

Exposition humaine aux aflatoxines et aux fumonisines

Pour pouvoir étudier l'impact des mycotoxines sur la santé et identifier des mesures efficaces d'atténuation, il faut disposer d'informations sur leur prévalence dans les aliments de base. Il faut également bien connaître les particularités de chaque pays ou de chaque région pour pouvoir identifier les denrées alimentaires responsables de l'exposition aux toxines dans les différentes populations. Les données de prévalence permettent également de suivre l'efficacité des mesures de sécurité sanitaire des aliments telles que l'instauration de taux maximums, tout en sachant que leur respect pourrait avoir des implications pour la sécurité de l'approvisionnement. En suivant l'évolution de la prévalence, on peut également obtenir des informations sur l'efficacité des différentes stratégies mises

en place pour réduire la contamination ou les niveaux d'exposition.

Pour évaluer le risque, c'est-à-dire pour connaître l'impact des mycotoxines sur la sécurité sanitaire des aliments et sur la santé de l'individu ou de la population, il suffit, dans l'idéal, de déterminer le niveau d'exposition, en intégrant les taux de contamination des aliments aux profils de consommation alimentaire. Ce n'est généralement pas possible dans les pays en développement, essentiellement à cause de l'absence d'informations sur le pays, ainsi que du manque de ressources et de capacités d'analyse.

Les biomarqueurs d'exposition, comme par exemple les adduits aflatoxine-albumine (AF-alb) sériques ou la fumonisine B₁ urinaire (UFB₁), permettent d'estimer l'exposition à chacune de ces toxines

indépendamment de leur source, de façon plus intégrée et en principe plus fiable. La mesure de l'exposition, que ce soit en combinant l'évaluation de la consommation aux niveaux de contamination ou à l'aide des biomarqueurs, peut servir à identifier les principaux composants alimentaires impliqués, à définir des zones où le niveau d'exposition n'est pas acceptable, à évaluer l'impact des mycotoxines sur la santé et leur rôle dans le développement de la maladie, et enfin à déterminer l'efficacité des stratégies d'intervention. Les nouvelles méthodes d'analyse multi-toxines, appliquées aux aliments ou aux prélèvements biologiques, ont permis de prendre conscience de l'exposition simultanée à l'aflatoxine et à la fumonisine, ou à d'autres mycotoxines que l'on ne soupçonnait pas.

Exposition aux aflatoxines

Les aflatoxines sont des mycotoxines que l'on trouve sous quatre formes principales : aflatoxines B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) et G₂ (AFG₂). Les aflatoxines se développent sur de nombreuses cultures, et notamment sur les principales céréales alimentaires de base (comme le maïs), les fruits à coque et les légumineuses comestibles, ainsi que leurs produits. En général, l'AFB₁ atteint les niveaux de contamination les plus élevés et c'est la plus toxique. Les aflatoxines sont produites essentiellement par *Aspergillus flavus*, qui produit les AFB₁ et AFB₂, et *Aspergillus parasiticus*, qui produit les quatre formes d'aflatoxines. La contamination peut se produire avant ou après la récolte ou dans les deux cas.

Les niveaux de contamination par les aflatoxines peuvent grandement varier, allant des produits conformes aux seuils maximums stricts fixés par la Commission européenne (2 µg/kg pour l'AFB₁ ; 4 µg/kg pour le taux total d'aflatoxines [somme des AFB₁, AFB₂, AFG₁ et AFG₂] dans les céréales et les fruits à coque destinés directement à la consommation humaine) (Commission européenne, 2010) jusqu'à des taux de contamination susceptibles d'entraîner une aflatoxicose aiguë. Par exemple, le dosage des aflatoxines totales, lors d'une enquête effectuée en 2004 dans les marchés ruraux de quatre districts du Kenya à l'occasion d'une épidémie aiguë, a montré des taux allant de 1 à 46 400 µg/kg, avec 7% des échantillons dépassant 1000 µg/kg (Lewis et coll., 2005). En 2003, Shephard (2003) a fait la synthèse des données disponibles pour les pays africains. Plus récemment Rodrigues et coll. (2011) et Schatzmayr et Streit (2013) ont

publié des données sur les teneurs en aflatoxine trouvées dans divers échantillons collectés à travers le monde. Gnonlonfin et coll. (2013) ont également publié récemment des résultats concernant l'Afrique. Parmi les exemples de contamination de denrées alimentaires cités dans ces publications figurent des gâteaux aux cacahuètes provenant du Nigéria (taux allant de 20 à 455 µg/kg) ; des arachides brutes provenant du Kenya (taux non détectables et jusqu'à 7525 µg/kg) et du Botswana (12–329 µg/kg) ; et du maïs provenant du Bénin (2–2500 µg/kg), du Ghana (20–355 µg/kg) et de Zambie (1–109 µg/kg). Les autres sources de contamination alimentaire rapportées pour les divers pays africains comprennent le manioc, le souchet, le niébé, le sorgho, le gombo et le piment, mais du fait des habitudes alimentaires, ce sont le maïs et l'arachide qui sont les plus importants en termes de niveaux d'exposition.

L'aflatoxine M₁ (AFM₁) est un métabolite toxique de l'AFB₁, classé comme cancérigène possible pour l'homme (IARC, 2012). Ce composé se retrouve dans l'urine et dans le lait des animaux exposés, et aussi chez l'homme. Les données sur le passage de l'AFM₁ dans le lait sont limitées, mais il se situerait, d'après les estimations, entre 0,1% et 0,4% (Zarba et coll., 1992), et l'exposition de nourrissons à l'AFM₁ à partir du lait maternel a été notée dans les pays en développement (Shephard, 2004 ; Turner, 2013 ; Magoha et coll., 2014). La présence d'AFM₁ dans le lait de vaches consommant du fourrage contaminé par l'AFB₁ est une source supplémentaire d'exposition. Lors de la 56^e réunion du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* ; JECFA), les scientifiques ont compilé les

données sur les taux d'AFM₁ trouvés dans le lait de vache commercialisé, frais ou transformé (Henry et coll., 2001). Mais les données relatives à l'Afrique sont rares, et celles qui ont été rapportées ne reflètent probablement pas les niveaux d'exposition habituels dans les villages ou les exploitations agricoles de subsistance. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les conséquences de l'ingestion d'AFM₁ à partir du lait maternel et/ou du lait de vache en Afrique.

Liu et Wu (2010) ont évalué l'ingestion d'aflatoxine dans le monde (en ng/kg de poids corporel/jour) à partir de l'estimation de la consommation habituelle de maïs et d'arachide, des leurs niveaux de contamination, et du poids corporel. Pour l'Afrique, les estimations concernent l'Afrique du Sud (0–17 ng/kg de poids corporel/jour), l'Éthiopie (1–36), la Gambie (4–115), le Kenya (4–133), le Mozambique (39–180), le Nigéria (139–227), la République démocratique du Congo (0–27), la République unie de Tanzanie (0–50) et le Zimbabwe (18–43). Les taux d'ingestion rapportés pour la Chine et les pays d'Asie du Sud-Est sont également élevés par rapport aux pays d'Europe occidentale et d'Amérique du Nord, où les taux situent entre 0 et 1 ng/kg de poids/jour (Turner et coll., 2012 ; Schleicher et coll., 2013). D'après ces résultats, l'exposition est de beaucoup la plus importante dans les régions à faible revenu. Il faut toutefois noter que ces estimations se fondent sur des données extrêmement limitées, en particulier pour les régions où le risque d'exposition est le plus élevé.

Exposition aux fumonisines

Les fumonisines, produites essentiellement par *Fusarium verticillioides*

(Sacc.) Nirenberg et *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, sont des contaminants courants du maïs et des produits à base de maïs. La fumonisine B₁ (FB₁) est la plus abondante (généralement ~70% des contaminations par les fumonisines), et on la trouve généralement en même temps que les fumonisines B₂ (FB₂) et B₃ (FB₃), ces dernières étant en quantités moindres. Sa présence dans le sorgho a également été rapportée (Bulder et coll., 2012).

Les fumonisines ont été évaluées par le JECFA en 2001 et en 2012 (Bolger et coll., 2001 ; Bulder et coll., 2012). Comme l'exposition résulte à la fois du niveau de contamination et du niveau de consommation, certaines communautés rurales dans les pays en développement peuvent dépasser la dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP) de 2 µg/kg de poids/jour de fumonisine si leur alimentation contient des quantités importantes de maïs (Burger et coll., 2010).

Wild et Gong (2010) ont analysé les données disponibles sur les niveaux d'ingestion de fumonisine (µg/kg de poids/jour) dans plusieurs pays d'Afrique, notamment l'Afrique du Sud (agglomérations de Bizana [1–19 µg/kg de poids/jour] et de Centane [2–36], Transkei [4] et KwaZulu-Natal [0]), le Burkina Faso (0–2) et le Kenya (ville de Bomet [$< 0,1$]). En République unie de Tanzanie, Kimanya et coll. (2014) ont noté des taux d'exposition de 0,2 à 26 µg/kg de poids/jour chez les enfants.

En Amérique latine, l'exposition à la fumonisine a été estimée à 3,5 µg/kg de poids/jour (zones urbaines) et 15,5 µg/kg de poids/jour (zones rurales) au Guatemala (Wild et Gong, 2010). Une étude plus récente fait état de doses ingérées se situant entre 0,20–23 µg/kg de poids/jour (Torres et coll., 2014).

Biomarqueurs des aflatoxines et des fumonisines

Les niveaux de contamination et de consommation des denrées alimentaires peuvent varier énormément entre les villages et entre les individus dans le contexte d'une agriculture de subsistance en milieu rural. Ces deux paramètres (contamination et consommation) sont difficiles à mesurer et à analyser. La toxicocinétique et la toxicodynamique des toxines ingérées varient selon les individus. C'est pourquoi des efforts considérables ont été consacrés au développement de biomarqueurs des aflatoxines et des fumonisines (Turner et coll., 2012).

Pour l'AFB₁, les adduits AF–alb présents dans le sang périphérique ont été validés comme biomarqueurs des expositions de durée modérée ou de longue durée (plusieurs mois), tandis que les biomarqueurs urinaires, aflatoxine–N7-guanine et AFM₁, reflètent les expositions plus récentes. Grâce à ces biomarqueurs, il a été possible d'établir un lien entre l'exposition aux aflatoxines et le développement du cancer du foie (Kensler et coll., 2011 ; IARC, 2012) et de démontrer l'efficacité des études d'intervention (Turner et coll., 2005).

D'après les données obtenues en Afrique sub-saharienne avec les biomarqueurs des aflatoxines validés, il est probable que les niveaux d'exposition varient énormément dans de nombreuses régions, entre zones agro-écologiques et villages voisins et même au sein de ces zones agro-écologiques et de ces villages, ainsi qu'au cours des saisons et au fil des années (Turner et coll., 2012 ; Turner, 2013). Les données obtenues avec les biomarqueurs soulignent encore l'importance de l'exposition périnatale, notamment *in utero* et durant la petite enfance. Les études

effectuées en Afrique occidentale désignent le maïs et l'arachide comme les deux principales sources d'ingestion d'aflatoxines. Les niveaux de biomarqueurs retrouvés habituellement chez les enfants de moins de 5 ans au Bénin, en Gambie et au Togo peuvent atteindre 1000 pg d'aflatoxine–lysine/mg d'albumine (Turner, 2013). Pour comparaison, les niveaux d'adduits AF–alb rapportés lors de la récente enquête nationale sur la santé et la nutrition des Etats-Unis (*National Health and Nutrition Examination Survey* ; NHANES) étaient pratiquement tous (99%) en-dessous de la limite de détection, et la moyenne géométrique des résultats positifs n'était que de 0,8 pg/mg (Schleicher et coll., 2013).

L'AF–alb a également été utilisée dans diverses études pour évaluer l'association entre l'exposition aux aflatoxines et le retard de croissance chez les nourrissons et les jeunes enfants (Turner, 2013). Habituellement, les marqueurs de l'exposition chronique aux aflatoxines sont considérés comme plus fiables, car ils fournissent une mesure intégrée sur plusieurs mois. Plusieurs biomarqueurs potentiels de l'exposition aux fumonisines ont été étudiés, parmi lesquels les bases sphingoides dans le plasma et l'urine, et la FB₁ dans les cheveux, les ongles, le sérum, l'urine et les fèces (Shepherd et coll., 2007), mais aucun d'eux n'a été validé dans des études chez l'homme. L'UFB₁ a été mesurée dans des échantillons provenant de sujets habitant dans des régions où l'exposition aux fumonisines alimentaires est élevée (Gong et coll., 2008a ; Xu et coll., 2010 ; van der Westhuizen et coll., 2011 ; Riley et coll., 2012 ; Torres et coll., 2014). En règle générale, des liens statistiquement significatifs ont été rapportés entre les taux d'UFB₁ et les taux d'ingestion de FB₁ mesurés ou

estimés ; mais d'après les données publiées, la mesure des marqueurs urinaires ne reflète que modérément le niveau d'ingestion.

Présence simultanée d'aflatoxines et de fumonisines

La présence simultanée d'aflatoxines et de fumonisines a été largement démontrée par l'étude des biomarqueurs et par l'analyse des aliments. En République unie de Tanzanie, le dosage de l'AF₁-alb et de l'UFB₁ effectué chez des jeunes enfants (Shirima et coll., 2013) a montré une prévalence élevée des deux mycotoxines, et l'exposition simultanée aux deux toxines chez 82% des enfants. Une corrélation modeste, mais statistiquement significative, a également été observée entre les concentrations de ces deux biomarqueurs ($r = 0,375$, $P < 0,001$) (Shirima et coll., 2013). Même si la présence d'aflatoxine et de fumonisine était moins fréquente dans les échantillons d'urine provenant de deux grandes villes du Cameroun, Yaoundé et Bamenda (Abia et coll., 2013) et de zones rurales du Nigéria (Ezekiel et coll., 2014), des expositions simultanées ont été mises en évidence. Les différences de sensibilité des méthodes d'analyse utilisées pour ces différentes études limitent toutefois la possibilité de comparaisons directes. Dans une autre étude menée au Cameroun, la recherche des marqueurs urinaires des mycotoxines chez les jeunes enfants a mis en évidence leur exposition concomitante à l'aflatoxine et à la fumonisine (Njumbe Ediage et coll., 2013). Ces données ont été complétées par une enquête dans de nombreuses zones agro-écologiques du Cameroun, où il s'est avéré que le maïs, l'arachide et le manioc étaient contaminés par de nombreuses mycotoxines (des fumonisines ont été trouvées dans

74% des échantillons de maïs et des aflatoxines dans 22% des échantillons de maïs, 29% des échantillons d'arachide et 25% des échantillons de manioc) (Ediage et coll., 2014). Dans une autre étude, Probst et coll. (2014) ont évalué la contamination par l'aflatoxine et la fumonisine de 339 échantillons de maïs provenant de 18 pays d'Afrique. Des aflatoxines ont été détectées (limite de détection, LD, 1 µg/kg) dans 47% des échantillons ; 7% avaient des taux dépassant 20 µg/kg et 6% dépassaient 100 µg/kg (le niveau maximum était de 1409 µg/kg). Des fumonisines ont été détectées (LD, 500 µg/kg) dans 81% des échantillons, avec 7% dépassant 5000 µg/kg et 3% dépassant 100 000 µg/kg. La contamination simultanée par des aflatoxines et des fumonisines a été observée dans 35% des échantillons. Les concentrations des deux contaminants variaient selon la région, mais pour la Province de la Côte au Kenya, par exemple, 50% des échantillons contenaient des niveaux élevés d'aflatoxines (moyenne, 97 µg/kg) et de fumonisines (moyenne, 32 000 µg/kg) (Probst et coll., 2014).

L'exposition simultanée aux aflatoxines et aux fumonisines est également bien démontrée en Amérique latine. Le maïs provenant de 22 districts du Guatemala a fait l'objet d'analyses ; 36% des 572 échantillons se sont révélés positifs pour les aflatoxines (moyenne, 63 µg/kg ; fourchette pour les échantillons positifs, 5–2655 µg/kg), et 99% des 640 échantillons étaient positifs pour les fumonisines (moyenne, 1800 µg/kg ; fourchette pour les échantillons positifs, 10–17 000 µg/kg) (Torres et coll., 2015).

Limites des analyses

L'utilisation de biomarqueurs urinaires est limitée par le volume

d'urine nécessaire. Même si le développement des techniques très sensibles de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) facilite la biosurveillance, le coût de l'instrumentation nécessaire restreint son utilisation aux laboratoires spécialisés. Avec le développement des techniques d'analyse multitoxines fondées sur la LC-MS/MS, des méthodes multibiomarqueurs – extension des méthodes multimycotoxines pour l'analyse des aliments – ont été mises au point pour le dosage biologique des toxines, dont la FB₁ et l'AFM₁ (Solfrizzo et coll., 2011 ; Warth et coll., 2012). Ces méthodes ont été appliquées en Afrique pour évaluer l'exposition (Abia et coll., 2013 ; Shephard et coll., 2013 ; Ezekiel et coll., 2014). A ce jour, peu d'études permettent de comparer les méthodes multitoxines des différents laboratoires. C'est pourquoi on accorde actuellement plus de confiance aux données résultant de mesures individuelles, mais il est urgent d'effectuer des études comparatives des méthodes des différents laboratoires pour pouvoir mieux les exploiter. Un autre problème tient au fait que certaines méthodes multitoxines, en particulier pour les aliments, pourraient mesurer des contaminants sans grand rapport avec la santé humaine, ce qui pourrait engendrer inutilement des coûts supplémentaires (par exemple, s'il faut mesurer > 60 métabolites) et être à l'origine d'erreurs dans les dosages.

Principales lacunes scientifiques

Le problème de l'exposition aux mycotoxines est très aigu dans les pays en développement, qui manquent de ressources et de capacités pour effectuer les analyses. Par conséquent, peu de données sont

disponibles pour ces pays et celles qui le sont reposent généralement sur un nombre limité d'échantillons de qualité incertaine. De ce fait, le fossé se creuse entre pays développés et pays en développement quant à la qualité et la quantité des données de prévalence générées par les laboratoires. Il faudrait disposer, dans les pays en développement, d'outils d'échantillonnage et d'analyse adaptés aux besoins spécifiques, comme par exemple :

- Une méthode de détection utilisable sur le terrain/au niveau des parcelles de subsistance, qui soit bon marché et facile à utiliser, et permette toute une gamme d'analyses dynamiques. Cela pourrait en outre constituer un système d'alerte rapide qui donnerait des indications pour la riposte et les actions à mener pour assurer la sécurité sanitaire des denrées alimentaires.
- Un programme de surveillance régional ou national, impliquant la mise en place d'un laboratoire de référence dans la région ou le pays concerné. Le programme de surveillance devra s'intégrer aux systèmes de surveillance existants et se développer avec le temps. Par exemple, de nombreuses régions possèdent des programmes nationaux concernant la santé et la nutrition, auprès desquels il est possible de se procurer des échantillons biologiques. On pourrait leur demander de recueillir de plus grands volumes d'échantillons (par exemple pour permettre la surveillance urinaire des substances xénobiotiques) à l'occasion de leurs enquêtes nationales. Les nouvelles activités de surveillance pourraient inclure à la fois l'analyse des denrées alimentaires et la recherche de biomarqueurs.

Pour mener à bien un programme de surveillance des denrées alimentaires, il est nécessaire d'avoir déjà

des plans bien établis pour le recueil des échantillons. La conception de plans d'échantillonnage dans le but de déceler la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires est complexe, mais il existe un outil pour aider les pays à cet égard : l'outil d'échantillonnage pour les mycotoxines de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* ; FAO) (<http://www.fstools.org/mycotoxins/>). De plus, le programme GEMS/Food (Système mondial de surveillance de l'environnement – Programme de surveillance et d'évaluation de la contamination des denrées alimentaires) de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) collecte les données mondiales concernant la contamination des aliments et fournit des informations sur la consommation des denrées alimentaires. Les données sur la consommation alimentaire moyenne *per capita* sont déterminées d'après les bilans alimentaires de la FAO. Il est important de noter que la base de données fournit les niveaux moyens de consommation, mais ne capte pas les profils de consommation au niveau des fermes de subsistance. Une autre base de données de GEMS/Food recueille les données sur les niveaux de contamination, notamment les taux d'aflatoxines et de fumonisines dans les denrées alimentaires et les cultures. Il pourrait être utile de rappeler aux chercheurs qu'ils peuvent enrichir cette base de données en y ajoutant leurs résultats. Néanmoins, le recueil d'informations sur les niveaux de contamination et de consommation chez les petits agriculteurs de subsistance reste un obstacle important.

Pour la surveillance, une des options envisageables consiste à prélever des échantillons dans les minoteries de maïs. Par exemple, dans

certaines parties d'Afrique orientale, les cultivateurs pourraient apporter le maïs à la minoterie locale, où la recherche d'aflatoxine et de fumonisine pourrait s'effectuer à l'aide de kits de détection rapide spécialement conçus pour les applications sur le terrain. Dans ce contexte, il devrait être possible de collecter des données sur une base relativement large, ce qui permettrait une meilleure surveillance, même si cela ne permet de capter que certaines des données de prévalence dans certaines régions, et aucune dans d'autres régions. Cela pourrait néanmoins permettre d'identifier les sites où il convient d'intervenir.

La mesure de l'exposition individuelle est importante pour les investigations épidémiologiques sur la cause des maladies et pour la démonstration de l'efficacité des interventions. Le développement d'une source fiable de normes certifiées, spécialement pour les biomarqueurs des aflatoxines, devrait permettre d'augmenter de façon substantielle leur utilisation dans les recherches épidémiologiques.

Le problème de l'insuffisance des données pourrait donc se résoudre par l'utilisation des biomarqueurs de l'exposition individuelle. Les biomarqueurs des aflatoxines sont bien connus, mais celui qui est le plus utile pour les études sur l'exposition chronique, l'AF-alb, n'est actuellement mesuré que dans un nombre limité de laboratoires. Il serait intéressant de pouvoir généraliser cette analyse, surtout dans les pays où l'on sait que l'exposition aux aflatoxines est élevée. Le manque de réactifs pour la détection des adduits aflatoxine-lysine et des mono-adduits AF-alb représente une contrainte majeure qu'il convient de résoudre. Les méthodes immuno-enzymatiques ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) sont généralement moins

coûteuses, mais le problème est alors l'absence de kits ou d'anticorps commercialisés. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) fournit des données robustes, mais le coût des analyses est prohibitif pour la plupart des laboratoires. Il est également nécessaire de surveiller l'exposition des nourrissons à l'AFM₁ dans les pays en développement où l'exposition à l'AFM₁ est élevée.

Dans plusieurs régions du monde, on mesure l'UFB₁ par

LC-MS, et là encore se pose le problème du coût de l'analyse. Une corrélation dose-réponse a été rapportée à plusieurs reprises, mais le dosage urinaire n'est pas suffisamment prédictif du niveau d'ingestion quand on le compare aux biomarqueurs des aflatoxines. Pour la surveillance biologique en général, ce n'est pas un gros problème ; mais c'est un problème quand il s'agit d'évaluer les effets potentiels sur la santé ou l'efficacité des interventions. En ce qui concerne l'utilisation de la FB₁ et de l'AFM₁,

il a été noté qu'aucune des deux ne permet de déceler l'exposition chronique. Pour la surveillance et l'épidémiologie des aflatoxines, on peut toujours utiliser comme marqueurs les adduits AF-alb sériques, mais pour la fumonisine, on ne dispose d'aucun marqueur de l'exposition prolongée. De plus, il est nécessaire de disposer d'outils d'analyse à haut débit ; en cela, la collaboration entre spécialistes de la mesure de l'exposition et experts des mycotoxines pourrait se révéler extrêmement bénéfique.