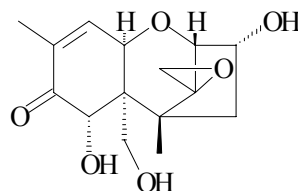


Marc Savard, Ph. D., *Centre de recherches de l'Est sur les céréales et les oléagineux, AAC, Ottawa*

Collaborateur : Guy Durivage, ing., M. Sc., *RMAAQ*

Durant cette présentation, nous allons discuter de l'analyse des mycotoxines. Nous allons voir les différentes méthodes d'analyse, leurs limitations, et les problèmes qu'on peut rencontrer quand on fait des analyses.

Premièrement, quand on parle de mycotoxines au Québec, on parle surtout du désoxynivalénol, aussi connue par le nom vomitoxine, à cause d'un des effets qu'elle produit chez les porcs. On connaît à peu près une centaine d'autres mycotoxines, mais celle-ci est définitivement la plus commune en ce moment.



Les méthodes d'analyse

Il y a trois étapes dans l'analyse de grains pour des mycotoxines : l'échantillonnage, la préparation de l'échantillon et le dosage. Nous allons commencer par décrire des méthodes de dosage. Il y a en premier, les méthodes chromatographiques. Celles-ci incluent la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie à haute performance. Les acronymes anglais mieux connus sont TLC, GC et HPLC. Ensuite, nous avons les méthodes non chromatographiques, les bioessais, la méthode visuelle, l'ELISA, la fluorométrie et le proche infrarouge.

Commençons par les méthodes les plus vieilles, les bioessais et l'évaluation visuelle. Les bioessais impliquent l'utilisation d'organismes et mesurent simplement la toxicité des extraits analysés. Ils sont encore utilisés surtout pour certaines toxines marines, et peuvent être très sensibles, sans toutefois identifier les toxines.

L'évaluation visuelle est probablement encore utilisée dans certains endroits pour l'évaluation de la vomitoxine. En fait, ce qu'on fait c'est l'évaluation du nombre de grains avariés, ce qui a été démontré comme étant très subjectif. En 2000, un échantillon de blé fut évalué comme contenant 0,7 % de grains avariés par l'*Université de Guelph* et 0,9 % par la *Commission canadienne des Grains*. Quand présenté à onze éleveurs de l'Ontario, on a eu des résultats allant de 0,4 % à 1,8 %, avec une moyenne de 1,1 %. Sept résultats étaient au-dessus de la tolérance de 1,0 %.

Méthodes instrumentales

Après ces méthodes sont venues les méthodes chromatographiques, qui consistent à la séparation de substances par une migration différentielle dans un milieu sorptif. Ceci est démontré avec la plus ancienne de ces méthodes, la chromatographie sur couche mince ou TLC. Un extrait est déposé au bas d'une plaque et celle-ci est déposée dans un peu de solvant. À mesure que le solvant monte sur la plaque par capillarité, les composantes de l'extrait montent aussi, mais à des vitesses différentes, caractéristiques des produits.

Les méthodes instrumentales, GC et HPLC, fonctionnent sous le même principe. Dans le cas du GC, un gaz au lieu d'un solvant pousse l'extrait au travers d'un tube contenant un adsorbant. Ce qui influence le plus de temps de rétention dans ce cas est le point d'ébullition des produits analysés. Pour le HPLC, c'est encore le même principe, sauf que l'éluion se fait avec un liquide sous haute pression, et la polarité des substances est le facteur déterminant.

Dans ces deux derniers cas, les produits élués sont détectés de façon quantitative par divers moyens, soit l'absorbance de la lumière ultraviolette, la réfraction, la fluorescence, etc. Cependant, ces méthodes ont aussi leurs limitations. Elles nécessitent beaucoup de manipulations, incluant le nettoyage des échantillons, et, à moins d'avoir en spectromètre de masse ou un spectrophotomètre à balayage comme détecteur, l'identification du produit se fait par seulement un temps de rétention.

On peut aussi se servir de colonnes d'immunoaffinité pour le nettoyage des échantillons, mais celles-ci ont une capacité limitée. Si un échantillon contient une plus grande quantité d'une toxine que la capacité de la colonne, l'excédent sera perdu et les résultats seront plus bas que la réalité.

La prochaine méthode d'analyse instrumentale est la fluorométrie. Il y a deux types d'instruments, mais le principe est le même. Il s'agit de mesurer la fluorescence de la toxine ou de la toxine modifiée avec une étiquette fluorescente. On suppose qu'aucun autre produit n'est fluorescent à la même longueur d'onde. Donc encore, la prépurification par immunoaffinité est suggérée.

L'ELISA

Enfin, la méthode la plus rapide en ce moment est l'ELISA, un acronyme pour *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Dans ce cas-ci, on peut analyser près d'une cinquantaine d'échantillons en même temps. J'en profiterai ici pour expliquer comment l'ELISA fonctionne. En fait, cette analyse est basée sur la capacité du système immunitaire animal de produire des anticorps à presque n'importe quoi. On produit donc des anticorps aux toxines qu'on veut analyser, et on choisit les anticorps les plus sélectifs. Si on est chanceux, les anticorps ne réagissent qu'avec la toxine visée et rien d'autre.

Pour mesurer la concentration de toxine, la méthode compétitive dont on se sert dans mon labo consiste à faire une compétition entre la toxine dans l'extrait et la même toxine attachée à un enzyme. Cet enzyme est la peroxydase de raifort (PR). Une fois qu'un équilibre est établi entre ces deux molécules, on peut mesurer la quantité de toxine attachée à la PR en ajoutant du peroxyde et un substrat de l'enzyme qui produit une couleur. On peut ensuite mesurer l'intensité de la couleur, ce qui est proportionnel à la concentration de PR et inversement proportionnel à la concentration de la toxine.

Pour faire ce genre d'analyse, on peut aussi acheter des kits de plusieurs compagnies. Les prix varient de 4 \$ à 10 \$ par analyse, en fonction de la compagnie et la précision de l'analyse.

Un autre genre de kits basé sur les anticorps est la languette à flot latéral, le même genre utilisé pour les tests de maternité. Dans ce cas-ci, les anticorps sont attachés à de fines particules d'or. Il y a des anticorps à deux molécules, un pour la toxine et un pour une molécule contrôle. Si la toxine dans l'extrait s'attache à l'anticorps dans la zone de réaction, l'anticorps ne peut monter sur la languette, et aucune couleur ne se développera dans la zone de développement. Le contrôle est là pour s'assurer que le système fonctionne bien en donnant une ligne rouge dans la zone de développement.

Sommaire des méthodes

En sommaire, si on compare les méthodes, sous trois caractéristiques :

- Le GC et le HPLC ont la meilleure précision, mais sont lents et dispendieux.
- La TLC coûte très peu, mais manque de précision et de vitesse.
- Les bioessais ne sont pas dispendieux, mais sont encore plus lents et sans beaucoup de précision.
- Les test visuels coûtent très peu et sont rapides, mais sont très subjectifs.
- La fluorométrie est moyenne dans tous les aspects.
- L'ELISA est la méthode la plus rapide, a une précision adéquate et un prix modéré.

L'échantillonnage

L'échantillonnage est le facteur le plus important pour l'obtention d'un dosage exact. Ceci est dû au fait que les mycotoxines ne sont pas distribuées également dans un contenant. Elles sont presque toujours localisées plus en certains endroits. Par exemple, pour une concentration toxique de 20 ppb d'aflatoxine, il n'y aura en moyenne que 6 grains sur 10,000 qui seront contaminés. Plusieurs exemples démontrant l'importance d'un bon échantillonnage sont donnés dans la présentation.

Pour conclure, pour une bonne analyse, il faut un bon échantillonnage, et pour ce faire, il faut :

- si possible, bien mélanger le lot avant l'échantillonnage
- prendre plusieurs prélèvements réguliers et bien les mélanger
- utiliser des contenants inertes
- échantillonner souvent