

Infrared spectroscopy applied to identification and detection of microorganisms and their metabolites on cereals (corn, wheat and barley)

Cécile Levasseur-Garcia

Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Département Sciences Agronomiques et Agroalimentaires, UPSP/DGER115, 75 voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 03, France

Keywords: infrared, cereal, microorganism, microbiological, contamination, sanitary, identification, discrimination, classification, detection

1. Introduction

Depuis plusieurs années, les mycotoxines font l'objet de nombreuses études. Ces molécules sont des métabolites secrétés par les mycètes. Ces eucaryotes jouent un rôle écologique majeur dans le cycle végétal. En effet, pour certains champignons, leur rôle de saprophyte les place au cœur de la dynamique des écosystèmes [Alexopoulos, et al., 1996].

Environ 350 espèces de moisissures produisent une très large gamme de métabolites secondaires (plus de 300 dont une trentaine serait toxique) [Fremy, et al., 2009]. Elles représentent un danger potentiel pour la santé animale et humaine et sont sources d'importantes pertes économiques dans la filière céréalière [Le Bars, et al., 1996]. Des diminutions de rendements en productions végétale et animale, des problèmes de santé publique ou bien encore des dévalorisations sur le marché international des céréales illustrent parfaitement ces effets. L'Organisation pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) estime les pertes mondiales dues aux mycotoxines à 1000 millions de tonnes de denrées alimentaires par an [Fao, 2001]. Les premiers organismes touchés sont les végétaux. De nos jours environ 25% des cultures agricoles mondiales seraient contaminées par ces métabolites [Charmley, et al., 2006].

En réponse à ces importants risques économiques et sanitaires, des barrières non tarifaires (normes sanitaires spécifiques imposées pour les produits importés) ont été érigées au niveau mondial afin de contrôler les échanges commerciaux en fonction de la qualité mycotoxique des produits alimentaires. Ces dispositions engendrent des pertes économiques et matérielles importantes pour les pays exportateurs de denrées contaminées, par le refus de cargaisons ou bien par la baisse des prix de vente. Pour limiter ces conséquences, les agriculteurs et les industriels s'efforcent de diminuer la présence des mycotoxines dans leurs produits. Les producteurs et transformateurs sont donc à la recherche de méthodes analytiques alternatives permettant une évaluation rapide, simple et peu coûteuse du risque de présence de champignons et de mycotoxines dans leurs produits. La spectroscopie infrarouge utilisée depuis de nombreuses années lors de contrôles qualité pourrait répondre à ces attentes.

Dans le cadre de ce chapitre, nous allons nous intéresser aux mycotoxines présentes majoritairement sur le blé, l'orge et le maïs et étudiées dans la littérature internationale; ce sont le deoxynivalénol, les fumonisines et l'aflatoxine B1.

2. Intérêt de l'utilisation de la spectroscopie infrarouge pour la gestion du risque fongique et mycotoxique sur blé, orge et maïs

Le champignon peut être détecté par des méthodes microbiologiques associées à des méthodes visuelles, microscopiques et culturales.

Les méthodes classiques de détection des moisissures sont basées sur l'observation directe des thalles à l'œil nu ou au microscope, sur denrées contaminées ou sur milieu de culture. Ces méthodes sont longues ; elles nécessitent des éléments viables et une bonne expertise. Les méthodes de comptage quant à elles sont difficilement applicables aux champignons car lors de la reproduction, une spore génère un mycélium qui peut à son tour se diviser en des dizaines d'individus. De plus, une contamination fongique peut ne pas être visible à la surface du grain [Hirano, et al., 1998, Pearson, et al., 2001].

D'autres méthodes sont basées sur la biologie moléculaire ou sur la détection d'antigènes spécifiques des moisissures. La Polymerase Chain Reaction (PCR) permet de détecter la présence d'un organisme encore vivant ou mort, en copiant en grand nombre une séquence d'ADN à l'origine en faible quantité (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard). En amplifiant certains gènes des souches toxigènes, la PCR devient un outil de détermination du risque potentiel de présence de mycotoxines. Différents auteurs ont testé la PCR pour détecter les contaminations de maïs par des espèces de *Fusarium* [Jurado, et al., 2006, Jurado, et al., 2005, Nicolaisen, et al., 2009]. Ces méthodes sont rapides, sensibles et peuvent être automatisées ; ce sont de bonnes méthodes qualitatives (bonne sélectivité) mais moyennement précises d'un point de vue quantitatif (semi-quantitatif). Ces techniques peuvent donc être très fiables à condition de savoir quelle souche fongique l'on veut détecter. Elles servent alors de méthodes de référence. On estime qu'un grain a une qualité microbiologique convenable si l'on dénombre au maximum 10 000 germes de la flore de stockage par gramme de grain.

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

Les composés sécrétés sont des composés de synthèse tels que des hydrates de carbone solubles (disaccharide tréhalose et alcools poly-hydriques tels que le mannitol ou l'arabitol) ou encore des produits de la métabolisation des carbones complexes : aldéhydes volatils, alcools, cétones, spores, métabolites primaires, métabolites secondaires (composés volatils). Ces derniers sont responsables de l'odeur caractéristique des champignons et sont généralement détectés avec un nez électronique. Pour les composés non volatils, d'autres outils comme la spectroscopie infrarouge semblent mieux adaptés.

Les composés de structure des moisissures peuvent également être utilisés pour la détection. Les polysaccharides majeurs de la paroi cellulaire des moisissures sont les α et β (1-3) glucanes, ainsi que la chitine. L'ergostérol est un constituant des membranes cellulaires fongiques.

La chitine peut être responsable de l'absorption de la lumière en spectroscopie infrarouge [Nilsson, et al., 1994, Roberts, et al., 1991]. L'inconvénient principal de l'utilisation de ce constituant en tant que témoin de contamination fongique réside dans le fait que la chitine n'est pas propre aux champignons; elle est présente chez les insectes, les diatomées, les arachnides, les nématodes, les crustacés et quelques autres êtres vivants [Muzzarelli, 1977]. De plus, elle peut se présenter sous différentes formes, chacune d'entre elles possédant des caractéristiques propres de détection. Roberts *et al.* [Roberts, et al., 1991] estiment les quantités de moisissures sur orge en détectant cette molécule, mais également les glucanes par spectroscopie proche infrarouge.

L'ergostérol est quant à lui plus spécifique des champignons. Cette molécule, encore appelée provitamine D2, est un stérol de base méthylé en C24 (faisant partie du sous-groupe de composés organiques solubles dans les lipides), présent dans les membranes cellulaires des mycètes filamenteux et des levures. Cette molécule est absente des cellules animales [Verscheure, et al., 2002] et est minoritaire parmi les stérols des végétaux supérieurs [Pitt, et al., 1997] et des insectes [Weete, 1980]. Griffiths *et al.* [Griffiths, et al., 2003], ont démontré que l'ergostérol est le stérol majoritaire des moisissures : l'ergostérol représente 95%

des stérols totaux, les 5% restants étant des précurseurs de l'ergostérol chez *Leptosphaeria maculans*. Cette spécificité fait de cette molécule un traceur potentiel de l'activité fongique. Il est communément admis que la teneur en ergostérol doit être inférieure à un certain seuil, la limite étant de 8 µg/g pour le maïs.

3. Application de la spectroscopie infrarouge à la détection de contaminations fongiques et de mycotoxines sur blé, orge et maïs

3.1. Généralités et présentation des travaux

Les premières applications de la spectroscopie infrarouge sur les microorganismes datent des années cinquante [Miguel Gomez, et al., 2003]. Dans ces applications, les spectromètres sont calibrés en fonction des méthodes de dosage des champignons ou des mycotoxines.

Dans les années 80, Fraenkel *et al.* [Fraenkel, et al., 1980] et Davis *et al.* [Davies, et al., 1987] publient leurs premiers travaux concernant la détection de contamination fongique par spectroscopie proche infrarouge (*Botrytis cinerea* et *Alternaria tenuissima*), mais cet outil appliqué à la détection de moisissures connaît son essor dans les années 90. Ceci s'explique par le fait que les modèles agronomiques existant alors requièrent un nombre très important d'informations à collecter au champ et sont de ce fait difficilement utilisables en routine. De plus, les industriels ont besoin de techniques non destructives afin d'assurer une évaluation sanitaire des récoltes. Plusieurs équipes de recherche ont alors utilisé la spectroscopie infrarouge pour détecter les moisissures et les mycotoxines sur céréales, ceci pouvant être réalisé en même temps que la quantification d'autres paramètres tels que les protéines, l'humidité, etc...

Une des méthodes proposées pour déterminer la teneur en champignons ou en mycotoxines est de quantifier la biomasse fongique totale. Dans ce but, l'ergostérol est utilisé en tant que marqueur fongique [Castro, et al., 2002, Saxena, et al., 2001, Seitz, et al., 1977, Seitz, et al., 1979]. Très souvent, cette étude est couplée à celle de la teneur en mycotoxines et des unités fongiques (unités formant colonies ou UFC). En effet, le lien entre la quantité de champignons et la quantité de mycotoxines n'est pas proportionnel puisqu'il est possible d'avoir peu de champignons et beaucoup de mycotoxines, et inversement. En effet, la moisissure peut avoir disparu après avoir sécrété des toxines, de par l'évolution de la mycoflore, ou l'application de traitements chimiques. De plus, certaines souches sont plus toxigènes que d'autres. Parmi les travaux sur ce sujet, deux conclusions existent, certains auteurs trouvent une corrélation entre la teneur en mycotoxines, la teneur en ergostérol et/ou les unités fongiques [Lamper, et al., 2000, Le Bouquin, et al., 2007, Miedaner, et al., 2000, Seitz, et al., 1977, Wanyoike, et al., 2002, Zill, et al., 1988], les autres ne trouvent aucune corrélation ou ne peuvent pas conclure catégoriquement [Beyer, et al., 2007, Diener, et al., 1982, Gilbert, et al., 2002, Nowicki, 2007, Penteado Moretzsohn De Castro, et al., 2002, Perkowski, et al., 1995].

Dans les 20 dernières années, nous avons dénombré plus d'une vingtaine d'articles traitant de l'application de la spectroscopie infrarouge, principalement, proche infrarouge, à la détection des moisissures et des mycotoxines sur le blé, l'orge et le maïs. Du fait que certains des travaux menés en spectroscopie infrarouge portent à la fois sur la détection ou l'identification des moisissures, leur quantification, mais également la quantification des mycotoxines, nous avons choisi de séparer les articles en 3 groupes. Le tableau 1 concerne les moisissures, le tableau 2 compile les essais portant sur le deoxynivalénol (DON), les fumonisines (FUM) et les aflatoxines B1 (AF1). Enfin, le tableau 3 rassemble les articles dans lesquels les auteurs ont travaillé à la fois sur l'aspect fongique et l'aspect mycotoxique. Chacun des tableaux liste: la matrice étudiée (blé, orge, maïs), l'appareillage, la gamme de teneurs, les performances des modèles et les principales conclusions, ainsi que le relevé des longueurs d'onde caractéristiques.

Les notations utilisées pour décrire les performances sont : r^2 (coefficient de détermination), SECV (Standard Error of Cross-Validation), SEC (Standard Error of Calibration), SEP (Standard Error of Prediction).

3.2. Principales conclusions

3.2.1. Identification et quantification fongique

Lors de l'identification fongique, les performances données en termes de pourcentage de classement correct sont très satisfaisantes puisqu'elles dépassent les 77%. Chacune des études propose l'identification de pics ou de zones spectrales liées à la croissance fongique et aux dégâts causés aux grains par le champignon.

Par ailleurs, la quantification de l'ergostérol donne des performances toujours intéressantes.

3.2.2. Quantification des mycotoxines deoxynivalénole (DON), fumonisines (FUM) et aflatoxines

Les mycotoxines sont présentes en trop faibles quantités (de l'ordre du ppm) pour être directement détectées. Leur détection est donc associée à un ensemble très complexe d'informations liées à la croissance du champignon sur la céréale, notamment à des modifications des teneurs en protéines et carbohydrates (amidon, cellulose,...).

Les conclusions quant à la capacité de la spectroscopie infrarouge à quantifier les mycotoxines diffèrent d'un auteur à l'autre. D'une manière générale, les performances liées au deoxynivalénole sont toujours meilleures que celles liées aux fumonisines. Malgré cela, même s'il semble que la quantification des mycotoxines soit possible, elle n'est pas suffisamment précise pour être utilisée sur le terrain. En effet, les erreurs standard de prédiction (SEP) sont trop élevées vis-à-vis des limites réglementaires, notamment européennes. D'ailleurs, afin de travailler dans des conditions réelles de teneurs en toxines, les principaux points d'amélioration de ces études pourraient être :

- Un nombre d'échantillons plus élevé
- Une variabilité annuelle plus importante (les échantillons sont souvent issus d'une seule récolte)
- Une contamination naturelle des grains (la contamination artificielle ne tient pas compte de tous les paramètres naturels de contamination, notamment des multi-contaminations)
- Une gamme de teneurs en mycotoxines plus adaptée à la réalité du terrain (les gammes sont souvent très étroites)
- Une collecte spectrale non pas en grain-à-grain, mais sur des lots de grains entiers. En effet, il est plus difficile d'affecter une teneur en mycotoxines globale à un lot, puisque la répartition des mycotoxines tout comme les moisissures par lesquelles elles sont synthétisées y est très hétérogène.
- Une utilisation d'un set d'échantillons en test (les performances proposées le sont souvent en validation croisée, et sont donc meilleures qu'elles ne le seraient en test externe)
- Un affichage du RPD (ratio of standard error of prediction to sample standard deviation)

Quelques études proposent donc, non pas une quantification, mais un classement des échantillons de céréales en fonction de leurs teneurs en mycotoxines. Cette approche qualitative donne de meilleurs performances et semble actuellement la plus probante pour une application en conditions réelles, dans l'attente de l'amélioration des performances des modèles quantitatifs.

Notons également que même si les SEC, SECV et SEP sont élevés pour les quantifications, ces modèles sont développés à partir de références chimiques qui elles-mêmes présentent des écarts-type d'erreur non négligeables.

4. Conclusion

La spectroscopie infrarouge présente de multiples avantages. Cet outil ne nécessite aucune préparation ni emploi de produits toxiques. Il permet une analyse non destructive des échantillons. Par ailleurs, cette technique est rapide, utilisable en ligne à un coût peu élevé. La cellule de mesure est résistante et assez

bon marché (verre ou quartz). Enfin, la spectroscopie infrarouge offre la possibilité d'analyses multiparamétriques et l'on dispose aujourd'hui d'une gamme importante d'appareils robustes. L'utilisation des modèles de classement des échantillons de céréales en fonction de la nature du champignon présent, ou de sa teneur, ou bien encore de la présence de mycotoxines, représente un outil très intéressant pour approcher le risque fongique et mycotoxique sur le terrain, au champ ou au silo par exemple. En ce qui concerne la quantification des mycotoxines, la chimiométrie, sans cesse en progrès, permettra peut-être un jour d'atteindre des performances compatibles avec les besoins agricoles, industriels et commerciaux.