



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 35-2007

**Concerne: Les risques chimiques émergents dans la chaîne alimentaire –
Etude de cas: les mycotoxines émergentes (dossier Sci Com 2007/07 : auto-
saisine)**

Avis approuvé par le Comité scientifique le 9 novembre 2007.

Résumé

Le Comité scientifique s'est saisi d'un dossier pour étudier les risques chimiques émergents. Dans un premier temps, le concept de «risques chimiques émergents (RCE)» est défini et l'étude des RCE est située dans le contexte national et international. Un système de classification des risques chimiques émergents est établi.

Dans un deuxième temps, l'étude de cas «les mycotoxines émergentes» est traitée en profondeur. Le Comité scientifique s'est focalisé sur les mycotoxines émergentes pour les quelles des recherches sont réalisées en Belgique et en Europe. Le Comité scientifique formule des recommandations pour le plan de surveillance de l'AFSCA et pour la recherche scientifique en ce qui concerne les mycotoxines émergentes.

Summary

Advice 35-2007 of the Scientific Committee of the FASFC

The Scientific Committee started a self tasking study on emerging chemical risks. Firstly, the concept of emerging chemical risks (ECR) is defined and the study of ECR is situated within the national and international context. A system of classification of emerging chemical risks is established.

Secondly, a case study on emerging mycotoxins is presented. The study is focused on emerging mycotoxins which are a subject of research in Belgium and in Europe. The Scientific Committee makes recommendations for the FASFC control plan and for scientific research on emerging mycotoxins.

Mots clés

Risques chimiques émergents, mycotoxines, étude de cas

1. Termes de référence

1.1. Objectif

L'objectif général du dossier auto-saisine «Risques chimiques émergents pour la chaîne alimentaire» consiste à établir une procédure pour l'identification de nouveaux dangers chimiques et à émettre des propositions pour l'actualisation du programme de surveillance de l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA).

Les termes de référence établis sont:

- 1) Définir le concept de risque chimique émergent (RCE)
- 2) Situer l'initiative du Comité scientifique dans le contexte national et international
- 3) Illustrer le concept de RCE par des exemples et/ou des études de cas.
- 4) Classer les RCE suivant plusieurs critères (groupes chimiques, effets, origines, ...).
- 5) Proposer un système d'identification et de priorisation des RCE
- 6) Emettre des recommandations pour le programme de contrôle
- 7) Emettre des recommandations pour la recherche scientifique

Vu les discussions menées durant les réunions de groupe de travail du 13 avril 2007, 6 juillet 2007, 9 octobre 2007 et la séance plénière du 9 novembre 2007,

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Sur base des informations disponibles dans la littérature, le concept de risques chimiques émergents dans la chaîne alimentaire est défini. Aux travers d'étude de cas, le Comité scientifique étudie les risques chimiques émergents pour la chaîne alimentaire. La première étude de cas qui sera présentée concerne les mycotoxines émergentes.

3. Les risques chimiques émergents (RCE)

3.1. Définition du concept de RCE

La définition proposée par l'EFSA (2006) a servi de point de départ. Cette définition a été adaptée pour devenir :

«Un risque chimique émergent est un problème qui dans le futur peut poser un risque pour la chaîne alimentaire. Les indicateurs d'un risque chimique émergent sont liés (1) à une exposition significative à un danger non reconnu précédemment, ou (2) à une exposition accrue (on parle alors de risque ré-émergent) ou (3) à une sensibilité croissante de la population à un danger connu».

Cette définition est illustrée par les exemples suivants:

(1) Exposition significative à un danger non reconnu précédemment (dans le contexte de la sécurité de la chaîne alimentaire).

- Nouvelles connaissances
 - Acrylamide dans les pommes de terre frites et dans les biscuits
 - Benzène dans les boissons rafraîchissantes

- Toxines T2 et HT2 dans les denrées alimentaires et dans les aliments pour animaux
 - Migration des résidus d'emballage (monomère des plastiques)
 - Nouvelles méthodes de production
 - Utilisation de benzoate comme conservateur dans les boissons rafraîchissantes, pouvant générer du benzène
 - Décontamination microbienne des produits végétaux par des dérivés chlorés (hypochlorite)
 - Irradiation des matériaux d'emballage par des rayons gamma
 - Comportement des matériaux d'emballage aux micro-ondes
 - Entrée dans la chaîne alimentaire de produits chimiques industriels et autres xénobiotiques
 - Substances perfluorées (PFOS, PFOA)
 - Composés polybromés (PBDE)
 - Organoétains
 - Phtalates
- (2) Exposition nouvelle / augmentante (et inattendue) à un danger connu.
- Exposition nouvelle à un composé interdit dû à :
 - Un usage frauduleux (colorants azoïques dans le chili (poudre), nitrofuranes et vert de malachite dans les produits de l'aquaculture, mélamine dans les aliments pour animaux domestiques, ...)
 - Contamination accidentelle (nitrofen dans les céréales et produits céréaliers, ...)
 - Contamination environnementale (DDT dans les oeufs de poules en libre parcours, vert de malachite dans le poisson, aldrine dans le saumon d'élevage, ...)
 - Exposition grandissante à un danger déjà connu dû à :
 - Modification des habitudes alimentaires (toxines et contaminants dans les suppléments alimentaires, préparations à base de plantes et d'épices, ...)
 - Changement dans le niveau de contaminants dans les aliments spécifiques (aflatoxine dans les poivrons hongrois ou dans le maïs italien (polenta), ...)
 - Exposition inattendue à un danger déjà connu dû à :
 - Contamination de procédé (dioxine dans la gélatine et dans la graisse due à une contamination de l'HCl et dioxines dans les aliments pour animaux dû à la contamination des argiles, ...)
 - Contamination croisée (allergènes dans des denrées alimentaires spécifiques, médicaments vétérinaires dans les aliments pour animaux, ...)
 - Contamination environnementale (métaux lourds et dioxines dans des denrées alimentaires suite à une activité industrielle, PCB, dioxines et autres contaminants environnementaux dans les œufs de poules en libre parcours, ...)
- (3) Augmentation de la sensibilité de la population à un danger déjà connu.
- Allergènes

3.2. Situation de l'initiative du Comité scientifique dans le contexte national et international

La European Food Safety Authority (EFSA) a une obligation sous l'article 34(1) du Règlement 178/2002 d'établir une procédure de monitoring pour la recherche systématique, pour la collecte, le rassemblement et l'analyse d'informations et de données en vue d'identifier les risques alimentaires émergents. Suivant l'opinion de l'EFSA sur les risques émergents (adopté le 31 mai 2006), une unité de risques émergents sera établie. Cette unité contrôlera

toutes les sources d'informations pertinentes afin de prédire les risques émergents à un stade précoce afin qu'ils puissent être empêchés et contenus (FSA, 2007).

Différents projets sur les risques émergents ont été mis en place. Un inventaire des différents projets se trouve ci-dessous:

- Le projet PERIAPT a simulé l'intérêt pour un futur réseau concentré sur la problématique de l'identification des risques émergents pour la recherche européenne, le développement et la politique de la sécurité alimentaire. Il a formé une plate forme qui peut développer à long terme un programme de recherche transnational sur les risques émergents par l'amélioration de la co-opération, des programmes de recherche nationales et régionales (projet SAFEFOODERA).
- EMRISK était un projet financé par l'EFSA pour le développement d'un système d'identification des risques émergents (ERIS), qui avait pour dessein de fournir des outils pour la détection d'un risque émergent. Le projet impliquait des collaborateurs de nombreux pays européens (FSA, 2007).
- Un réseau d'experts existe au sein du projet intégré SAFE FOOD dans le 6^{ème} programme cadre.
- Des réseaux internationaux et des systèmes d'échange nationaux comme l'OIE -World Animal Health Information System international (http://www.oie.int/eng/info/en_info.htm), WHO - Global outbreak Alert and Response Network (GOARN) (<http://who.int/csr/outbreaknetwork/en/>) and global Public Health Intelligence Network (GPHIN) (<http://www.who.int/csr/alertresponse/en/>), le Food Surveillance System (FSS), le réseau global des autorités nationales de sécurité alimentaire de l'OMS (l'INFOSAN) et RASFF(CE) ont été mis en place.
- L'USDA-APHIS Center for Emerging Issues (USA, <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/index.htm>) identifie les problèmes qui peuvent affecter les maladies animales ou le commerce de produits animaux aux USA. Les sujets sont principalement microbiologiques mais des cas chimiques sont occasionnellement inclus (Kleter GA et al. 2006).
- L'Office of Research and Development de l'US Environmental Protection Agency (EPA ORD) Research on «environmental futures» including «emerging pollutant» (USA, <http://epa.gov/osp/futures/aboutgoal.htm>) a pour objectif d'identifier les polluants émergents pour lesquels l'occurrence dans l'environnement a été modifiée ou était précédemment inconnue ou pour lesquels la toxicité n'a pas été connue dans le passé (Kleter GA et al. 2006).
- Un Comité scientifique européen sur les risques de santé émergents et nouvellement identifiés (SCENHIR, http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/04_scenihir/04_scenihir_en.htm) couvre l'alimentation mais aussi d'autres problèmes comme les nouvelles technologies (Kleter GA et al. 2006).
- Un projet «Horizon scanning for environmental contaminants», en cours au Central Science Laboratory (CSL) de la Food Safety Agency (FSA) (octobre 2006 - mars 2007), a pour objectif d'examiner les méthodologies pour l'identification des menaces des contaminants émergents pour la sécurité alimentaire.
- Un workshop international de la FSA sur la prévention des incidents alimentaires et sur un balayage horizontal de la sécurité des risques alimentaires émergents organisé en coopération de l'EFSA s'est tenu les 5 et 6 mars 2007. L'objectif clef du workshop est de réduire le risque des consommateurs des aliments contaminés par le développement d'une stratégie de prévention des incidents.
- Kleter et al. (2006) ont, au travers de trois études de cas, tenté de définir des indicateurs et une approche pour l'identification des risques des aliments émergents. Ces trois cas sont : 1) usage des antibiotiques dans l'aquaculture intensive de crevettes et de poissons, 2) les pesticides d'origine naturelle, qui peuvent inclure les produits chimiques et microbiologiques et 3) la toxoplasmose dans les cochons d'élevage biologique et de libre parcours en comparaison avec l'élevage conventionnel.

Des projets de recherche sont en cours au niveau national sur les risques émergents. Un projet dont l'objectif est de mettre au point et de valider un outil expérimental qui puisse permettre d'évaluer les risques chimiques émergents en sécurité alimentaire est en cours au CERVA.

3.3. Classification des RCE

Par voie d'entrée dans la chaîne alimentaire:

- Toxines naturelles (végétales, fongiques, marines, bactériennes,...)
- Pesticides, médicaments, colorants et additifs non autorisés
- Contaminants environnementaux (métaux lourds, dioxines, PCB, composés bromés et perfluorés)
- Contaminants liés aux procédés de transformation, de préparation et d'emballage des aliments, (acrylamide, furanes, benzène, semicarbazide,...)

Par mode d'action toxicologique:

- Substances cancérogènes et génotoxiques (aflatoxines, hydrocarbures aromatiques polycycliques, colorants azoïques, furanes, composés allyloxybenzéniques, dioxines, ...)
- Perturbateurs endocriniens (médicaments à effets hormonaux, certains pesticides et contaminants environnementaux (dioxines), micro-constituants végétaux (polyphénols), ...)
- Substances allergènes
- Autres (substances néphrotoxiques, hépatotoxiques, immunosuppressives, ...)

Par type de risque:

- Risque aigu : toxines de plantes, phycotoxines, allergènes (exemple : algues marines dans les huîtres)
- Risque chronique : perturbateurs endocriniens, produits cancérigènes, produits bioaccumulables, ...

Par facteurs pouvant influencer l'apparition des RCE:

Les différents facteurs agro-industriels, géo-climatiques et sociétaux suivants sont à prendre en considération pour aider à identifier et prioriser les RCE :

- Changements dans les procédés liés à la production agricole et la transformation / préparation des denrées. Exemples :

- Sélection variétale (enrichissement en substances de défense potentiellement toxiques (ex. solanine); problématique des OGM interdits en Europe, facteurs anti-nutritionnel du soja)
- Amendements et fertilisation (boues d'épuration, cadmium dans les engrais phosphatés, ...)
- Protection des cultures et des denrées conservées (changement dans la nature des résidus de pesticides, impuretés botaniques, mycotoxines)
- Intensification de l'aquaculture (risques d'accumulation de polluants persistants, résidus médicamenteux, toxines, ...)
- Intensification de la fruiticulture et horticulture dans des pays en voie de développement (ex. usage intensif de nématocides, insecticides et fongicides en cultures sous abris pour l'exportation)
- Non confinement des filières de production (OGM, Bio) et problématique de résidus indésirables (ex. OGM interdits dans alimentation humaine et animale, contamination des productions bio par des résidus pesticides de synthèse, contamination de plantes médicinales par des plantes sauvages toxiques (confinement))
- Contraintes économiques (pression économique) et risques d'intensification des usages de produits illicites (pesticides, antibiotiques (ex. nitrofurane dans les œufs importés d'Inde), colorants interdits) ou de moins bonne qualité (exemple auxiliaires technologiques)

- Nouveaux contaminants produits lors d'un changement de procédé (séchage, chauffage, friture, autoclavage, ...) et des matériaux en contact (emballages, sealings, encre (ITX), colle, etc); «Non food grade chemicals»
- Produits réduits en énergie et sel (exemples produits allégés et risque de prolifération de moisissures)
- Nouveaux flux de déchets de l'industrie agro-alimentaire et produits secondaires de substitution (ex. tourteaux de colza, corn gluten feed résultant de la production de bioéthanol, biodiesel)

Facteurs sociétaux:

- Voyages et engouement pour les produits exotiques et naturels (compléments alimentaires à base de plantes exotiques, épices, plantes médicinales, consommation de produits moins connus d'un point de vue toxicologique comme infusions de plantes, huiles essentielles, salades de fleurs de diverses natures,...)
- Echanges transcontinentaux (ex. importation plus importante de semences contaminées par de nouveaux germes producteurs de mycotoxines)
- Perception tronquée des risques réels auprès des consommateurs (préférence pour des aliments et médicaments « naturels » sans considération pour la toxicité éventuelle de toxines et contaminants présents; préférence aux compléments alimentaires pour combler d'éventuelles mauvaises habitudes alimentaires avec risque de surdosage de certains constituants, végétarisme, etc.)
- Préférence pour des denrées alimentaires élaborées (prêtes à être consommées) avec augmentation des risques de problèmes en cours de traitement (contamination croisée, utilisation de mauvais ingrédients ou auxiliaires, contamination par des produits en contact, ...)

Facteurs géo-climatiques:

- Introduction de nouvelles espèces fongiques suite aux changements climatiques et risque accru de production de mycotoxines exotiques (ex. aflatoxine dans paprika hongrois et dans maïs italien)
- Augmentation des périodes favorables au développement de champignons cryptogamiques (chaleur et humidité) et augmentation de la contamination des productions céréalières par les mycotoxines (y compris aflatoxines)
- Introduction de nouvelles espèces de plantes cultivées ou sauvages en raison des changements climatiques avec risque de nouveaux agents cryptogamiques (production de mycotoxines) et impuretés botaniques.

Les facteurs mentionnés dans le projet PERIAPT sont: l'économie, le commerce international, le climat, la culture, la démographie et l'interaction avec les médicaments. Cette liste de facteurs n'est pas exhaustive mais illustre le besoin de l'implication d'une grande série de disciplines et de champs d'expertises pour explorer et déterminer une stratégie efficace de l'identification des risques alimentaires émergents (VWA, 2005).

Le facteur « économie » n'est pas repris en temps que tel dans la classification proposée par le Comité scientifique mais est considéré, entre autre, sous les changements liés à la production agricole et sous les contraintes économiques.

4. Etude de cas: les mycotoxines émergentes

4.1. Introduction: Définition du champs d'investigation

Le domaine des mycotoxines émergentes étant tellement vaste, cette note va se focaliser, d'une part, sur les mycotoxines pour lesquelles des recherches ont été ou sont réalisées au niveau Belge ou Européen ou pour lesquelles la législation est en train d'évoluer. Dans certains cas, il s'agit de nouvelles mycotoxines non encore réglementées (mycotoxines émergentes *sensu stricto*). Dans d'autres cas, il s'agit de mycotoxines ré-émergents, la toxine étant déjà connue mais posant de nouveaux problèmes suite à sa détection dans de nouvelles matrices, des modifications de pratiques culturales, les changements climatiques, le commerce international, etc.

4.2. Mycotoxines émergentes

4.2.1. Toxines de Fusarium non encore prises en compte par la législation

- 3-acétyldeoxynivalenol, 15-acétyldeoxynivalenol et nivalénol. Pour ces trichothécènes de type B produites, entre autres, par *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, les mesures envisagées pour le deoxynivalenol (DON) sont apparemment suffisantes. Il y a lieu de rester vigilant afin de s'assurer que le rapport de production entre ces toxines (non contrôlées dans les programmes officiels) et la toxine marqueur (DON) n'évolue pas de façon significative dans les céréales produites en Belgique et importées de l'étranger.
- Fumonisine B3 (FB3). Il s'agit d'une toxine de Fusarium (*F. proliferatum*, *F. verticillioides*). Le contrôle des fumonisines B1 (FB1) et B2 (FB2) est apparemment suffisant en Belgique. Cependant, en Tanzanie, des analyses de fumonisines sur le maïs ont montré que l'occurrence de la fumonisine B3 est plus élevée que celle de la FB1 et FB2 (B. De Meulenaer, communication personnelle).
- T2 et HT2. Il s'agit de trichothécènes de type A produites par Fusarium (*F. poae*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. lansesthae*). Des limites maximales sont envisagées au niveau européen pour 2008. Les estimations des doses absorbées indiquent que la présence de ces toxines peut-être préoccupante du point de vue de la santé publique. La dose journalière tolérable (TDI) combinée provisoire est de 0,06 µg/kg body weight (bw) par jour (EU Scientific Committee on Food, 2002). Il faut poursuivre la collecte de données et étudier davantage les facteurs responsables de leur occurrence. Il est nécessaire de contrôler la présence des toxines T2 et HT2 dans les céréales et les produits céréaliers, en particulier sur l'avoine et les produits à base d'avoine. L'année 2006 s'est révélée particulièrement propice à la contamination par ces toxines.
- Enniatines et beauvericine. Il s'agit de cyclodepsipeptides pour lesquelles les données toxicologiques sont encore fragmentaires mais qui peuvent être présentes dans les céréales à des teneurs relativement élevées (niveau ppm). Les premières sont surtout présentes en Scandinavie et ont également été mises en évidence en Belgique (cfr annexe 1). La seconde a été moins fréquemment détectée en Belgique. En revanche, elle est bien présente en Italie et USA (ex. survey in Kansas Counties (2005): 8 échantillons de maïs sur 48 contiennent plus de 100 ppm de beauvericine et un seul sur 48 en contient moins d'1 ppm ! (communication personnelle de J. Scott Smith, Kansas State University). La beauvericine est essentiellement produite par *F. sporotrichioides* qui est également responsable de la production des toxines T2 et HT2.
- Il existe encore d'autres toxines de Fusarium (diacetoxyscirpenol (DAS), fusarine, moniliformine, acide fusarique, ...) pour lesquelles il n'existe pas encore assez d'études tant au niveau de l'occurrence dans les conditions prévalant en Belgique que de la toxicologie.

4.2.2. Toxines d'Alternaria

Alternaria alternata et *A. radicina* sont deux moisissures qui peuvent se développer sur céréales, graines de tournesol, poivre, sésame, olive, divers fruits, tomate, carotte et céleri.

Les métabolites secondaires produits par *A. alternata* sont l'alternariol, l'alternariol méthyl ether, l'altéroxin et l'acide tenuazonique (voir annexe 2) et ceux produits par *A. radicina* sont la radicine, l'épi-radecinol et le radicinol.

La présence de ces métabolites dans les aliments peut être dangereuse pour l'homme. Certains ont montré des effets embryotoxiques et tératogènes chez les souris et les hamsters et cytotoxiques pour des bactéries et cellules de mammifères. Des extraits de *A. alternata* se sont avérés mutagènes envers différents microorganismes et les cellules de mammifères.

La problématique des toxines d'Alternaria fait l'objet de recherche au sein d'un projet Européen (European Project QLK1-1999-00986: "Reduction of contamination by fungi and mycotoxins during the organic vegetable production chain: Alternaria-carrot model"). (<http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/ka1/volume1/qlk1-1999-00986.htm>)

Il n'y a pour l'instant pas de limites ou de valeurs guide pour les mycotoxines d'*Alternaria* car l'exposition de l'homme par voie alimentaire serait faible. Il faut cependant attirer l'attention sur les groupes de produits spécifiques comme les jus de légumes et les aliments pour bébés (à base de carotte, de pomme). Des actions pourraient être entreprises ultérieurement si des informations nouvelles le nécessitent.

4.2.3. Autres toxines

De nombreuses autres toxines produites essentiellement par le genre *Penicillium* et *Aspergillus* pourraient entrer en considération au vu des recherches réalisées à l'étranger. En Belgique, il y a lieu de noter qu'un grand nombre de toxines connues telles que l'ochratoxine A (OTA), la gliotoxine, la stérigmatocystine mais également moins connues comme l'acide cyclopiazonique, l'acide mycophénolique, la citrinine, l'acide pénicillinique et l'acide helvolique ont été retrouvées dans les poussières prélevées dans des entrepôts de blé (Tangni *et al.*, 2007). (voir également le paragraphe consacré aux voies alternatives d'exposition dans la section « mycotoxines ré-émergentes »).

4.3. **Mycotoxines ré-émergentes**

4.3.1. Agriculture biologique

La crainte de voir les produits de l'agriculture biologique davantage contaminés par les mycotoxines vu l'emploi limité de fongicides et d'insecticides a incité la réalisation de nombreuses recherches dans ce domaine. En Belgique, le projet CP-30 financé par la Politique Scientifique Fédérale et coordonné par le prof. Larondelle de l'UCL s'est particulièrement penché sur la contamination des céréales et produits céréaliers issus de l'agriculture conventionnelle et biologique. Les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont repris dans le tableau ci-dessous.

Table 1: Summary of the mycotoxin contamination study carried out in Belgium (2002-2004) (Larondelle Y., Motte J.C., Peeters J., Van Peteghem C., Schneider Y.J. Mycotoxin contamination of regular and organic foodstuffs, Belgian Science Policy, Brussels, 2005)

Mycotoxin	Wheat cereals	Whole-wheat flour	Beer	Whole-wheat pasta	Corn-flakes	Polenta	Sweet corn
OTA	nd	CP OR > CV	CP OR > CV	nd	nd	nd	nd
FB1	nd	nd	No OR = CV	nd	PA OR > CV	CP OR < CV	No OR = CV
FB2	nd	nd	No OR = CV	nd	PA OR > CV	CP OR < CV	No OR = CV
FB3	nd	nd	nd	nd	PA OR = CV	nd	nd
DON	CP OR < CV	CP OR < CV	No OR = CV	PA ?	nd	nd	nd
ZEA	CP OR < CV	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd, no data;

CP, the foodstuff presents a Critical Point for contamination by the specified toxin;

PA, the foodstuff presents a Point of Attention for contamination by the specified toxin;

No, No problems awaited in this foodstuff for the studied mycotoxin;

OR > CV, organic tends to be more contaminated;

OR < CV, conventional tends to be more contaminated;

OR = CV, organic and conventional show similar contamination potential.

Il en ressort que la situation est assez contrastée et dépend du type de mycotoxine et de la matrice considérée. Un exemple frappant est celui de la bière pour laquelle des teneurs en OTA parfois assez élevées ont été détectées dans la filière biologique (Harcz *et al.*, 2007). Une synthèse de l'ensemble des résultats de l'étude est donnée à l'annexe 3.

Des travaux ont également été réalisés en Belgique sur la patuline dans les jus de pomme, indiquant que des teneurs plus élevées étaient présentes dans les jus de pomme biologiques (Tangni *et al.*, 2006; Baert *et al.*, 2007).

4.3.2. Ensilages, fourrages et autres aliments pour animaux

La Politique Scientifique Fédérale finance actuellement un projet consacré à l'étude des moisissures et des mycotoxines susceptibles d'affecter la qualité et la sécurité sanitaire des ensilages à base d'herbe et de maïs (projet BELSPO « SILFUNGITOX » C3/00/22). Les mycotoxines recherchées sont le DON, la zéaralénone (ZEA) et zéaralénol, les toxines T2 et HT2, les enniatines et beauvericine, la patuline, l'OTA et la citrinine, l'acide mycophénolique, l'acide cyclopiazonique, la mevinolin, le verruculogen et le penitrem A, la roquefortine C et la PR toxine. Le choix des mycotoxines a été guidé par les indications de la littérature (voir par exemple Fink-Gremmels, Mycotoxins in forages, The Mycotoxin blue book). Dans les ensilages à base de maïs, le DON peut être présent en quantités très élevées tandis que dans les ensilages d'herbe la patuline est plus abondante (Tangni, communication personnelle). Il sera utile d'attendre les résultats définitifs de cette recherche afin de pouvoir focaliser les efforts sur les toxines les plus pertinentes en termes de santé animale.

La culture de maïs qui dans nos contrées est essentiellement réservée à l'alimentation des animaux mérite une attention particulière. En effet, des rapports émanant de pays voisins (France) ou éloignés (USA) et les études en cours en Belgique ont montré que cette matrice avait tendance à être sérieusement contaminée par diverses toxines de *Fusarium* (fumonisines mais aussi DON et zéaralénone). En outre, cette matrice peut également contenir (H)T-2) et des enniatines (Callebaut, communication personnelle). Aux USA, l'Indiana Statistics Service a rapporté en 2006 les plus hauts niveaux de mycotoxines dans le maïs depuis 10 ans. Ainsi l'Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory a déterminé, dans des échantillons de six comtés, du DON à des teneurs de 0,5 à 8 ppm et du FB1 à des

teneurs de 0,7 à 174 ppm (Newsletter R-Biopharm Rhone). Rappelons qu'aux Etats-Unis, le maïs est, en outre, particulièrement contaminé par la mycotoxine émergente 'beauvericine' (voir section Mycotoxines émergentes).

D'après Galtier *et al.* (2006), les fourrages à base d'herbe méritent également notre attention en terme de risque de contamination par *Neotyphodium* spp qui génère des composés toxiques incluant l'ergovaline (alcaloïde) et le lolitrem B. Ici aussi les préoccupations sont essentiellement formulées en terme de santé animale.

L'aquaculture connaît d'importants développements (augmentation de la production) et, en outre, on assiste à de profonds changements dans la technique de nutrition. En effet, de plus en plus, il est tenté de substituer des composés végétaux (protéines, huiles) aux produits animaux (dérivés de la pêche) en vue, notamment, d'éviter l'accumulation de substances persistantes et lipophiles (comme les dioxines, les PCB et les pesticides organochlorés) dans les produits de l'aquaculture. Cette substitution a pour corollaire un risque accru d'intoxication par des mycotoxines telles que les aflatoxines, les toxines de Fusarium et l'OTA. Actuellement, les données disponibles ne permettent pas de déduire si les mycotoxines présentent également un danger pour le consommateur de produits de l'aquaculture.

Pour l'instant, les problèmes de transfert vers les denrées alimentaires d'origine animale ne sont bien documentés que dans le cas de l'aflatoxine M1 (AFM1) métabolite de l'aflatoxine B1 (AFB1) mais une vigilance s'impose pour d'autres toxines qui n'ont pas encore fait l'objet d'études (ex. enniatines). La problématique du transfert des mycotoxines de l'aliment vers les produits animaux doit être gardée à l'esprit compte tenu des évolutions rencontrées et compte tenu de la nature très diverse des mycotoxines émergentes. Une attention particulière doit être portée non seulement au lait mais également aux œufs, tissus comestibles des poissons et aux organes tels que le foie, les rognons (reins). Pour les œufs par exemple, le rapport de concentration par rapport à l'aliment peut être assez préoccupant pour certaines toxines. Ainsi, avec des teneurs en ZEA de 3 ppm (recommandation européenne pour aliments à base de maïs), la teneur dans le jaune d'œuf pourrait atteindre 60 ppb compte tenu du rapport «aliment/jaune d'œuf» égal à 50 établi à l'aide de traceurs radioactifs (Dailey *et al.*, 1980). Sachant que la TDI pour la ZEA est de 200 ng/kg bw (EU Scientific committee on Food, 2000), en consommant un œuf par jour à ce niveau de contamination (soit environ 20 g de jaune d'œuf à 60 ng ZEA/g), un consommateur de 60 kg s'exposerait, rien que par cette voie, à une dose de ZEA correspondant à 10 % de la TDI, ce qui est loin d'être négligeable, compte tenu des autres sources d'exposition.

4.3.3. Modification climatiques, échanges internationaux et nouveaux risques pour les mycotoxines ré-émergentes

Aflatoxines

Des publications récentes font état de contaminations par les aflatoxines dans certains cas particuliers où le problème n'existait pas auparavant. Dans un premier cas, il s'agit de la contamination de paprika Hongrois par l'aflatoxine B1 (AFB1). La crise qui en a découlé en Hongrie en 2004 a obligé les autorités à se pencher sur cette problématique. Il en est ressorti que la contamination résultait d'un mélange du paprika local avec du paprika importé d'autres pays tels que l'Afrique du Sud et le Pérou. La contamination du paprika local peut découler directement du mélange avec le produit importé mais également suite à l'inoculation du produit local avec des souches productrices d'aflatoxines, souches qui sont véhiculées par le produit importé (Banati and Lakner, 2006).

Un autre cas est décrit en Italie (Piva *et al.*, 2006) et concerne la contamination de maïs produit, notamment, en Lombardie durant l'année 2003. Cette année très chaude a été propice à l'implantation d' *Aspergillus flavus*, espèce productrice d'aflatoxines. Le maïs contaminé a été à l'origine de la contamination du lait par l'AFM1 avec 14% d'échantillons

prélevés en Lombardie au dessus de la limite maximale européenne ¹ (0,05µg/kg) pendant la période d'octobre 2003 à février 2004. A noter qu'en 2004 et 2005, années climatiquement moins chaudes, la situation était redevenue normale à quelques exceptions près. La survie d'*A. flavus* dans les régions concernées et ailleurs doit être suivie attentivement.

Les échanges internationaux et le réchauffement climatique mondial sont des paramètres très importants à prendre en considération étant donné les risques d'introduction de nouvelles souches de moisissures dans nos contrées et les risques inhérents de production de mycotoxines «exotiques» telles que les aflatoxines.

Alcaloïdes de l'ergot

Les alcaloïdes de l'ergot ont probablement été les premières mycotoxines responsables d'intoxications alimentaires par le passé. Ces dernières années il semble qu'il y ait une recrudescence du nombre de cas alors que leur présence dans les céréales avait quasiment disparu durant la seconde moitié du siècle dernier. Les alcaloïdes de l'ergot comprennent un grand nombre de composés différents qui sont produits par le genre *Claviceps* (seigle et autres céréales) mais aussi par *Neotyphodium* (champignon endophyte des herbes; voir ci-dessus). Parmi les composés les plus importants on peut citer l'ergotamine, l'ergocristine, l'ergocryptine et l'ergocornine (céréales) mais aussi l'ergovaline, l'ergine, l'erginine et les alcaloïdes de type clavine (herbages).

Une recommandation européenne invite les états membres à collecter des données aussi bien dans les aliments pour animaux que dans les denrées alimentaires.

Autres matrices à risque pour diverses mycotoxines

Les épices, les préparations à base de plantes (tisanes, par exemple), les condiments, les compléments alimentaires constituent des matrices favorables à la contamination par divers types de mycotoxines telles que l'OTA, l'AFB1, la zéaralénone, les toxines trémorgènes, etc. Peu de données existent à l'heure actuelle (sauf pour les épices) mais il semble opportun d'attirer l'attention sur les risques de contamination de ces denrées. L'EFSA recommande, par exemple, de prêter attention aux «silent carrier» d'aflatoxines (EU Food Law 9 Mars, 2007).

Toxines masquées et métabolites

Des formes masquées de mycotoxines peuvent exister dans diverses denrées alimentaires. Il s'agit essentiellement de formes conjuguées ou la mycotoxine réagit avec un sucre comme le glucose, par exemple (Berthiller *et al.*, 2005). Ces formes conjuguées échappent généralement à l'analyse alors que in vivo la mycotoxine peut être libérée par hydrolyse enzymatique et manifester son effet toxique. Ce phénomène de mycotoxines conjuguées pourrait être à l'origine du « fumonisin paradox ». En effet, les expérimentations animales indiquent que très peu de FB1 est absorbé in vivo et, pourtant, des effets toxiques peuvent se manifester malgré la très faible absorption du toxique, probablement parce que des formes conjuguées du FB1 pourraient être plus disponibles et se transformer rapidement en FB1 après absorption (Shier W T, 2000).

Les métabolites de certaines mycotoxines peuvent également poser problème, notamment dans certains produits animaux. Les cas de l'AFM1 (métabolite de AFB1) dans le lait sont connus depuis longtemps mais d'autres cas ont été détectés plus récemment comme les métabolites de ZEA que l'on peut retrouver dans les œufs. Plusieurs métabolites de ZEA étant dotés de propriétés oestrogènes tout comme le produit parent, représentent un risque potentiel qui devrait être évalué plus en détail.

¹ Règlement (CE) n° 1831/2003 portant fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires

Mélanges de toxines et interactions avec autres contaminants

Des études récentes (voir par exemple Dillenburger *et al.*, 2001) ont montré que les effets de mycotoxines isolées (introduites à l'état pur dans l'organisme investigué) sont généralement moins néfastes que ceux observés avec des aliments qui ont été naturellement contaminés par des organismes producteurs de toxines. Il est supposé que cette différence est imputable au fait, qu'en contamination naturelle, d'autres substances peuvent être produites et interagir avec le mode d'action de la toxine cible. Si certaines interactions entre aflatoxines et autres mycotoxines sont déjà bien connues en nutrition animale, on manque encore d'informations sur les interactions pouvant se produire entre DON, T2, OTA, ZEA entre elles ou avec d'autres toxines telles que les autres trichothécènes, l'acide pénicillinique, l'acide fusarique, la moniliformine et la beauvericine (De Schothorst, 2003). A noter, toutefois, une étude (Lusky *et al.*, 1998) de laquelle il ressort que le transfert d'OTA vers les organes du porc est 1,5 à 2 fois plus important lorsque l'aliment est co-contaminé par le DON.

Voies alternatives d'exposition

L'alimentation n'est pas la seule voie d'exposition de l'être humain aux mycotoxines. Des études ont montré que dans certains environnements, l'être humain pouvait inhaler des aérosols (poussières, par exemples) chargés en mycotoxines. Des études épidémiologiques tendent à démontrer que cette forme d'exposition s'ajoute à l'exposition alimentaire tel qu'il peut être montré par des analyses de toxines (Aflatoxines, OTA) dans le sérum sanguin des populations particulièrement exposées par leur environnement de travail (exemple, travailleurs chargés du chargement/déchargement de silos de grains ou dans des ateliers de conditionnement d'épices, etc) (Autrup JL *et al.*, 1993; Brera C. *et al.*, 2002). Récemment, il a été suggéré que les travailleurs exposés à des bio-aérosols générés dans des centres de tri de déchets organiques et dans des usines de compostage pourraient également subir une exposition accrue à certaines toxines comme l'OTA (Degen GH *et al.*, 2007).

5. Recommandations

5.1. Recommandation au niveau du plan de surveillance de l'AFSCA

Le Comité scientifique recommande de:

Céréales et produits céréaliers (hors maïs)

- Maintenir un haut niveau de contrôle tant dans les céréales et produits dérivés (ex.. pâtes, farines, son, pain, biscuits, snacks, céréales petit-déjeuner, plats préparés, alimentation pour nourrissons, ...) produits en Belgique qu'importés de l'étranger. Les mycotoxines visées sont le DON, ZEA, OTA, T2, HT2 dans les céréales indigènes. A celles-ci il convient d'ajouter les aflatoxines, les alcaloïdes de l'ergot pour les céréales importées. Il est important de cibler les contrôles sur les matrices à risque comme par exemple les farines complètes, les denrées enrichies en fibres,

Maïs et produits dérivés destinés à la consommation humaine

- Maintenir un haut niveau de contrôle dans les produits concernés (corn flakes, polenta, snacks à base de maïs, etc). Les mycotoxines visées sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, ZEA, T2, HT2, FB1, FB2.

Boissons

- Maintenir un haut niveau de contrôle de la patuline dans les jus de pomme avec un accent particulier pour le jus de pomme artisanal et/ou biologique.
- Maintenir un bon niveau de contrôle du DON et OTA dans la bière avec une attention particulière pour les productions artisanales et/ou biologiques.
- Maintenir un bon niveau de contrôle de l'OTA dans les vins et jus de raisins avec une attention particulière pour les produits originaires des contrées méridionales (ex. Sud de l'Europe).

Fruits secs, épices & condiments, compléments alimentaires

- Maintenir un bon niveau de contrôle des aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) et de l'OTA dans les fruits secs et renforcer le niveau de contrôle des aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) et de l'OTA dans les épices, condiments et compléments alimentaires.

Aliments pour animaux

- Maintenir un bon niveau de contrôle des matières premières (céréales, maïs, produits dérivés de l'agro-industrie) et des aliments élaborés. Etre particulièrement vigilant lorsque les conditions climatiques sont favorables aux contaminations au champ (fusarioses) et à l'égard des produits importés (aflatoxines, OTA, fumonisines, alcaloïdes de l'ergot, ...).

Le Comité scientifique insiste sur le fait que les échantillons en vue de l'analyse soient prélevés dans le respect des législations en vigueur lorsqu'elles existent et qu'il est impératif d'accorder la plus grande attention aux problèmes pouvant résulter de l'hétérogénéité de la contamination de la matrice.

5.2. Recommandations au niveau de la recherche

Le Comité scientifique recommande de:

1) Développer des méthodes d'analyses multi-mycotoxines qui permettent d'analyser davantage de mycotoxines dans les matrices présentant une importance particulière. Comme exemples, on peut citer:

- méthodes multi-mycotoxines (aflatoxines, DON, OTA, ZEA, T2, HT2) pour les céréales et les produits dérivés en veillant à ce que des performances analytiques clé (recovery, incertitude de mesure, sensibilité suffisante) soient maîtrisées pour les différentes toxines et les différentes matrices à analyser
- méthodes multi-mycotoxines (aflatoxines, DON, ZEA, T2, HT2, FB1, FB2) pour le maïs et les produits dérivés en veillant à ce que des performances analytiques clé (recovery, incertitude de mesure, sensibilité suffisante) soient maîtrisées pour les différentes toxines et les différentes matrices à analyser
- méthodes d'analyse de mycotoxines (aflatoxines, OTA, patuline, ZEA, toxines d'*Alternaria*, toxines trémorgènes,) dans de nouvelles matrices susceptibles d'en contenir (épices, condiments, légumes, jus de fruits, jus de légumes, compléments alimentaires, produits phytothérapeutiques, ...)
- méthodes d'analyse de mycotoxines (OTA, citrinine, patuline, acide mycophénolique, acide cyclopiazonique, mevinolin, toxines trémorgènes, roquefortine C, PR Toxin,) dans les fourrages, les ensilages et autres produits destinés à l'alimentation animale
- méthodes d'analyse d'alcaloïdes (de *Claviceps* et d'endophytes), dans les céréales et les fourrages (ergotamine, ergocristine, ergocryptine, ergocornine, ergovaline, ergine, erginine et alcaloïdes de type clavine).

2) Développer des méthodes d'analyse permettant de prendre en compte les mycotoxines cachées (masked mycotoxins), comme par exemple des produits de conjugaison, qui sont susceptibles de générer in vivo des composés toxiques non pris en compte par les méthodes classiques.

3) Poursuivre les études sur les risques engendrés par les fourrages et les ensilages destinés à l'alimentation animale:

- tous les produits à base de maïs (maïs grain, ensilages plante entière, ...). L'accent sera mis sur les toxines connues et émergentes.
- fourrages à base de graminées (foin, pailles, ensilages de ray-grass).

En outre, être particulièrement attentif aux évolutions de la réglementation européenne concernant les possibilités d'utilisation d'adsorbants (mycotoxin binders) en tant qu'additifs pour les aliments pour animaux. Si l'autorisation de tels additifs est envisagée, il est nécessaire d'évaluer en détail les avantages et inconvénients.

4) Poursuivre les études sur les risques engendrés par des modes de production nouveaux ou alternatifs ou à de nouvelles habitudes alimentaires:

- productions artisanales et/ou biologiques
- produits dérivés de la production de biofuels pouvant entrer dans la chaîne alimentaire
- nouvelles techniques d'ensilages (alimentation animale)
- nouvelles denrées alimentaires (appauvries en sel, en graisses, ...) plus susceptibles de contamination par des moisissures
- influence de nouveaux procédés technologiques (ex. atmosphère modifié) sur le développement de moisissures et la production de toxines
- exposition du consommateur par les épices, les condiments, les compléments alimentaires, les légumes frais ou les produits élaborés... à l'égard de toxines connues ou émergentes.

5) Poursuivre les études d'exposition globale des consommateurs aux toxines connues. Outre l'apport par voie alimentaire, accorder toute l'attention requise aux autres voies d'exposition (indoor mycotoxins, exposition sur le lieu de travail via poussières, bio-aérosols, ...).

6) Poursuivre les études concernant l'occurrence en Belgique et les propriétés toxicologiques de mycotoxines émergentes tant en alimentation humaine qu'en alimentation animale

- occurrence de toxines peptidiques (enniatines, beauvericine) dans les céréales belges et dans les céréales importées, devenir dans les produits élaborés, absorption par les animaux et les humains, persistance et transfert dans chaîne alimentaire, propriétés toxicologiques (y compris génotoxicité et carcinogénicité)
- occurrence de toxines d'*Alternaria* dans légumes frais et transformés. Propriétés toxicodynamiques et toxicologie (effets perturbateurs endocriniens, par exemple)
- Occurrence de la fumonisine B3 et des trichothécènes autres que le DON dans les céréales (y compris maïs) et suivi du rapport de concentrations entre celles-ci et les mycotoxines faisant l'objet de normes officielles
- occurrence de mycotoxines diverses (alcaloïdes tels qu'ergovaline, ergine, ... et alcaloïdes de type clavine, toxines trémorgènes, acide myco-phénolique, ...) dans les produits végétaux particuliers tels que les légumes, les épices, les condiments, les compléments alimentaires, les produits phytothérapeutiques. Etudes des propriétés toxico-dynamiques et des effets toxicologiques
- études sur le transfert de mycotoxines spécifiques telles que l'acide cyclopiazonique, la citrinine, les mycotoxines peptidiques, la ZEA (+ produits de conjugaison) vers les organes et les produits animaux (notamment le lait et les œufs) avec une attention toute

particulière pour les produits de métabolisation gardant une activité biologique (alpha et beta zéaralénol, par exemple).

7) Réaliser des études de biomonitoring des mycotoxines suite à l'exposition alimentaire et dans l'environnement du travail (déchargement de bateaux, silos, ateliers de conditionnement d'épices, etc).

8) Entreprendre des études pour la fixation de limites maximales pour les alcaloïdes de l'ergot dans les céréales.

Pour le Comité scientifique,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert.
Président

Bruxelles, le 07/12/2007

Références

- Autrup JL, Schmidt J, Autrup H. 1993. Exposure to aflatoxin B1 in animal-feed production plant workers. *Environ Health Persp* (99) 195-197.
- Brera C, Caputi R, Miraglia M, Iavicoli I, Salerno A and Carelli G. 2002. Exposure assessment to mycotoxins in workplaces : aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera, *Microchemical Journal*, 73, 167-173.
- Baert K, De Meulenaer B, Verdonck F, Huybrechts I, De Henauw S, Vanrolleghem PA, Debevere J, Devlieghere F. 2007. Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food and Chemical Toxicology* 45 (9) 1745-1751.
- Baert K, De Meulenaer B, Kamala A., Kasase C, Devlieghere F. 2006. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *Journal of Food Protection*, 69, 1371-1378.
- Banati D and Lakner Z. 2006. Analysis of an aflatoxin-caused food safety crisis in Hungary : Actors and strategies. In "The mycotoxin factbook" p121138 Edited by Barug, Bhatnagar, Van Egmond, Van der Kamp, Van Ossenbruggen, Visconti, Wageningen Academic Publishers
- Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R. 2005. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3421-3425.
- Dailey R E, Reese R E and Brouwer A. 1980. Metabolism of [14C] zearalenone in laying hens. *J Agric Food Chem.*, 28: 286-291.
- Degen GH, Mayer S. and Blaskewicz. 2007. Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers. *Mycotoxin Research* 23 (2), 94-100).
- De Schothorst (Stichting instituut voor de Veevoeding), 2003, Kwaliteitsreeks nr 89, 80p).
- Dillenburger T, Lauber U, Schollenberger M, Muller HM, Drochner W. 2001. Wirking von deoxynivalenol beim wachsenden Schwein. *Mycotoxin Research*, 17A, 170-173.
- EU Scientific Committee on Food. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf
- EU Scientific Committee on Food 2000. Opinion on the Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins Part 2: Zearalenone (ZEA). SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf
- EFSA. 2006. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to the early identification of emerging risks .*The EFSA Journal* (2006) 375, 1-14.
- FSA. 2007. Food Standards Agency's international workshop on food incident prevention and horizon scanning to identify emerging food safety risks, organised in cooperation with European Food Safety Authority London 5-6 March 2007.
- Galtier P et Loiseau N, Oswald I. and Puel O. How to identify new mycotoxin risks, *The World Mycotoxin Forum*, 6-8 November 2006, Cincinnati, USA.
- Fink-Gremmels J. Mycotoxins in forages. In "the mycotoxins blue book" p249-268.

Harcz P, Tangni EK, Wilmart O, Moons E. Van Peteghem C, De Saeger S, Schneider YJ, Larondelle Y, Pussemier L. 2007. Intake of OTA and DON through beer consumption in Belgium. *Food Additives and Contaminants*, 24 (8), 910-916.

Kleter GA. Poelman M, Groot MJ, Marvin HJP. 2006. Inventory of possible emerging hazards to food safety and an analysis of critical factors. Report 2006.010. RIKILT.

Lusky K., Göbel R., Tesch D., Tenner G., Haider W. 1997. Tiergesundheit und Rückstandverhalten beim Schwein bei gleichzeitiger Aufnahme der Mykotoxine Ochratoxin A and Deoxynivalenol. *Tierärztliche Umschau*, 1998, 53, 623-680.

Piva G., Battilani P and Pietri A .2006. Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy in "The mycotoxin factbook" p139-153 Edited by Barug, Bhatnagar, Van Egmond, Van der Kamp, Van Ossenbruggen, Visconti, Wageningen Academic Publishers.

Shier WT. 2000. The fumonisin paradox: A review of research on oral bioavailability of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol.* 19, 161–187.

Tangni EK et Pussemier L. 2007. Ergosterol and mycotoxins in grain dusts from fourteen Belgian cereal storages: A preliminary screening survey. *J. Sci Food Agric*, 87, 1263-1270.

Tangni EK, Theys R, Mignolet E, Maudoux M, Michelet JY, Larondelle Y. 2003. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, 20, 482-489.

VWA. 2006. Forming a global system for identifying food-related emerging risks Emrisk FINAL REPORT Service contract EFSA/SC/Tender/01/2004.

VWA. 2005. Report of SSA ERA-NET project PERIAPT: Pan-European Pro-Active Identification of Emerging risks in the Field of Food Production, Noteborn HPJM, Ooms BW, and M. De Prado (Eds), The Hague, VWA pp1-56.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

V. Baeten, D. Berkvens, C. Bragard, P. Daenens, G. Daube, J. Debevere, P. Delahaut, K. Dierick, R. Ducatelle, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, L. Pussemier, B. Schiffers, E. Thiry, J. Van Hoof, C. Van Peteghem

Remerciements

Le Comité scientifique remercie le secrétariat scientifique et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé de:

Membres du Comité scientifique

L. Pussemier (rapporteur), P. Daenens, P. Delahaut, A. Huygebaert, B. Schiffers, C. Van Peteghem

Experts externes

B. Demeulenaer, L. Goeyens, G. Maghuin-Rogister

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 27 mars 2006.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.

Annexe 1: Enniatines en Beauvericine

(SOURCE A. CALLEBAUT, CODA-CERVA)

1. Definitie

Enniatines (enn's) en beauvericine (beau) zijn natuurlijke cyclodepsipeptiden. Het zijn mycotoxines die geproduceerd worden door 2 groepen van schimmels : entomopathogene (*Beauveria bassiana*, *Verticillium* sp.) en plant-pathogene schimmels (voornamelijk *Fusarium* species, ook *Alternaria*).

2. Voorkomen

Fusarium-schimmels zijn vaak pathogeen voor graangewassen en deze mycotoxines komen vooral voor in tarwe, maïs, gerst, rogge en haver. Hun aanwezigheid in groenten en/of fruit werd nauwelijks onderzocht. In Scandinavië werden ppm hoeveelheden enn's teruggevonden in graangewassen, met maxima van 18 ppm in tarwe en 10 ppm in gerst. De hoeveelheid van de contaminanten varieert sterk met de klimatologische omstandigheden tijdens de aarzetting en in de periode vlak voor de oogst. Enniatine B is het voornaamste enniatine (Jestoi et al, 2004; Uhlig et al, 2006). Zuidelijker in Europa vindt men minder enn's, maar meer beau, vooral dan in maïs. Beau wordt ook in ppm hoeveelheden teruggevonden, met een uitschieter van 540 ppm in Italië. Er zijn geen data bekend over de grote Europese landen als Duitsland, Engeland, Frankrijk en Spanje. In Zuid-Afrika en in de USA wordt frequent beau gevonden.

Voor het oogstseizoen 2006 hebben we stalen van graangewassen, geteeld in België, gescreend op het voorkomen van enn's en beau (samenwerking BEMEFa).

Tarwe (15 stalen) bevatte gemiddeld 2.8 ppm Enn-B, met 1 uitschieter van 54 ppm. Gerst (6 st) bevatte gemiddeld 7 ppm, met 26.9 als uitschieter. Rogge (3 st) en haver (6 st) zijn vergelijkbaar met beide graangewassen, terwijl in maïs ook ppm niveau's gevonden wordt. Naast Enn-B, bevatten sommige stalen ook Enn-B₁, terwijl Enn-A en Enn-A₁ slechts sporadisch (in lage concentraties) aanwezig zijn. In één staal werd een spoor beau gevonden, waardoor de belgische situatie in 2006 sterk lijkt op de Scandinavische gegevens.

In FAVV-stalen werden enniatines teruggevonden in brood (2 st) en ontbijtgranen (3 st), op ppm niveau. Mout (16 st) bevatte tot 15 ppm Enn-B. Ook in kuilvoer werden enniatines gevonden.

3. Biologische activiteit

Enn's en beau zijn ionofore moleculen, dwz zij zijn vetoplosbaar en transporteren ionen door de celwand. Een aantal van de cyclodepsipeptiden hebben mogelijkheden als antibioticum of als anti-kankermiddel. Enn's en beau zijn insecticiden.

Enn's zijn cytotoxisch (Ivanova et al, 2006). In celcultuur treedt vaak celdood op, via apoptosis. Lage concentraties enn's zouden kankerverwekkend kunnen zijn en hoge concentraties zouden kankercellen kunnen doden (Dornetshuber et al, 2007).

Er zijn bijzonder weinig rapporten over hun effecten op mens en dier, maar recent werden ze teruggevonden in vlees en lever van gevogelte, weliswaar op ppb niveau (Jestoi et al, 2007). Gezien hun vetoplosbaarheid kunnen ze bio-accumuleren.

4. Referenties

Dornetshuber et al : Chem Res Toxicol 2007, 20, 465 – 473

Ivanova et al : Toxicon 2006, 47, 868-876

Jestoi et al : Food Add Contam 2004, 21(8), 794-802

Jestoi et al : Mol Nutr Food Res 2007, 51(5), 625-637

Uhlig et al : Food Chem 2006, 94, 193-201

Annexe 2: toxines d'ALTERNARIA

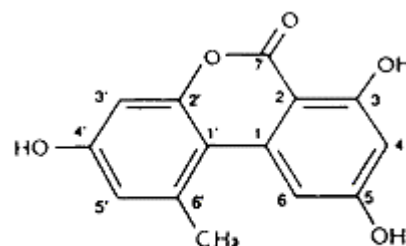
source : EMAN - European Mycotoxin awareness network (www.mycotoxins.org)

Introduction

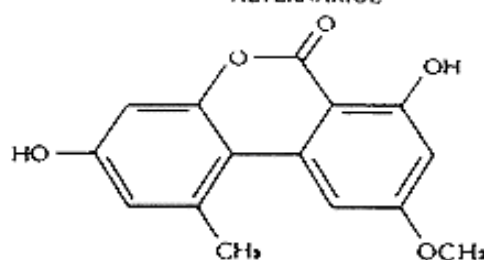
Alternaria is a common genus with a number of species that can invade crops at the pre- and post-harvest stage and cause considerable losses due to rotting of fruits and vegetables. Under suitable conditions it may lead to production of a range of mycotoxins as well as other less-toxic metabolites. Some species are fairly specific to particular crops. *A. alternata* is probably the most important mycotoxin-producing species and occurs on cereals, sunflower seeds, oilseed rape, olives, various fruits etc. A large number of metabolites have been reported so that the situation is similar to the *Fusarium* mycotoxins in that, in the present state of knowledge, only a few occur naturally in food commodities or are of major toxicological significance. The principle *Alternaria* mycotoxins that have been shown to occur naturally are tenuazonic acid, alternariol monomethyl ether, alternariol, altenuene, and altertoxin I. Iso-altenuene and altertoxin II have not been found in crops to date. AAL-toxins are produced by *A. alternata* f. sp. *Lycopersici*, a rarely occurring pathotype of *A. alternata*, and are structurally related to fumonisins. There is only one report on their natural occurrence in hay silage.

Chemical and Physical Properties

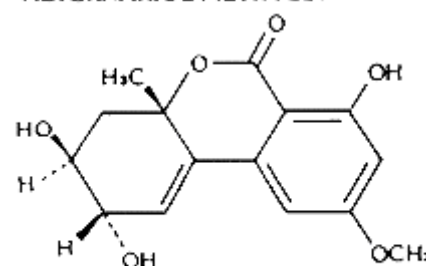
Tenuazonic acid is a colourless, viscous oil and is a monobasic acid with pKa 3.5. It is soluble in methanol and chloroform. On standing, heating or treatment with a base, optical activity is lost and crystallisation may occur as a result of formation of isotenuazonic acid. It forms complexes with calcium, magnesium, copper, iron and nickel ions. Tenuazonic acid is usually stored as its copper salt. Alternariol and alternariol monomethyl ether crystallise from ethanol as colourless needles, and melting points with decomposition are 350 Deg C and 267 Deg C respectively. They sublime in a high vacuum without decomposing at 250 Deg C and 180-200 Deg C. They are soluble in most organic solvents and give a purple colour reaction with ethanolic ferric chloride. Altenuene crystallises as colourless prisms melting at 190-191 Deg C. Altertoxin I is an amorphous solid melting at 180 Deg C and fluoresces bright yellow under UV light.



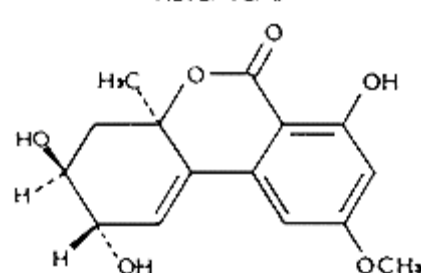
ALTERNARIOL



ALTERNARIOL METHYLÉTHÉR



ALTENUENE



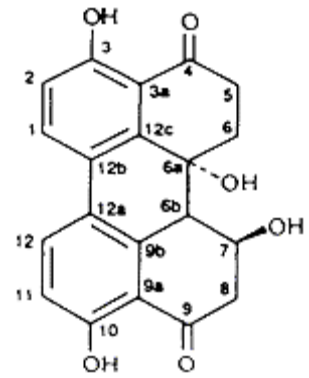
ISOALTENUENE

Toxicity and Importance

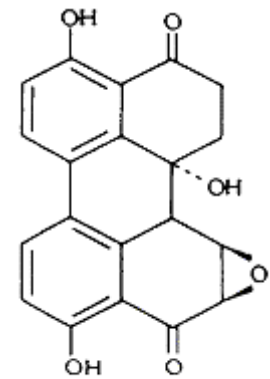
Alternaria toxins exhibit both acute and chronic effects. The LD₅₀ values for alternariol monomethyl ether, alternariol, altenuene, and altertoxin I in mice is reported as 400, 400, 50 and 200 mg/kg b. w. respectively. Those for tenuazonic acid are 162 and 115 mg/kg b.w. (i.v.) for male and female mice respectively.

Alternaria toxins have been implicated in animal and in human health disorders. During investigation into outbreaks of suspected mycotoxicoses, it was shown that cereal samples collected from affected farms in Germany were more frequently contaminated with *Alternaria* mycotoxins than samples from farms with healthy animals. Cases of death in rabbits and poultry have been reported as a result of toxic action of *Alternaria* spp. found in the fodder and feed. *Alternaria* spp. were also detected in cereal samples in which *Fusarium* spp. were implicated as the likely cause for the outbreak of alimentary toxic aleukia in Russia

Tenuazonic acid has been most studied. Its principle mode of action appears to be the inhibition of protein synthesis by suppression of the release of newly formed proteins from the ribosomes into the supernatant fluid. It exhibits antitumor, antiviral and antibacterial activity. Alternariol and alternariol monomethyl ether show foetotoxic and teratogenic effects in mice, including a synergistic effect when a combination of the toxins was administered. Most *Alternaria* mycotoxins exhibit considerable cytotoxic activity, including mammalian toxicity. and the altertoxins



ATX-I

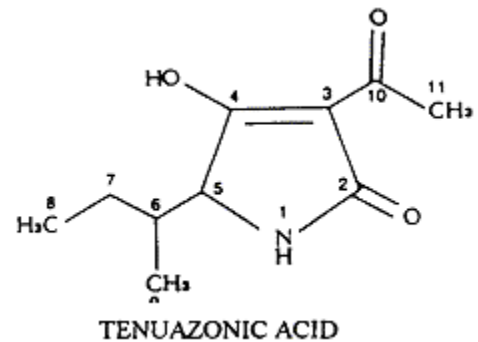


ATX-II

are of a particular concern due to their mutagenic activity. Alvertoxin III exhibits mutagenic activity that is approximately one tenth of that of aflatoxin B1, while alvertoxins I and II show lower mutagenicity.

Products Affected and Natural Occurrence

Contamination with alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid, and, in some cases, altenuene and alvertoxin I, is normally associated with fruits, vegetables and oilseeds visibly infected by *Alternaria* rot, including tomatoes, olives, mandarins, peppers, and apples. Occurrence of *Alternaria* spp. and their mycotoxins in oilseeds has been reported by a number of workers (e.g. discoloured pecan nuts, sunflower seed, sunflower seed meal and oil seed rape). Mycotoxins produced by *Alternaria* spp. have also been reported in cereals such as sorghum, wheat, rye, diseased rice and tobacco. Alternariol and alternariol monomethyl ether have also been produced in artificially mould-infested building materials in a study aimed at detecting mycotoxins produced by common fungi growing on such materials



Sampling and Analysis

Alternaria mycotoxins can be extracted by methods based on methanol or similar polarity solvents followed by defatting with hexane and further clean-up procedures, although the precise conditions and solvents will depend on the foodstuff and the mycotoxin being sought. Different extraction and clean-up methods are usually required for tenuazonic acid. Methods for *Alternaria* mycotoxins have been reported using TLC, HPLC, GC, GC/MS and HPLC/MS. GC/MS, HPLC/MS and HPLC-MS/MS methods have been reported for confirmation of identity of these mycotoxins in naturally contaminated samples whereas HPLC with UV or fluorometric detection is commonly used for routine analysis of food and feed commodities.

Stability and Persistence

Few studies on the stability and reactions have been carried out on *Alternaria* mycotoxins although in common with other mycotoxins they are probably quite stable. A major proportion of the toxins survived the autoclaving of tomatoes in producing tomato paste. Alternariol, alternariol monomethyl ether, and alvertoxin I were stable in fruit juices and wine over 20 days or at 80 Deg C after 20 min. When olives are pressed only a very small percentage is transferred to olive oil. However, heat treatment at 121 Deg C for 60 minutes significantly reduced the concentration of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in *A. alternata*-contaminated sunflower flour. The heat-treated material produced toxic effects when fed to rats.

Legislation and Control

There are currently no statutory or guideline limits set for *Alternaria* mycotoxins because surveys to date have shown that their natural occurrence in foods is very low and the possibility for human exposure is very limited. The need for regulation is kept under review as new information becomes available.

Annexe 3: Mycotoxines en agriculture biologique

(source projet BELSPO CP-30)

1. Levels of contamination of cereals-derived foodstuffs on the Belgian market

Seven food matrices marketed in Belgium and prone to be contaminated by mycotoxins have been investigated. Wheat cereals have been collected during two consecutive harvests (2002 and 2003). Wheat cereal-based foodstuffs including wholemeal wheat flour for bread making, beer, wholemeal pasta, as well as sweet corn, corn flour for polenta and cornflakes have been collected in retail stores.

Concerning wheat cereals at harvest, OTA, DON and ZEN have been measured.

OTA was detected in only 40% of the samples at very low levels (mean contamination of 0.065 ± 0.179 $\mu\text{g}/\text{kg}$) which is not surprising since OTA is a storage mycotoxin.

By contrast, DON occurred in almost all samples at high levels, especially in 2002 (mean concentration of 460 ± 562 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Three samples contained DON at a level over the proposed limit of 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In 2003, DON content was on average two times lower than in 2002 (mean concentration of 210 ± 226 $\mu\text{g}/\text{kg}$). These results illustrate quite well the weather-dependent contamination of cereals by DON. Rainfall during summer 2002 was indeed important while June 2003, corresponding to the flowering period of wheat, was characterized by a dry weather. Weather conditions also influenced ZEN contamination. In 2002, 67% of the samples contained detectable amounts of ZEN, including 6 samples with ZEN concentration above the proposed limit of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. By contrast, in 2003, ZEN was found in only 6% of the samples, at trace levels.

Since DON and ZEN are produced by the same species of *Fusarium*, a nice correlation between DON and ZEN concentrations in cereals emerged from the results of 2002.

These data demonstrate once again that multi-contaminations may occur in many cases.

Wholemeal wheat flours, unlike wheat cereals samples have been collected after a storage period. Thus, OTA was found in almost all samples (98%) but at moderate levels. Mean concentration was evaluated at 354 ± 434 ng/kg . Only one sample was contaminated at a level over 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Occurrence of DON in the same samples was a little less important (85%). Mean concentration was not high (170 ± 136 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and the proposed limit of 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was never exceeded.

Regarding OTA contamination of beer, the mycotoxin was detected in about 90% of the samples and levels were often far below the proposed limit of 200 ng/l . However, a few batches were much more contaminated, at levels exceeding this limit.

Mycotoxins are usually distributed heterogeneously in stored-grain bulks and "hot spots" of OTA may occur even if the average conditions of the bulk are not favourable to moulds development. Exceptionally high concentrations of OTA in a batch of beer may occur if such contaminated barley is employed.

Our study illustrates quite well the heterogeneity of contamination levels since we found highly significant differences ($p < 0.0001$) in contamination between different batches of the same brand.

In order to avoid highly contaminated beers, the sampling on malt must be performed in a very efficient way. The sampling methods for control analysis must respect the Commission Directive 2002/26/EC. Malt should not contain more than 3 μg OTA/kg (Commission Regulation (EC) No 123/2005). Nowadays, malt and beer producers must follow these regulations. This should guarantee the production of beers with low and acceptable levels of OTA.

Our results show that occurrence and levels of DON, FB1 and FB2 in beers should definitely not be a major cause for concern since these mycotoxins were detected at very low levels and in a small number of beers.

Wholemeal wheat pasta were analysed for DON, which was detected in around 60% of the samples at a mean level of 145 ± 147 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Maximum levels were always below the proposed limit of 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Contamination variations in samples from different batches of a same brand were very significant. Levels of DON do not seem to be worrying but the pasta foodstuff deserves to be followed.

Sweet corn samples were screened for FB1 and FB2. All results were below the LOD which lead to the conclusion that this matrix is not a matter of concern in terms of fumonisins.

FB1 and FB2 were analysed in corn flour for polenta. FB1 was detected in about 90% of the samples. Mean level of contamination was 753 ± 941 μg FB1/kg. A considerable part of the samples (18%) contained FB1 at levels from 1000 to 4353 μg FB1/kg. Such alarming contaminations were also found for FB2 since 70% of the samples contained DON at a mean level of 278 ± 339 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with a maximum level of 1659 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Polenta may thus contribute to an important part to the daily intake of FB1 and FB2 and should therefore be taken into account when setting up monitoring programs. Here again, contamination variations in samples from different batches of a same brand were very significant.

A total of 205 cornflakes samples were analysed for FB1, FB2 and FB3 with the validated LC-MS/MS method. Sixty-five % of the cornflakes samples analysed in this survey were contaminated with FB1, FB2 and FB3 concentrations above the respective detection limits. FB2 and FB3 were not detected without FB1. FB1 concentrations always exceeded FB2 and FB3 concentrations.

Fumonisin concentrations found in this survey were generally low. However, batches with a considerable contamination (FB1 concentration > 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) did occur. Therefore, conventional evaluation of fumonisins in cornflakes can be recommended. The variation between different batches of a same brand was significant. These observations are in line with the heterogeneous distribution of mycotoxins in bulk commodities and emphasize the importance of a well defined sampling plan in the process of risk management and food safety control.

The sampling plan plays an important part and influences the interpretation and statistical analysis of the results. Our results show that market-oriented supply studies should include samples from a large number of different batches since this factor is determinant regarding the contamination of products from a same brand.