTIA

Avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale développement agricole et rural CASDAR

 **MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION**
*Liberté
Égalité
Fraternité*

1^{ère} journée de transfert du RMT Al-chimie

Les analyses de sclérotés et d'alcaloïdes d'ergot

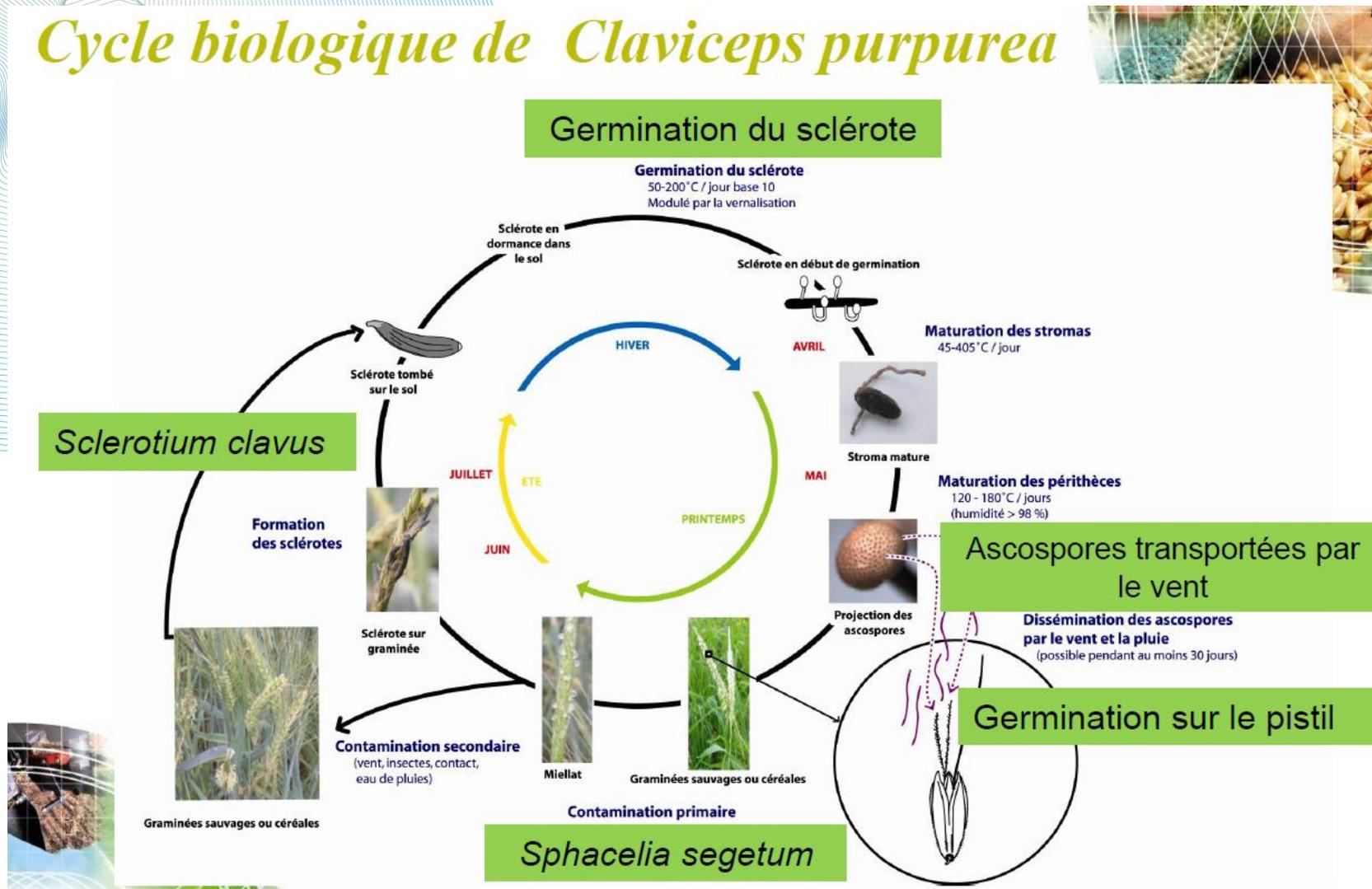
Graziella RIGAL - Laboratoire FranceAgriMer - Groupe de travail 3 -



Généralités

- ➔ Point bibliographique
- ➔ Point réglementaire

Cycle biologique de *Claviceps purpurea*



Source : ARVALIS-Institut du végétal

Les sclérotés d'ergot sont :

- ⇒ Présents à la récolte des céréales à paille
- ⇒ Répartis de façon hétérogène
- ⇒ De tailles très variables



CONTAMINATIONS CHIMIQUES
DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE

- ⇒ Les ergots contiennent plus de 40 alcaloïdes dont 12 sont à l'heure actuelle réglementés sous la forme d'une somme
- ⇒ La concentration des alcaloïdes d'ergot contenue dans les sclérotés est très variable (données Arvalis : de 57 à 36385 µg/g)
- ⇒ L'établissement d'une relation directe entre une masse de sclérotés et une quantité d'alcaloïdes ne peut être qu'approximative car la relation est non linéaire néanmoins on peut retenir que :

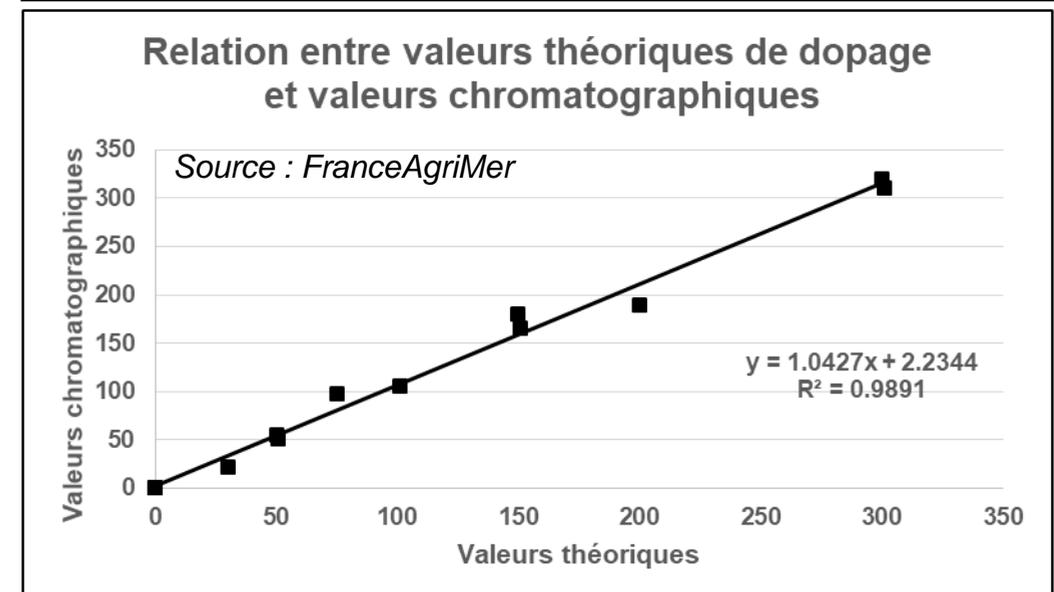
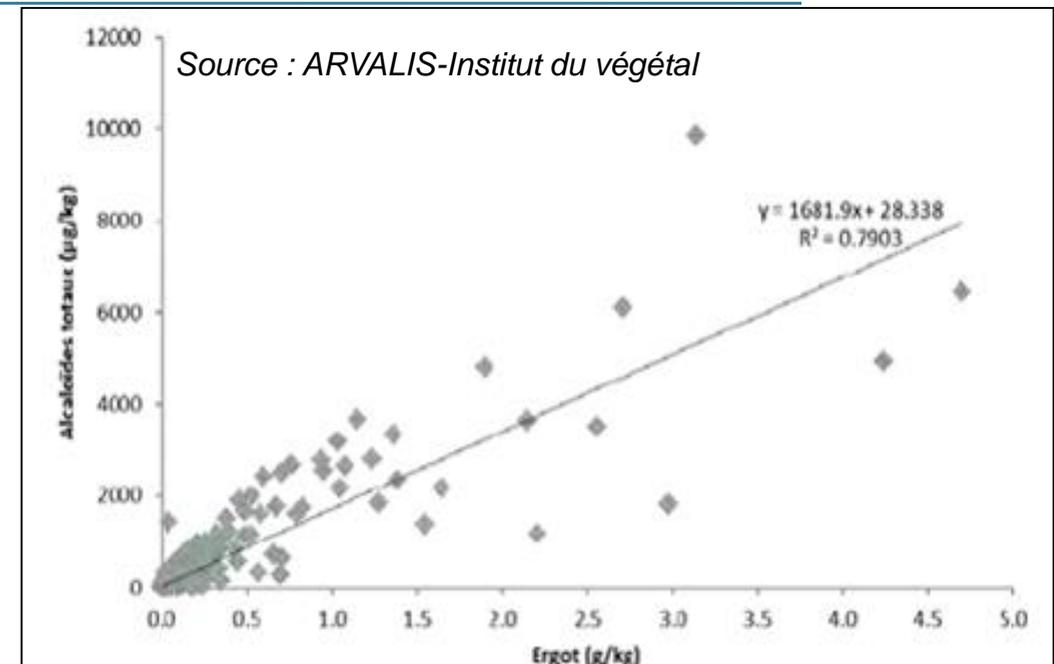
1 gramme de sclérote d'ergot contient environ 3103 µg d'alcaloïdes soit 0.3 % (données ARVALIS)

Dopage de plusieurs niveaux lors d'essais menés par FranceAgriMer :

→ Bonne corrélation entre la masse de poudre d'ergot et la concentration en alcaloïdes (même poudre en ergot utilisée)

Exemple : pour un dopage théorique à 100 µg/kg, rajout de 0.032 grammes de poudre de sclérote à 1 kilogramme de broyat de céréales

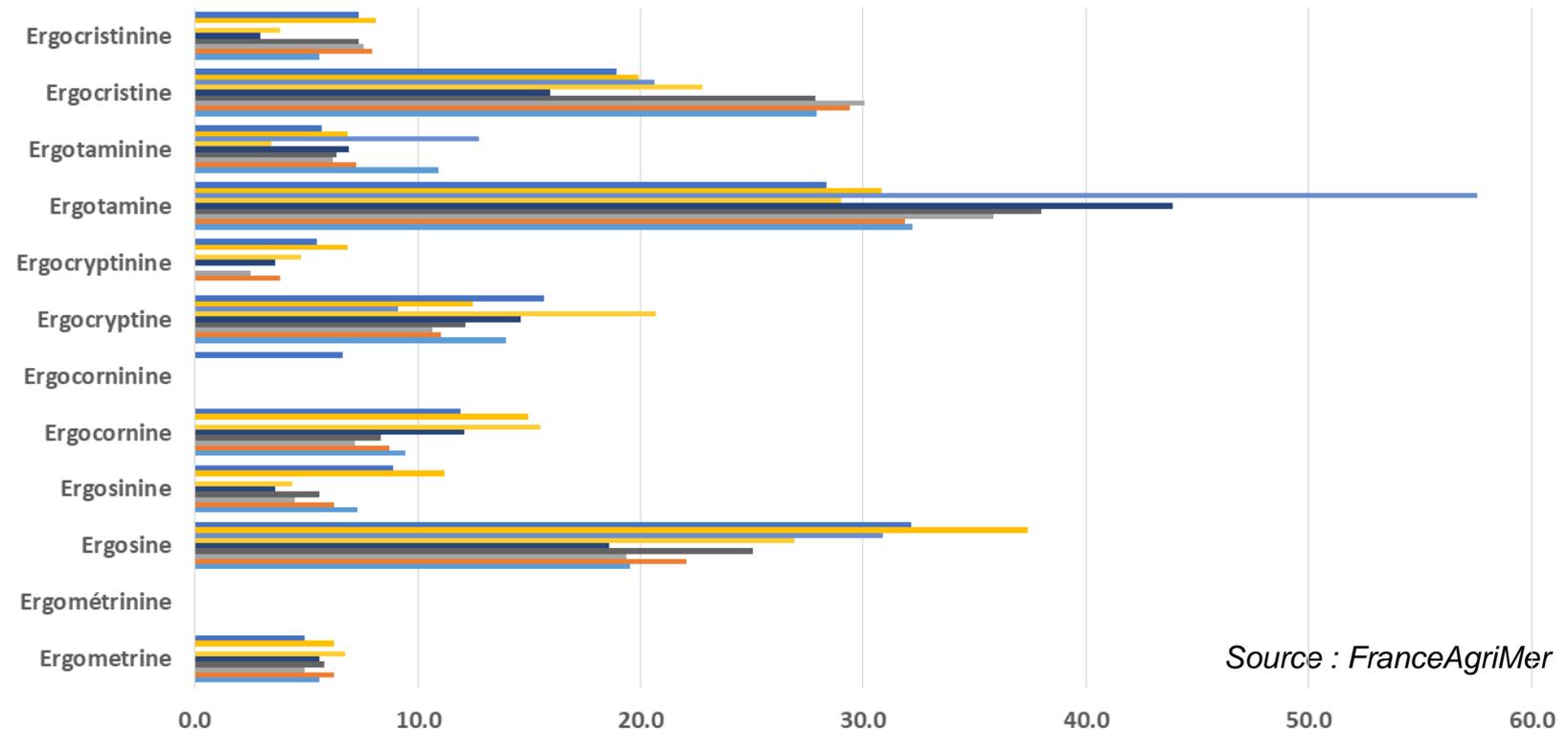
Point bibliographique



⇒ La répartition des 12 alcaloïdes est différente d'un sclérote à l'autre et n'est pas stable dans le temps (phénomène d'épimérisation réversible)

| Formes -ine | Formes -inine (épimères) |
|--------------|-----------------------------|
| Ergocristine | Ergocristinine |
| Ergotamine | Ergotaminine |
| Ergocryptine | Ergocryptinine |
| Ergocomine | Ergocominine |
| Ergosine | Ergosinine |
| Ergomethrine | Ergomethrinine |

Répartition des alcaloïdes en % sur farines
Valeurs en alcaloïdes totaux >à 50 µg/kg



Source : FranceAgriMer

⇒ Certains alcaloïdes restent cependant majoritaires : ergotamine, ergosine et ergocristine

CONTAMINATIONS CHIMIQUES
DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE

⇒ Des teneurs maximales réglementaires actuellement en vigueur pour les sclérotés d'ergot :

- en **alimentation humaine** (règlement 1881/2006 modifié par le règlement 1399/2021)

| Denrées alimentaires (*) | | Teneurs maximales (µg/kg) |
|--------------------------|---|--|
| 2.9 | Sclérotés d'ergot et alcaloïdes de l'ergot | |
| 2.9.1. | Sclérotés d'ergot | |
| 2.9.1.1. | Céréales brutes ⁽¹⁸⁾ , à l'exception — du maïs, du seigle et du riz | 0,2 g/kg |
| 2.9.1.2. | Seigle brut ⁽¹⁸⁾ | 0,5 g/kg jusqu'au 30.6.2024 0,2 g/kg à partir du 1.7.2024 |

- en **alimentation animale** (directive 2002/32)

| Substances indésirables | Produits destinés aux aliments pour animaux | Teneur maximale en mg/kg (ppm) d'aliments pour animaux d'une teneur en humidité de 12 % |
|--|--|---|
| 2. Ergot du seigle (<i>Claviceps purpurea</i>) | Matières premières des aliments pour animaux et aliments composés pour animaux contenant des céréales non moulues. | 1 000 |

CONTAMINATIONS CHIMIQUES
DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE

⇒ Des teneurs maximales réglementaires actuellement en vigueur pour les alcaloïdes d'ergot:

- en **alimentation humaine** (règlement 1881/2006 modifié par le règlement 1399/2021)

| Denrées alimentaires (1) | | Teneurs maximales (µg/kg) |
|--------------------------|---|--|
| 2.9.2. | Alcaloïdes de l'ergot (63) | |
| 2.9.2.1. | Produits de la mouture de l'orge, du blé, de l'épeautre et de l'avoine (ayant une teneur en cendres inférieure à 900 mg/100 g) | 100 µg/kg 50 µg/kg à partir du 1.7.2024 |
| 2.9.2.2. | Produits de la mouture de l'orge, du blé, de l'épeautre et de l'avoine (ayant une teneur en cendres égale ou supérieure à 900 mg/100 g) Grains d'orge, de blé, d'épeautre et d'avoine mis sur le marché pour la vente au consommateur final | 150 µg/kg |
| 2.9.2.3. | Produits de la mouture du seigle Seigle mis sur le marché pour la vente au consommateur final | 500 µg/kg jusqu'au 30.6.2024 250 µg/kg à partir du 1.7.2024 |
| 2.9.2.4. | Gluten de blé | 400 µg/kg |
| 2.9.2.5. | Préparations à base de céréales destinées aux nourrissons et enfants en bas âge (3) (29) | 20 µg/kg |

- en **alimentation animale** (directive 2002/32)

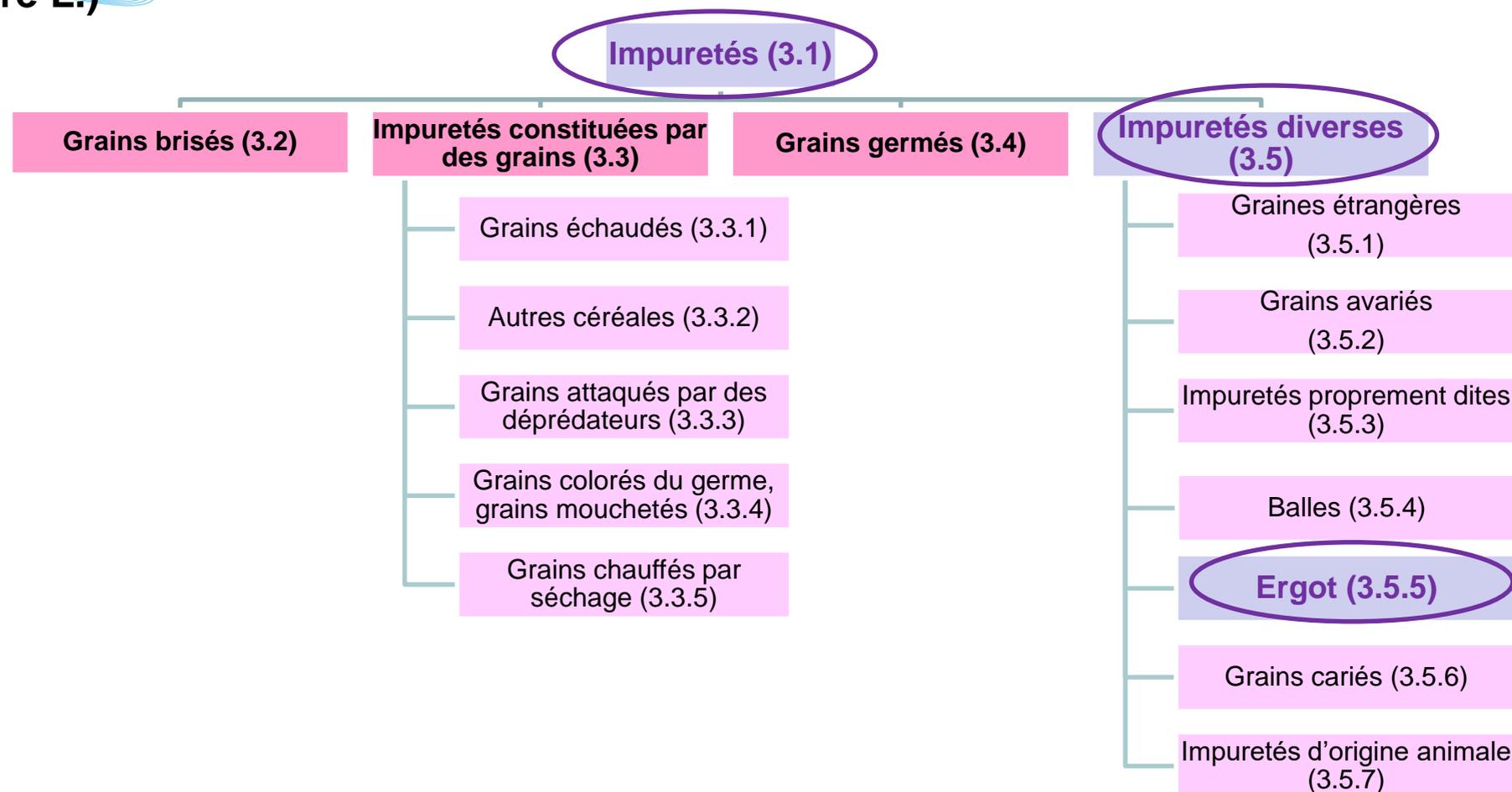
Des discussions pour l'établissement de valeurs recommandées

Méthodes de quantification des sclérotés d'ergot

- ➔ Méthode normative
- ➔ Méthode réglementaire
- ➔ Autres méthodes

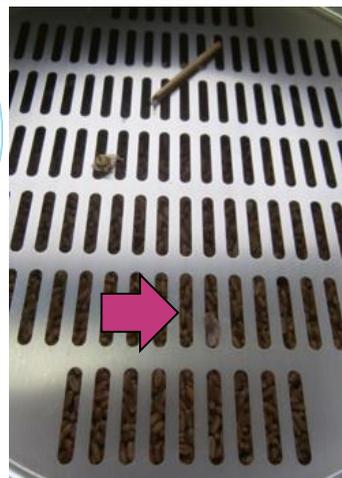
Norme NF EN 15587

Céréales et produits céréaliers - Détermination du taux d'impuretés dans le blé (*Triticum aestivum* L.), le blé dur (*Triticum durum* Desf.), le seigle (*Secale cereale* L.), le triticales (*Triticosecale* Wittmack spp) et l'orge fourragère (*Hordeum vulgare* L.)



Norme NF EN 15587

Prise d'essai : 250 g



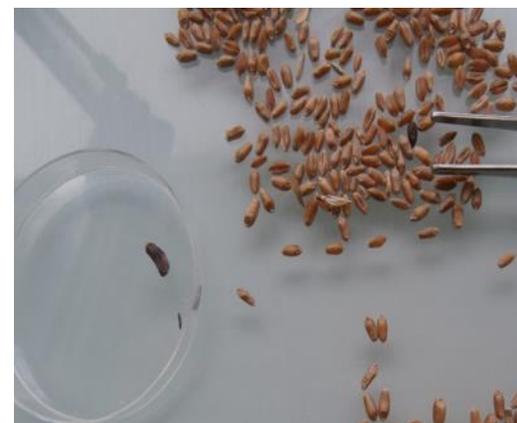
2

Recherche des ergots
Sur le tamis 3,55 mm
Sous le tamis 1 mm

1

Tamisage 30
secondes
(3,55 et 1 mm)

3

Recherche des ergots
Fraction retenue du tamis de 1 mm

4

Pesée des sclérotés d'ergots
Ramener le résultat en
g/kilogramme

5

Si l'on trouve plus de
0,5 g/kg d'ergot :
effectuer la recherche
sur l'échantillon entier
ou au moins 1 kg

PROJET de modification règlement 401/2006

Objet : rajout d'une méthode de recherche de sclérotés d'ergot

- méthode visuelle et optique de recherche d'ergot : quantification (g/kg)
- méthode chimique d'identification d'ergot : qualification

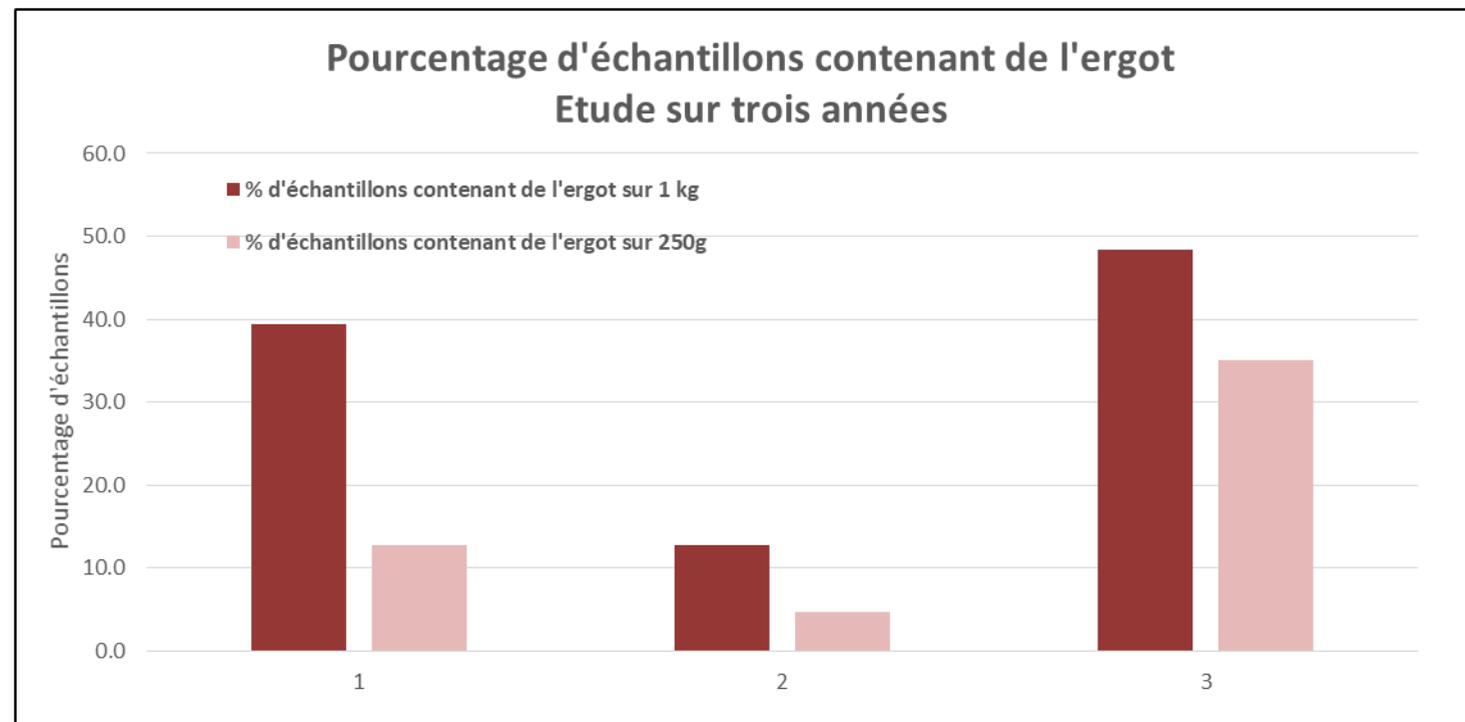
Quelques différences entre la norme NF EN 15587 et le projet de modification du règlement :

- l'usage
- la masse de l'échantillon de départ
- la masse des sous échantillons
- l'exclusion des fractions inférieures à 0.5 mm

CONTAMINATIONS CHIMIQUES
DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE

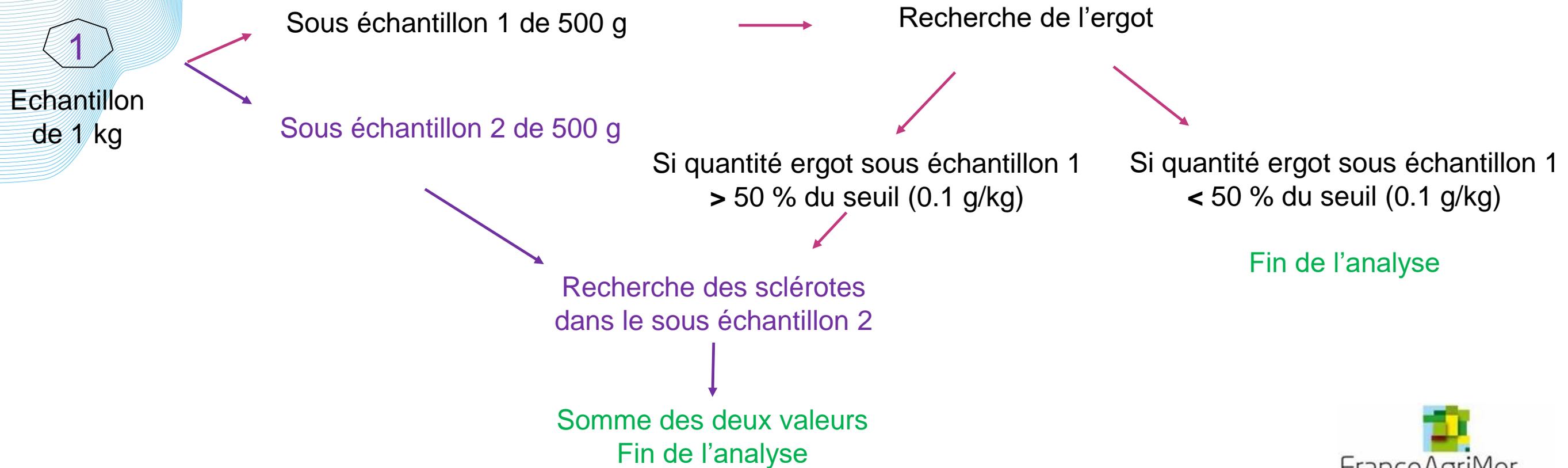
1/ Comparaison d'une recherche sur 1 kilogramme et sur 250 grammes (NF EN 15587) pratique FranceAgriMer

- Etude menée sur trois ans rassemblant 451 échantillons de blé tendre

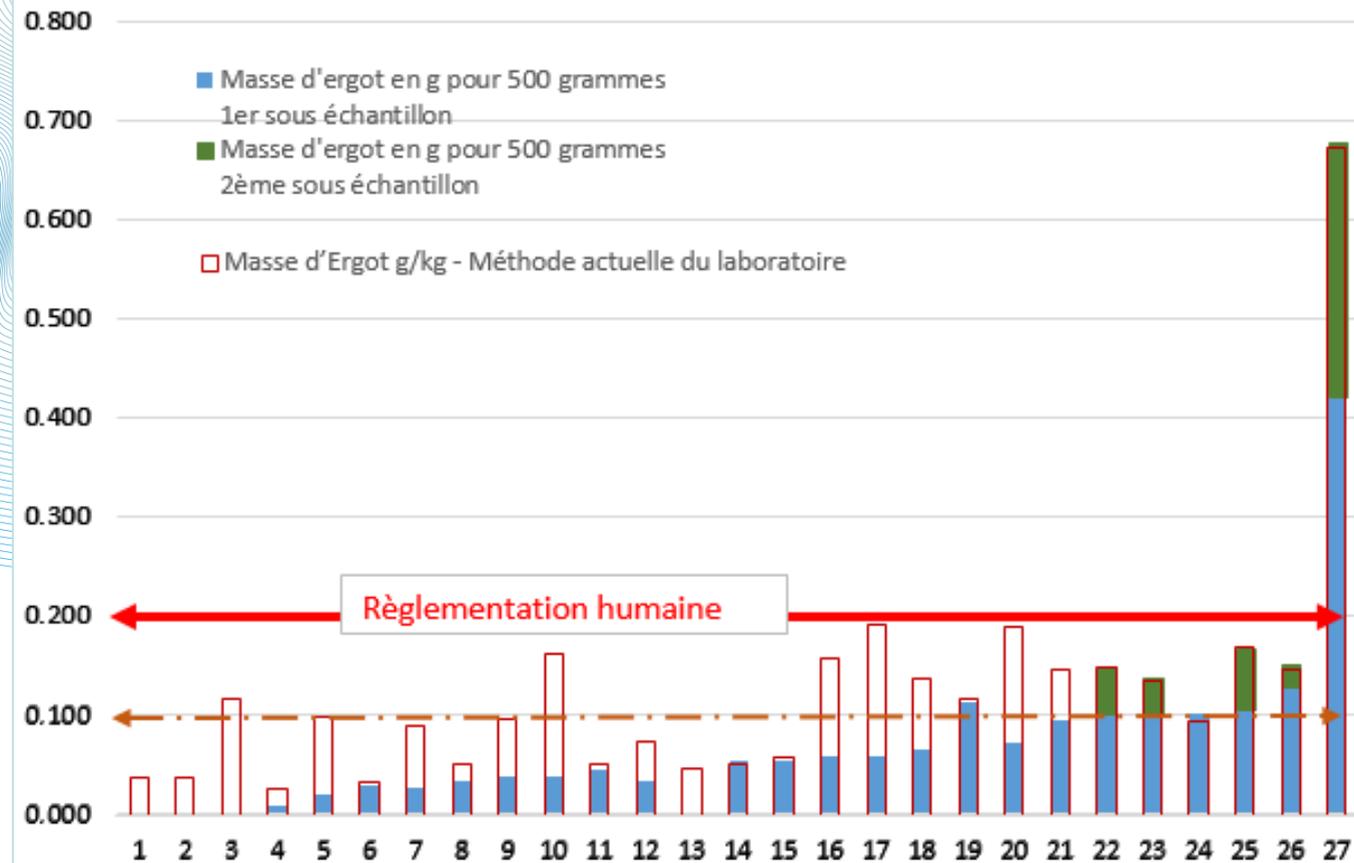


- La recherche sur 1 kilogramme entraîne plus de détection de sclérotés que sur 250 g

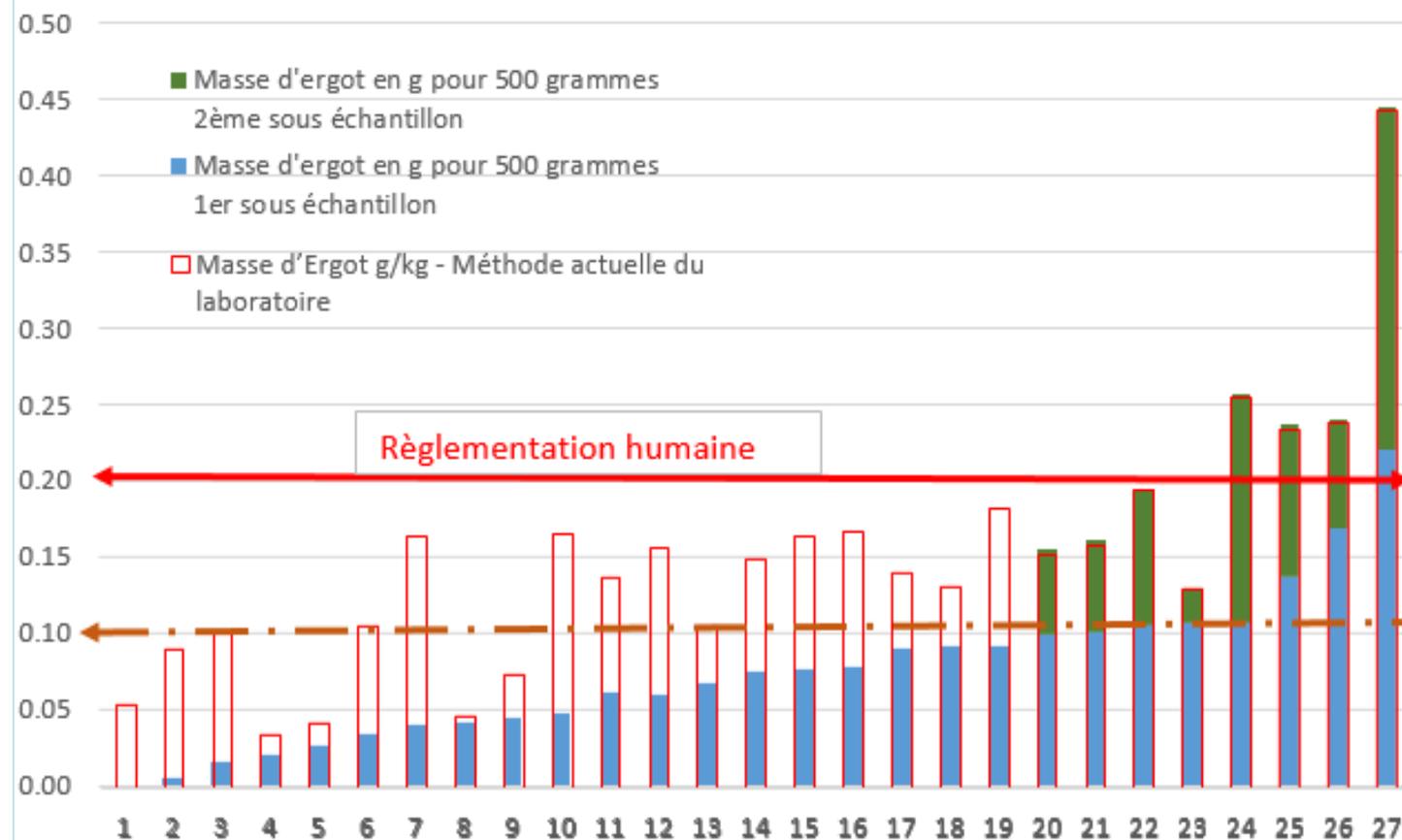
2/ Comparaison d'une recherche sur 1 kilogramme et sur 500 grammes (étude FranceAgriMer)



Comparaison des deux méthodes - Blé dur



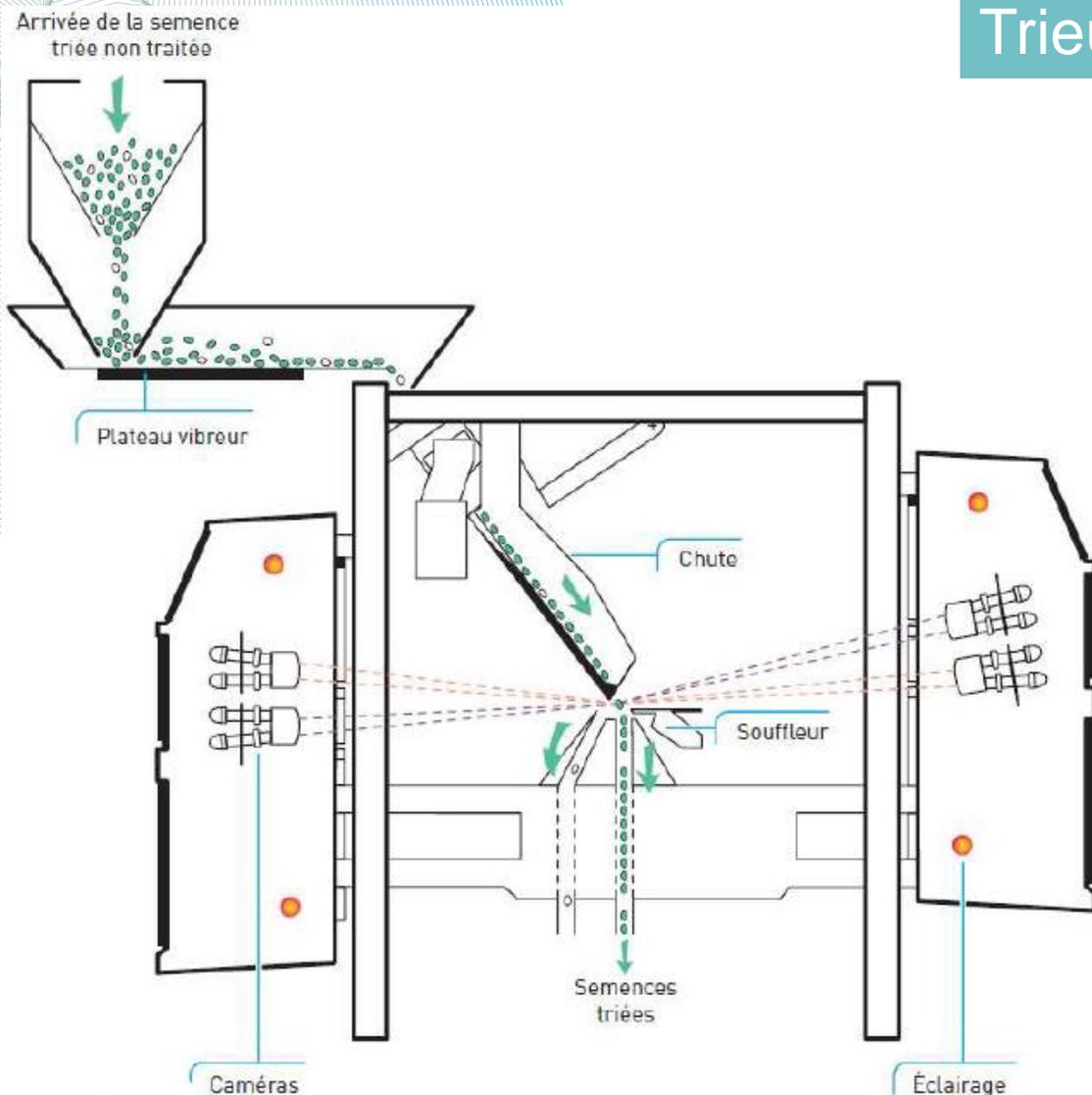
Comparaison des deux méthodes - Blé Tendre



➤ Avec ce panel pas de prise de risque de réaliser la recherche d'ergot sur 500 grammes

Méthodes de reconnaissance et de tri des sclérotés d'ergot automatisée sur céréales

Trieurs optiques



Source : GNIS et ARVALIS



Source : ASM

Exemple : Trieur de graines LABSEED 1000 (ASM/VTI)

Matrices : blé tendre, blé dur, orge, triticale...

Tri entre 25 à 30 kilogrammes/heure

Conçu pour petites quantités: utilisable en laboratoire ou petits producteurs

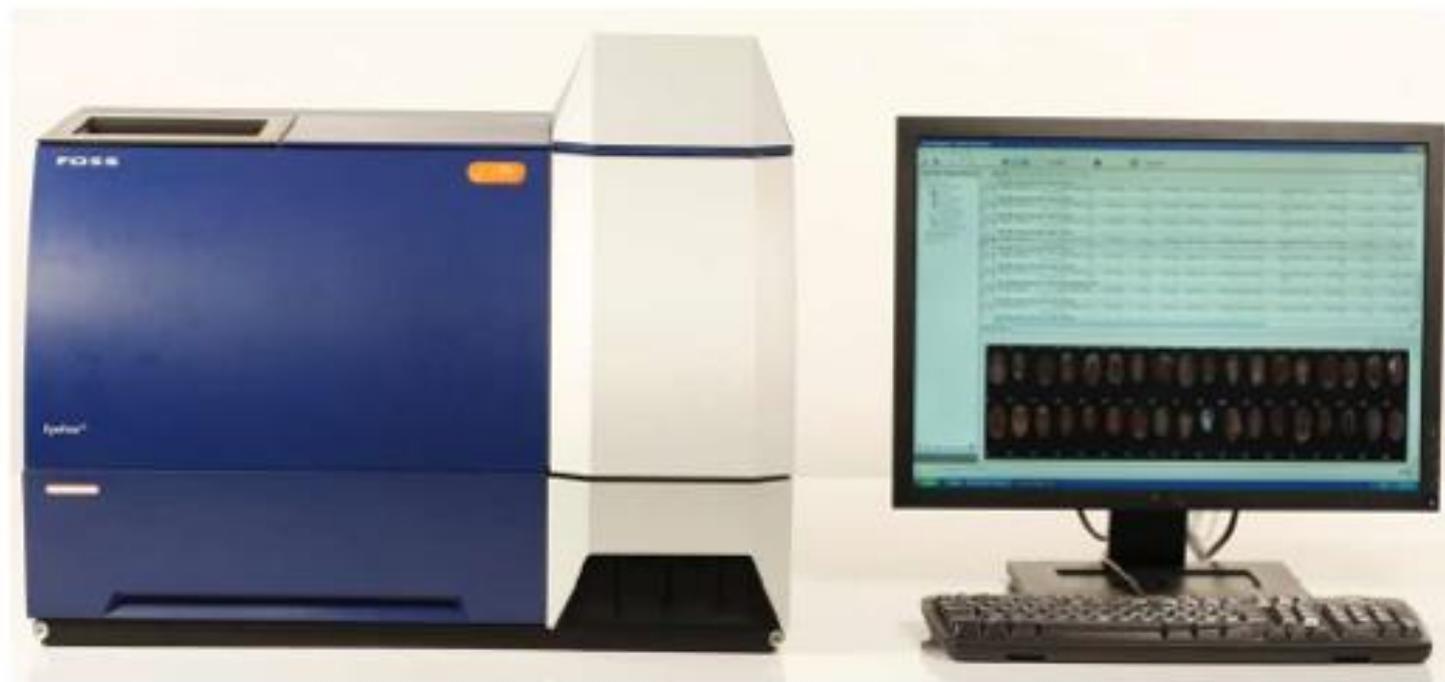
Nécessite une prise en main pour effectuer des réglages en fonction de l'objectif (refus) :

- vitesse d'alimentation
- contrastes caméras
- Taille en pixels etc...

Méthode de reconnaissance et de quantification de sclérotas d'ergot automatisée sur céréales

EyeFoss™ (société FOSS)

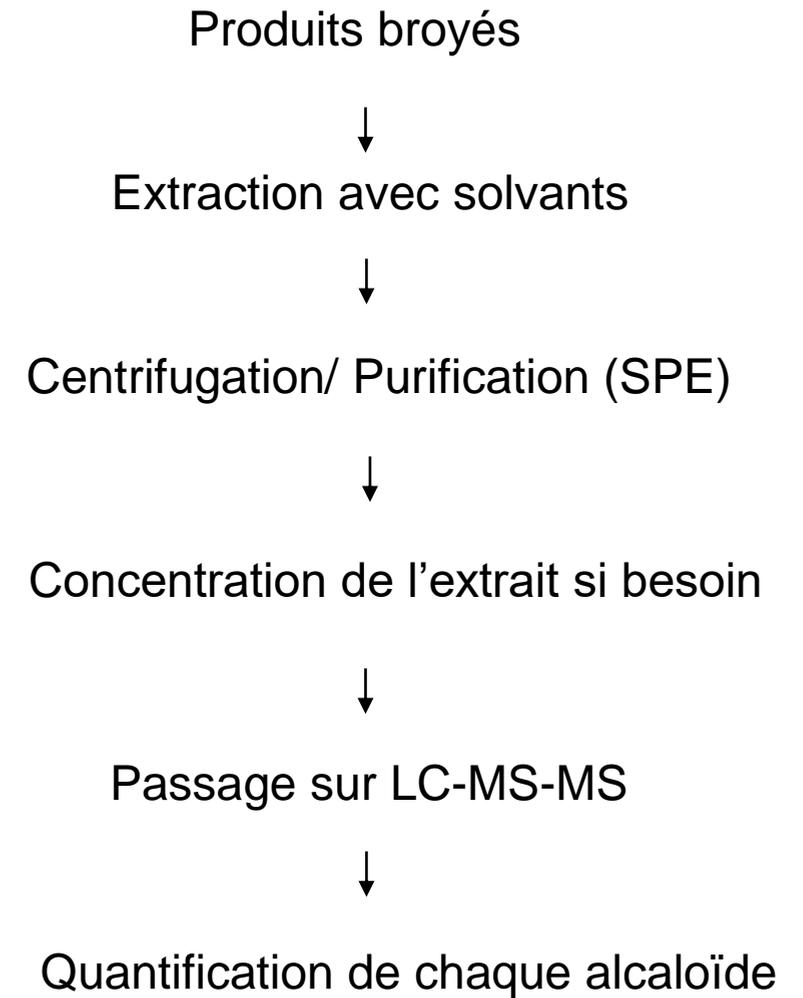
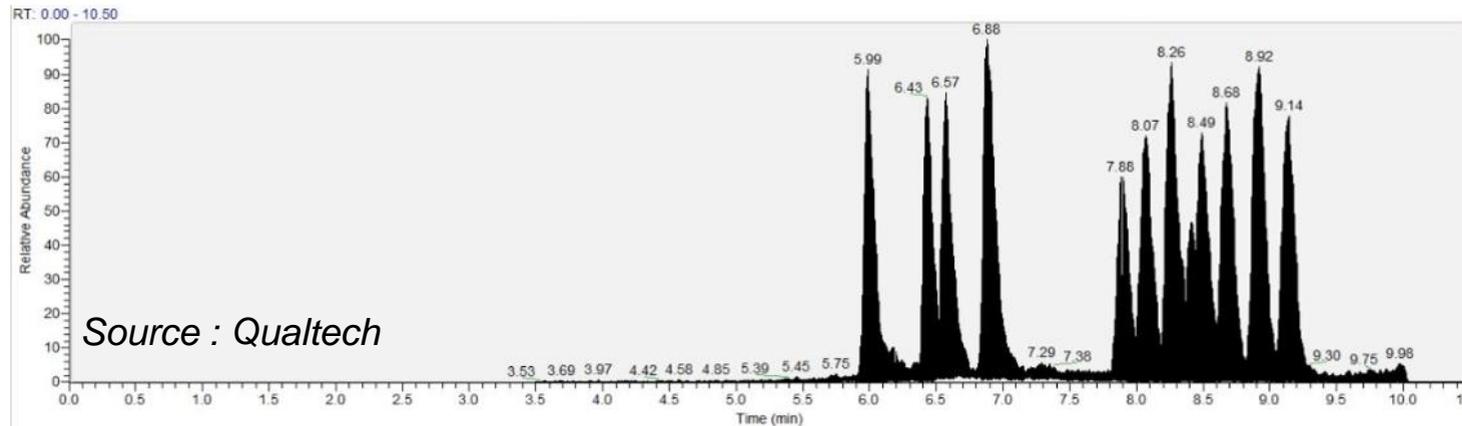
- Commercialisé en France depuis 2019
- Utilisable en laboratoire ou chez les collecteurs
- Matrices : Blé tendre, blé dur et orge
- 500 grammes de grains par passage
- Résultats dans un laps de temps restreint (4 minutes)
- Maintenance : vérification zéro appareil et de nettoyage



Méthodes de quantification des alcaloïdes d'ergot

- ➔ Méthodes chromatographiques
- ➔ Autres méthodes

Grandes étapes des méthodes chromatographiques :



Quantification les 12 alcaloïdes de manière individuelle

* Méthodes Normalisées (AFNOR) :

NF EN 17425 – (07/2021) - **Produits alimentaires**

Dosage des alcaloïdes de l'ergot dans les céréales et les produits céréaliers par purification par dSPE et CL-SM/SM

Le présent document décrit une méthode pour le dosage de la somme des six alcaloïdes de l'ergot (ergocornine, ergométrine, ergocristine, ergotamine, ergosine et ergocryptine) et de leurs épimères (inines) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) après purification par extraction sur phase solide dispersée (dSPE).

NF EN 17256 – (11/2019) - **Aliments des animaux**

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse - Détermination de la teneur en alcaloïdes de l'ergot et en alcaloïdes tropaniques dans les matières premières et les aliments composés par CL-SM/SM

Le présent document décrit une méthode de détermination de la teneur en alcaloïdes de l'ergot et en alcaloïdes tropaniques dans les céréales non transformées et les aliments composés à base de céréales par chromatographie

* Méthodes Européennes (EURL):

<https://www.wur.nl/en/Research-Results/Research-Institutes/food-safety-research/Reference-laboratory/European-Union-Reference-Laboratory/EURL-mycotoxins-plant-toxins>

EURL MP Methods

> EURL-MP-method_003 Ergot alkaloids by LC-MS/MS v2

> EURL-MP-method_006 Ergot sclerotia by visual screening v1

* Méthodes internes développées par les laboratoires

- S'inspirent soient de méthodes normalisées /de méthodes trouvées en bibliographie + développement et validation
- 3 laboratoires actuellement accrédités COFRAC sur ce critère analytique

Méthodes bandelettes: en cours de développement pour certains fournisseurs

Méthodes kits ELISA : 2 fournisseurs actuellement sur le marché (RANDOX et LC TECH)

RANDOX

Limite de quantification : de 50 µg/kg à 250 µg/kg selon les matrices



2,5g
↓
25 ml de solution
Méthanol (60%) / Eau (40%) / acide
formique (0.4%)
Agitation 15 minutes
↓
2 minutes de centrifugation
↓
Dilution : 200 µl dans tampon
↓
Analyse sur kit ELISA
(deux incubations : 1 heure + 20 minutes)

LC Tech

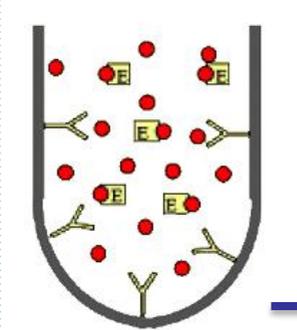
Limite de quantification : 250 µg/kg



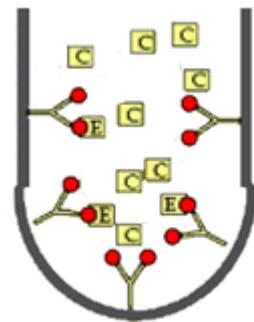
20 g
↓
25 ml de solution
Méthanol (40%) / Acide
phosphorique 0.25% (60%)
↓
Agitation 20 minutes
↓
Filtration
↓
Dilution : 5 ml de filtrat dans 5
ml de tampon
↓
Filtration filtre en verre
↓
Analyse sur kit ELISA
(trois incubations : 30 minutes + 1 heure + 15 minutes)

Méthodes exprimant le résultat en alcaloïdes totaux

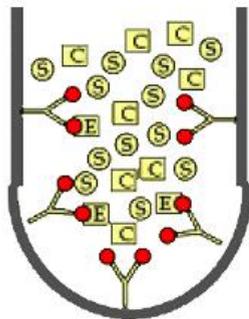
Principe des kits ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) : exemple d'un kit par compétition



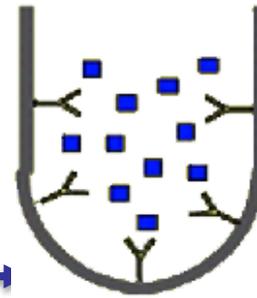
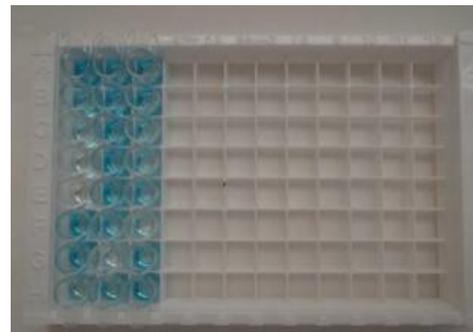
Dépôt
étalons/échantillons
+ conjugué



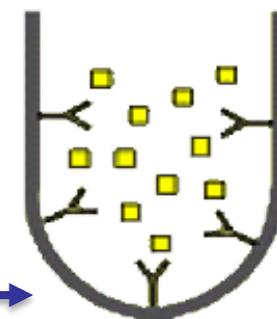
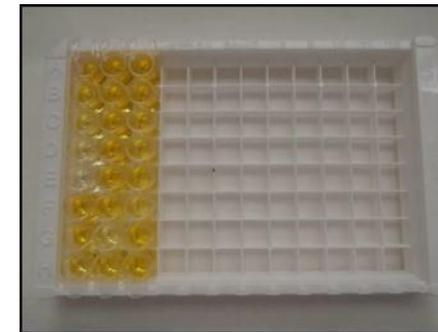
Incubation
puis lavage



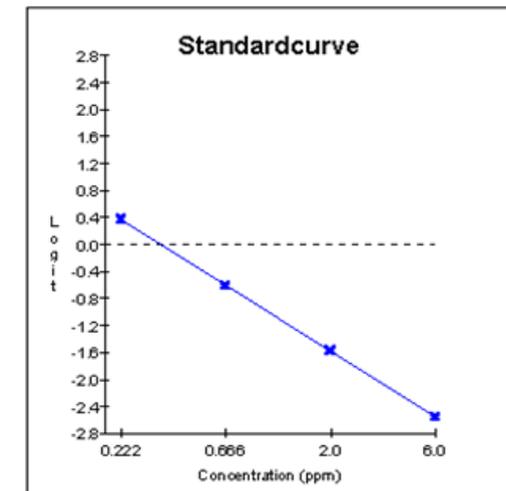
Ajout d'un
substrat



Arrêt de la réaction



Lecture des
densités optiques



Utilisation des densités optiques de la gamme étalon pour calculer les concentrations des échantillons

Quelques éléments comparatifs entre les méthodes chromatographiques et les méthodes ELISA pour les alcaloïdes de l'ergot :

| Méthodes chromatographiques | Méthodes ELISA |
|---|--|
| Résultats pour chacun des 12 alcaloïdes | Résultat en somme d'alcaloïdes |
| Limite de quantification de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ | Limite de quantification à partir de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| Méthodes dite quantitatives | Méthodes dites semi-quantitatives voir qualitatives |
| Méthodes donnant un résultat entre 24 à 48 heures | Méthodes donnant un résultat dans la demie journée |
| Méthodes de confirmation de choix | Méthodes nécessitant une confirmation (selon une règle de décision/prise de risque) |
| Méthodes mises en œuvre uniquement en laboratoire (matériels imposants, lignes de gaz etc..) | Méthodes pouvant être mises en œuvre en « mini laboratoires » |
| Investissements matériel conséquent | Investissements matériel faible |
| Technicité élaborée | Technicité simple |
| Cout d'une analyse >200 euros | Cout d'une analyse > 15 euros |

Méthodes de
recherche de
sclérotés d'ergot

Méthodes visuelles

Méthodes optiques

Méthode normative : **NF EN 15585**

Méthode(s) réglementaire(s) : consultation publique imminente

Appareils automatisés

Méthode de
quantification des
alcaloïdes

Méthodes
chromatographiques

Méthodes
immunologiques

Méthodes normatives **NF EN 17425 et NF EN 17256**

Autres méthodes

Méthodes ELISA

Merci pour votre attention !

<https://www.actia-asso.eu/projets/al-chimie/>

<http://www.quasaprove.org/moodle/course/view.php?id=132>



Contact : graziella.rigal@franceagrimer.fr

Tél : 05-46-42-85-92

Laboratoire FranceAgriMer
34 rue chef de Baie
17000 La rochelle

GT3 : méthodes rapides d'analyse

Accueil > Cours > Actions en cours > GT3

Méthodes rapides d'analyse

Les méthodes rapides sont un besoin récurrent pour des applications pratiques permettant de détecter rapidement des lots potentiellement contaminés à des taux supérieurs aux normes et les écarter de la chaîne.

Les opérateurs souhaitent connaître toutes les possibilités actuelles, avec une analyse critique pour pouvoir choisir celle adaptée à leur problématique. Un état des lieux des kits et techniques disponibles a été fait il y a plus de 10 ans pour les mycotoxines. Depuis, des nouveautés sont apparues et il y a un intérêt pour d'autres contaminants.

En absence de solution « commerciale », il sera utile de favoriser leur développement à partir des progrès trouvés dans la littérature scientifique et technique ou grâce à de nouveaux projet R&D.



Livrable : Synthèse des méthodes rapides d'analyse des mycotoxines

Pour aider ces opérateurs à identifier les méthodes rapides d'analyse de contaminants chimiques les mieux appropriées à leur situation, les membres du RMT Al-Chimie ont souhaité pouvoir disposer d'une photographie des méthodes existantes disponibles sur le marché pour le dosage des contaminants dans les produits alimentaires, d'une vision actualisée sur les méthodes en cours de développement qui pourraient mieux répondre à leurs attentes et faire un point sur les contaminants non encore pris en compte pour stimuler des projets de recherche et développement si nécessaire.

Le groupe de travail du RMT (GT3) s'est focalisé dans un premier temps sur les **mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux**. A côté des méthodes chromatographiques utilisées pour des dosages précis et la détermination de la conformité réglementaire de lots, il existe de multiples kits commerciaux de tests de mycotoxines qui visent une utilisation facile, moins onéreuse, et l'obtention plus rapide des résultats. Ces kits sont généralement utilisés pour des autocontrôles.

Grâce à une interaction constructive des membres du GT3 avec les fournisseurs présents sur le marché français, un **outil d'aide au choix des kits commerciaux** adapté à chaque situation a été élaboré. Il se présente sous forme d'un **tableur** et d'un **système de tri** mis en accès libre sur le site web du RMT (ci-après). Ce travail a permis de souligner les manques de systèmes d'analyses rapides pour des mycotoxines réglementées, telle que les alcaloïdes tropaniques, ou des mycotoxines émergentes comme les enniatines.

 **Outil d'interrogation par filtres** Déposé le 23 mars 22, 09:06

 **Tableur de synthèse** Déposé le 23 mars 22, 09:09