

# Evaluation de la présence de mycotoxines dans l'eau de rivière et l'eau de boisson

Période : décembre 2014 - mars 2015

Annie PFOHL-LESZKOWICZ | [leszkowicz@ensat.fr](mailto:leszkowicz@ensat.fr)

Université de Toulouse, UMR CNRS/INPT/UPS 5503 – Laboratoire de génie chimique, Département Bioprocédés et systèmes microbiens, UMR CNRS 5503. Ecole nationale supérieure agronomique de Toulouse - Avenue Agrobiopole – Auzeville-Tolosane – France

Mots clés : aflatoxine, aspergillus, détoxification, eau, mycotoxine, fusarium, ochratoxine, penicillium, zéaralénone

Les moisissures se développent sur les végétaux mais également dans les systèmes de ventilation et produisent des mycotoxines<sup>1</sup>. Ces mycotoxines contaminent les aliments ainsi que la nourriture animale, et peuvent être responsables de maladies (altération du tube digestif, hépatotoxicité<sup>2</sup>, néphrotoxicité<sup>3</sup>, baisse de la reproduction, cancer...). Le risque lié aux mycotoxines dans les aliments est de mieux en mieux pris en compte, et de nombreuses législations ont été édictées. Les eaux de pluie peuvent entraîner les mycotoxines se trouvant dans les céréales, mais également celles contenues dans le fumier. Les mycotoxines peuvent alors se retrouver dans l'eau. D'autre part, des moisissures peuvent se développer dans les systèmes de distribution d'eau (1). Cependant, les données concernant les mycotoxines dans l'environnement sont rares. Des mycotoxines ont été retrouvées dans les eaux de surface, souterraines et de stations d'épuration (2-4). Les quantités sont de l'ordre de quelques nanogrammes/L (5-7). Elles sont bien plus faibles que celles détectées dans les aliments, et les techniques développées sont souvent trop peu sensibles pour détecter de telles doses. Les deux publications choisies portent sur le développement de méthodes analytiques de grande sensibilité permettant d'extraire et de détecter d'une part la zéaralénone et ses métabolites dans les échantillons aqueux environnementaux et, d'autre part, un mélange de plusieurs mycotoxines dans des eaux minérales. Les techniques optimisées ont été appliquées à des échantillons naturels.

## Détermination de mycotoxines œstrogéniques dans des échantillons d'eau environnementale après micro-extraction liquide-liquide peu toxique et chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Soares Emidio E, Pereira da Silva C, Rodrigues de Marchi MR. Determination of estrogenic mycotoxins in environmental water samples by low-toxicity liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chrom* 2015;1391:1-8

### Résumé

La zéaralénone (ZEA) et ses métabolites ( $\alpha$ -zearelanol [ $\alpha$ -ZEL] et  $\alpha$  zearalanol [ $\alpha$ -ZAL]) ont des propriétés œstrogéniques similaires à celles des œstrogènes naturels (8) et plus puissantes que celles de perturbateurs endocriniens tels que le bisphénol A ou l'atrazine (9). Leur présence dans l'environnement pourrait avoir un effet notamment sur le développement des poissons. Les méthodes actuelles pour l'analyse de la ZEA et ses métabolites n'ont pas une sensibilité suffisante pour détecter les concentrations retrouvées dans l'environnement. Dans cette étude, une méthode de microextraction par dispersion liquide-liquide par solvant bromé, suivie de l'analyse de la ZEA et ses

métabolites ( $\alpha$ -zearelanol [ $\alpha$ -ZEL],  $\beta$ -zearelanol [ $\beta$ -ZEL],  $\alpha$ -zearelanol [ $\alpha$ -ZAL],  $\beta$  zearalanol [ $\beta$ -ZAL], zearalanone [ZAN]) par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse a été mise au point.

Les solvants les plus largement utilisés sont généralement des solvants chlorés présentant une toxicité environnementale non négligeable. Le premier but de l'étude était de trouver un solvant moins polluant. Les conditions d'extraction ont été optimisées concernant le choix du solvant, le pH ainsi que le volume de solvant. Le solvant doit être plus dense que l'eau. Quatre solvants bromés ont été testés. L'extraction de la ZEA et du ZAN par les solvants bromés est similaire à celle obtenue avec les solvants chlorés. L'extraction de  $\alpha$ -ZAL et de  $\alpha$ -ZEL est meilleure avec les solvants bromés. Bien que le  $\beta$ -ZEL et  $\beta$ -ZAL soient moins bien extraits par les solvants bromés, le solvant retenu est le bromocyclohexane car sa toxicité est plus faible. Le volume optimal de solvant est de 100  $\mu$ L pour un échantillon de 10 mL. Le pH 4 s'est révélé être le pH idéal. L'agitation par vortex permet une meilleure extraction, plus reproductible qu'une simple agitation et permet de ne pas utiliser de dispersant tel que le méthanol.

Pour l'élution lors de la chromatographie, plusieurs solvants (eau/acide formique; méthanol/ acétonitrile; méthanol, acétonitrile/ eau) ont été testés. La meilleure sensibilité a été obtenue avec une phase mobile constituée d'eau/ acétonitrile/méthanol 48/25/27 v/v/v, 0.1 % acide formique. Pour démontrer l'applicabilité de la méthode, des

échantillons d'eau ont été prélevés dans le fleuve Rico situé près des villes de Monte Alto et Jaboticabal dans l'État de Sao Paulo au Brésil. Les prélèvements ont eu lieu (i) à la source de la rivière ; (ii) dans les zones exposées aux cultures de maïs et recevant des épandages de fumier ; (iii) au point de pompage de l'eau destinée à la population de Jaboticabal, qui est affecté par les eaux de sortie de station d'épuration des eaux urbaines et rurales. Deux métabolites,  $\beta$ -ZAL et ZAN ont été détectés à raison respectivement de 168ng/L et 17ng/L dans l'eau de la station d'épuration qui traite les eaux usées rurales et urbaines. Les concentrations  $\beta$ -ZAL en sont 200 fois plus élevées que celle rapportées dans une étude faite en Italie (10)

#### Commentaire

Une technique simple, rapide pour extraire et concentrer des mycotoxines présentes dans des échantillons aqueux environnementaux, utilisant un solvant moins toxique que le chloroforme, a été mise au point. Sa sensibilité permet de détecter la ZEA et ses métabolites à raison de quelques ng/L. On a ainsi montré que deux métabolites de la ZEA ne sont pas éliminés par le traitement des stations d'épuration. Cette publication constitue une avancée importante dans le développement de techniques très sensibles pour doser de faibles quantités de mycotoxines. D'autre part, elle pointe la possibilité de contamination de l'eau de rivière notamment par la ZEA et ses métabolites provenant du drainage des champs contaminés, des rejets des animaux incluant l'épandage de fumier ainsi que des urines humaines. Cette méthode devra être appliquée à un plus grand nombre d'échantillons. La présence des métabolites œstrogéniques nécessitera d'évaluer leur impact toxicologique potentiel aux concentrations retrouvées.

### Eau en bouteille : Analyses de mycotoxines par LC-MS/MS

Mata AT, Ferreira JP, Oliveira BR, Batoreu MC, Barreto Crespo MT, Pereira VJ, Bronze MR. Bottle water: Analysis of mycotoxins by LC-MS/MS. *Food Chemistry* 2015;176:455-464

#### Résumé

Des champignons filamenteux ont été retrouvés dans les systèmes de distribution d'eau, mais également dans les eaux de surface, eaux de sources ou eaux souterraines. De ce fait, le problème de la présence de mycotoxines dans les eaux embouteillées se pose (1, 11). Dans cette étude une méthode a été mise au point dans le but de quantifier simultanément neuf mycotoxines (l'aflatoxine B1 [AFB1], l'aflatoxine B2 [AFB2], l'aflatoxine G1 [AFG1], l'aflatoxine G2 [AFG2], la fumonisine B1 [FB1], la fumonisine B2 [FB2], la fumonisine B3 [FB3], le neosolaniol, l'ochratoxine A [OTA]) dans des eaux en bouteille.

L'extraction a été réalisée en phase solide sur colonne, suivie d'une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. D'autre part, les champignons filamenteux présents dans l'eau ont été analysés et quantifiés macroscopiquement et microscopiquement.

Vingt-six bouteilles d'eau minérale et d'eau de source de neuf marques différentes ont été achetées dans des centres commerciaux. De l'eau potable de Lisbonne a également été analysée. Le solvant utilisé est le méthanol en présence de 0,1% d'acide formique, car c'est le seul permettant la récupération des fumonisines. Les échantillons d'eau après passage sur la colonne sont concentrés 5000 fois, ce qui permet de quantifier 0,2 ng/L d'AF et d'OTA ; et 2ng/L de FB et neosolaniol. La méthode a été validée avec de l'eau du robinet, de l'eau millipore et les deux types d'eau en bouteille. L'analyse des AF s'est révélée impossible avec l'eau du robinet, vraisemblablement à cause de la présence des composés chlorés utilisés pour le traitement de l'eau.

Onze échantillons provenant de cinq marques différentes sur 26 contiennent des mycotoxines. L'AFB2 est la plus fréquente. Onze eaux en contiennent avec un maximum de 0,48 + 0,05 ng/L. Viennent ensuite l'AFB1, l'AFG1 et l'OTA à raison de 0,7 + 0,06 ng/L ; 0,6 + 0,02 ng/L et 0,26 + 0,02 ng/L respectivement. Dans tous les échantillons où des mycotoxines ont été détectées, *Cladosporium* a été isolé. Des *Penicillia* et des *Fusaria* ont aussi été isolées dans la plupart des échantillons. L'apport journalier en mycotoxine a été calculé sur la base de ces analyses. Considérant un adulte de 70 kg ingérant 1,5 L/jour, l'apport en OTA correspond à 0,005ng/kg pc/j, soit 1/1000 de la dose journalière admissible calculée sur la base de l'apparition de tumeur du rein dans une étude de carcinogénicité de deux ans chez les rats. L'apport en AFB1 et en AFB1 +AFB2+AFG1 est respectivement de 0,009 et 0,3 ng/kg pc/j, soit 50 fois moins que la dose journalière admissible calculée sur la carcinogénicité de l'AFB.

#### Commentaire

La méthode mise au point permet d'analyser simultanément les aflatoxines, l'ochratoxine, les fumonisines dans les eaux minérales. Cette publication confirme que l'eau minérale peut contenir des champignons filamenteux et des mycotoxines. Il aurait été intéressant de rechercher aussi la zéaralénone qui est produite par les *Fusaria*. Les quantités en mycotoxines sont faibles (moins d'un ng/L) et sont interprétées comme non dangereuses pour la santé. Cette conclusion devrait être modulée car il faut prendre en compte l'effet cocktail et le fait que les mycotoxines peuvent se stocker dans l'organisme.

**CONCLUSION GÉNÉRALE**

Le développement de méthodes d'analyses très sensibles fondées sur la spectrométrie de masse permet de mettre en évidence des contaminations en mycotoxines des eaux environnementales et des eaux minérales. Certes les quantités sont relativement faibles mais ces mycotoxines s'ajoutent à d'autres polluants. Notamment la présence de zéaralénone et de ses métabolites dans les eaux de rivières peut amplifier les effets perturbateurs endocriniens. Ces travaux mettent également en évidence le fait que les stations d'épuration n'éliminent pas totalement ce type de polluant. La présence de plusieurs mycotoxines cancérogènes (aflatoxines, ochratoxine) dans les eaux en bouteille pose le problème des effets synergiques possibles entre elles. Ces résultats montrent qu'il est important de faire une évaluation plus approfondie de la contamination de l'eau en général par des mycotoxines afin de mettre en place de moyens de détoxification.

**GENERAL CONCLUSION**

*Developing sensitive analytical methods using mass spectrometry makes it possible to detect mycotoxins in environmental water and in bottle water. Although the amounts are low, they add to overall pollution. For example the presence of zearalenone and its metabolites in stream may increase endocrine disruption. This pinpoints that wastewater treatment plants cannot fully eliminate all pollutants. The presence of several carcinogenic mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin) in bottle water raises the issue of synergism between mycotoxins. Altogether these results show how important it is to better evaluate water contamination, including by mycotoxins, in order to set up detoxification processes.*

**Lexique**

- (1) Mycotoxine : Toxines élaborées par diverses espèces de champignons microscopiques, tels les moisissures.
- (2) Hépatotoxicité : Toxicité au niveau du foie
- (3) Néphrotoxicité : Toxicité au niveau du rein

**Publications de référence**

- (1) **Doggett MS.** Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**(3): 1249-1251

- (2) **Gromadzka K, Waskiewicz A, Golinski R et al.** Occurrence of estrogenic mycotoxin-zearalenone in aqueous environment samples with various NOM content. *Water Res* 2009; **43**(3):1051-1059

- (3) **Lagana A, Bacaloni A, De Leval et al.** Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural water. *Analyt Chimica Acta* 2004; **501** (1): 79-88

- (4) **Schenzel J, Schwarzenbach RP, Bucheli TD.** Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. *J Agric Food Chem* 2010; **58**:11207-11217

- (5) **Lundgren MS, Novak PJ.** Quantification of phytoestrogens in industrial waste streams. *Environ Toxicol Chem* 2009; **28** :2318-2323

- (6) **Kolpin DW, Schenzel J, Meyer MT et al.** Mycotoxins, diffuse and point source contributions of natural contaminants emerging concern to streams. *Sci Total Environ* 2014; **470-471** :669-676.

- (7) **Hartmann N, Erbs M, Wettstein FE et al.** Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *J Chromatogr. A* 2007; **1138**:132-140.

- (8) **Le Guevel R, Pakdel F.** Assessment of estrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in vitro methods. *Hum. Reprod.* 2001; **16**: 1030-1036

- (9) **Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, et al.** Evaluation of a recombinant yeast cell estrogenic screening assay. *Environ. Health Perspect.* 1997; **105** :734-742.

- (10) **Lagana A, Bacaloni A, De Leva I et al.** Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta* 2004; **501**:79\_88

- (11) **Pereira VJ, Basilio MC, Domingues M et al.** Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. *Water Research* 2009; **43**(1): 3813-3819

**Autres publications identifiées**

**Ma X, Baron JL, Vikram A et al.** Fungal diversity and presence of potentially pathogenic fungi in a hospital hot water system treated with on-site monochloramine. *Water research* 2015; **71**:197-206

*Cette publication montre la possibilité de retrouver des champignons filamenteux opportunistes comme les Penicillia, les Aspergilli, les Fusaria, et cladosporia dans les plomberies du système d'eau chaude des hôpitaux. Le traitement par de la monochloramine utilisé pour limiter le développement de légionnelles est sans effet sur les moisissures. Cette publication pointe le risque d'aggraver certaines pathologies par la non maîtrise du développement de moisissures dans l'eau*

**Belhassen H, Jimenez-Diaz I, Arrebola JP et al.** Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case control study in Tunisia. *Chemosphere* 2015; **128** :1-6

*Le but de cette publication était d'analyser l'excrétion de la zéaralénone et de ses métabolites ( $\alpha$ -zéaralénone,  $\beta$  - zéaralénone,  $\alpha$  zéaralanol,  $\beta$  zéaralanol, zéaralanone) chez des patients atteints de cancer du sein. L'analyse a été faite en*

*utilisant une méthode de chromatographie liquide couplée à un spectre de masse (ms/ms). Tous ces métabolites sont excrétés dans l'urine. Un lien a pu être établi entre l' $\alpha$  zearalanol et le cancer du sein.*

**Taranu I, Marin DE, Pistol GC et al.** Induction of pro-inflammatory gene expression by *E coli* and mycotoxin zéaralénone contamination protection by a lactobacillus mixture in porcine IPEC-1 cells. *Toxicon* 2015;**97**:53-63

*L'effet conjugué d'E coli et de la zéaralénone sur le système immunitaire a été testé. Cette publication pointe l'interaction des deux agents pathogènes. Ces contaminants peuvent également se retrouver simultanément dans l'environnement humain et être à l'origine de phénomènes inflammatoires. Les auteurs ont testé des lactobacillus comme agent protecteur*

**Markov K, Mihaljvic B, Domijan A et al.** Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B1 in vitro and in situ using gamma irradiation. *Food control* 2015;**54**:79-85

*Cette publication montre la possibilité de retrouver des champignons filamenteux opportunistes comme les Penicillia, les Aspergilli, les Fusaria, et cladosporia dans les plomberies du système d'eau chaude des hôpitaux. Le traitement par de la monochloramine utilisé pour limiter le développement de légionnelles est sans effet sur les moisissures. Cette publication pointe le risque d'aggraver certaines pathologies par la non maîtrise du développement de moisissures dans l'eau*

**Sun LH, Lei MY, Zhang NY et al.** Individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1, zeralenone, deoxynivalenol and fumonisin B1 on BRL 3A rat liver cells. *Toxicon* 2015;**95**:6-12

*L'effet combiné de ces mycotoxine a été testé sur des cellules hépatiques. Ainsi la coexistence d'AFB1 avec la ZEA et le DON amplifie les effets hépatotoxiques de chaque mycotoxine individuellement. Cette publication est importante pour confirmer que l'évaluation du risque mycotoxine doit prendre en compte l'effet cocktail.*

### Conflits d'intérêts :

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêt  
 avoir un ou plusieurs conflits d'intérêt