

Jongler avec les ince

Les quantités minimales de mycotoxines recherchées dans les lots de grains rendent les analyses complexes et laissent un niveau d'incertitude pouvant paraître peu satisfaisant. Les méthodes par chromatographie font figure de référence, et servent de base pour déterminer la fiabilité de tests plus légers à mettre en œuvre.

Pour le dosage des mycotoxines, l'expression « chercher une aiguille dans une botte de foin » prend tout son sens. Quantifier ces molécules au niveau du $\mu\text{g}/\text{kg}$ (microgramme/kg), comme l'exige la réglementation européenne, équivaut à trouver 1 gramme de mycotoxine dans 1000 tonnes de céréales. Ceci équivaut à atteindre une cible placée à 100 km, alors que pour un dosage de protéines, la cible serait placée à 10 m ! Or, les incertitudes liées à l'analyse augmentent à mesure que la concentration du produit mesuré diminue (*figure 1*).



Le dosage par chromatographie, même s'il nécessite un mode opératoire complexe, est la référence pour le dosage des mycotoxines.

L'incertitude est l'intervalle dans lequel la valeur vraie se situe avec une probabilité de 95 %. Tout résultat analytique est accompagné d'une incertitude sur la mesure. Elle est nécessaire à l'interprétation des résultats.

Pour les mycotoxines, l'incertitude peut descendre à

250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les laboratoires les « plus pointus », mais il semble difficile de réussir à la diminuer davantage, car nous atteignons alors les limites du possible (*figure 1*).

Pour s'assurer de la qualité des analyses, les clients des laboratoires peuvent se renseigner, et les laboratoires ont

certainement des résultats à communiquer quant aux critères de performance de leurs méthodes.

▶ Les méthodes de dosage visent à trouver 1 gramme de mycotoxine dans 1000 tonnes de céréales.

rtitudes

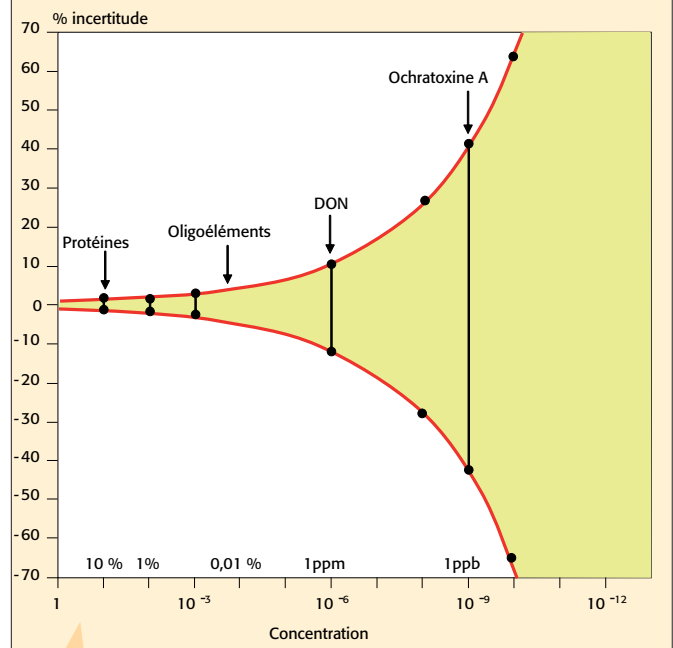
Le dosage par chromatographie : la référence

Les méthodes séparatives (chromatographiques) ont valeur de référence pour le dosage des mycotoxines. Elles ont l'avantage d'être totalement spécifiques et permettent de doser plusieurs mycotoxines à la fois. Il existe des méthodes normalisées pour les fumonisines, l'ochratoxine A. Celle pour le DON est encore à l'état de projet.

Elles sont utilisables pour la quantification et la confirmation des résultats obtenus par kits ou bandelettes.

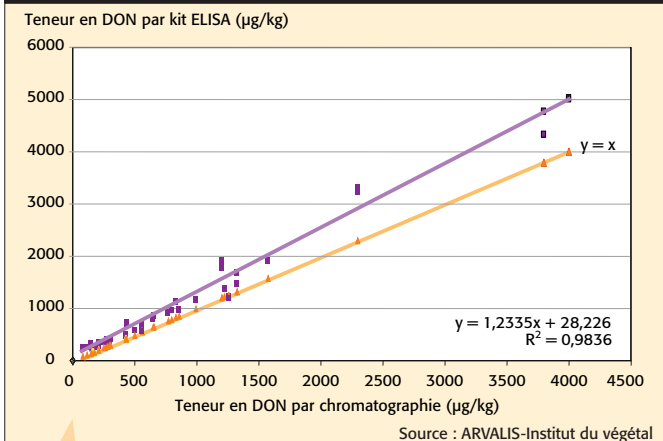
Les bandelettes sont réalisables au champ et ne nécessitent pas d'équipement particulier. Ces méthodes par kits et bandelettes ont l'avantage d'être très rapides (15 à 30 minutes pour les bandelettes). Mais ces tests ne sont pas quantitatifs et non spécifiques, et ne sont valables que pour une mycotoxine.

Les limites de l'analyse (fig.1)



La courbe d'Horwitz montre que l'incertitude des résultats d'analyse augmente quand la concentration du produit mesuré diminue.

Comparaison de dosage kit Elisa et chromatographie (fig.2)



Les kits Elisa ont l'inconvénient de ne pas être spécifiques et surestiment les résultats.

De plus, les kits nécessitent un environnement de laboratoire. Leur utilisation reste possible pour écarter des lots négatifs, mais la caractérisation des lots devra être validée par chromatographie (figure 2).

D'autres méthodes de dosage testées

ARVALIS – Institut du végétal et l'ONIC ont testé la méthode de dosage par infrarouge, à partir de matériel existant chez les organismes stockeurs, mais les résultats n'ont pas été concluants. Pourtant, la méthode avait l'avantage d'être rapide, d'être bien adaptée

au contrôle à réception et de permettre d'effectuer les analyses parallèlement à d'autres paramètres. Les premiers résultats DON sur blé ont montré que, parmi les lots estimés sous le seuil de 1250 µg/kg par la méthode infrarouge, 33 % dépassaient le seuil par la méthode de référence. À l'inverse, parmi les lots prédits au-dessus du seuil réglementaire, 30 % étaient jugés comme corrects par la méthode de référence. L'erreur obtenue sur la récolte 2005 a été supérieure à celle attendue et les résultats ont été considérés insuffisants; les expérimentations ont été arrêtées.



La préparation des échantillons

À partir d'un échantillon de 10 kg, il faut plusieurs étapes pour obtenir un échantillon analysable. Le grain est d'abord broyé à 1 mm, puis homogénéisé. Un sous échantillonnage permet d'obtenir des lots de farine de 500 g à 0,5 mm, qui sont ensuite mélangés à un solvant pour extraire les mycotoxines. La fraction soluble est enfin chauffée pour concentrer le substrat et effectuer enfin un dosage par chromatographie.

À partir de 10 kg de grains, de 5 à 9 étapes sont nécessaires avant d'obtenir la solution qui sera dosée par chromatographie.

En revanche, d'autres matériels sont actuellement testés. Les résultats sont encourageants, mais restent à confirmer. ■

Le prélèvement des échantillons

Pour obtenir une analyse représentative, les prélèvements d'échantillons sont essentiels. Or, la présence de mycotoxines est très hétérogène dans un lot. Un règlement européen (n° 401/2006 du 23 février 2006) fixe les règles d'échantillonnage, mais son application est irréaliste : par exemple, pour un lot de 3000 tonnes en mouvement au débit de 500 t/heure, il faudrait effectuer un prélèvement toutes les 36 secondes pendant 6 heures ! Le texte européen laisse cependant une porte de sortie pour les « lots importants stockés dans des silos », ce qui est le cas pour

tous les organismes stockeurs. Dans ce cas, l'opérateur peut utiliser la méthode qu'il souhaite, pour autant qu'elle soit « aussi représentative que possible et fasse l'objet d'une description complète, dûment documentée ». Des orientations devraient être fournies dans un guide qui sera disponible le 1^{er} juillet 2006 sur http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/index_en.htm.

En l'absence de norme ISO pour les lots non homogènes, la filière a travaillé sur un protocole techniquement et économiquement réaliste.

L'objectif est de proposer deux protocoles alternatifs à la réglementation : un protocole normatif qui devrait aboutir en 2007, et qui pourrait se substituer au réglementaire dans certains cas, et un protocole de routine, plus rapide, utilisable pour les échanges commerciaux et les contrôles quotidiens.

Des comparaisons des trois types d'échantillonnage (réglementaire, normatif et de routine) permettent de valider la pertinence des deux protocoles alternatifs. Selon les modes opératoires, l'échantillon global pèse de 4 à 165 kg pour

des grains en mouvement, de 20 à 270 kg pour des prélèvements statiques en silo, et de 1,5 à 150 kg en statique camion ou train.

Les analyses de teneur en DON montrent qu'il n'y pas de différence significative des concentrations entre les trois protocoles. Seul le protocole de routine a décroché, mais uniquement pour les prélèvements en camion et seulement dans 2 cas sur 14. L'application réglementaire semble donc générer des coûts injustifiés, par rapport aux protocoles plus légers établis par la profession.