

## Mise en évidence des COV produits par des champignons toxigènes.

Benzekri A<sup>1</sup>, Iraqui R<sup>1</sup>, Bouseta A<sup>1</sup>, Collin S<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès.

<sup>2</sup> Laboratoire de brasserie et des Industries Alimentaires, Faculté d'ingénierie biologique agronomiques et environnementale, Université catholique de Louvain, Belgique.

### Résumé

Certaines moisissures peuvent produire des toxines et émettre dans l'atmosphère des composés organiques volatils (COV) très nocifs pour la santé humaine et pour l'environnement. En effet l'inhalation des COV et des mycotoxines présents dans l'air ambiant peut entraîner des réactions immunologiques et allergiques, avoir des effets toxiques ou causer des infections. Selon des études récentes d'exposition en milieu intérieur, des maladies graves telles que le Syndrome Toxique aux Poussières organiques (STPO) ont été attribuées aux expositions fongiques. La détection rapide des COV permettra le contrôle de la qualité sanitaire et la décontamination à un stade précoce des bâtiments et des denrées. Dans ce cadre notre étude vise la mise en évidence des COV produits par des moisissures toxigènes cultivées sur des céréales. Des extraits aromatiques représentatifs du point de vue odeur des milieux de culture des différentes souches de *Fusarium* ont été obtenus par extraction distillation simultanée à l'aide d'un appareil Likens-Nickerson et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les COV sont séparés sur colonne capillaire et détectés à la fois par un détecteur à ionisation de flamme et par un détecteur olfactif (flairage en sortie de colonne). L'odeur globale du milieu de culture dépend de la souche utilisée (sucrée, moisie,...). Plus de 100 COV appartenant à des familles chimiques très diverses ont été détectés. Ils sont identifiés sur la base de leur indice de Kovats et de leur odeur.

### Abstract

Some moulds can produce toxins and emit sweet organic volatile compounds (COV) very harmful for human's healthy and for the environment. In fact COV's inhalation and the mycotoxins presents in the ambient area can lead to immunologies and allergic reactions, toxins's effect, and bring about infections. In accordance with recent studies of exposition in inside environment, serious illness like the Organic Dust Toxic Syndrome (ODTS) have been attributed to fungus expositions. The fast detection of the COV will permit to control the health quality and the discontaminationn in an early stage of foodstuffs and building. In this situation, toxin moulds cultivated on cereals produce this study aim for COV. Aromatic's extracts cultivated in different stumps of *Fusarium* have been taken by extraction-distillation simultaneous with Likens-Nickerson device and analysed by chromatography in a gas phase. COV are pulled away on capillary columns and detected by an ionisation flame's detector and an olfactory's detector (smelling at column exit). The aggregate's smell of the cultivation's environment depends on the stump used. (Mouldy, sweet...) More of 100 COV, which belong to different chemical's families, have been detected. They are identified on the base of their Kovat's indices and their smell.

**Mots clefs :** COV, environnement, santé.

**Key words:** COV, environment, healthy.

### Introduction

Les moisissures peuvent synthétiser, durant leur métabolisme primaire et secondaire, des composés organiques volatils (COV) [1] qui altèrent les qualités sanitaires et odorantes aussi bien dans les bâtiments que dans les denrées alimentaires qu'elles contaminent [2]. A côté de ces COV, certaines espèces appartenant principalement aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* produisent des toxines [3] qui sont très nocives pour la santé humaine et pour l'environnement [2]. En effet l'inhalation des COV et des mycotoxines présents dans l'air ambiant peut entraîner des réactions immunologiques et allergiques [4,5], avoir des effets toxiques ou causer des infections mal connues, liées au modernisme de nos conditions d'habitats [2]. Selon des études récentes d'exposition en milieu intérieur, des maladies graves

telles que le Syndrome Toxique aux Poussières organiques (STPO) ont été attribuées aux expositions fongiques [6,7]. En plus du risque sanitaire et des problèmes environnementaux graves liés à l'altération des lots par les toxines et à l'émission dans l'atmosphère de COV, la contamination des aliments et des semences par les champignons entraîne des pertes économiques considérables (décoloration du produit, altération de la saveur, diminution des rendements et perte en valeur nutritive). Ainsi pour prévenir ces altérations fongiques, l'étude des COV en tant qu'indicateur de moisissures s'est surtout développée dans le domaine agro-alimentaire [8]. D'autres travaux ont montré que certains COV sont détectés principalement dans les maisons contaminées [9] et seraient un bon moyen d'identification des espèces fongiques présentes dans les milieux

intérieurs [2,10]. Ces COV appartiennent à des classes chimiques diverses parmi lesquelles on peut citer les alcools, les aldéhydes, les esters et les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. En effet, des hydrocarbures aliphatiques comme le benzène, le toluène et le xylène ont été identifiés comme métabolites fongiques [11]. Wessen et Schoeps [12] ont rapporté qu'un ensemble de 23 composés organiques comme le 3-Méthylbutanol et le 1-Octen-3-ol seraient produits uniquement par les moisissures et les bactéries. D'autres substances volatiles telles que les sesquiterpènes serviraient quant à eux à la classification taxonomique, l'identification des espèces de *Penicillium* [12] et pourraient servir comme indicateurs de mycotoxines chez *Aspergillus* et *Fusarium* [3,13]. La production des COV a été proposée par Olsson et al. [14] comme un moyen de prédiction de deux mycotoxines : l'ochratoxine A (OTA) et le deoxynivalenol (DON). Ainsi des teneurs élevées en aldéhydes (Nonanal, 2-Hexanal) et en alcools (1-Penten-3-ol, 1-Octanol) indiqueraient des taux en OTA inférieurs à 5 µg / Kg. A l'inverse, les échantillons ayant des teneurs supérieures à 5µg / Kg en OTA, seraient riches en cétones (2-Hexanone, 3-Octanone). Une corrélation positive existerait entre le DON et des composés volatils tel que le Pentane, Méthylpyrazine, 3-Pentanone, 3-Octen-2-ol et isoocetylacétate. Cependant, certains alcools (Ethylhexanol, 1-Octanol, 1-Nonanol, 1-Hépatanol) et hydrocarbures (Pentadécane, Toluène) seraient corrélés négativement au DON. Notre étude vise dans un premier temps la mise en évidence des COV produits par des souches de *Fusarium culmorum* toxigènes cultivées sur des céréales. Des extraits aromatiques représentatifs, du point de vue odeur, des milieux de culture des différentes souches ont été obtenus par distillation extraction simultanée à l'aide d'un appareil type Likens-Nickerson et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les COV sont séparés sur une colonne capillaire et détectés à la fois par un détecteur à ionisation de flamme et par un détecteur olfactif (flairage en sortie de colonne).

#### Matériels et méthodes

##### *Milieu de culture et préparation de la suspension de spores*

Trois souches de *Fusarium culmorum* répertoriées, en provenance de la mycothèque de l'Université Catholique Louvain Belgique, sont cultivées sur malt agar. Après dix jours d'incubation à 28°C, à l'obscurité, les boîtes de pétri sont lavées à l'eau stérile et les spores sont comptées. Deux erlens de 250ml contenant du blé préalablement humidifié à 40% et autoclavé deux fois 20 min à 120°C sont inoculés par 10<sup>3</sup> spores / g de blé pour chaque souche. Après 21 jours d'incubation à 28°C les grains de blé sont séchés 48 heures à 50°C, broyés au Moulinex et conservés à -18°C jusqu'à leur utilisation. Deux erlens, contenant du blé humidifié et autoclavé, seront incubés comme précédemment et serviraient de témoin.

##### *Extraction des composés organiques volatils*

5 g de mouture sont extraits 3 fois par 10 ml de dichlorométhane à l'ultra turrax pendant 3 min. La phase liquide est récupérée et évaporée à 45 °C jusqu'à 1 ml. Afin d'éliminer les substances non volatiles et d'enrichir le milieu en COV, une distillation extraction simultanée est réalisée à l'aide d'un appareil Likens-Nickerson durant 45 min [15]. L'extrait est concentré à 0.5 ml après ajout de 20 µl de solution de standard externe (le chloroheptane à 2078 ppm). 2 µl sont injectés dans le chromatographe. Les COV seront identifiés sur la base de leur temps de rétention, leur odeur et indice de Kovats (Ik) en les comparant aux composés standards. En effet les indices de Kovats se basent sur la relation linéaire existant entre le temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone d'une série d'alcane. Ainsi, les temps de rétention de tous les composés analysés par chromatographie peuvent être comparés à deux alcanes, de préférence l'encadrant sur le chromatogramme, et être convertis en Ik. Par définition l'Ik d'un alcane est fixé à 100 fois son nombre d'atomes de carbone. Le grand avantage des Ik est leur constance pour une phase stationnaire donnée et cela, quel que soient les conditions expérimentales.

##### *Analyse par chromatographie en phase gazeuse*

Le chromatographe (Thermo Finigan, Trace 2000) est équipé d'un injecteur split-splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un détecteur olfactif et d'un intégrateur (Spectra Physic, Chromjet DP-700). La séparation des COV est réalisée sur une colonne capillaire apolaire (50 m x 0.32 mm Wall Coated Open Tubular (WCOT); CP-SIL 5 CB (CHROMOPACK), épaisseur du film de 1.2 µm). La température du four est maintenue à 36°C pendant 2 min et ensuite programmée de 36 à 85°C avec une pente de 20°C/min puis jusqu'à 145°C à 1°C / min et enfin jusqu'à 250°C à 3°C / min. Le four est maintenu à 250°C pendant 30 minutes. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 1 ml/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 225 à 275°C. Tous les échantillons sont analysés en double et l'injection se fait en mode splitless. La surface minimale des pics intégrée est fixée 1000 µV.S. En sortie de colonne, un diviseur permet d'envoyer la moitié de l'effluent vers le détecteur (FID) et l'autre moitié vers une sortie chauffée, munie d'un entonnoir où sera placé le nez de l'opérateur (détecteur olfactif). Chaque composé préalablement séparé sur la colonne est flairé, ainsi l'intensité et l'odeur perçue seront notées.

##### Résultats et discussion

Les COV sont présents dans les céréales à des concentrations de l'ordre du mg / Kg voir même de µg / Kg et appartiennent à des classes chimiques diverses. Leur étude nécessite le recours à des méthodes d'extraction, de concentrations et de séparation par des techniques chromatographiques. A cette fin, nous

avons réalisé une distillation extraction simultanée des COV comme décrit dans matériels et méthodes. L'odeur globale de l'extrait s'est avérée représentative de celle des milieux de culture. Par ailleurs, l'analyse par GC des différents extraits en double montre une bonne reproductibilité de la méthode. Un exemple de chromatogrammes observés en GC/FID est présenté à

la figure 1 et 2. La figure 1 montre que très peu de COV sont présents dans l'extrait de blé témoin. A l'inverse la figure 2 où plus d'une centaine de composés ont été détectés, représente un chromatogramme typique des COV produits par les souches toxigènes de *Fusarium*.

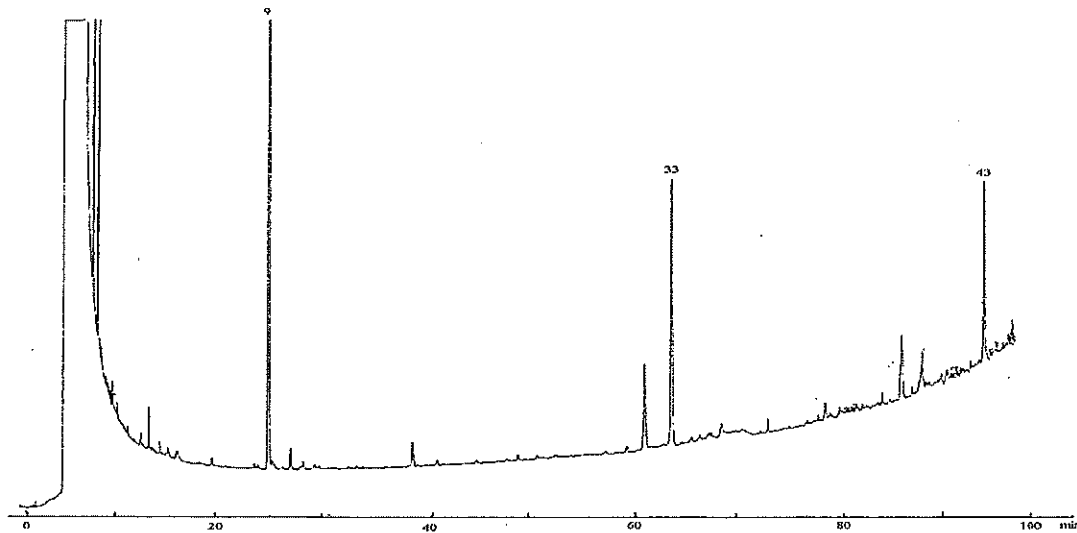


Figure 1. Chromatogramme des COV du blé témoin.

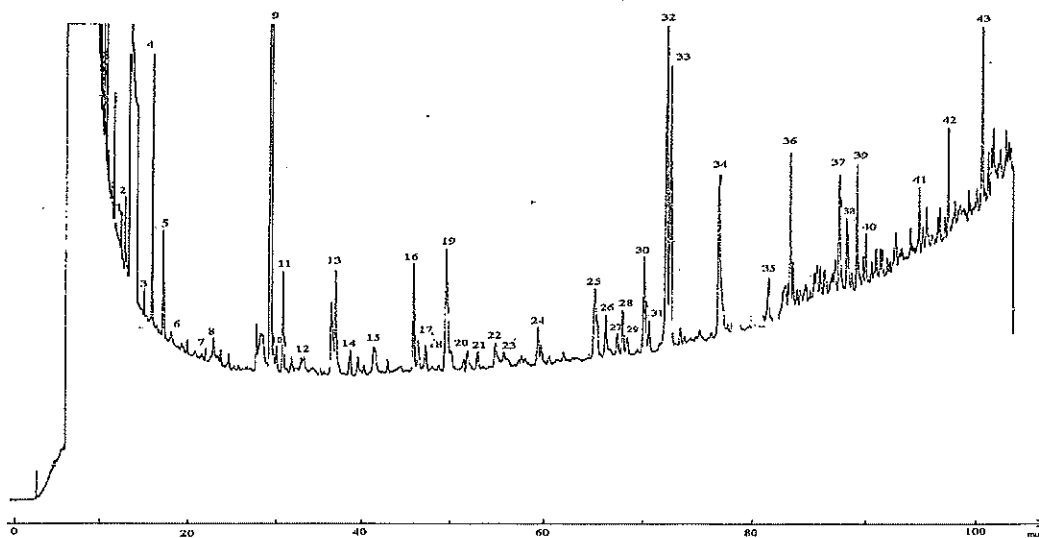


Figure 2. Chromatogramme typique des COV produits par une souche toxigène de *F. culmorum* (Fus 2).

Tableau I : Production des COV par 3 souches de *F.culmorum* cultivés sur blé après 21 jours d'incubation

						Concentration moyennes mg/Kg de blé				
C O M P O S É S  I D E N T I F I É S	Composés	NP	TR	Ik	Odeur	T	Fus 1	Fus 2	Fus 3	
		3-Méthylbutanol	1	11.62	705	Amandes amères	-	1.28	1.17	1.11
		2-Méthylbutanol	2	12.07	716	Vernis	-	0.61	0.54	0.47
		Toluène	3	13.64	753	Colle	-	0.63	0.50	0.50
		Hexanal	4	14.41	771	Verdure	-	1.01	0.60	0.69
		1-Hexanol	6	18.69	846	Gazon coupé	-	0.85	0.70	0.73
		1-Hepten-3-ol	7	19.37	856	Terre humide	-	0.41	0.27	0.28
		2-Heptanone	8	20.58	874	graisse	-	1.12	0.74	0.89
		Chloroheptane=EST	9	26.15	942					
		Camphène	10	26.76	949	Essence d'arbre	-	0.49	0.44	0.47
		1-Octen-3-ol	11	27.4	956	Champignon	-	0.56	0.50	0.43
		Heptanol	12	29.45	978	Zeste de citron	-	0.99	0.59	0.60
		Phénylacétaldéhyde	13	32.66	1010	Florale, jacinthe	-	2.17	2.20	2.14
		2-Phényléthanol	15	40.89	1084	Florale, fruitée	-	0.69	0.63	0.62
		Phényléthylacetate	25	58.76	1230	Rose fanée	-	1.10	0.64	1.13
	i2, i4 Décadiénal	33	66.10	1290	Huile de paraffine	1.27	0.66	0.98	0.78	
P I C S  N O N  I D E N T I F I É S						Surface des pics $\mu$ V.S				
		14	33.96	1022	Agréable	-	6689	10110	3471	
		16	40.44	1080	Encens	-	35184	19272	69751	
		18	41.59	1091	-	-	12934	6482	6266	
		19	43.69	1108	Verdure	-	182608	37122	26392	
		24	52.85	1183	Pain grillé	-	38523	9914	6970	
		27	59.58	1237		-	14242	10943	10639	
		30	63.62	1270	Encens, musc	-	28215	32703	22056	
		32	65.72	1287	-	-	161042	139263	89805	
		34	71.10	1344	Coriandre	-	17466	18309	68219	
		35	75.78	1399	-	-	17518	10599	5854	
		36	78.02	1434	-	-	38423	26852	23841	
		37	82.92	1515	Verdure	-	14488	13454	19628	
		38	83.50	1526	Bonne	-	55080	12384	35756	
		39	84.61	1548	-	-	35100	22747	19085	
	40	85.48	1565	Moisi	-	10459	8865	1735		
	41	90.79	1679	-	-	14384	11161	19959		
	42	93.89	1803	Pain	-	11666	14505	10191		
	43	96.97	1857	Épices	520699	66980	39160	54070		

-: Odeur non perçue, EST: Standard externe, NP: numéro de pic, TR: temps de rétention en minutes; Ik: indice de Kovats pour colonne CP-Sil 5CB; T: témoin; Fus 1-3: isolats de *Fusarium culmorum*: Fus 1(0.23 ppm DON), Fus 2(50 ppm DON), Fus 3(100 ppm DON).

Afin de déterminer la nature chimique de ces composés, nous avons réalisé une analyse olfactométrique en parallèle avec la CPG/FID sur l'extrait et sur des standards par comparaison des temps de rétention et des odeurs perçues par 3 personnes et 3 fois. Les composés majeurs, leurs temps de rétention, leurs odeurs et les concentrations moyennes dans les extraits des souches étudiées ainsi que les surfaces des pics des composés non identifiés sont regroupées dans le tableau I. Ce dernier montre que 14 métabolites ont pu être identifiés et ils appartiennent à différentes classes chimiques comme les alcanes, alcools, aldéhydes et hydrocarbures. Nous remarquons que les 3 souches produisent à des concentrations similaires des alcools comme le 3-

Méthylbutanol et le 1-Octen-3-ol. Ces alcools ont été répertoriés par Wessen et Schoops [12] comme UMVOC (composés organiques volatils microbiens produits uniquement par les champignons et les bactéries dans les milieux intérieurs) et identifiés dans les COV de certaines espèces d'*Aspergillus* [16]. L'heptanol et le toluène qui seraient corrélés négativement au deoxynivalenol d'après Olsson et al., [14] sont détectés dans les 3 souches toxigènes. Notons que la souche Fus1 qui produit très peu de DON synthétise plus d'heptanol et de toluène. Les 2 autres souches, ayant une capacité de production de DON dépassant les 50 ppm montrent un profil similaire. Par ailleurs des composés aromatiques comme le phénylacétaldéhyde, le 2-Phényléthanol et

le phényléthylacétate seraient détectés pour la première fois dans les cultures de *Fusarium*. Ces composés seraient formés via une voie métabolique similaire, probablement à partir de la phénylalanine. Le t2, t4 Décadiénal, composé détecté aussi dans le témoin, serait produit plutôt par oxydation chimique des lipides. Des composés comme les pics 18, 19, 24 et 34 méritent d'être identifiés. En effet, les composés 18, 19 et 24 présents dans la souche Fus 1 en concentration élevée seraient corrélés négativement au DON. Par contre la détection du pic 34 indiquerait la présence de cette mycotoxine. Des monoterpènes comme le limonène et le  $\alpha$ -pinène identifiés par Pasanen et al., [3] n'ont pas été détectés dans les

cultures de *Fusarium*. Ces auteurs ont par ailleurs montré que la biosynthèse des monoterpènes dépendrait du milieu et des conditions de culture ainsi que de l'espèce/genre des moisissures. Nos résultats montrent que la nature et les teneurs des MCOV dépendraient des conditions de culture (résultats non présentés) et de l'espèce fongique, ce qui est en accord avec les travaux de Pasanen et al., [3] et Senesson et al., [9]. Enfin, étant donné que les 2 souches toxigènes montrent un profil chromatographique similaire, l'analyse des COV serait sans doute un moyen rapide de prédiction des mycotoxines ou des souches toxigènes.

### Remerciements

Ce travail a été réalisé avec

- le soutien du conseil Inter Universitaire de la communauté Française de Belgique (Projet CUD : PIP 2001-2005)
- le soutien du Comité Mixte Inter Universitaire Maroco-Français, Action intégrée n° MA/ 03/ 81.

### Bibliographie

1. Schnurer J., Olsson J., Borjesson T., (1999). Fungal volatiles as indicators of feeds spoilage. *Fungal gent Biol*; **27**, 209-217.
2. Wilkins K., Larsen K., Sinkus M., (2000). Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. *Chemosphere*; **41**, 437-446.
3. Pasanen A.L., Lappalainen P., (1996). Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. *Analyst*; **121**, 1949-1953.
4. Pittet A; (1998). Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds an update review. *Revue Méd. Vet*; **149**, 479-492.
5. Pitt J.I., (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*; **56**, 184-192.
6. Malmberg P; (1990). Health effects of organic dust exposure in dairy farmers. *American Journal of industrial Medicine*; **17**, 7-15.
7. Von Essen S., Robins R., Thompson A., Rennard S., (1990). Organic Dust Toxic Syndrome: an acute febrile reaction to organic dust exposure distinct from hypersensitivity pneumonitis. *Clinical Toxicology*; **28**, 389-420.
8. Magan N., Evans P., (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stored Prod. Res*; **36**, 319-340.
9. Sunesson A.L., Vaes W., Nilsson., Blomquist G., Anderson B., Carlson R., (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Appl. Environ. Microbiol*; **61**, 2911-2918.
10. Miller J.D., Laflame AM., Sobal Y., Lafontaine P., Greenhalgh R., (1988). Fungi and fungal products in some Canadian house. *Int. Biodeterioration*; **24**, 103-120.
11. Ezenou I M., Noble J A., Simmons R B., Price D L., Crow S A., Ahearn D G., (1994). Effect of relative humidity on fungal colonization of fibreglass. *App. Environ. Microbiol*; **60**, 2149-2151.
12. Wessen B., Schoeps K.O., (1996). Microbial volatile organic compounds-what substances can be found in sick building? *Analyst*; **121**:1203-1205.
13. Jelen H., Latus-Zietkiewicz D., Wasowicz E., Kamins E., (1997). Trichodiene as a volatile marker for trichotecenes biosynthesis. *Journal of Microbiological Methods*; **31**, 45-49.
14. Olsson J., Schnurer J., Borjesson T., (2002). Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl. Environ. Microbiol*, **8**, 2599-2605.
15. Bouseta A., Collin S., (1995). Optimized Likens-Nikerson methodology for quantifying honey flavours. *Journal of agricultural and food chemistry*; **43**, 1890-1897.
16. Gao P., Korley F., Martin J., Chen B., (2002). Determination of unique microbial volatile organic compounds product by five *Aspergillus* species commonly found in problem buildings. *AIHA Journal*; **63**, 135-140.