

**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2013 - Thèse n°

***EXCRETION URINAIRE DES MYCOTOXINES CHEZ LES
BOVINS : ESSAI D'UTILISATION D'UN TEST ELISA DE
DETECTION DE LA ZEARALENONE DANS LES URINES***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 21 juin 2013
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Jessica FORAISON
Née le 5 Septembre 1986
à Chambéry (73)



VetAgro Sup



**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2013 - Thèse n°

***EXCRETION URINAIRE DES MYCOTOXINES CHEZ LES
BOVINS : ESSAI D'UTILISATION D'UN TEST ELISA DE
DETECTION DE LA ZEARALENONE DANS LES URINES***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 21 juin 2013
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Jessica FORAISON
Née le 5 Septembre 1986
à Chambéry (73)



VetAgro Sup



Liste des enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon 1/2

Civilité	Nom	Prénom	Unités pédagogiques	Grade
M.	ALOGNINOUIWA	Théodore	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	ARTOIS	Marc	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BARTHELEMY	Anthony	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
Mme	BECKER	Claire	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	BELLI	Patrick	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences Contractuel
Mme	BELLUCO	Sara	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Unité pédagogique Equine	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BOULOCHER	Caroline	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	BOURDOISEAU	Gilles	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	BRUYERE	Pierre	Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Maître de conférences Contractuel
M.	BUFF	Samuel	Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Maître de conférences
M.	BURONFOSSE	Thierry	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	CACHON	Thibaut	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
M.	CADORE	Jean-Luc	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	CAROZZO	Claude	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	CHABANNE	Luc	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	COMMUN	Loic	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	DEMONT	Pierre	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	DESJARDINS PESSON	Isabelle	Unité pédagogique Equine	Maître de conférences Contractuel
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	ESCRIOU	Catherine	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	FAU	Didier	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	FOURNEL	Corinne	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Professeur
M.	FRANCK	Michel	Unité pédagogique Gestion des élevages	Professeur
M.	FREYBURGER	Ludovic	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	GENEVOIS	Jean-Pierre	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	GRAIN	Françoise	Unité pédagogique Gestion des élevages	Professeur
M.	GRANCHER	Denis	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	GUERIN	Pierre	Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Professeur
Mme	GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	JUNOT	Stéphane	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	KECK	Gérard	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences Stagiaire
M.	LACHERETZ	Antoine	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAMBERT	Véronique	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
Mme	LEBLOND	Agnès	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur

Liste des enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon 2/2

Civilité	Nom	Prénom	Unités pédagogiques	Grade
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Unité pédagogique Equine	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Unité pédagogique Equine	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	MARCHAL	Thierry	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Professeur
Mme	MIALET	Sylvie	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
Mme	MICHAUD	Audrey	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences Stagiaire
M.	MOUNIER	Luc	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
M.	PEPIN	Michel	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	PIN	Didier	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PONCE	Frédérique	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PORTIER	Karine	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Stagiaire
Mme	PROUILLAC	Caroline	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
Mme	REMY	Denise	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	ROGER	Thierry	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	SABATIER	Philippe	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	SEGARD	Emilie	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
Mme	SERGENTET	Delphine	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	SONET	Juliette	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
M.	THIEBAULT	Jean-Jacques	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences Contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Frédéric Bérard,

De la faculté de Médecine de Lyon,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Tous mes hommages les plus respectueux.

A Monsieur le Professeur Loïc Commun,

Du Campus Vétérinaire de VetAgro Sup,

Pour son aide et ses précieux conseils,
Pour sa disponibilité et sa gentillesse,
Qu'il reçoive ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Laurent Alves de Oliveira,

Du Campus Vétérinaire de VetAgro Sup,

Qui a été à l'initiative de ce travail,
Pour m'avoir accompagnée durant ces trois années,
Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

Table des figures	10
Table des tableaux	13
Table des abréviations	15
Introduction	17

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les mycotoxines posant des problèmes en élevage bovin	19
A. Les principales mycotoxines et leur production	19
1. Production des mycotoxines	19
a) Généralités	19
b) Conditions favorables au développement des moisissures et des mycotoxines dans les aliments	22
2. Principales mycotoxines rencontrées dans les rations des bovins	24
a) Les aflatoxines	24
b) L'ochratoxine A	24
c) La patuline	25
d) Les alcaloïdes de l'ergot	25
e) Les trichothécènes (DON, Toxine T-2)	26
f) Les fumonisines	26
g) La zéaralénone	27
B. Le contexte mycotoxique actuel	27
1. Bref historique	27
2. Impact actuel des mycotoxines	28
3. Évolution des pratiques culturales	29
C. Réglementation	30
1. État actuel sur la réglementation des mycotoxines	30
2. Seuils réglementaires fixés pour les principales familles de mycotoxines	32
a) Teneurs maximales recommandées par le JEFCA dans les rations animales pour les aflatoxines, l'ochratoxine A, les trichothécènes et les fumonisines	32
b) Cas particulier de la zéaralénone en France	32
3. Évolution de la réglementation mondiale	34
D. Prédispositions au développement des différentes mycotoxines	38
1. Selon le type de fourrage présent dans la ration	38
a) Les mycotoxines dans les ensilages	38
b) Les mycotoxines dans le foin	39
2. Selon les caractéristiques du milieu	39
a) Les aflatoxines	39
b) L'ochratoxine A	40
c) La patuline	40
d) Les alcaloïdes de l'ergot	40
e) Les trichothécènes	40
f) Les fumonisines	41
g) La zéaralénone	41
E. Influences des mycotoxines sur les performances zootechniques	42
1. Pertes économiques	42
2. Pertes céréalières	43
3. Pertes de performance et effets sur la consommation alimentaire des bovins	43
a) Observations non spécifiques sur le terrain	43

b)	Signes cliniques attribuables aux différentes mycotoxines, en élevage bovin	45
II.	<i>Mycotoxigose en élevage bovin : prévention, diagnostic et gestion</i>	50
A.	Prévention de la contamination des denrées par les mycotoxines	50
1.	L'importance du choix du cultivar	50
2.	Les bonnes pratiques de stockage	52
a)	Anaérobiose	53
b)	Absence d'humidité	54
c)	Absence de terre	54
3.	Les bâtiments et matériels	54
a)	Précaution pour les bâtiments	54
b)	Précaution pour le matériel	55
4.	Le nettoyage des grains	55
5.	La ventilation	55
6.	L'alimentation des animaux	56
B.	Diagnostic : suspicion et échantillonnage	57
1.	Contamination fongique d'une ration et suspicion de mycotoxigose (fig. 24)	57
2.	Importance et difficulté d'un bon échantillonnage	58
3.	Exemples pratiques d'analyses de ration	59
a)	Analyse de grains	59
b)	Le prélèvement au front d'attaque du silo	60
C.	Gestion des animaux lors de mycotoxigose	60
D.	Traitements des aliments lors de contamination mycotoxique	61
1.	Les différentes méthodes	61
a)	Les méthodes physiques	61
b)	Les méthodes chimiques	63
c)	Les méthodes microbiologiques	63
2.	Le coût de la décontamination	64
III.	<i>Focus sur la zéaralénone</i>	65
A.	Généralités	65
1.	Propriétés physiques et chimiques	65
2.	Métabolisme de la zéaralénone	66
a)	Le mécanisme d'action	66
b)	La zéaralénone et ses métabolites	67
c)	Les voies d'élimination de la zéaralénone	70
3.	Conséquences sur l'organisme d'une consommation chronique de zéaralénone	72
a)	Signes cliniques	72
b)	Lésions microscopiques	73
B.	Une sensibilité à la zéaralénone différente selon l'espèce considérée	75
1.	Distinction entre les espèces sensibles et peu sensibles	75
2.	Cas particulier des ruminants ; devenir et bioconversion de la zéaralénone chez les bovins	76
3.	Cas particulier de l'homme	78
a)	Episodes de contamination chez l'homme	78
b)	Dose journalière admissible chez l'homme	80
c)	Carcinogénicité de la zéaralénone	80
C.	Des seuils toxiques chez les bovins très difficiles à déterminer	81
1.	Quelques résultats expérimentaux	81
2.	Un seuil toxique très différent selon les auteurs	82
D.	Etat des connaissances sur la cinétique d'excrétion urinaire de la zéaralénone dans quatre espèces parmi les animaux d'élevage	83
1.	Chez les porcins	83
2.	Chez les ovins	83

3.	Chez les caprins _____	84
4.	Chez les bovins _____	86
E.	L'adsorption de la zéaralénone _____	88

PARTIE II : DEMARCHE EXPERIMENTALE

I.	Les différentes méthodes d'analyse des mycotoxines disponibles _____	91
A.	Analyse chromatographique des mycotoxines _____	91
1.	Généralités _____	91
2.	Dosage des mycotoxines dans les aliments _____	92
3.	Dosage des mycotoxines dans les urines _____	93
a)	L'urine, un fluide judicieux pour la détection de la zéaralénone _____	93
b)	Les méthodes disponibles _____	93
B.	Analyses ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et mycotoxines _____	94
1.	Généralités sur l'ELISA _____	94
2.	Choix de l'ELISA : avantages et inconvénients _____	94
a)	Avantages _____	94
b)	Inconvénients _____	95
3.	Étapes de l'ELISA type compétition indirecte _____	96
4.	Les tests Ridascreen® Zearalenon disponibles _____	98
5.	Résultats _____	100
a)	Lecture des résultats _____	100
b)	Validation des résultats _____	100
c)	Calculs de la concentration en zéaralénone de l'échantillon _____	101
d)	Acceptabilité des mesures _____	103
II.	Expérimentation _____	104
A.	Introduction _____	104
B.	Matériel et méthodes _____	104
1.	Plan expérimental _____	104
a)	Animaux utilisés _____	104
b)	Ration distribuée _____	104
c)	Planning de l'expérience _____	105
d)	Planning d'une période _____	106
e)	Préparation des bolus de zéaralénone _____	107
2.	Analyses de laboratoire _____	107
a)	Traitement préliminaire de l'échantillon d'urine _____	107
b)	Analyse de l'échantillon urinaire _____	108
C.	Résultats et discussion _____	108
1.	État de santé des animaux _____	108
2.	Résultats obtenus avec le test « Fast » _____	109
D.	Conclusion _____	110
	Perspectives envisagées _____	111
	Conclusion générale _____	113
	Bibliographie _____	115

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Vue microscopique de têtes aspergillaires d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	19
Figure 2 : Le cycle de contamination des mycotoxines.....	20
Figure 3 : Températures et optimum de croissance d' <i>Aspergillus</i> , de <i>Penicillium</i> et de <i>Fusarium</i> (YIANNIKOURIS A., 2002).....	22
Figure 4 : Les différents facteurs intervenants dans le développement des mycotoxines	23
Figure 5 : Structure chimique des Aflatoxines les plus courantes (B1,B2, G1 et G2)	24
Figure 6 : Structure chimique de l'Ochratoxine A.....	24
Figure 7 : Structure chimique de la Patuline	25
Figure 8 : Structure chimique de l'Ergovaline	26
Figure 9 : Structure chimique des Trichothécènes	26
Figure 10 : Structure chimique de la Fumonisine B1	27
Figure 11 : Structure chimique de la Zéaralénone	27
Figure 12 : Blé contaminé par l'ergot de seigle, au moment de la floraison	28
Figure 13 : Pourcentages d'échantillons positifs pour 5 familles de mycotoxines (BIOMIN, 2009).....	35
Figure 14 : Répartition mondiale de la réglementation en matière de mycotoxines (AFSSA, 2009).....	35
Figure 15 : Prévalence des mycotoxines selon les analyses confiées au laboratoire Biomin (BIOMIN, 2009).....	36
Figure 16 : Teneurs maximales en zéaralénone recommandée selon les pays (FAO, 2003) ...	37
Figure 17 : Epi de maïs atteint de fusariose	43
Figure 18 : Cas mondiaux d'aliments contaminés par des mycotoxines et analysés par le laboratoire Biomin en 2009 (BIOMIN, 2009)	46
Figure 19 : Schéma simplifié des effets des mycotoxines sur l'organisme (LEFEBVRE D., 2003; FOURNIER, 2006; ARZUL P., 2010; BIOMIN, 2009)	49
Figure 20 : Le danger des résidus de culture laissés dans les champs contaminés (FANGEAT, 2008).....	52
Figure 21 : Diagramme de conservation des céréales (Burges et Burrel, 1964).....	53

Figure 22 : L'aération des grains et la variation des zones d'humidité en fonction des saisons (OMAFRA, 2008).....	56
Figure 23 : Etapes clés pour la prévention contre les mycotoxines.....	57
Figure 24 : Conduite à tenir face à une suspicion de mycotoxines dans la ration (ARZUL P., 2010).....	58
Figure 25 : Points de prélèvements de l'ensilage sur le front d'attaque du silo (LAUMONNIER, 2006).....	60
Figure 26 : Excrétion urinaire de zéaralénone en présence ou non d'adsorbant (TAKAGI M., 2011).....	62
Figure 27 : Semoulette MMi.S.....	62
Figure 28 : Comparaison des formules chimiques de la zéaralénone et du 17 β -œstradiol	66
Figure 29 : Mécanisme d'action de la zéaralénone (DIAZ, 2005)	67
Figure 30 : La zéaralénone et ses métabolites (KLEINOVA M., 2002).....	69
Figure 31 : Voie générale de métabolisation et d'excrétion des xénobiotiques (JARD, 2009)	70
Figure 32 : Coupes histologiques d'organes de chèvres ayant reçues de la zéaralénone par voie intraveineuse (DONG M., 2010)(a)	74
Figure 33 : Biotransformation de la zéaralénone en α -zéaralénol par les microsomes hépatiques de différentes espèces (MALEKINEJAD M., 2006).....	75
Figure 34 : Pourcentage de dégradation de la zéaralénone par les protozoaires (blanc) et les bactéries (noir) contenus dans le fluide ruminal de bovins, d'après (KIESSLING K-H., 1984).	77
Figure 35 : Seuil toxique de la zéaralénone selon différents auteurs.....	82
Figure 36 : Excrétion cumulée de la zéaralénone et de l' α -zéaralénol dans l'urine de porcs (en pourcentage de bolus) (DANICKE S., 2005).....	83
Figure 37 : Excrétion fractionnée de la zéaralénone et de l' α -zéaralénol dans l'urine de porcs (en pourcentage de bolus/heure) (DANICKE S., 2005)	83
Figure 38 : Concentrations plasmatiques de zéaralénone et de ses métabolites libres et conjugués, au cours des 48 heures suivant l'administration intraveineuse unidose de zéaralénone à 1,2 mg/kg de poids corporel chez des chèvres (DONG M., 2010)(a).	85
Figure 39 : Excrétion des formes conjuguées et libres de zéaralénone, d' α -zéaralénol et de β -zéaralénol dans les fécès de chèvres (DONG M., 2010)(a).	85
Figure 40 : Concentration urinaire moyenne en zéaralénone et ses métabolites en fonction du temps chez des génisses nourries avec 2kg d'avoine comportant 1370 μ g/kg de zéaralénone (KLEINOVA M., 2002).....	87
Figure 41 : Les différents procédés de dégradation de la zéaralénone (ZINEDINE A., 2007) ..	88

Figure 42 : Les différentes méthodes d'analyse chromatographique pour le dosage des mycotoxines en laboratoire (FANGEAT, 2008).....	92
Figure 43 : Coloration des puits de la plaque de microtitration, visible à l'œil nu.	95
Figure 44 : Courbe d'activité enzymatique ELISA "compétition" (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011)	100
Figure 45 : Relation entre le signal DO et la concentration en Ag dans un test ELISA par compétition (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011).....	101
Figure 46 : Concentration en zéaralénone en fonction de B/Bo %.....	102
Figure 47 : Courbe étalon de log it en fonction de log [ZEA]	102
Figure 48 : Planning de distribution de la zéaralénone au cours de l'expérience	105
Figure 49 : Description du planning d'une période de l'expérimentation.....	106
Figure 50 : Evolution de la température rectale des vaches durant la totalité de l'expérimentation.....	108
Figure 51 : Résultats de 2 séries de mesures avec le test Fast	109

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux champignons et mycotoxines associées (YIANNIKOURIS A., 2002).....	21
Tableau II : Influence de la température sur l'élaboration de Zéaralénone et de Déoxynivalénol par <i>Fusarium graminearum</i> (PFOHL-LESZKOWICZ, 2001)	22
Tableau III : Analyse mycotoxique d'échantillons de blé et de maïs entre 1996 et 1997 (YIANNIKOURIS A., 2002).....	29
Tableau IV : Exposition alimentaire de la population française aux trichotécènes (AFSSA, 2009).....	31
Tableau V : Valeurs toxicologiques de référence du JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) dans les rations animales (AFSSA, 2009; JECFA, 2000)	32
Tableau VI : Teneurs maximales en zéaralénone dans les denrées alimentaires humaines (AFSSA, 2009)	33
Tableau VII : Teneurs maximales en zéaralénone dans les aliments pour animaux selon la recommandation 2006/576/CE du 17 août 2006	34
Tableau VIII : Analyses des principales mycotoxines selon les régions du globe (BIOMIN, 2009).....	37
Tableau IX : Prévalence des différentes mycotoxines selon le type d'aliment considéré (FANGEAT, 2008)	38
Tableau X : Aspect et condition de développement des principales espèces fongiques des ensilages (BAILLY J.D., 2006)	39
Tableau XI : Effets spécifiques des mycotoxines.....	46
Tableau XII : Capacité des glucomannanes à lier les mycotoxines (YIANNIKOURIS A., 2002) .	63
Tableau XIII : Métabolisme comparé de la zéaralénone : distribution des métabolites dans l'urine et les matières fécales (GAUMY J.L., 2001)(b)	71
Tableau XIV : Résidus de mycotoxines dans le lait de vache recevant des aliments contaminés ou des doses orales de toxines (YIANNIKOURIS A., 2002)	72
Tableau XV : Exposition alimentaire moyenne de la population française à la zéaralénone (AFSSA, 2009)	79
Tableau XVI : Contamination des aliments par de la zéaralénone dans différents pays européens (ZINEDINE A., 2007).....	79
Tableau XVII : Recueil de cas de signes cliniques observés chez des bovins recevant des rations contaminées en zéaralénone	81

Tableau XVIII : Concentration en zéaralénone et ses métabolites retrouvés dans l'urine d'ovins nourris avec une dose orale de zéaralénone de 5 mg (MILES C.O., 1996).	84
Tableau XIX : Détermination de la zéaralénone et ses métabolites dans les urines de 3 bovins par analyses HPLC (DE ANDRES F., 2008)	86
Tableau XX : Concentrations urinaires et hépatiques en zéaralénone et ses métabolites chez des génisses nourries avec de l'aliment contaminé, avec un implant de zéranol ou appartenant au groupe contrôle (KLEINOVA M., 2002).	86

TABLE DES ABREVIATIONS

A. : *Aspergillus*

ADN : Acide désoxyribonucléique

Afla : Aflatoxines (AFB1 : Aflatoxine B1, AFM1 : Aflatoxine M1)

AFSSA : Agence Française de Santé sanitaire des Aliments

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Aw : Activité de l'eau

DAS : Diacetyoxyscirpenol

DJMTP : Dose Journalière Maximale Tolérable Provisoire

DJT : Dose journalière tolérée

DL50 : Dose létale pour 50% des animaux mis en contact avec la substance

DO : Densité optique

DON : Déoxynivalénol

DSEH : Dose Sans Effet Hormonal

DSENO : Dose Sans Effet Nocif Observé

EFTA : European Free Trade Association (pays de l'Union Européenne, Islande, Liechtenstein, Norvège et Suisse)

ELISA : Enzyme Linked Immunoassay

ER : Estrogen receptor

F. : *Fusarium*

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FUM : Fumonisine (FB1 : Fumonisine B1, FB2 : Fumonisine B2, FB3 : Fumonisine B3)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LDA : Laboratoire Départemental d'analyses

MERCOSUR : Mercado Común del Sur (Argentine, Brésil, Paraguay , Uruguay, Venezuela, Équateur, Bolivie)

MS : Matière sèche

NIV : Nivalénol

OMAFRA : Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural affairs

OTA : Ochratoxine A

P. : *Penicillium*

PUPD : Polyurie polydipsie

Sp. : Species

T° : Température (en °C)

UV : Ultraviolet

ZON, ZEN : Zéaralénone

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par des champignons. On dénombre environ 20 000 espèces de moisissures, mais seulement 300 toxines sont connues et 30 sont incriminées dans des troubles en santé animale et humaine.

Dans un troupeau, une intoxication par les mycotoxines se traduit par une atteinte similaire d'un grand nombre d'animaux présentant des symptômes non spécifiques. L'affection peut être aiguë mais cela reste exceptionnel ; ce sont les effets chroniques (exposition répétée à de faibles voire très faibles doses) qui sont les plus fréquents et donc les plus redoutés.

Mais l'incidence des mycotoxines est mal connue, tout particulièrement en production bovine, à cause d'une sous déclaration des cas et d'une méconnaissance de la part des vétérinaires. Ce qui est certain, c'est qu'avec les pratiques modernes de culture, l'alimentation des bovins présente des risques mycotoxiques dont les répercussions économiques sont importantes.

Lors de recherches systématiques des principales mycotoxines dans des rations de bovins, on remarque que les aliments sont très souvent contaminés, sans pour autant que les animaux présentent des signes cliniques. Ceci s'explique en partie par le fait que le rumen détoxifie la plupart de ces molécules : les ruminants sont donc moins sensibles que les monogastriques à la présence de mycotoxines dans leur alimentation.

Cependant plusieurs situations rendent le rumen moins efficace : une ration riche en concentrés, un niveau d'ingestion élevé, une vitesse d'ingestion élevée et un transit rapide. Ainsi, parmi les bovins, on définit des animaux plus sensibles, qui sont les jeunes de moins de 6 mois, les laitières hautes productrices et les femelles en période péripartum. La période autour du vêlage est à risque car il y a à la fois une baisse de l'immunité, une transition alimentaire ainsi qu'un déficit énergétique.

Dans ce contexte, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à une mycotoxine, la zéaralénone. Elle appartient au groupe des œstrogènes exogènes, mais ses conséquences sur la fertilité ont été très peu étudiées chez les bovins. Pourtant, cette mycotoxine ne doit pas être négligée puisqu'elle représente aussi un risque pour la santé humaine.

Dans un premier temps, nous ferons un état des connaissances actuelles sur les mycotoxines posant des problèmes en élevage bovin et nous verrons les mesures à prendre en cas de mycotoxicose, puis nous nous consacrerons plus particulièrement à la zéaralénone et à son métabolisme chez les bovins.

Dans un second temps, nous développerons la partie expérimentale de notre travail, qui consiste à doser, à l'aide d'un kit ELISA de détection rapide, la zéaralénone présente dans les urines de bovins ayant reçu des doses de mycotoxines par voie orale.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les mycotoxines posant des problèmes en élevage bovin

A. Les principales mycotoxines et leur production

1. Production des mycotoxines

a) Généralités

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produites principalement par trois espèces de moisissures : *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* (fig 1) et *Penicillium sp.*



Figure 1 : Vue microscopique de têtes aspergillaires d'*Aspergillus fumigatus*

Les moisissures libèrent des mycotoxines lorsqu'elles sont en compétition avec d'autres organismes et/ou en situation de stress (ARZUL P., 2010) (lors de changement de température, de variation de la teneur en eau,...) (FOURNIER, 2006).

La présence des toxines liées au développement de moisissures peut être due à 4 processus différents :

- le métabolisme secondaire fongique (les mycotoxines ne sont pas nécessaires au développement du champignon comme le sont les acides aminés, les acides gras, les acides nucléiques ou les protéines)
- la bioconversion de composés végétaux (exemple : le dicoumarol)
- la réaction de la plante à des agressions telles les insectes ou la présence de champignons (exemple : le coumestrol)
- l'association plante-champignons (FANGEAT, 2008).

Ces toxines sont des contaminants naturels de denrées d'origine végétale (fruits et légumes secs ...), d'aliments manufacturés (céréales, jus et produits de fermentation ...) et de denrées d'origine animale (lait, œufs, viande, abats) (fig 2). La contamination par les spores de moisissures pouvant se faire par voie alimentaire ou par voie aérienne (PFOHL-LESZKOWICZ, 2001).

NB 1 : Les issues de céréales seront plus contaminées que les céréales entières car les mycotoxines se concentrent à la périphérie des grains (sons, brisures, drêches) (ARZUL P., 2010).

NB 2 : Les mycotoxines sont généralement thermostables et ne sont pas détruites par les procédés habituels de cuisson et de stérilisation. Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et leur lipophilie en font des toxiques capables de persister dans l'organisme en cas d'expositions répétées et rapprochées (AFSSA, 2009).

Par contre, elles sont largement détruites lors de l'extraction des huiles et des traitements industriels (YIANNIKOURIS A., 2002).

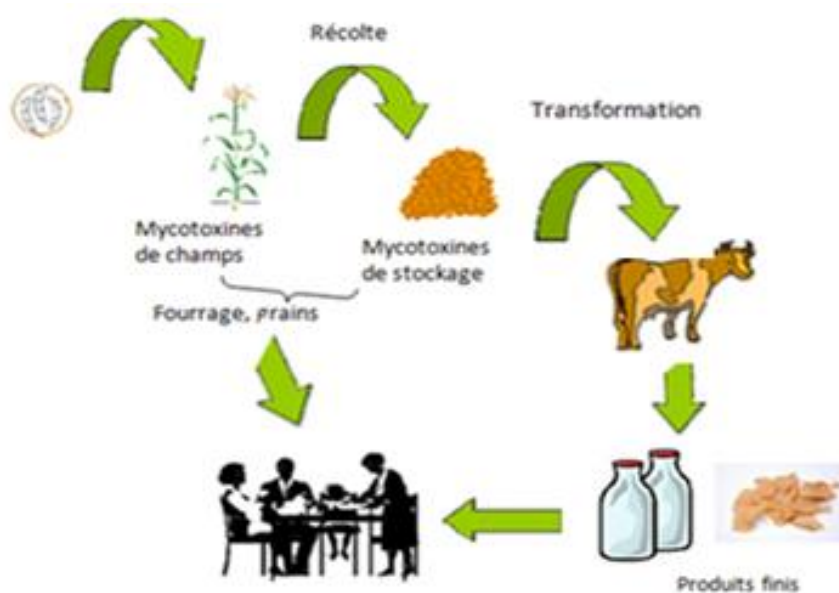


Figure 2 : Le cycle de contamination des mycotoxines

La synthèse de mycotoxines peut se faire au cours de toutes les étapes de fabrication d'un produit, même si, dans la majorité des cas, un développement fongique incontrôlé n'entraîne qu'une altération des qualités diététiques et de l'appétence de l'aliment. Les mycotoxines étant produites dans des conditions plus strictes que celles permettant la croissance fongique, il n'existe pas de relation directe entre la présence d'une espèce fongique potentiellement toxigène et la contamination de l'aliment (BAILLY J.D., 2006). De plus, une denrée peut contenir une mycotoxine alors que le champignon n'est plus présent. Par ailleurs, une moisissure peut produire différentes mycotoxines. Et, à l'inverse, une même mycotoxine pourra être produite par plusieurs espèces et genres de moisissures.

Les effets d'une mycotoxine peuvent être augmentés par la présence d'autres mycotoxines : on parle alors de synergie toxique (AFSSA, 2009; ARZUL P., 2010). Mais deux mycotoxines peuvent aussi être antagonistes ; peu de choses sont connues à ce sujet (DRIEHUIS F., 2008)

En outre, toutes les souches d'une espèce fongique réputée toxigène ne le sont pas forcément. Le pouvoir toxigène augmente ou diminue à la suite de mutations génétiques ; par exemple, il peut varier de 1 à 1000 pour *F. graminearum*.

Et le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même, mais peut aussi provenir de ses métabolites (AFSSA, 2009).

Les aliments récoltés dans de bonnes conditions possèdent une flore équilibrée et limitée, résultant de la superposition progressive de trois types écologiques de champignons :

- * la flore de champ (pré-récolte)
- * la flore intermédiaire (en cours de récolte)
- * la flore de stockage (conservation).

Il existe quelques centaines de molécules produites par les moisissures et présentant des propriétés mycotoxiques mais nous nous limiterons à celles rencontrées le plus fréquemment dans les rations de nos animaux de rente (tab I).

Tableau I : Principaux champignons et mycotoxines associées (YIANNIKOURIS A., 2002).

	Champignons	Mycotoxines
Mycotoxines de stockage	<i>Penicillium expansum</i> <i>P. urticae</i> <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssochlamys nivea</i>	Patuline
	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus clavatus</i>	Ochratoxine A
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nominus</i>	Aflatoxines B1, B2, G1, G2
Mycotoxines des champs	<i>Claviceps purpurea</i>	Alcaloïdes de l'ergot : Ergolines
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. poae</i> <i>F. roseum</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. acuminatum</i>	Trichothécènes
	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i>	Fumonisines B1, B2, B3
	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>	Zéaralénone

NB : Les trois mycotoxines les plus couramment rencontrées dans les aliments composant la ration des bovins sont le déoxynivalénol (DON), appelée aussi vomitoxine, et la toxine T-2 (qui sont deux toxines de la famille des Trichothécènes) ainsi que la zéaralénone : elles sont toutes produites par des champignons de la famille des *Fusarium*.

b) Conditions favorables au développement des moisissures et des mycotoxines dans les aliments

Les champignons peuvent croître dans des intervalles de températures assez larges mais ils possèdent un optimum de croissance, qui est propre à chaque moisissure (fig 3).

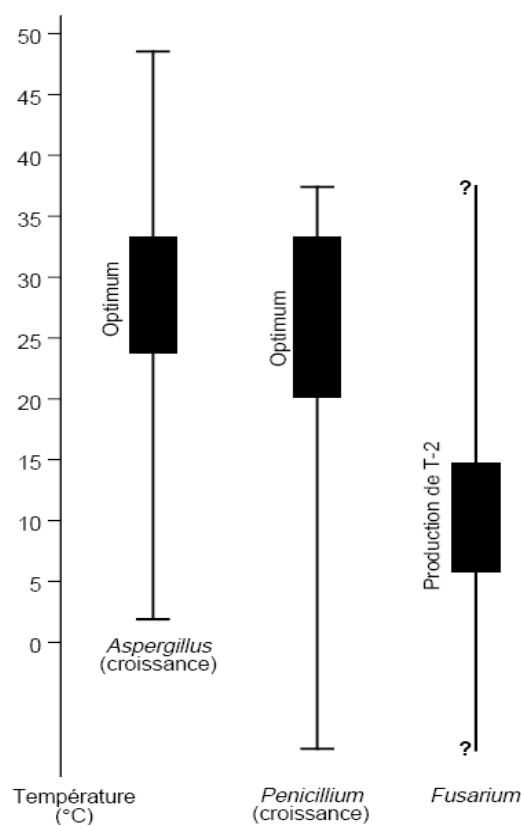


Figure 3 : Températures et optimum de croissance d'Aspergillus, de Penicillium et de Fusarium (YIANNIKOURIS A., 2002)

De plus, la production de mycotoxines varie selon les températures lorsque ces dernières ne sont pas optimales (tab II).

Tableau II : Influence de la température sur l'élaboration de Zéaralénone et de Déoxynivalénol par Fusarium graminearum (PFOHL-LESZKOWICZ, 2001)

Température	Concentration en ppm	
	zéaralénone	déoxynivalénol
19,5	57,7 ± 7	6,1 ± 0,6
25	120 ± 13	149 ± 14
28	98 ± 34	365 ± 15

La plupart des aliments de ferme contiennent des moisissures et des spores de champignons à des niveaux faibles. Certaines conditions peuvent accélérer la croissance de

ces organismes. C'est le cas avec le climat humide et froid de début octobre par exemple (FOURNIER A., 2000).

En effet, la croissance fongique est régie par les paramètres physico-chimiques suivants : l'humidité (l'activité en eau, Aw, doit être supérieure à 0,6 (AFSSA, 2009)), la température, la présence d'oxygène ou de dioxyde de carbone, la nature du substrat (le rapport C/N permet une croissance optimale s'il est compris entre 8/1 et 12/1), les conditions de pH, l'intégrité des graines, le taux de champignons, la présence d'insectes (rôle de vecteurs) ou de rongeurs, oiseaux,... ainsi que les interactions microbiennes (fig 4) (TABUC, 2007).

Dans l'ensilage, dans des conditions normales de stockage, la croissance de ces espèces fongiques est lente et la sporulation souvent nulle. C'est à proximité du front de coupe que les moisissures pourront commencer à se développer très rapidement et à sporuler (BAILLY J.D., 2006).

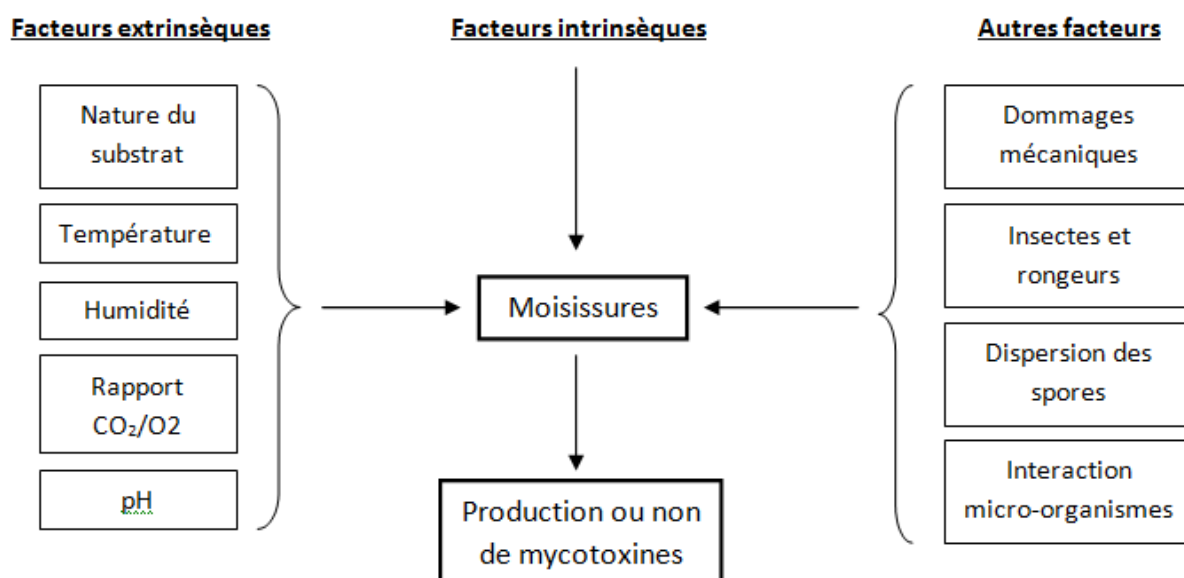


Figure 4 : Les différents facteurs intervenants dans le développement des mycotoxines

Prenons pour exemple la zéaralénone. Les spores de *F. graminearum* entrent dans la plante par les racines, les tiges, les feuilles ou les graines. Ensuite, elles peuvent soit coloniser entièrement le végétal via la sève (contamination précoce), soit rester en surface du plant et on observera alors une pellicule blanche rosée caractéristique. Mais l'envahissement par la moisissure peut aussi être latent ; le développement reprendra dès que les conditions redeviendront favorables à la croissance du champignon, c'est à dire des températures comprises entre 15 et 20°C, une Aw > 0,95 et des périodes prolongées de temps frais et humide (GAUMY J.L., 2001)(a).

Les moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur une grande variété de substrats alimentaires.

2. Principales mycotoxines rencontrées dans les rations des bovins

a) Les aflatoxines

Elles sont produites principalement par *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Il en existe plusieurs groupes, celles du groupe 1 étant les plus toxiques (fig 5).

Ce sont des toxines cancérigènes. Elles sont métabolisées principalement par les cytochromes hépatiques ; leurs métabolites interagissant avec l'ADN.

Chez les bovins, l'aflatoxine B1 (AFB1) peut être transformée en aflatoxine M1, plus toxique et qui peut passer dans le lait, mais aussi dans le beurre et la crème. Ces mycotoxines sont très difficiles à éliminer car ce sont de petites molécules stables qui résistent à la pasteurisation et à la stérilisation.

Les jeunes sont beaucoup plus sensibles à leur action que les adultes.

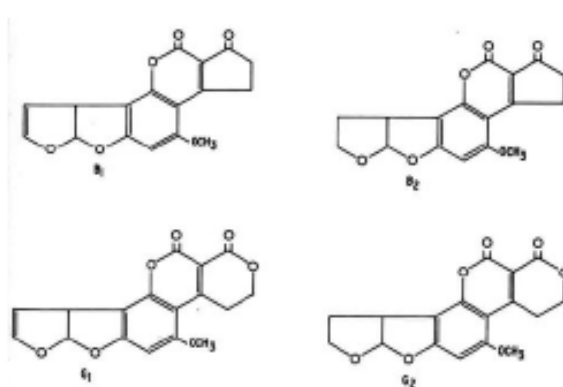


Figure 5 : Structure chimique des Aflatoxines les plus courantes (B1,B2, G1 et G2)

b) L'ochratoxine A

Elle est produite par *Aspergillus ochraceus* dans les zones chaudes et *Penicillium viridicatum* dans les pays tempérés.

L'ochratoxine A (OTA) (fig 6) fait partie de la famille des ochratoxines qui compte une dizaine de molécules connues.

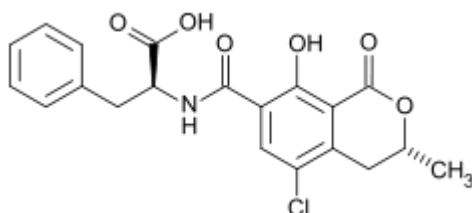


Figure 6 : Structure chimique de l'Ochratoxine A

c) La patuline

La patuline (fig 7) est un métabolite secondaire issu d'un certain nombre d'espèces fongiques des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Byssochlamys*, dont *Penicillium expansum* est probablement l'espèce la plus fréquente (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

Byssochlamys nivea est essentiellement un parasite de blessures : piqûres d'insectes, chocs subis par les fruits, altération de l'épiderme suite à une attaque d'autres champignons. Il a souvent été identifié sur des fruits portant des symptômes de pourritures externes (ROUSSEL M., 2007).

Environ un ensilage sur deux est contaminé par cette mycotoxine, mais elle n'est souvent pas en quantité suffisante pour déclencher une intoxication.

La patuline est neurotoxique, tératogène, embryotoxique et immunotoxique. Elle possède aussi des propriétés anti bactériennes ; son ingestion pourrait donc entraîner un dysfonctionnement de la flore ruminale (BAILLY J.D., 2006).

Le problème se pose pour la fin du silo car la patuline apparaît après plusieurs mois de stockage.

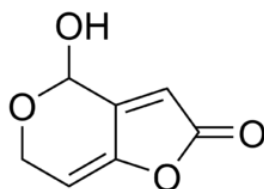


Figure 7 : Structure chimique de la Patuline

d) Les alcaloïdes de l'ergot

Les alcaloïdes de l'ergot, ou ergolines (fig 8), sont produites principalement par *Claviceps purpurea*. Cette moisissure contient des dérivés de l'acide lysergique qui induisent une multitude d'effets cliniques dont une contraction des fibres musculaires lisses notamment au niveau des petits vaisseaux sanguins. Ce pouvoir vasoconstricteur est utilisé à des fins thérapeutiques (Methergin®, Serotonine®) mais il peut aussi engendrer une intoxication chez diverses espèces animales ou chez l'homme à la suite de l'ingestion de denrées contaminées : l'ergotisme.

La contamination des céréales se fait pendant la floraison.

Il existe une multitude d'alcaloïdes de l'ergot dont la plus étudiée est l'ergovaline (FANGEAT, 2008).

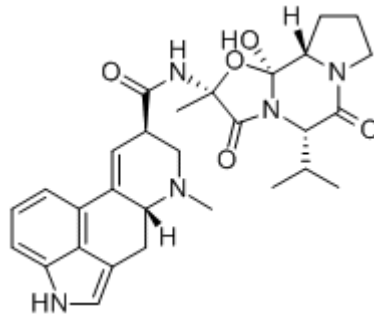


Figure 8 : Structure chimique de l'Ergovaline

e) Les trichothécènes (DON, Toxine T-2)

Ils sont produits par plusieurs types de *Fusarium* ; leur répartition est mondiale. Il existe plusieurs familles (fig 9) mais deux types surtout sont à distinguer : les trichothécènes de type A (ex : la toxine T-2), très toxiques, et les trichothécènes de type B (ex : le DON), très répandus mais moins toxiques. Leur effet est dose dépendant.

Chez les ruminants, le DON est métabolisé dans le rumen en un métabolite non toxique.

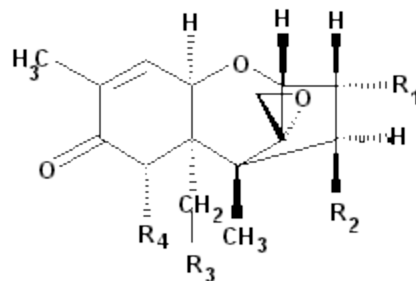


Figure 9 : Structure chimique des Trichothécènes

f) Les fumonisines

Les fumonisines, dont fait partie la fumonisine B1 (fig 10), sont produites principalement par *Fusarium verticilloides* et *F. proliferatum*.

Elles ont une structure semblable à celle de la sphingosine, un des composants des sphingolipides qui eux-mêmes sont des éléments structuraux de la myéline et de certains tissus nerveux. Leur toxicité résulte du blocage de la biosynthèse des sphingolipides.

Les épis de maïs peuvent contenir de fortes teneurs en fumonisines sans aucune altération visible à l'œil nu (FANGEAT, 2008).

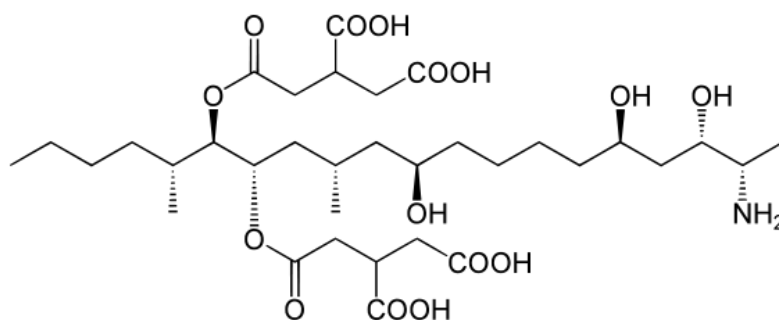


Figure 10 : Structure chimique de la Fumonisine B1

g) La zéaralénone

La zéaralénone (fig 11) est produite principalement par *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum* et *F. culmorum* (BAILLY, 2008).

Les effets de la zéaralénone sont les plus marqués chez le porc, mais toutes les espèces y sont sensibles (HAURAY, 2000).

Elle sera vue plus en détail dans le paragraphe III de cette partie.

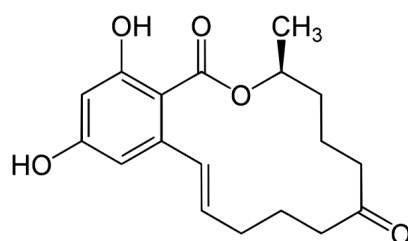


Figure 11 : Structure chimique de la Zéaralénone

B. Le contexte mycotoxique actuel

1. Bref historique

La mycotoxicose humaine la plus anciennement connue est l'ergotisme, également appelée "feu de Saint-Antoine", "feu sacré" ou "mal des ardents". Des épidémies sévirent entre le XIII^{ème} et le XVI^{ème} siècle et causèrent la mort de centaines de milliers de personnes en France. *Claviceps purpurea* (fig 12) produit des toxines entraînant délires, prostrations, douleurs violentes, abcès et gangrènes des extrémités aboutissant à des infirmités graves et incurables (AFSSA, 2009; HAURAY, 2000).

Ce n'est qu'en 1977 que l'origine de ce fléau fut découverte grâce aux travaux de l'Abbé Tessier.

Aujourd'hui, l'ergot ne pose plus de problème pour l'Homme mais il subsiste quelques cas chez les animaux.



Figure 12 : Blé contaminé par l'ergot de seigle, au moment de la floraison

Concernant les animaux, c'est en 1960 que la première mycotoxicose est mise en évidence en Grande Bretagne où plus de 100 000 dindes sont mortes de nécroses importantes du foie et d'une hyperplasie biliaire provoquées par des aflatoxines (maladie X des dindons) (YIANNIKOURIS A., 2002).

Depuis, de nombreuses mycotoxines ont été découvertes.

2. Impact actuel des mycotoxines

Les céréales sont des vecteurs importants de mycotoxines puisqu'elles sont universellement consommées par les hommes et les animaux.

Diverses enquêtes révèlent que de 25 à 40 % des céréales mondiales sont contaminées par des mycotoxines.

Les mycotoxines peuvent avoir des conséquences néfastes directes sur le consommateur de produits végétaux contaminés, et indirectes liées à la présence de résidus toxiques dans les produits animaux destinés à la consommation humaine, comme le lait ou la viande.

D'où l'importance de mettre en place une réglementation mondiale, pour chaque famille de mycotoxines (YIANNIKOURIS A., 2002).

Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée (exposition unique à une forte dose), mais cela reste des cas exceptionnels en Europe. Par exemple, chez le porc, une administration unique de 1,2mg/kg de poids corporel d'AFB1 entraîne des hémorragies internes massives et de la nécrose hépatocytaire en région périportale en quelques heures seulement.

Les signes aigus, bien qu'impressionnants restent rares. En fait les effets chroniques, liés à une exposition répétée à de faibles voire très faibles doses, sont les plus fréquents et donc les plus redoutés (AFSSA, 2009).

Concernant le niveau de contamination des cultures, plusieurs travaux montrent que celui-ci est assez élevé.

Par exemple, en France, entre 1996 et 1997, une étude à été réalisée sur des lots de maïs et des lots de blé français dans lesquels ont été dosé le DON, le nivalénol (NIV), la fumosine B1 (FB1) et la zéaralénone (ZEN).

Les résultats sont répertoriés dans le tableau suivant (tab III).

Tableau III : Analyse mycotoxique d'échantillons de blé et de maïs entre 1996 et 1997
(YIANNIKOURIS A., 2002)

Céréale	Nombre d'échantillons	Mycotoxines	% d'échant. positifs	Quantité de toxines contenues dans les positifs (µg/kg)	
				Moyenne	Mini – Maxi
Blé 1996	46	DON	40	39	Trace – 580
		NIV	28	24	Trace – 60
		ZEN	12	9	Trace – 16
Blé 1997	69	DON	90	87	Trace – 650
		NIV	92	32	Trace – 232
		ZEN	12	7	Trace – 9
Maïs 1996	17	DON	84	400	Trace – 2800
		NIV	78	276	Trace – 1300
		ZEN	95	335	Trace – 1750
		FB1	72	370	Trace – 3300
Maïs 1997	24	DON	76	100	Trace – 558
		NIV	47	69	Trace – 250
		ZEN	90	15	Trace – 40
		FB1	66	320	Trace – 1100

INRA Productions Animales, février 2002

Dans cette étude, le blé a donc été plus contaminé en 1997 qu'en 1996 et avec des quantités moyennes de mycotoxines plus importantes dans les échantillons positifs, alors que c'est l'inverse qui s'est produit pour le maïs. Ainsi, un même climat peut être favorable au développement d'une mycotoxicose sur une céréale et défavorable sur une autre (YIANNIKOURIS A., 2002).

Une autre expérience conduite par le LDA 22, concernant la contamination des ensilages de maïs en 2008 en France, a montré une association systématique de DON (85-1070 ppb) et de ZEA (40-400 ppb) sur 100% des échantillons.

Les épisodes de contamination des céréales dans les pays développés ne sont donc pas rares. En plus des problèmes de pertes économiques importantes, il y a un risque pour le consommateur, qui ne doit pas être négligé.

3. Évolution des pratiques culturales

Depuis le début du XXI^{ème} siècle, l'évolution des pratiques culturales (extension du mode de production biologique, émergence de la production de biocarburants, extension du non-labour,...) et celles consécutives au changement climatique ont impliqué des

modifications de l'attention portée à l'évaluation du risque mycotoxique dans l'alimentation humaine et animale.

En effet, la répartition géographique des moisissures évolue.

De plus, l'un des principaux enjeux environnementaux passés en revue lors du « Grenelle de l'environnement » d'octobre 2007 est la diminution de l'usage des pesticides (sachant que l'on est déjà passé de plus de 60 000 tonnes en 1995 à moins de 40 000 en 2005). Or, cette réduction de l'usage de produits chimiques est favorable au développement des moisissures et donc potentiellement à la production de mycotoxines.

Par ailleurs, l'agriculture biologique est en plein essor. Comment peut-on limiter le développement des mycotoxines alors que l'on avait l'habitude de le faire en utilisant des anti-fongicides chimiques ?

Les partisans de la production biologique disent que cet objectif peut être atteint par des pratiques agricoles qui évitent la contamination par les moisissures, telles que la rotation des cultures, le travail du sol, le faible taux d'apports azotés et la non utilisation des régulateurs de croissance. Le rapport 290703 de l'AFSSA relatif à l'agriculture biologique souligne même que les fongicides ne sont pas une assurance contre l'apparition de mycotoxines dans un stock de céréales (AFSSA, 2009).

L'association de consommateurs italienne « Alterconsumo » a rapporté un niveau de mycotoxines supérieur à 10 fois les normes autorisées dans des lots de céréales biologiques. Mais d'autres données disponibles sur la contamination de produits issus de l'agriculture biologique par les mycotoxines, bien que limitées, montrent des taux de contamination variables, sans qu'il puisse être dégagé de grandes différences avec ceux des produits issus de l'agriculture conventionnelle (Consoglobe, 2012).

C. Réglementation

L'exposition des hommes et des animaux aux mycotoxines se fait principalement par ingestion, et secondairement par voie cutanée ou par inhalation.

Les maladies engendrées sont appelées « mycotoxicoses ». Elles sont largement sous évaluées car souvent non détectées, sauf lors de contaminations massives (ZAIN, 2011).

1. État actuel sur la réglementation des mycotoxines

L'évaluation du risque mycotoxique est délicate car ce risque est d'origine naturelle, difficilement contrôlable, et peut être multiple (notamment par le fait qu'une moisissure peut produire plusieurs mycotoxines) (JARD, 2009).

L'homme n'est pas épargné par la présence de mycotoxines dans son alimentation et les taux relevés sont parfois préoccupants et préjudiciables pour la santé du consommateur. Ainsi, même si les animaux consommant des rations contaminées ne présentent aucun signe clinique jusqu'à un certain seuil de mycotoxines, la présence de résidus toxiques dans les produits comme le lait, les œufs et la viande constitue un risque pour le consommateur (YIANNIKOURIS A., 2002; AKSOY A., 2009).

Il est donc important de mettre en place une réglementation qui définit des seuils toxiques acceptables au niveau mondiale pour déclasser les aliments trop contaminés afin qu'ils ne soient pas consommés dans le pays d'origine ou bien exportés (AFSSA, 2009).

Selon l'AFSSA, l'évaluation des risques est « l'évaluation de la probabilité qu'un effet indésirable sur la santé survienne à la suite de l'absorption d'une denrée alimentaire présentant un danger, dans une population, après exposition au danger ».

Pour caractériser les dangers, une Dose Journalière Tolérable (DJT) est fixée grâce aux études toxicologiques. Pour qu'il n'y ait pas de risque pour la santé, il faut que l'exposition journalière d'un individu soit inférieure à la DJT (JARD, 2009).

Remarque : La consommation journalière moyenne de zéaralénone est estimée à 20ng/kg au Canada, au Danemark et en Norvège et à 30ng/kg aux USA (ZINEDINE A., 2007).

Notons qu'il n'a pas été fixé de DJT pour les aflatoxines. En effet, ces substances présentent des effets cancérigènes génotoxiques sans seuil. La seule approche réaliste est de réduire l'exposition à un niveau aussi faible que possible suivant le principe ALARA (As Low As reasonably Achievable (JARD, 2009).

Mais toutes les tranches d'âge ne sont pas touchées de la même façon (tab IV). Ainsi, les mesures à prendre seront différentes selon la population à considérer (AFSSA, 2009).

Tableau IV : Exposition alimentaire de la population française aux trichotécènes (AFSSA, 2009)

Exposition moyenne (µg/kg p.c./j)	Population	
	Adultes	Enfants (3-14 ans)
DON	0,460	0,730
NIV	0,060	0,090
T-2	0,075	0,111

Chez l'homme, comme chez l'animal, l'effet cancérigène des aflatoxines (AFB1 et AFM1) et de l'ochratoxine A (OTA) a été prouvé. La fumonisine B1 (FB1) ainsi que la zéaralénone sont actuellement classées dans la catégorie des cancérigènes probables et pourraient entrer dans la classe des cancérigènes. La patuline, quant à elle, est classée parmi les toxines à risque (YIANNIKOURIS A., 2002).

Une réglementation existe déjà pour les aflatoxines et l'ergot en alimentation humaine et animale ainsi que pour l'ochratoxine A, la patuline, le DON, la zéaralénone et les fumonisines en alimentation humaine. Elle est en préparation pour l'ochratoxine A, le DON, la zéaralénone et les fumonisines en alimentation animale (AFSSA, 2009) ainsi que pour la T-2 en alimentation humaine (ARVALIS, 2010).

Mais la mise en place de nouvelles réglementations est longue et fastidieuse car nous manquons de connaissances pour la plupart des mycotoxines (hormis le DON qui est plutôt bien connu).

2. Seuils réglementaires fixés pour les principales familles de mycotoxines

a) Teneurs maximales recommandées par le JEFCA dans les rations animales pour les aflatoxines, l'ochratoxine A, les trichothécènes et les fumonisines

La recommandation 2006/576/CE du 17 août 2006 définit des niveaux d'attention afin de protéger l'animal et le consommateur.

Le tableau ci-dessous (tab V) résume les recommandations dans les rations des animaux, pour 4 familles de mycotoxines (JOURNAL OFFICIEL DE L'UNION EUROPEENNE, 2006).

Tableau V : Valeurs toxicologiques de référence du JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) dans les rations animales (AFSSA, 2009; JECFA, 2000)

Mycotoxines	Valeurs toxicologiques de référence chez les animaux
Aflatoxines	* AFB1 : aussi basse que raisonnablement possible * 20 µg/kg dans les aliments pour bovins, à l'exception des aliments pour bétail laitier (5 µg/kg) et des aliments pour veaux (10 µg/kg)
Ochratoxine A	* Dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP) = 0,5 mg/kg * Ingestion tolérable provisoire = 100 ng/kg poids corporel/semaine
Trichothécènes	Doses journalières tolérables provisoires : * Toxines T-2 et HT-2 : 0,06 µg/kg de poids corporel * DON : 1 µg/kg de poids corporel
Fumonisines	En 2001, le JECFA a établi une DJMTP de 2 µg/kg de poids corporel pour FB1, FB2 ou FB3 seules ou en mélange, sachant que la dose sans effet néfaste a été estimée à 0,2 mg/kg de poids corporel/j dans des études de toxicité chronique rénal chez le rat.

b) Cas particulier de la zéaralénone en France

(1) *Valeur toxicologique de référence*

En 1999, le conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a proposé une DJT de 0,1 µg/kg/j et une dose sans effet nocif observé (DSENO) de 50 µg/kg/j. C'est celle-ci qui a été fixée comme limite maximale par la Commission européenne (AFSSA, 2009).

Mais la réglementation n'est pas simple puisque les taux varient selon le type d'aliment et l'animal de destination (espèce, catégorie d'âge,...).

(2) *Exposition de la population et des animaux à la zéaralénone en France*

En 2000, une étude a été menée afin de connaître le niveau de consommation et d'exposition de la population française à la zéaralénone à partir de 245 aliments "prêts à consommer". Les résultats ont montré que 5 échantillons (2%) ont des niveaux de

zéaralénone supérieurs à la limite de détection, dont 2 supérieurs à la limite maximale de 50 µg/kg fixée par la Commission européenne.

Pour l'alimentation humaine, le règlement 1126/2007/CE fixe les teneurs maximales pour la zéaralénone dans les denrées alimentaires (tab VI). Pour l'alimentation animale (matières premières et aliments), aucune teneur maximale en zéaralénone n'est fixée ; la Commission Européenne fait seulement des recommandations (tab VII) (AFSSA, 2009).

Tableau VI : Teneurs maximales en zéaralénone dans les denrées alimentaires humaines (AFSSA, 2009)

Produit	Teneur maximale en µg/kg
Céréales brutes autres que le maïs	100
Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide (*)	350
Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son et germe en tant que produit fini commercialisé pour la consommation humaine directe, à l'exception des denrées alimentaires figurant aux points 6, 7, 8, 9 et 10	75
Huile de maïs raffinée	400
Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner (à l'exception des collations au maïs et des céréales pour petit déjeuner à base de maïs)	50
Maïs destiné à la consommation humaine directe, collations au maïs et céréales pour petit déjeuner à base de maïs	100
Préparations à base de céréales (à l'exception des préparations à base de maïs) et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	20
Préparations à base de maïs destinées aux nourrissons et enfants en bas âge	20
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est supérieure à > 500 microns µm auxquelles s'applique le code NC 1103 13 ou 1103 20 40 et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est supérieure à > 500 µm destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 1904 10 10	200
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est 500 auxquelles s'applique le code NC 1102 20 et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est 500 destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 1904 10 10	300

(*) l'exception s'applique uniquement au maïs dont l'étiquetage ou la destination, par exemple, font clairement apparaître qu'il est destiné à être utilisé dans un processus de mouture humide (production d'amidon)

Tableau VII : Teneurs maximales en zéaralénone dans les aliments pour animaux selon la recommandation 2006/576/CE du 17 août 2006

Produits	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux :	
<ul style="list-style-type: none"> • Les céréales et sous-produits céréaliers • Les sous-produits du maïs 	<p>2000</p> <p>3000</p>
Aliments complémentaires et complets pour :	
<ul style="list-style-type: none"> • Les porcelets et les jeunes truies • Les truies et les porcs d'engraissement • Les veaux, le bétail laitier, les ovins (y compris les agneaux) et les caprins (y compris les chevreaux) 	<p>100</p> <p>250</p> <p>500</p>

NB : La proportion d'individus dont l'apport théorique de zéaralénone dépasse la DJT établie est de 2,5% pour les enfants de 3 à 14 ans, et de 31% pour la population végétalienne.

3. Évolution de la réglementation mondiale

En permettant de tester de façon systématique la contamination par les mycotoxines d'un grand nombre de productions agricoles ou d'élevage, le développement de méthodes rapides de détection a permis la mise en place de plans de vigilance à grande échelle. C'est le cas par exemple du projet « MYCOGLOBE » (2004-2007), financé par la Commission européenne, qui est chargé d'exploiter les résultats de plusieurs projets de recherche européens concernant le domaine des mycotoxines et des toxines fongiques. Il a pour objectif de soutenir, d'orienter et de faciliter la participation scientifique et la coopération des différents pays européens et des pays tiers (pays en développement inclus) dans les projets intégrés de recherche et de développement sur les mycotoxines.

Ainsi, la prise de conscience du risque et une plus grande accessibilité des méthodes de détection ont entraîné une augmentation du nombre de pays réglementant les mycotoxines, du nombre de mycotoxines réglementées et du nombre de matières premières analysées (FANGEAT, 2008).

En effet, dans plusieurs régions du monde, les mycotoxines constituent actuellement un problème majeur de sécurité sanitaire des aliments. Par exemple, entre Janvier et Juin 2009, le laboratoire « Biomin » a testé 4019 échantillons dans plusieurs pays pour les principales mycotoxines. Le pourcentage d'analyses positives varie entre 21 et 57%, ce qui n'est pas négligeable (fig 13).

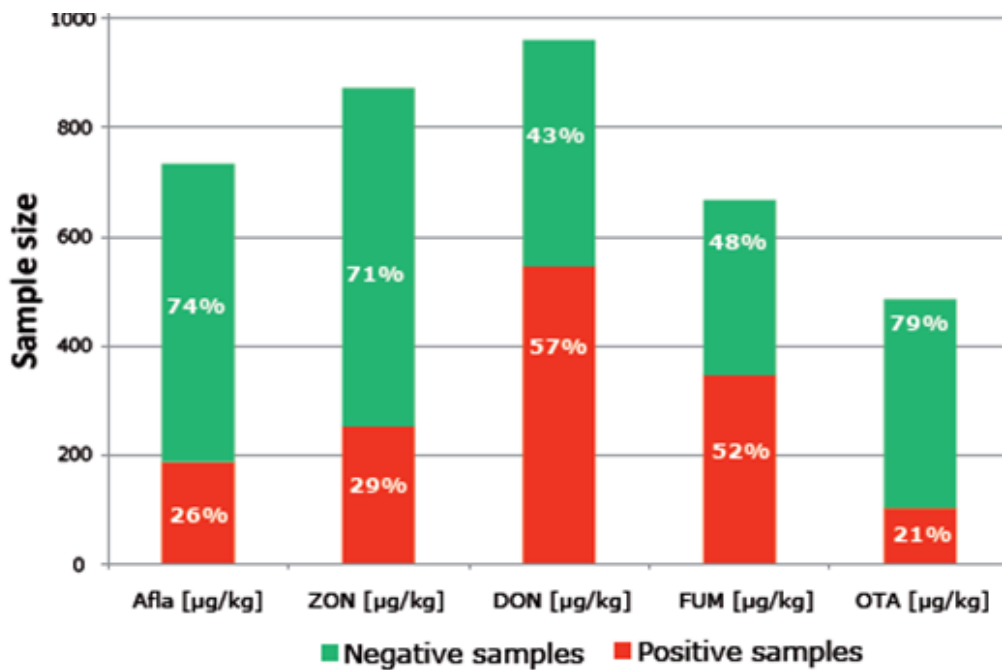


Figure 13 : Pourcentages d'échantillons positifs pour 5 familles de mycotoxines (BIOMIN, 2009)

Fin 2003, 99 pays avaient élaboré des limites spécifiques pour les mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et/ou animale (fig 14), soit une hausse d'environ 30% par rapport à 1995, et leur nombre ne cesse de progresser. Au total, ces pays regroupent près de 87% des habitants de la planète.

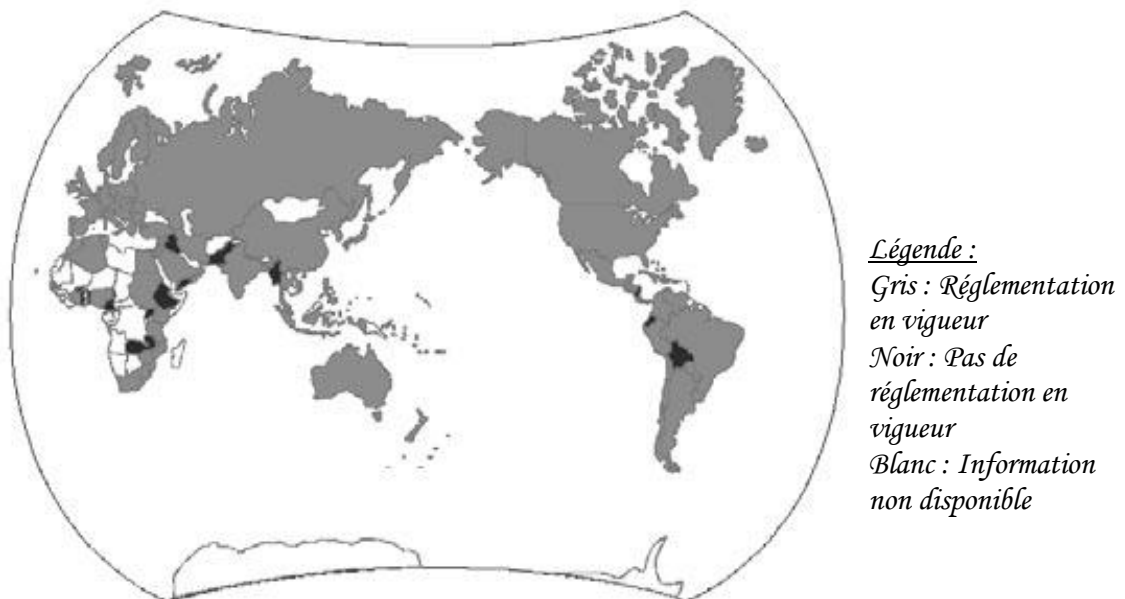


Figure 14 : Répartition mondiale de la réglementation en matière de mycotoxines (AFSSA, 2009)

S'il existe une réglementation dans presque tous les pays, le problème qui subsiste est qu'elle est loin d'être harmonisée (fig 15 et tab VIII). Cela peut s'expliquer en partie par le fait que la prévalence des mycotoxines varie d'un pays à l'autre, selon le type de culture, le climat, les pratiques agricoles,...

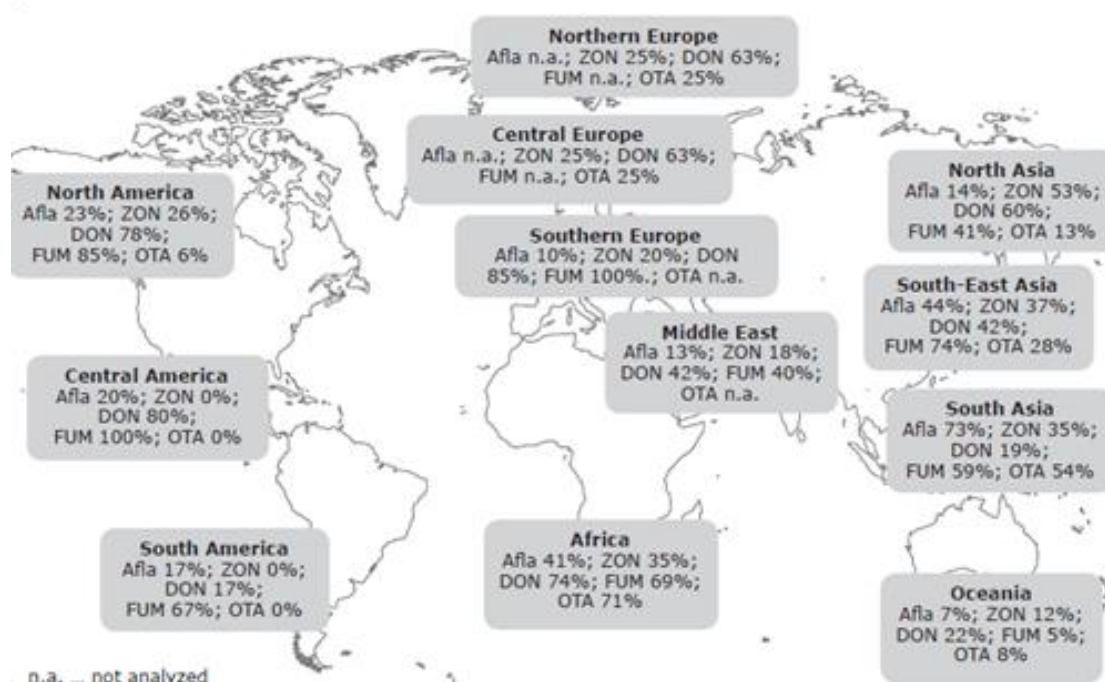


Figure 15 : Prévalence des mycotoxines selon les analyses confiées au laboratoire Biomin (BIOMIN, 2009)

Tableau VIII : Analyses des principales mycotoxines selon les régions du globe (BIOMIN, 2009)

Asia	Afla	ZON	DON	FUM	OTA
Number samples tested	377	364	381	395	399
Positive [%]	27	40	45	46	20
Average of positive [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	75	360	952	2335	26
Maximum [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2454	7422	11836	32510	1582
Europe	Afla	ZON	DON	FUM	OTA
Number samples tested	73	238	297	19	53
Positive [%]	10	15	66	84	36
Average of positive [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2	220	679	2752	3
Maximum [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	6	973	4689	7714	7
America	Afla	ZON	DON	FUM	OTA
Number samples tested	50	51	56	24	27
Positive [%]	22	22	71	83	4
Average of positive [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	8	548	851	1448	3
Maximum [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	14	4787	3810	5944	3
Middle East	Afla	ZON	DON	FUM	OTA
Number samples tested	94	94	91	94	n.a.
Positive [%]	13	18	42	40	n.a.
Average of positive [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	6	94	411	547	n.a.
Maximum [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	18	392	1620	2261	n.a.
Africa	Afla	ZON	DON	FUM	OTA
Number samples tested	140	125	135	135	7
Positive [%]	10	15	66	84	36
Average of positive [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	105	66	1103	1209	12
Maximum [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	436	293	11022	4398	12

n.a. ... not analyzed

Le plus gros problème est que les limites tolérables peuvent être très différentes selon l'endroit où on se trouve (fig 16). Par exemple, si on regarde les concentrations maximales tolérées pour la zéaralénone, elles varient d'un facteur 20 entre les pays.

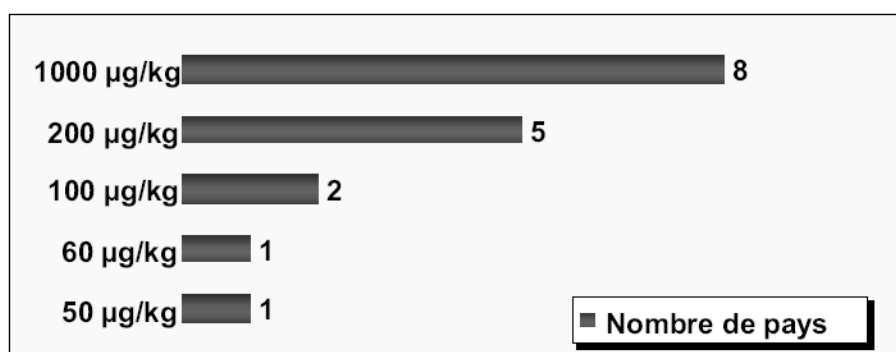


Figure 16 : Teneurs maximales en zéaralénone recommandée selon les pays (FAO, 2003)

Mais on tend tout de même vers une harmonisation. En effet, depuis 1998, l'UE a harmonisé les réglementations pour les mycotoxines, ainsi que les protocoles d'échantillonnage et les critères pour les méthodes d'analyse. On observe le même phénomène au niveau des zones de libre échange (EFTA, MERCOSUR, Australie/Nouvelle-Zélande) et des efforts sont faits pour les produits faisant l'objet d'un commerce international (Codex Alimentarius).

En 2003, les pays ayant adopté des réglementations spécifiques pour les mycotoxines présentes dans les denrées destinées à l'alimentation humaine étaient beaucoup plus nombreux que ceux dotés de réglementations spécifiques pour les aliments pour animaux mais celui-ci devrait augmenter sensiblement dans les années à venir (FAO, 2003).

D. Prédipositions au développement des différentes mycotoxines

1. Selon le type de fourrage présent dans la ration

Les mycotoxines dépendent de plusieurs facteurs tels que l'activité en eau (A_w) et le pH, pour leur développement.

Pour les fourrages par exemple, selon les mycotoxines considérées, ce seront plutôt les foins ou plutôt les ensilages qui seront contaminés (tab IX) (FANGEAT, 2008).

Tableau IX : Prévalence des différentes mycotoxines selon le type d'aliment considéré (FANGEAT, 2008)

Espèces		Mycotoxines	Foin	Ensilage
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Aflatoxines	-	X
	<i>ochraceus</i>	Ochratoxine A	X	-
<i>Fusarium sp.</i>		Zéaralénone, DON, Fumonisines, Toxine T-2	X	X
<i>Penicillium sp.</i>		Ochratoxine A, Patuline	X	X

a) Les mycotoxines dans les ensilages

En règle générale, les rations les plus à risque sont celles à base d'ensilage de maïs et, dans une moindre mesure, celles avec de l'ensilage de blé (FANGEAT, 2008).

Or, l'ensilage de maïs plante entière est un des fourrages les plus utilisés dans la ration des vaches laitières (hormis dans les zones de production AOC), les consommations journalières étant de l'ordre de 10 à 15 kg de MS pour une vache laitière en production (ROUSSEAU, 2006).

Dans un ensilage, au sein d'un même silo, les mycotoxines seront produites soit au front d'attaque soit dans la masse du silo en fonction de la famille du champignon considérée (tab X) (BAILLY J.D., 2006).

Tableau X : Aspect et condition de développement des principales espèces fongiques des ensilages (BAILLY J.D., 2006)

Espèce	Couleur et aspect	Condition de développement	Localisation	Conséquence du développement fongique	Mycotoxine potentiellement produite
<i>Trichoderma</i>	Jaunâtre puis vert (petits amas)	Apparition en fin de silo, surtout si dégradation avancée	Front de coupe		Trichothécènes
<i>Byssochlamys</i>	Blanc persistant, aspect compact	Développement dans la masse, visible un mois après l'ouverture du silo	Masse du silo		Patuline
<i>Fusarium</i>	Blanc puis rose, aspect cotonneux	Contamination au champ. Développement possible si tassement insuffisant et avancement trop lent	Masse du silo		Zéaralénone
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bleu-gris	Apparition précoce après l'ouverture, silos avançant lentement, période chaude	Front de coupe	Agent de mycose respiratoire et génitale	Plusieurs mycotoxines

b) Les mycotoxines dans le foin

Dans le foin, le facteur limitant pour le développement des mycotoxines est la faible humidité (séchage rapide et humidité inférieure à 10-20%). Elles se développeront donc dans des fourrages mal séchés ou ré humidifiés pendant leur conservation.

Les moisissures les plus souvent retrouvées dans les foins mal conservés sont celles des genres *Aspergillus* (notamment *A. fumigatus*) et *Penicillium*.

2. Selon les caractéristiques du milieu

a) Les aflatoxines

- * Elles se développent aussi bien au champ qu'au cours du stockage (FANGEAT, 2008).
- * Conditions climatiques favorables à leur apparition : climats tropicaux et subtropicaux.
- * *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton alors que *A. parasiticus* est plutôt retrouvé dans les graines d'arachide.

* Facteurs de développement : Aw = [0,84-0,86] (aliments secs) et T° = [25°C-40°C] (AFSSA, 2009).

b) L'ochratoxine A

* L'OTA se retrouve dans les produits qui ont été mal séchés avant leur stockage (YIANNIKOURIS A., 2002).

* Conditions climatiques favorables à leur apparition : climats frais et tempéré.

* Elle contamine toutes les céréales, surtout le maïs, l'orge, l'avoine, le seigle et le blé, ainsi que les oléagineux (AFSSA, 2009).

c) La patuline

* Elle est présente dans les produits cidricoles non fermentés ou faiblement fermentés lorsque des fruits blessés, de mauvaise qualité ou pourris, ont été utilisés ; mais aussi dans certains fourrages tels que les ensilages de maïs moisissés.

* Elle résiste à la pasteurisation et est produite dans des intervalles d'hygrométrie et de températures larges (maximum de production vers 17°C), ainsi qu'en présence ou non de lumière (ROUSSEL M., 2007).

d) Les alcaloïdes de l'ergot

* Ils se développent surtout dans les espèces ou variétés dont les glumes restent ouvertes longtemps ; on les retrouve dans l'ovaire des graminées (DUVAL, 1994).

* Facteurs de développement : T = [9°C-15°C], humidité relative de 100% ou lorsque qu'une période ensoleillée suit des averses (AFSSA, 2009).

* Le seigle est la céréale la plus sensible à ce pathogène, mais toutes les céréales à paille peuvent également être infectées.

e) Les trichothécènes

* Elles se développent durant la récolte et le pré-stockage (FANGEAT, 2008).

* Conditions climatiques favorables à leur apparition : moisissure ubiquiste, capable de résister à des climats rigoureux (régions à climat tempéré d'Amérique du Nord, d'Europe et d'Asie) ; la production de toxines est même fortement stimulée par les épisodes de refroidissement (AFSSA, 2009). Par exemple, les conditions optimales pour le développement de *Fusarium graminearum* sont une période de froid avec une haute humidité.

* On les retrouve dans la plupart des céréales : blé, maïs, orge, sarrasin, seigle, millet, avoine et riz.

L'acide fusarique les accompagne souvent et amplifie leur toxicité (YIANNIKOURIS A., 2002).

* Facteurs de développement : pluie au moment de la floraison.

f) Les fumonisines

* Ces mycotoxines se développent exclusivement au champ.

* Conditions climatiques favorables à leur apparition : climats tempérés et chauds.

* Associées principalement au maïs, un peu au sorgho, à l'orge, au riz et au soja, elles ne sont pas présentes dans les grains de blé (YIANNIKOURIS A., 2002).

* Facteurs de développement : températures estivales élevées [13°C-28°C]. Leur présence est augmentée après les attaques de pyrale (*Ostrinia nubilalis*), un insecte qui provoque des lésions dans les épis et les tiges de maïs (AFSSA, 2009). En outre, plus la récolte est tardive, plus la teneur en fumonisines des grains de maïs est élevée. Elle est aussi liée à la durée entre la récolte et le séchage des grains de maïs. En effet, les fumonisines se développent de façon optimale lorsque le pourcentage de matière sèche est de 30%.

Les sons sont en moyenne 1,6 à 2 fois plus contaminés que les grains.

g) La zéaralénone

* Elle se développe principalement au champ et en début de stockage si le séchage n'est pas assez rapide ou en cas de ré-humidification (BAILLY, 2008).

Les données de contamination disponibles issues des plans de surveillance et de contrôle des services de l'Etat (Direction Générale de l'Alimentation – DGAL- et Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes- DGCCRF) des récoltes de 2003 à 2006 montrent que le maïs est plus à risque que les grains de céréales à paille (blé, avoine,...). En effet, sur 100 échantillons de blé, 100 d'orge et 223 de maïs, aucun échantillon de blé ou d'orge ne renferme plus de 100 µg/kg en zéaralénone, alors que 11 % des échantillons de maïs en contiennent plus de 200 µg/kg.

Le pourcentage d'échantillons de maïs dont la teneur en zéaralénone dépasse 200 µg/kg varie de 0 à 20 % selon les années.

Les semoules et farines de maïs sont les aliments les plus contaminés, avec une teneur moyenne en zéaralénone de 13,3 µg/kg (AFSSA, 2009).

* Conditions climatiques favorables à leur apparition : c'est une moisissure ubiquiste mais surtout présente dans les régions tempérées d'Europe, d'Amérique et d'Asie (AFSSA, 2009).

* Elle est retrouvée dans le maïs principalement (avec des taux d'humidité oscillant entre 22 et 25% et des températures comprises entre 10 et 15°C), et plus faiblement dans le sorgho, les graines de sésame, l'orge, le blé (dans des conditions d'humidité avoisinant 74%), le riz et l'avoine récoltés tardivement, et sur des grains dont l'enveloppe a été abîmée (FANGEAT, 2008).

Si les moisissures produisant la zéaralénone colonisent principalement les céréales, elles ont été également détectées dans les foins et les pailles mal séchés. Les fourrages ensilés peuvent aussi contenir de la zéaralénone dont l'origine est double : apportée par le fourrage contaminé au moment de sa mise en silo, ou produite dans le silo après un mauvais tassement ou une acidification tardive (fréquemment rencontrées avec les maïs ensilés sous forme de brins longs et à des teneurs en matière sèche supérieures à 35 %).

La concentration en zéaralénone dans les silos de maïs est plus importante en périphérie que dans la zone centrale car la teneur en oxygène y est plus faible.

Une enquête épidémiologique réalisée au Brésil entre mai 1997 et mars 2001 montre que la zéaralénone détectée dans 57,5% des échantillons analysés est la mycotoxine la plus fréquemment rencontrée dans l'ensilage de maïs (AFSSA, 2009).

Dans le cas du blé, le gluten est plus fortement contaminé que le grain (de 200 à 1200%). Les germes sont également très contaminés (de 80 à 522 % de la teneur des grains) (AFSSA, 2009).

La contamination est très hétérogène si l'on compare différents pieds de céréales atteints.

* Facteurs de développement : mauvaises conditions climatiques (exposition des épis aux intempéries). La production de zéaralénone est très faible à 32°C et maximale à 20°C mais dépend des différences génétiques des souches. Elle est considérablement augmentée lors de variations successives de températures.

En 1973, Gousse et al. ont montré que si l'on met un substrat moisi quelques semaines à 25°C puis qu'on le passe six semaines à 12°C, on obtient alors une production maximale de zéaralénone (GOUSSE R., 1973).

E. Influences des mycotoxines sur les performances zootechniques

1. Pertes économiques

Ces dernières années, aux Etats-Unis, les pertes économiques dues aux mycotoxines ont été évaluées à 1,4 milliards de dollars/an.

Elles résultent directement des effets néfastes des toxines fongiques sur les productions animales ou sur les rendements agricoles mais aussi des moyens mis en œuvre dans les programmes de prévention (WHITLOW L.W., 2008).

Dans la région Emilia Romagna (Italie, 150 000 vaches), le coût des mycotoxines a été estimé à 200 millions d'euros sur la campagne 2003-2004 (ARZUL P., 2010).

Les pertes économiques sont multiples et sont :

- directes

* pour le marchand de grain : une mauvaise qualité (fig 17)

* pour l'éleveur : diminution de la reproduction et réduction des performances de son troupeau, pertes dues aux maladies

* pour les industries alimentaires : substances non vendables

- indirectes :

* prix de revient augmenté

* dépense pour les soins vétérinaires



Figure 17 : Epi de maïs atteint de fusariose

2. Pertes céréalières

Les champignons provoquent des modifications dans les graines, qui se traduisent par une perte de germination, la production de métabolites toxiques et la diminution en sucres et acides gras entraînant ainsi une baisse de la valeur nutritive. Sur différentes variétés de blé, les pertes de rendement brut varient entre 12 et 65%.

Selon les estimations de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), les pertes totales de denrées alimentaires dues aux mycotoxines seraient de l'ordre de 1 000 millions de tonnes par an (FAO, 2003).

3. Pertes de performance et effets sur la consommation alimentaire des bovins

Les pertes de performance (chute de la production de lait, perte d'état corporel, ...) se situent entre 5 et 10% avec des rations moisies même en l'absence de mycotoxines. Mais les mycotoxines augmentent ces pertes en causant des avortements, des maladies respiratoires, des déplacements de caillette, ... De plus, leur effet est amplifié avec le stress (ANIMAL FEED NEWS, 2008).

a) Observations non spécifiques sur le terrain

(1) *Généralités*

Les mycotoxicoses subcliniques sont rarement détectées chez les ruminants par les éleveurs ou par les vétérinaires puisque les moyens de détection sont très peu développés et que l'on ne pense pas souvent à en faire l'hypothèse, du moins pas en première intention.

Ainsi, il est difficile d'avoir une idée précise des conséquences de la consommation d'aliments contaminés par des mycotoxines sur la santé et la production des bovins.

Par ailleurs, ces maladies sont largement influencées par plusieurs facteurs indépendants de la concentration de mycotoxines comme le stade physiologique de l'animal, son alimentation, son état de santé général,... Ceci explique que ce sont les animaux qui subissent un stress lié à l'environnement ou à l'exploitation qui présentent les signes cliniques les plus prononcés.

Le plus souvent, ce sont donc les animaux à production élevée et les signes cliniques sont alors confondus avec des pathologies classiques comme l'acidose ruminale par exemple (YIANNIKOURIS A., 2002).

En effet, des études ont montré que 100 ppm de fumonisine réduisaient la production laitière chez les bovins laitiers alors que 148 ppm n'affectaient pas le gain moyen quotidien chez des bovins de boucherie. Ceci pourrait être attribuable à un stress accru subi par les vaches laitières en début de lactation, par comparaison avec la situation des bovins de boucherie (WHITLOW, 2001).

De plus, les veaux ont un tractus digestif semblable à celui des monogastriques puisque leur rumen n'est pas encore développé. Ils n'ont pas encore acquis la capacité de biotransformer certaines mycotoxines comme les adultes et sont donc plus sensibles à leur action toxique. Ils peuvent alors développer des mycotoxicoses aiguës comme celles retrouvées chez les porcs, les chiens, les chevaux....

C'est le cas de la T-2 toxicose, de l'aflatoxicose ou encore de l'ergotisme (FANGEAT, 2008).

Ainsi les sujets les plus sensibles sont les vaches en période de transition, les fortes productrices et les sujets de remplacement de moins de 6 mois.

Le régime alimentaire doit favoriser un fonctionnement optimal de la flore ruminale.

(2) Principaux effets non spécifiques des mycotoxines

Une consommation élevée d'une (ou plusieurs) mycotoxine(s) peut entraîner des symptômes aigus sur un bovin adulte, tels que des hépatites, des hémorragies, des lésions rénales, des avortements et même provoquer la mort de l'animal (FOURNIER, 2006; FOURNIER A., 2000). Mais le plus souvent, ce sont des pathologies subcliniques qui seront rencontrées.

On distingue principalement trois effets non spécifiques :

1/ Réduction de la quantité d'éléments nutritifs disponibles pour l'animal :

+ Diminution de la teneur en vitamines, acides aminés,...

Ceci entraîne une réduction de la valeur énergétique des aliments pour animaux (WHITLOW, 2001). Il y a alors chute de production et apparence de malnutrition avec un pelage rugueux.

+ Diminution de la consommation alimentaire et, par conséquent, de l'apport en éléments nutritifs (par diminution de l'appétence de l'aliment ou par irritation de l'appareil digestif).

On observe alors des troubles de l'ingestion et des troubles métaboliques entraînant :

- Cétose, amaigrissement
- Déplacement de caillette
- Boiterie, fourbure

Il y a aussi une perturbation du métabolisme des éléments nutritifs (par exemple, la toxine T-2 inhibe la synthèse protéique).

Les conséquences seront des troubles de fonctionnement du rumen et des troubles digestifs tels que :

- Diarrhées, hémorragies digestives
- Bouses hétérogènes

2/ Effets sur le système endocrinien et les glandes exocrines.

C'est le cas pour la zéaralénone principalement.

On assiste alors à des troubles de fécondité avec :

- Retard des retours en chaleur, kystes ovariens
- Avortements embryonnaires

3/ Immunosuppression, entraînant une :

- + Moindre réponse aux vaccins
- + Sensibilité accrue aux infections (augmentation du nombre de mammites, des taux cellulaires élevés, métrites)
- + Réactivation d'infections subcliniques
- + Perte d'efficacité thérapeutique

Tout ceci étant augmenté lors de la production de corticoïdes endogènes en réponse au stress ainsi qu'en période entourant le vêlage (WHITLOW, 2001; LEFEBVRE D., 2003; FOURNIER, 2006; ARZUL P., 2010).

b) Signes cliniques attribuables aux différentes mycotoxines, en élevage bovin

La pathologie observée dépend des toxines présentes (type, synergie, quantité et durée d'exposition), de la sensibilité de l'animal (âge, stade physiologique, statut sanitaire, statut immunitaire, statut nutritionnel) et de l'environnement (météo, confort, stress, hiérarchie sociale,...) (ARZUL P., 2010).

Il est difficile de relier les signes cliniques à une mycotoxine déterminée car les poly-contaminations sont fréquentes.

Par exemple, le laboratoire BIOMIN a analysé des échantillons d'aliment contaminé, dans différents pays, les résultats sont répertoriés ci-dessous (fig 18) :

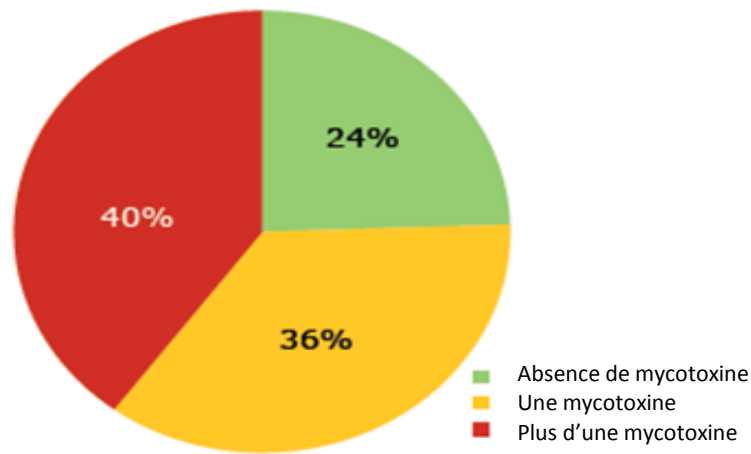


Figure 18 : Cas mondiaux d'aliments contaminés par des mycotoxines et analysés par le laboratoire Biomin en 2009 (BIOMIN, 2009)

Ainsi, 40% des échantillons analysés par ce laboratoire sont contaminés par plus d'une mycotoxine.

Par ailleurs, une étude en Hollande en 2008 montre que 100% des ensilages et 75% des échantillons de rations contaminées par de la zéaralénone contenaient aussi du DON (DRIEHUIS F., 2008).

On peut tout de même attribuer des signes cliniques, plus ou moins pathognomoniques, à une mycotoxine plus qu'à une autre (tab XI).

Tableau XI : Effets spécifiques des mycotoxines

Mycotoxines	Effets observés	Mécanismes d'action
AFLATOXINES	<p>* <u>TOXICITE AIGUE</u> (hépatotoxicité) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hépatite toxique, parfois nécrose hépatique, cirrhose - Foie hypertrophié, décoloré, friable, hémorragique (AKSOY A., 2009) <p>=> Inappétence, léthargie, diminution efficacité alimentaire et/ou production laitière (FANGEAT, 2008), déshydratation, avortement démarche chancelante, spasme musculaire, nervosité puis mort</p> <p>+ ictère, ascite, hémorragie, congestion (AFSSA, 2009; LYNCH, 2005)</p> <p>* <u>TOXICITE CHRONIQUE</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hépatocarcérogénicité (l'un des plus puissants cancérogène d'origine naturelle) <p>=> Hépatome, carcinome hépatocellulaire, cholangiocarcinome (ARZUL P., 2010)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Immunomodulation - Génotoxicité (AFSSA, 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> -Agent intercalant de l'ADN : liaisons avec les guanines entraînant la mort de la cellule ou sa transformation en tumeur maligne (FANGEAT, 2008). -Inhibition ARN polymérase des cellules du foie (LYNCH, 2005). -Peroxydation lipidique -Bioactivation par cytochrome P450 (AFSSA, 2009) -Conjugaison aux glutathion-transférases (AFSSA, 2009) -Fixation sur protéines plasmatiques (AFB1 sur albumine) (AFSSA, 2009)

	<p><u>Aflatoxicose</u> : Accumulation d'acides gras dans le foie, les reins et le cœur pouvant être à l'origine d'encéphalopathies, d'ascites et d'œdèmes viscéraux. Mort de l'animal en quelques heures à quelques jours. Conséquences: Augmentation de l'alanine phosphate dans le sérum et diminution du taux de vitamine A dans le foie et nécrose des cellules du foie (FANGEAT, 2008; LYNCH, 2005).</p>	
OCHRATOXINE A	<p>-Néphrotoxicité : *Tubulonéphrite interstitielle avec une enzymurie *PUPD *Reins décolorés, nécrose, fibrose interstitielle, atrophie des tubules, hyalinisation des glomérules. -Anorexie -Affaiblissement -Hépatotoxicité (AFSSA, 2009) -Immunomodulation -Génotoxicité (AFSSA, 2009)</p>	<p>-Impact sur synthèse des protéines -Inhibition production d'ATP -Détoxification par des peptidases</p> <p>(Rare chez les ruminants)</p>
PATULINE	<p>-Signes caractéristiques d'un syndrome nerveux : hyperesthésie, incoordination des organes moteurs, paraplégie pouvant entraîner la mort. -Paralysie des réservoirs gastriques => troubles généraux de l'ingestion et de la digestion avec météorisation (conséquences importantes sur la production laitière ou la croissance) (FANGEAT, 2008) -Cancérigène (AFSSA, 2009) -Mutagène -Immunodépression.</p>	<p>-Altère la perméabilité ionique et/ou la communication intracellulaire, engendrant un stress oxydatif et la mort cellulaire. -Inhibition indirecte d'enzymes</p>
ALCALOÏDES DE L'ERGOT	<p>-Gangrènes sèches des extrémités (boiteries dues à inflammation zone coronaire et tuméfaction du paturon => nécrose et chute des extrémités (queue, oreilles,...)) (FANGEAT, 2008) -Intolérance à la chaleur -Nécrose adipeuse bovine -Grand besoin en eau, salivation importante -Diarrhée - Pelage d'apparence hirsute - Diminution de la production lactée, voire agalactie - Avortement (FANGEAT, 2008)</p>	<p>-Effet alpha-agoniste => vasoconstricteur (utilisé comme antimigraineux). -Action agoniste ou agoniste partielle sur les récepteurs vasculaires de la sérotonine</p>

<p>TRICHOTHE- CENES (Déoxynivalénol (DON) ou vomitoxine, Diacétoxyscirpé nol (DAS), Toxine T-2 et Hydroxy-T-2 (HT-2))</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Inappétence => réduction de l'ingéré (WHITLOW L.W., 2005) -Diminution de la production laitière -Immunosuppression : <ul style="list-style-type: none"> *Diminution de la prolifération des lymphocytes *Diminution des concentrations sériques en IgA, IgM, IgG *Augmentation de la sensibilité à différents pathogènes *Diminution de l'efficacité vaccinale -Chétivité (AKSOY A., 2009) -Infertilité, anoestrus -Hémorragies intestinales : inflammation, érosion des muqueuses digestives, ulcères du tube digestif (toxine T-2 ++) (FANGEAT, 2008; ARZUL P., 2010) -Diarrhées sanguinolentes -Dermatoses sévères et hémorragies pouvant aller jusqu'à la mort -Irritation des yeux, de la peau, des muqueuses -Problèmes respiratoires -Maux de tête -Fatigue -Perte de poids -Hématotoxicité (CHARMLEY E., 1993) 	<ul style="list-style-type: none"> - T-2 et DON inhibent la synthèse protéique et entraînent la mort des cellules de différents organes (FANGEAT, 2008). -Induction de l'apoptose sur les cellules hématopoïétiques et immunitaires -Impact sur la synthèse des protéines (AKSOY A., 2009) -Altération des Ig
<p>FUMONISINES</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution du GMQ (FANGEAT, 2008) -Baisse de la production -Hépatotoxicité (ARZUL P., 2010) -Lésions profondes du tractus gastro-intestinal et du système nerveux central -Génotoxicité (AFSSA, 2009) -Immunomodulation 	<ul style="list-style-type: none"> -Inhibition de la synthèse des sphingolipides (FANGEAT, 2008) -Altération du cycle cellulaire <p>(Ruminants peu sensibles).</p>
<p>ZEARALENONE</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Troubles de la reproduction (cf. III) -Augmentation des taux cellulaires du lait -Effets anabolisants : amélioration des performances de croissance des ovins et des bovins 	<ul style="list-style-type: none"> -Liaison aux récepteurs oestrogéniques -Bioactivation par déshydrogénases -Conjugaisons par glucuronyl-transférases

Actuellement, seule la zéaralénone a des effets prouvés sur l'appareil reproducteur. Mais des cas d'avortements et de troubles de la reproduction ont été rapportés avec d'autres mycotoxines (fig 19) (BAILLY, 2008).

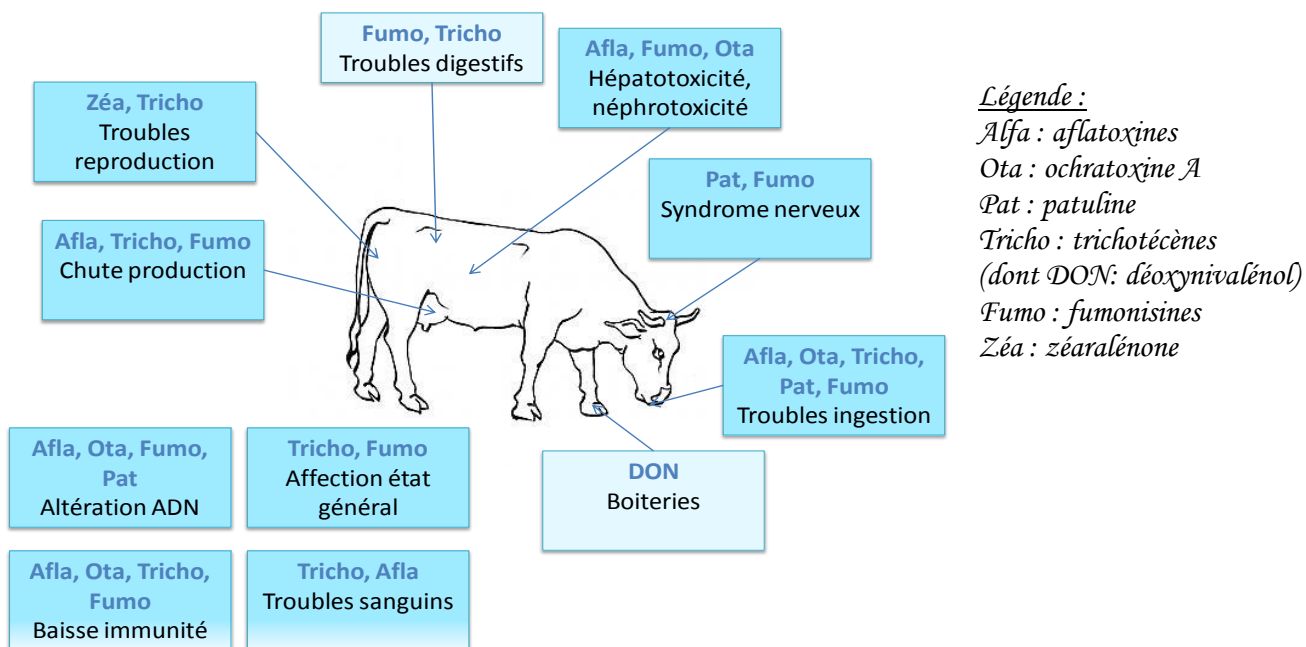


Figure 19 : Schéma simplifié des effets des mycotoxines sur l'organisme (LEFEBVRE D., 2003; FOURNIER, 2006; ARZUL P., 2010; BIOMIN, 2009)

Les aliments des bovins peuvent donc être contaminés par de nombreuses mycotoxines, la liste présentée ci-dessus n'étant pas exhaustive. Les signes cliniques sont très variés et variables d'un individu à l'autre, il faut donc toujours garder à l'esprit les mycotoxicoses, surtout si plusieurs animaux sont touchés.

Il est regrettable que, sur le terrain, il existe si peu de moyens pour la mise en évidence de la contamination par des mycotoxines. Ainsi, il n'est pas rare que le vétérinaire invoque une intoxication aux mycotoxines, en dernier recours, lorsque toutes ses autres hypothèses diagnostiques ont été écartées.

Nous allons voir à présent quelles mesures mettre en place lorsque l'on suspecte un troupeau d'être atteint de mycotoxicose.

II. Mycotoxicose en élevage bovin : prévention, diagnostic et gestion

A. Prévention de la contamination des denrées par les mycotoxines

Les fourrages et les céréales sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, ainsi que durant le transport et le stockage. Mais les champignons des flores intermédiaires et de stockage sont en quantité plus importantes dans les aliments récoltés et conservés humides, d'où la nécessité de prendre des précautions.

De plus, à cause du processus d'échauffement spontané, les formes hygrophiles et thermo-tolérantes (*Aspergillus fumigatus*, *Stachybotrys atra*) sont prédominantes.

Par ailleurs, la durée de conservation des ensilages peut modifier leur faciès fongique. Après 2 à 3 mois, il y a prédominance de *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* alors que *Byssochlamys nivea* (synthétisant la Patuline) apparaît au bout de 6 mois de conservation (YIANNIKOURIS A., 2002).

Les facteurs de risque sont de deux types : les facteurs culturaux, sur lesquels l'agriculteur peut agir, et les facteurs météorologiques, que l'on peut analyser en vue de prédire le risque de développement de la maladie.

Quelle est la conduite à tenir afin d'éviter au maximum la contamination des céréales par les mycotoxines ?

Les facteurs influençant le développement des champignons sont spécifiques à une culture. Par exemple, la présence de mycotoxines augmente dans le blé avec une humidité importante à la floraison et pendant les stades ultérieurs. Alors que pour le maïs, les maladies causées par *Fusarium* résultent le plus souvent de l'association d'insectes, d'un temps chaud puis de conditions humides vers la fin de la saison de croissance (WHITLOW, 2001).

Il y a cinq moments privilégiés pour le développement des mycotoxines: la culture, la récolte, le stockage, la transformation et l'alimentation des animaux (PFOHL-LESZKOWICZ, 2001).

1. L'importance du choix du cultivar

Le développement des mycotoxines dépend de la quantité d'inoculum présent et de la sensibilité de la plante à l'infection. Ainsi, si l'on parvient à minimiser l'une de ces composantes, on peut réduire significativement les risques.

De plus, les mycotoxicoses des plantes sont favorisées par les monocultures et par le semi direct sans labour (ARZUL P., 2010). Il est conseillé de mettre des cultivars avec des dates de floraison et de maturités différentes afin de mieux répartir le risque de propagation de l'infection.

L'infection correspond à la pénétration de la moisissure dans les tissus de la plante. Le stade de la céréale le plus critique pour l'infection est la période épiaison-floraison, qui dure à peine quelques jours. À ce moment, la fleur est ouverte et donc plus sujette à

l'invasion par la (les) moisissure(s). Ce sont l'humidité et la température qui ont le plus grand impact sur le niveau de contamination.

Ainsi, la connaissance de la sensibilité des plantes aux différents stades de croissance et l'adoption de pratiques culturales appropriées (rotation de culture, labour...) permettront de limiter la présence de mycotoxines dans les céréales cultivées.

Des chercheurs québécois ont montré qu'il existe une différence entre les cultivars et les hybrides quant à leur résistance à certaines maladies fongiques. Par exemple, un hybride de maïs à maturation tardive (classe 600-700) présente des taux 3 à 4 fois supérieurs de zéaralénone et de vomitoxine par rapport aux hybrides à maturation hâtive (classe 400-500). En fait, la résistance et la tolérance des plantes aux maladies sont complexes et plusieurs gènes sont impliqués.

Depuis 2010, on cherche à identifier des gènes de résistance au développement de ces champignons pour créer des plantes résistantes ou possédant une capacité de dégradation des mycotoxines. Cette méthode utilise la sélection assistée par marqueur qui permet le passage du gène d'une variété à une autre (ARVALIS, 2010). Au Québec par exemple, on souhaite développer des lignées de blé naturellement résistants à l'infection par la fusariose de l'épi (CENTRE DE DEVELOPPEMENT DU PORC DU QUEBEC, 2002).

Le choix d'un cultivar résistant est donc le moyen de prévention de la contamination par les mycotoxines avant la récolte à privilégier. Mais il faut tout de même faire attention car une incompatibilité de l'hybride de maïs dans la région dans laquelle il est planté peut prédisposer la plante à la croissance fongique et au développement des mycotoxines.

Bien évidemment, il faut éviter de laisser des résidus de culture dans les champs ayant un historique de contamination, sous peine que la nouvelle culture soit à son tour contaminée (FOURNIER, 2006). Certains recommandent de broyer les débris à la récolte et les enfouir pour limiter la contamination de surface par les spores de moisissures (ARZUL P., 2010) mais il a été montré que le labour n'était pas suffisant pour assainir une parcelle et qu'on pouvait avoir une contamination deux ans plus tard, même en changeant de cultivar chaque année (figure 20) (FANGEAT, 2008).

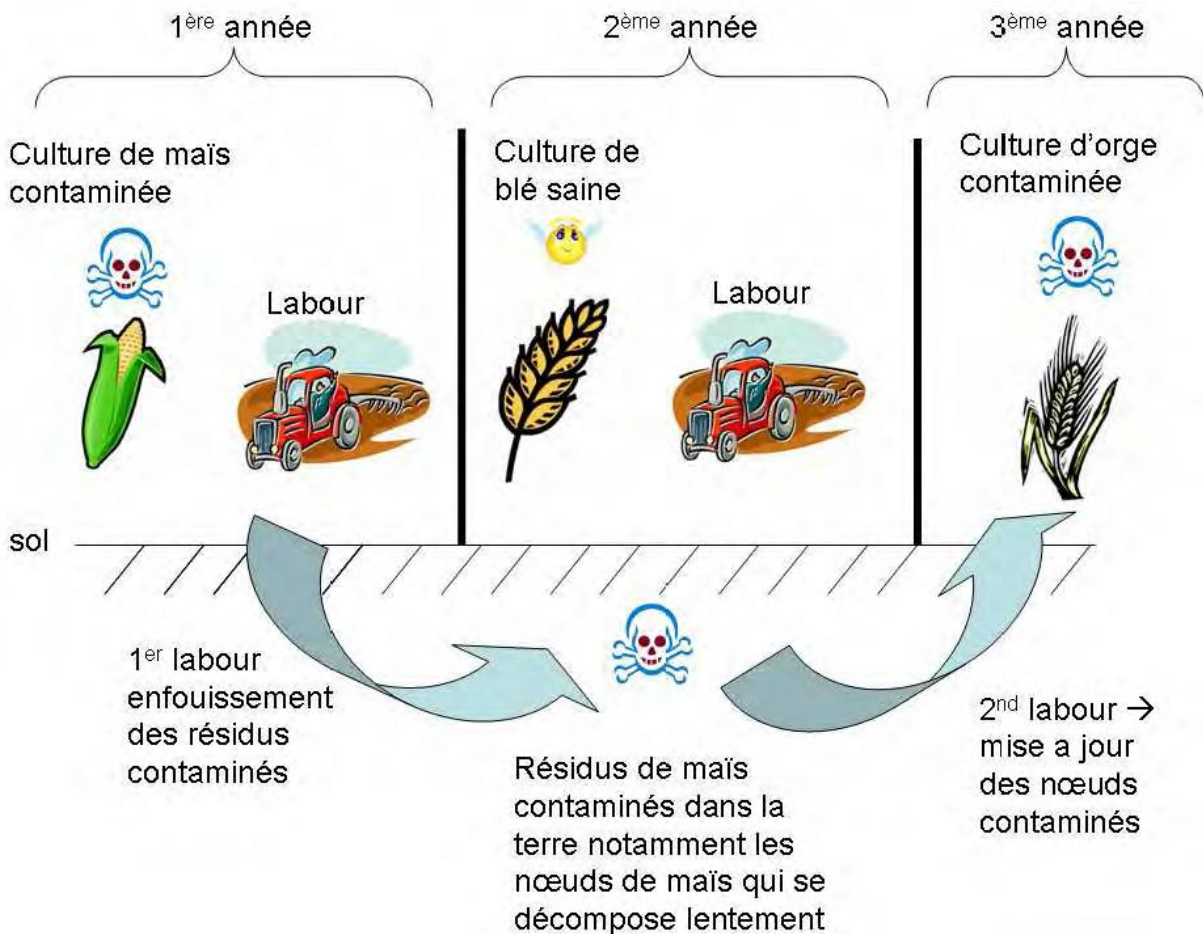


Figure 20 : Le danger des résidus de culture laissés dans les champs contaminés (FANGEAT, 2008)

Prenons l'exemple de la zéaralénone : les spores peuvent être transportées par le vent, par les éclaboussures de pluie et les insectes. Les fauches et récoltes rases des pailles, foin et surtout des fourrages destinés à être ensilés, favorisent leur contamination par des spores présentes dans le sol. La fragilisation voire la destruction des enveloppes protectrices des céréales au cours de la récolte ou par des nuisibles, permet la germination de ces spores.

NB : Les grains atteints de fusariose sont souvent plus légers ; il est donc possible de les éliminer au moment de la récolte en ajustant la ventilation de la moissonneuse-batteuse. Néanmoins, le champignon persiste alors dans le sol et pourra s'attaquer à une culture de céréales l'année suivante (DUQUESNOY, 2005)

2. Les bonnes pratiques de stockage

Les bonnes pratiques de stockage ne sont pas les mêmes selon le type d'aliment. Dans le foin, le facteur limitant le développement des moisissures est la faible humidité (séchage rapide et humidité inférieure à 10-20%), alors que dans les ensilages, ce sont les conditions d'anaérobiose (tassage) et de pH (inférieur à 4). Pour les céréales, les facteurs

limitant sont la température et l'humidité des grains (fig 21) (FANGEAT, 2008; YIANNIKOURIS A., 2002; LAUMONNIER, 2006).

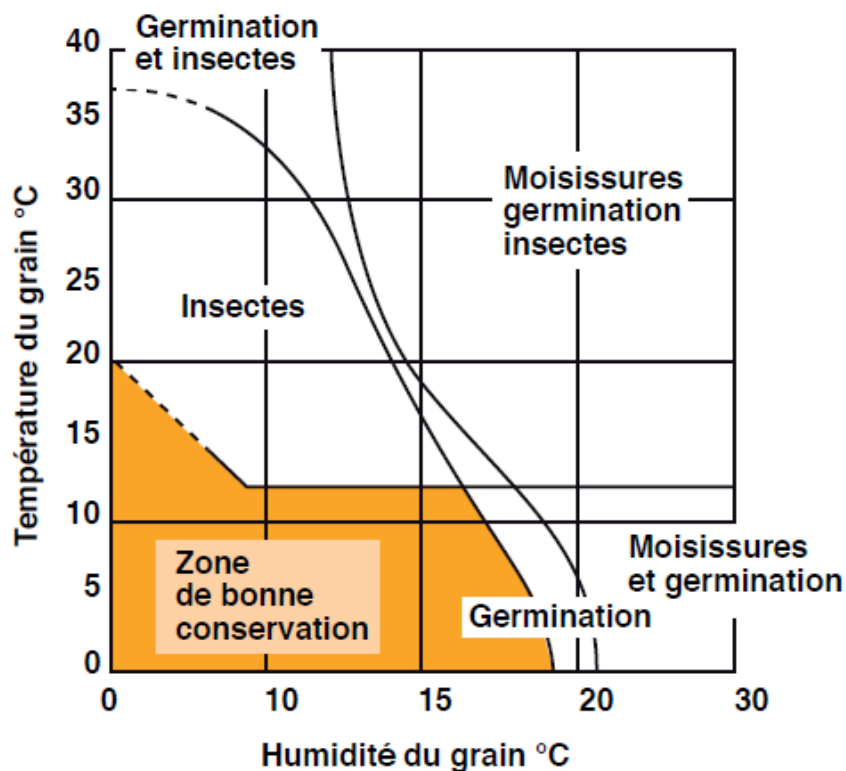


Figure 21 : Diagramme de conservation des céréales (Burqes et Burrel, 1964)

a) Anaérobiose

Dès la mise en silo, il est très important de mettre l'ensilage dans des conditions d'anaérobiose précoces et durables (hachage fin, bon tassage, teneur en matière sèche pas trop élevée) et d'assurer un départ rapide de la fermentation (possibilité de rajouter des conservateurs) (BAILLY J.D., 2006). En effet, bien qu'aérobies obligatoires, les champignons peuvent continuer à respirer à des concentrations en oxygène de 4 % (DUQUESNOY, 2005). Par exemple, la présence d'oxygène dans le front d'attaque ou dans le silo (formation de poches d'air) peut faciliter l'implantation de micromycètes (YIANNIKOURIS A., 2002) ; il est conseillé d'assurer une vitesse d'avancement du silo supérieure à 20 cm par jour (BAILLY J.D., 2006) et de limiter les temps de stockage (GRANCHER, 2011).

De plus, il faudra veiller à dératiser car les rongeurs, en détruisant les bâches protectrices des ensilages, vont créer des conditions d'aérobiose favorables à la multiplication fongique (DUQUESNOY, 2005).

b) Absence d'humidité

Le stockage de l'ensilage doit se faire à une humidité comprise entre 13 et 15 % dans les 48 heures suivant la récolte. Plus l'humidité est élevée et plus les risques sont importants. En effet, elle conduit à la dégradation de l'amidon et à la production de CO₂, de vapeur d'eau et de chaleur (glucose + O₂ → CO₂ + H₂O + énergie), ce qui augmente les risques de moisissures et d'échauffement spontanés des grains entreposés.

Il faut donc éviter de rentrer des céréales trop humides dans les silos ou de faire des mélanges de grains secs et humides (ANCEAU C., 2005), sinon il sera indispensable de ventiler le silo.

Par ailleurs, cette activité microbienne peut également contribuer à la décoloration des grains, au chauffage, à la perte de matière sèche, à la dégradation des lipides et des protéines,... ce qui diminue la valeur nutritive, raison de plus pour veiller au maintien de l'intégrité des grains de céréales (YIANNIKOURIS A., 2002).

c) Absence de terre

Il faut aussi éviter la contamination par la terre. Pour cela, il faut récolter par temps sec, régler la hauteur de la barre de coupe, ne pas faire monter les remorques sur le tas d'ensilage,... (ARZUL P., 2010).

S'il y a contamination durant la récolte, l'infection se poursuit pendant la manipulation et la période d'entreposage.

Le séchage, la ventilation et le refroidissement rapide des céréales contribuent à éviter d'aggraver la situation.

3. Les bâtiments et matériels

En fonction des activités (tonnage et type de céréales stockées, cadence de réception, profondeur du silo,...), il est nécessaire de déterminer précisément les infrastructures nécessaires pour réaliser un travail de qualité.

a) Précaution pour les bâtiments

Il faut vider, nettoyer et désinsectiser les installations avant chaque nouvelle récolte. En effet, si l'on prend l'exemple des céréales, la plupart des insectes prédateurs des grains stockés ne survivent d'une année à l'autre que dans les installations où les tas de grains sont mal refroidis et/ou trop humides ainsi que dans la poussière.

Pour l'ensilage, si la poussière s'accumule dans le silo, cela peut nuire à la ventilation.

Il est donc recommandé de nettoyer les silos et les systèmes d'alimentation six fois par an (YIANNIKOURIS A., 2002). On peut aussi incorporer de l'acide propionique (entre 0,5 et 1,5%) à l'ensilage ou sur les surfaces horizontales et verticales afin de limiter la croissance fongique ; mais cela n'est pas efficace si les champignons sont déjà présents (BAILLY J.D., 2006).

Il faut aussi veiller à ce que l'accès aux céréales ne soit pas possible pour les animaux indésirables. Même s'il est très difficile de lutter contre la présence des oiseaux, il faut respecter quelques règles simples telles que la fermeture des portes, un grillage aux ouvertures de ventilation, un filet au dessus des grains. Il faut éliminer les cachettes et les possibilités de nicher.

Les voies d'accès doivent aussi être protégées pour interdire toute pénétration des rongeurs.

En fin, tout le site, y compris les abords, doit être maintenu dans le meilleur état de propreté possible ; il ne faut pas laisser de déchets végétaux moisiss à proximité du silo (ANCEAU C., 2005).

Remarque : Il faut bien avoir en tête que le silo de grains n'est pas un milieu homogène : teneur en eau inégale, présence plus abondante de mauvaises herbes dans certaines zones, accumulations de particules fines qui réduisent la ventilation. Il doit donc être inspecté régulièrement afin de vérifier la température et l'odeur des grains (CEROM, 2003).

De plus, il faut faire attention à la localisation des silos métalliques ; en effet, si une partie du silo est au soleil alors que l'autre est à l'ombre, il va y avoir une migration d'eau en fonction de la température, pouvant entraîner la production de mycotoxines si les champignons se trouvent dans un milieu propice à leur croissance.

b) Précaution pour le matériel

Les conteneurs et véhicules servant au transport des céréales doivent être étanches et ils doivent être vidés, nettoyés et désinsectisés avant chaque récolte (ANCEAU C., 2005).

4. Le nettoyage des grains

Durant ce procédé, les céréales sont passées dans un nettoyeur qui enlève les déchets et débarrasse les grains de leurs glumes et glumelles, parties susceptibles de renfermer des parasites. Ceci permet de réduire de moitié le risque mycotoxique sur le grain fusarié par exemple.

Le nettoyage permet aussi à l'air de mieux passer entre les grains, ce qui améliore la ventilation (ANCEAU C., 2005).

5. La ventilation

La ventilation, lorsqu'elle est efficace, permet d'évacuer la chaleur et l'humidité, de refroidir le grain et de le maintenir à une température suffisamment basse et uniforme dans tout le silo et de changer périodiquement l'air interstitiel des grains (CEROM, 2002). Tout ceci assure une bonne conservation par réduction de l'activité biologique des grains et des micro-organismes. . Cette technique est employée dans de gros silos tours.

La conduite à suivre est la suivante :

- Juste après la moisson, une ventilation nocturne amène les grains à 20°C afin de limiter les invasions d'insectes.
- Le deuxième seuil à atteindre est de 10°C, température en dessous de laquelle ne se développent plus les charançons (insectes les plus résistants au froid).
- Si le grain est conservé jusqu'au printemps, mieux vaut descendre la température sous la barre des 5°C.

Un différentiel d'environ 10°C doit séparer la température du silo de celle de l'extérieur.

Si cet écart est inférieur, le refroidissement sera moins bon alors que s'il est supérieur, il peut y avoir formation de condensation (fig 22). Cette ré-humidification peut alors provoquer un début de germination (CENTRE DE DEVELOPPEMENT DU PORC DU QUEBEC, 2002). Si le refroidissement des céréales ne peut pas être réalisé efficacement, il faut traiter les céréales avec un produit insecticide (ANCEAU C., 2005).

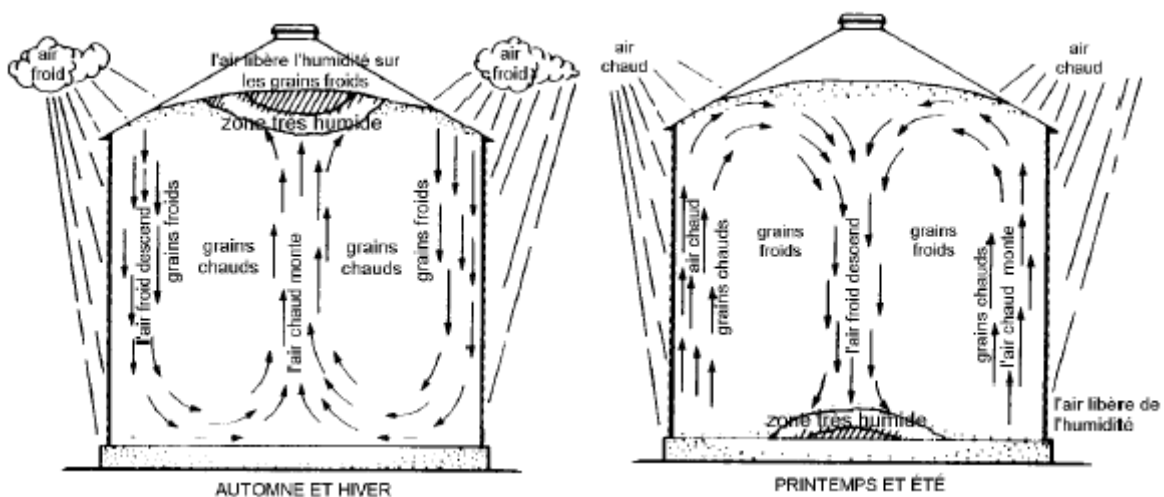


Figure 22 : L'aération des grains et la variation des zones d'humidité en fonction des saisons (OMAFRA, 2008)

NB : La zone très humide n'est pas située au même endroit du silo selon que l'on est en période froide ou en période chaude, ce qui implique de ne pas faire les prélèvements pour analyses mycotoxiques au même endroit selon la saison.

6. L'alimentation des animaux

Il ne faut surtout pas nourrir les animaux avec les poussières et déchets de céréales car ils ont une probabilité élevée d'être hautement contaminés (AFSSA, 2009).

En conclusion, la prévention se résume à de bonnes pratiques agricoles, qui sont à respecter entre la récolte et l'alimentation des animaux (fig 23).

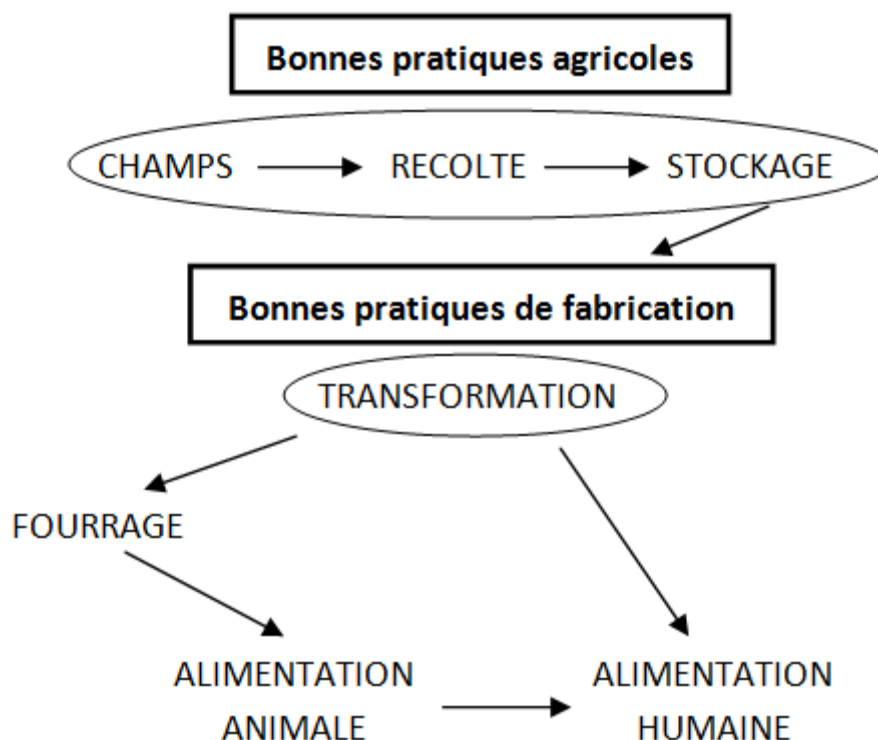


Figure 23 : Etapes clés pour la prévention contre les mycotoxines

B. Diagnostic : suspicion et échantillonnage

1. Contamination fongique d'une ration et suspicion de mycotoxicose (fig. 24)

La seule façon de savoir si la ration est contaminée est de prélever un échantillon représentatif de l'aliment et de mesurer la présence de mycotoxines en laboratoire. On peut aussi rechercher les résidus du produit ou des métabolites dans les tissus et fluides des animaux (viande, urine, lait, ...). Mais l'absence de marqueurs biologiques ne signifie pas toujours non contamination. Quant à la corrélation entre exposition et incidence, elle ne peut être mise en évidence que par des études épidémiologiques (FOURNIER A., 2000).

Pendant le temps nécessaire à la recherche de mycotoxines, il est préférable de suspendre la distribution de l'aliment ou, pour l'ensilage, de réaliser une nouvelle coupe, suffisamment profonde (40 à 50 cm de large) (BAILLY J.D., 2006).

Dans le cas où le laboratoire ne trouve aucune mycotoxine, il convient de rappeler à l'éleveur que le développement fongique peut être hétérogène et limité à quelques zones (BAILLY J.D., 2006).

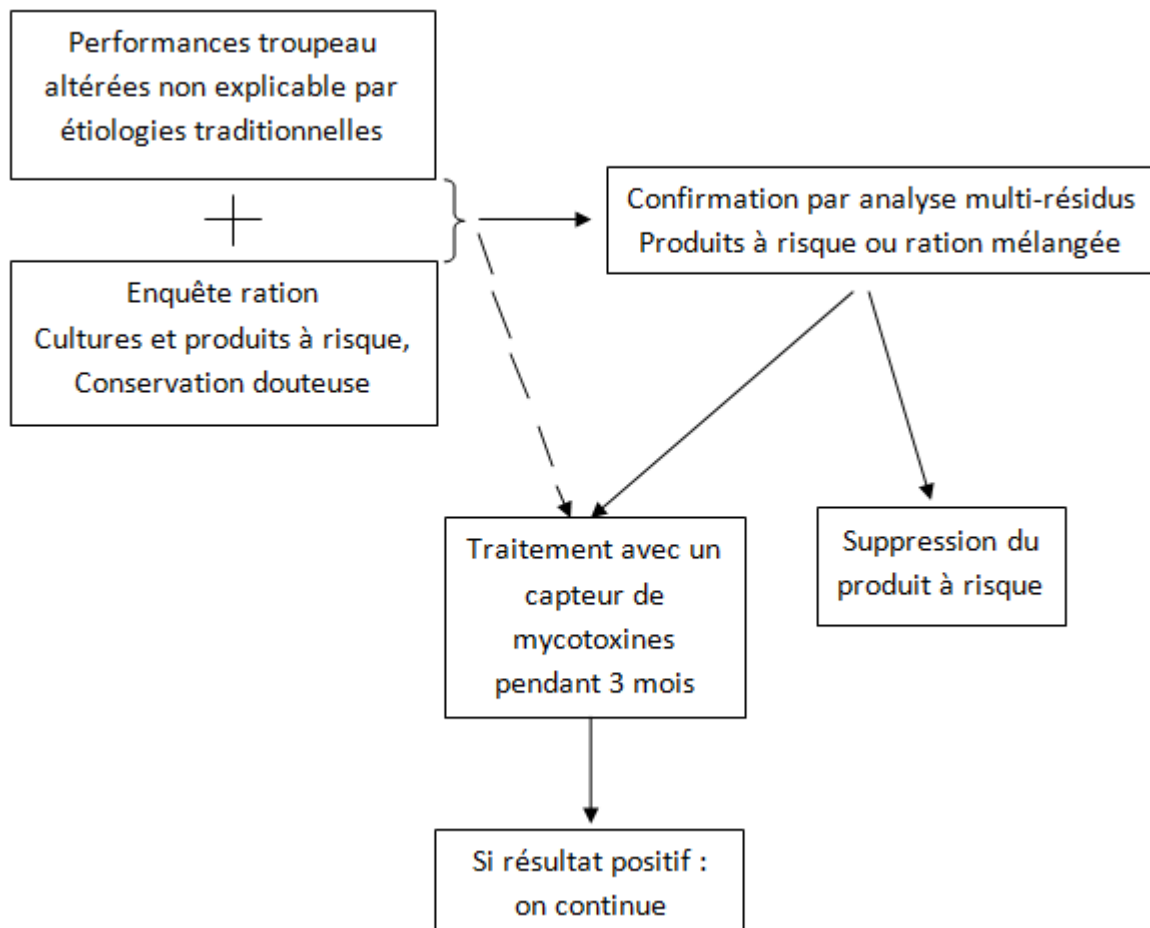


Figure 24 : Conduite à tenir face à une suspicion de mycotoxines dans la ration (ARZUL P., 2010)

Par la suite, l'évolution des signes cliniques est à mettre en parallèle avec l'arrêt de l'aliment suspect. Prenons exemple d'un élevage dans lequel il y avait de nombreux avortements précoces chez des vaches, 30 à 90 jours après insémination. Après analyse de la ration, de la zéaralénone a été retrouvée dans le foin à un taux de 10 ppm. Après retrait de l'aliment incriminé, il n'y a pas eu de nouvel avortement mais les inséminations des vaches ayant avortées furent inefficaces malgré un retour en chaleur à 2-23 jours post-avortement (BAILLY, 2008; KALLELA K., 1984). Cela souligne donc bien l'importance de retirer l'aliment incriminé, même si des répercussions sont possibles sur les animaux, à postériori.

2. Importance et difficulté d'un bon échantillonnage

Attention, près de 90% des erreurs d'analyses associées au dosage des mycotoxines sont attribuées à la façon dont on prélève l'échantillon.

En effet, comme les aliments contaminés ne sont pas répartis uniformément dans le lot, un mauvais échantillonnage peut donner une valeur erronée du taux réel de mycotoxines présentes. L'AFSSA recommande d'établir des plans d'échantillonnage sur la base de protocoles normalisés ou validés permettant d'obtenir un échantillon final aussi

représentatif que possible de la salubrité globale de l'aliment (AFSSA, 2009). Plusieurs organismes et fournisseurs ont donc établi leur propre procédure quant à la méthode à adopter pour prélever un échantillon de façon adéquate (CENTRE DE DEVELOPPEMENT DU PORC DU QUEBEC, 2002).

Il est important de tenir compte du fait que les ensilages de maïs sont assez hétérogènes et que la teneur en mycotoxines est souvent différente au début et à la fin du silo d'où la nécessité de répéter les analyses.

En outre, le diagnostic de mycotoxicose est difficile à établir à cause de la diversité et de la non spécificité des signes cliniques et par le fait que les échantillons ne sont pas toujours représentatifs du lot d'aliment.

Mais tout résultat doit être impérativement confronté à la clinique (production, état d'engraissement,...) : c'est toujours l'animal qui valide l'analyse de l'ensilage (LAUMONNIER, 2006). Une ration dans laquelle aucune moisissure n'est visible peut tout de même être contaminée par des mycotoxines. Des études réalisées au Québec rapportent que 25 % des ensilages visuellement parfaits contiennent de faibles quantités de mycotoxines (CINQ-MARS, 2004).

Les laboratoires n'identifient généralement que quelques toxines.

En effet, il est possible d'utiliser la vomitoxine comme indicateur de la présence du *Fusarium* et de la possibilité qu'il y ait d'autres mycotoxines dont la nocivité est plus élevée. Ainsi, lorsque l'on détecte sa présence dans un aliment, il faut effectuer de nouveaux tests pour vérifier la présence d'autres toxines comme la zéaralénone ou la toxine T-2 (FOURNIER, 2006). Les grains seront alors déclassés.

Il est important de faire analyser la récolte en cas de doute, surtout quand les conditions climatiques ont été propices à l'apparition de champignons (LEFEBVRE D., 2003).

3. Exemples pratiques d'analyses de ration

a) Analyse de grains

Il faut prendre un échantillon d'environ 2kg, représentatif de chaque unité d'entreposage ou de chargement du grain (aliment moisi, aliment distribué au moment de l'apparition des troubles,...) (ARZUL P., 2010).

Le dosage des mycotoxines dans les denrées doit mettre en jeu des méthodes analytiques sur la base de modes opératoires normalisés ou validés. Il doit être réalisé au sein de laboratoires placés au moins sous assurance qualité ou, au mieux, accrédités (AFSSA, 2009).

Les résultats seront obtenus en 15-20 jours.

b) Le prélèvement au front d'attaque du silo

Cela est réalisé lorsque la hauteur du front d'attaque est au moins égale au $\frac{1}{4}$ de la hauteur maximale du silo.

On bêche alors le front d'attaque et on prend une poignée d'ensilage au front. Les prélèvements devant être répétés une dizaine de fois (fig 25).

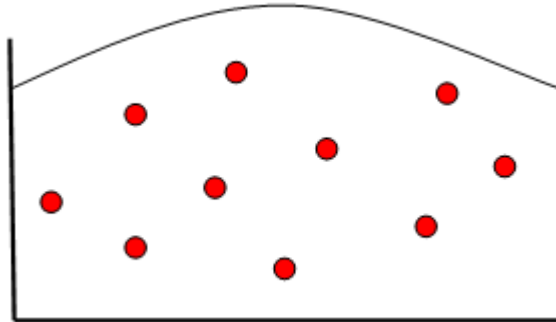


Figure 25 : Points de prélèvements de l'ensilage sur le front d'attaque du silo (LAUMONNIER, 2006)

Les échantillons ne seront représentatifs que si l'ensilage est homogène (LAUMONNIER, 2006).

C. Gestion des animaux lors de mycotoxicose

Lorsque l'on a à faire à un(des) animal(aux) suspect(s) de mycotoxicose, il faut suivre la démarche suivante :

- Observer les symptômes et envisager toutes les autres causes possibles.
- Analyser les aliments en recherchant les mycotoxines les plus répandues (DON, ZEN, toxine T-2 et fumonisines).
- Si les concentrations en mycotoxines sont trop élevées, il est préférable de retirer l'aliment contaminé, mais cela n'est pas toujours possible. Ainsi, si l'éleveur ne peut/veut pas totalement vider son silo, il faut respecter quelques règles de base :
 - Eviter de les donner aux sujets les plus sensibles (vaches en période de transition (pré et post-partum), fortes productrices et sujets de remplacement de moins de six mois)
 - Mélanger l'aliment contaminé avec de l'aliment sain.

Si cette mesure s'avère insuffisante ou difficile à mettre en pratique (aliment contaminé conservé sous forme humide par exemple), l'utilisation de certains additifs alimentaires peut être envisagée. Mais attention, il n'existe actuellement aucun additif homologué avec une allégation d'atténuation des effets liés à la contamination par les mycotoxines (cf. D.) (LEFEBVRE D., 2003).

- Réduire le stress.

- Utiliser des additifs tampons afin de maintenir un pH normal dans le rumen et de prévenir l'acidose (chez les vaches laitières hautes productrices).
- Élever la teneur des aliments en protéines et en énergie tout en maintenant une quantité optimale de fibres alimentaires.
- Accroître la proportion d'éléments nutritifs antioxydants, tels que la vitamine E et le sélénium (WHITLOW, 2001).

Les mycotoxicoses entraînent de lourdes pertes économiques car c'est tout le lot de bovins nourrit avec la ration contaminée qui est touché. La meilleure des conduites reste donc la prévention.

D. Traitements des aliments lors de contamination mycotoxique

1. Les différentes méthodes

a) Les méthodes physiques

- * Tri et élimination des grains contaminés
- * Lavage à l'eau ou avec du carbonate de sodium (pour *Fusarium* sp. dans le maïs)
- * Inactivation thermique à haute température
- * Irradiation par UV, rayons X ou micro-ondes
- * Extraction des aflatoxines par des solvants
- * Ajout à la ration d'adsorbants capables de fixer les mycotoxines. Cela permet de réduire leur biodisponibilité dans l'organisme animal et de limiter les risques liés à la présence de résidus dans les produits animaux destinés à la consommation humaine.

-Argiles (aluminosilicates) : aluminosilicate de sodium et calcium hydratés (HSCAS) et phyllosilicate pour l'AFB1, bentonite pour l'AFB1 et la toxine T-2, montmorillonite et kaolin pour l'AFB1, zéolite pour l'AFB1 et la ZEN,...

-Charbon actif

Inconvénients : il capte aussi les minéraux et est actif principalement sur les aflatoxines

-Résines : cholestyramine et polyvinyl-poly pyrrolidone (PVPP), capables de fixer l'OTA et l'AFB1.

Inconvénients : ces ligands inorganiques peuvent réduire la biodisponibilité de certains minéraux ou vitamines de la ration (YIANNIKOURIS A., 2002).

En 2011, Takagi et al. ont étudié l'excrétion de zéaralénone dans des urines de vaches nourries avec de l'aliment naturellement contaminé et supplémenté ou non avec un adsorbant de mycotoxines.

Les animaux ont reçu de l'adsorbant pendant deux semaines, puis trois semaines sans, puis à nouveau deux semaines avec et finalement six semaines sans (fig 26).

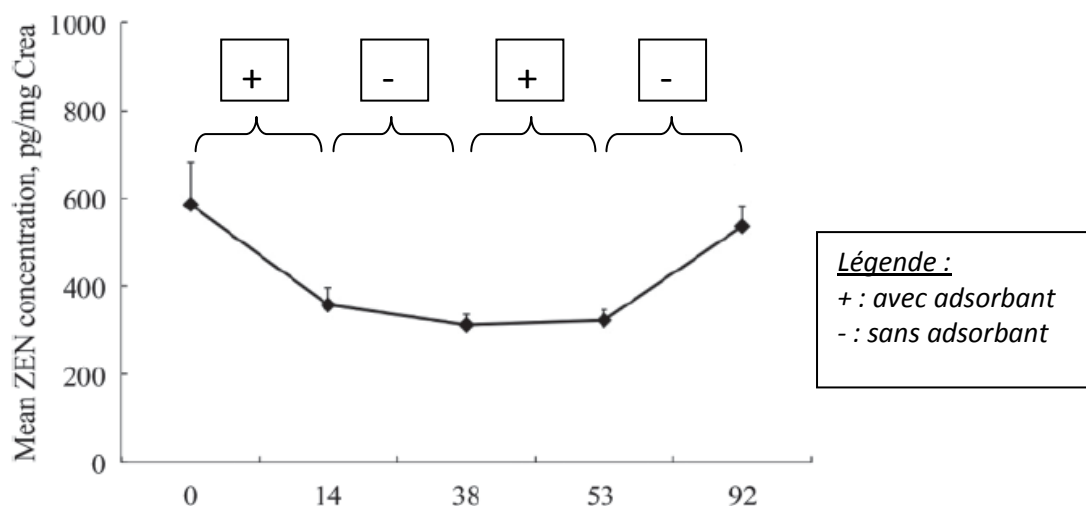


Figure 26 : Excrétion urinaire de zéaralénone en présence ou non d'adsorbant (TAKAGI M., 2011)

On remarque donc que l'ajout d'adsorbant à la ration permet une diminution significative de la présence de zéaralénone dans l'aliment puisqu'on en retrouve moins dans les urines. L'arrêt de cet additif pendant trois semaines n'entraîne pas une remontée significative du taux de zéaralénone urinaire alors que lorsque l'adsorbant est arrêté pendant six semaines, les taux d'excrétion urinaire de zéaralénone obtenus sont proches de ceux du début de l'expérimentation (TAKAGI M., 2011).

Ainsi, on remarque que l'ajout d'adsorbant est efficace mais qu'il ne permet pas d'éliminer totalement les mycotoxines présentes dans un aliment.

Prenons l'exemple d'un produit mis sur le marché par le laboratoire « Olmix » en juin 2012. Il s'agit d'une semoulette (MMi.S) capable de capter les principales familles de mycotoxines rencontrées dans l'aliment des vaches laitières (Ochratoxines, Fumonisines, Trichotécènes, Zéaralénone et Aflatoxines) (fig 27).

Cette présentation permet une bonne homogénéité dans la mélangeuse. Le MMi.S contient de la montmorillonite processée, de la terre de diatomée, des parois de levures, des extraits d'algues et de la mélasse de canne à sucre.

Il faut 35g/vache/j pendant 6 mois, ce qui revient à un coût de 0,19€/vache/j.

Figure 27 : Semoulette MMi.S



b) Les méthodes chimiques

Elles permettent la dégradation ou la biotransformation des mycotoxines et plus particulièrement des aflatoxines. Il en existe différentes sortes :

- * Acides
- * Bases (ammoniaque, soude)
- * Agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, ozone)
- * Agents réducteurs (bisulfites)
- * Agents chlorés
- * Formaldéhyde

c) Les méthodes microbiologiques

Certaines souches de bactéries lactiques, de propionibactéries et de bifidobactéries possèdent des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines. Par exemple, *Flavobacterium aurantiacum* peut fixer l'AFB1 et la rendre inactive.

De plus, des glucomannanes issus de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines (tab XII). Par exemple, 500 g de glucomannanes a la même capacité d'adsorption que 8 kg d'argile et permet de réduire de 58 % les concentrations d'AFB1 dans le lait de vache recevant des aliments contaminés par l'aflatoxine lorsqu'il est utilisé à un taux d'inclusion de 0,05 % de la matière sèche de la ration (YIANNIKOURIS A., 2002).

Tableau XII : Capacité des glucomannanes à lier les mycotoxines (YIANNIKOURIS A., 2002)

Mycotoxines	Pourcentage de mycotoxine liée
Aflatoxines	95,0
Fumonisines	67,0
Zéaralénone	77,0
Toxine T-2	33,4
DAS	12,7
DON	12,6
Ochratoxine A	12,5

Enfin, des souches d'*Aspergillus flavus* et d'*A. parasiticus* non aflatoxinogènes ont même été isolées en vue d'une biocompétition (même niche écologique), mais leur utilisation reste expérimentale.

Il est possible d'utiliser aussi certaines enzymes (estérase, époxidase) ou des biopolymères (YIANNIKOURIS A., 2002; ARZUL P., 2010).

Malgré un nombre important de méthodes disponibles, l'évaluation du risque mycotoxique demeure délicate et la contamination fongique est difficilement contrôlable, d'autant plus qu'elle peut être multiple (AFSSA, 2009).

De plus, il n'existe pas de produits qui captent toutes les mycotoxines : il faut donc associer plusieurs agents (par exemple, argile + paroi de levures + enzymes). Et les ligands absorbent parfois, en plus des mycotoxines, des minéraux ou des vitamines.

Aucun d'entre eux pour le moment n'est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour la prévention ou le traitement des mycotoxicoses mais les recherches sont encourageantes. C'est le cas de l'argile « Navasil » qui pourrait prévenir efficacement l'aflatoxicose sans intervenir avec la disponibilité des vitamines et autres micronutriments (FANGEAT, 2008).

2. Le coût de la décontamination

Les additifs présentés ci-dessus sont utilisés à raison de 25 à 50g/vache/jour avec 6 à 10€/kg de produit, ce qui équivaut en moyenne à 0,3€/vache/jour.

Les délais pour une amélioration significative de l'état sanitaire sont de :

- 2 semaines pour résoudre les problèmes d'ingestion, de digestion et de production
- 3 mois pour retrouver un taux faible de cellules somatiques et guérir les mammites
- 6 mois pour les problèmes de reproduction

Ces coûts sont loin d'être négligeables pour les éleveurs qui ont donc intérêt à tout mettre en œuvre pour que les moisissures ne se développent pas (ARZUL P., 2010).

Remarque : Afin d'aider les agriculteurs, Arvalis a financé « le guide interprofessionnel de gestion des mycotoxines ». Cet outil a été établi en 2009 par les membres d'Intercéréales et contient la réglementation explicite, des règles pour faciliter la gestion des mycotoxines, ainsi que des fiches d'information.

Ainsi, la mise en évidence des mycotoxicoses n'est pas simple mais il faut y penser, surtout lorsque plusieurs animaux présentent le même tableau clinique. La confirmation passera obligatoirement par une analyse de laboratoire, d'où l'importance de réaliser un bon échantillonnage. Mais la meilleure chose à faire reste encore la prévention.

Intéressons nous à une mycotoxine en particulier, la zéaralénone, qui est encore mal connue chez les bovins et pour laquelle les données sur les seuils toxiques sont contradictoires.

III. Focus sur la zéaralénone

La zéaralénone était auparavant appelée toxine F-2. Elle est synthétisée par un grand nombre de champignons de la famille des Fusarium dont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. semitectum*.

La production de cette toxine peut débuter avant la récolte ou après, si les conditions de stockage et de triage ne sont pas optimales (ZINEDINE A., 2007).

Elle appartient au groupe des œstrogènes exogènes, tout comme les polluants industriels (dioxine, Bisphénol-A,...) et les phytoestrogènes (les flavonoïdes dans le soja, le coumestrol dans la luzerne,...).

Les effets seront différents si l'animal atteint est un fœtus, un embryon, un nouveau-né, un jeune ou un adulte (SHIER, 1998).

Selon l'AFSSA, la présence de la zéaralénone et de ses métabolites, notamment l' α -zéaralénol, dans les produits animaux, devrait faire l'objet d'études complémentaires afin d'évaluer la réalité du transfert dans les denrées d'origine animale (AFSSA, 2009).

A. Généralités

1. Propriétés physiques et chimiques

La zéaralénone pure se présente sous forme de cristaux blancs. Son poids moléculaire est de 318 g/mol et son point de fusion est de l'ordre de 164-165°C.

Ce composé absorbe la lumière ultraviolette (UV), les longueurs d'onde des maxima d'absorption étant les suivants : 236 nm, 274 nm et 316 nm.

La zéaralénone est également fluorescente. Elle apparaît d'une couleur bleu-vert lorsqu'elle est excitée par des longueurs d'onde élevées (360 nm), et d'un vert plus intense avec des longueurs d'onde plus faibles (260 nm). Le maximum de fluorescence dans l'alcool éthylique est observé pour une longueur d'onde d'environ 314 nm, avec une émission à 450 nm. Cette propriété est utilisée en chromatographie pour le dosage de la zéaralénone et de ses dérivés.

La zéaralénone présente une solubilité maximale dans les alcools et les solvants de polarité intermédiaire (dichlorométhane, acétone) (GAUMY J.L., 2001)(b).

C'est une lactone de l'acide 6-(10-hydroxy-6-oxotrans-1-undecenyl)-b-résorcyclique. Sa structure comporte un groupe hydroxyl phénolique (DUQUESNOY, 2005), tout comme le 17 β -œstradiol (fig 28). Ainsi, elle peut se lier aux récepteurs à œstrogènes présents dans les cellules et est classée dans le groupe des perturbateurs endocriniens (DE ANDRES F., 2008).

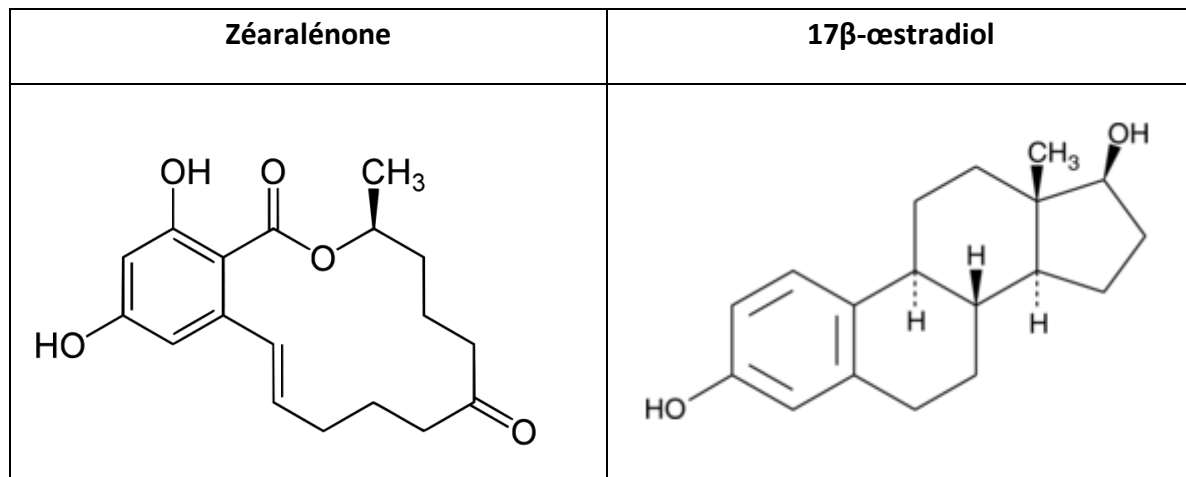


Figure 28 : Comparaison des formules chimiques de la zéaralénone et du 17 β -œstradiol

La fixation de la zéaralénone ou de ses métabolites est tout de même moins efficace que celle de la molécule endogène.

En effet, après administration orale, la potentialité oestrogénique de la zéaralénone et de ses métabolites, comparée à celle du 17 β -œstradiol est : 17 β -œstradiol > α -zéaralénol (10 fois moins efficace) > zéranol (150 fois moins efficace) > β -zéaralanol (350 fois moins efficace) > zéaralanone (400 fois moins efficace) > zéaralénone (650 fois moins efficace) > β -zéaralénol (3500 fois moins efficace) (GAUMY J.L., 2001)(b).

2. Métabolisme de la zéaralénone

a) Le mécanisme d'action

La zéaralénone est rapidement absorbée et éliminée. Elle est métabolisée par le foie, ainsi que par la muqueuse intestinale, et est excrétée dans l'urine et dans les fèces. Elle est très peu stockée dans les tissus.

En 2000, le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) a montré que, dans le sang, la zéaralénone et le zéaralanol se lient aux globulines spécifiques des hormones sexuelles humaines.

Cette mycotoxine se lie aux récepteurs cytosoliques oestrogéniques au niveau de l'utérus, du foie, des glandes mammaires et de l'hypothalamus (fig 29).

Mais l'affinité de la mycotoxine pour les récepteurs oestrogéniques ne représente que 5% de celle des œstrogènes endogènes (STEIBLEN, 1996).

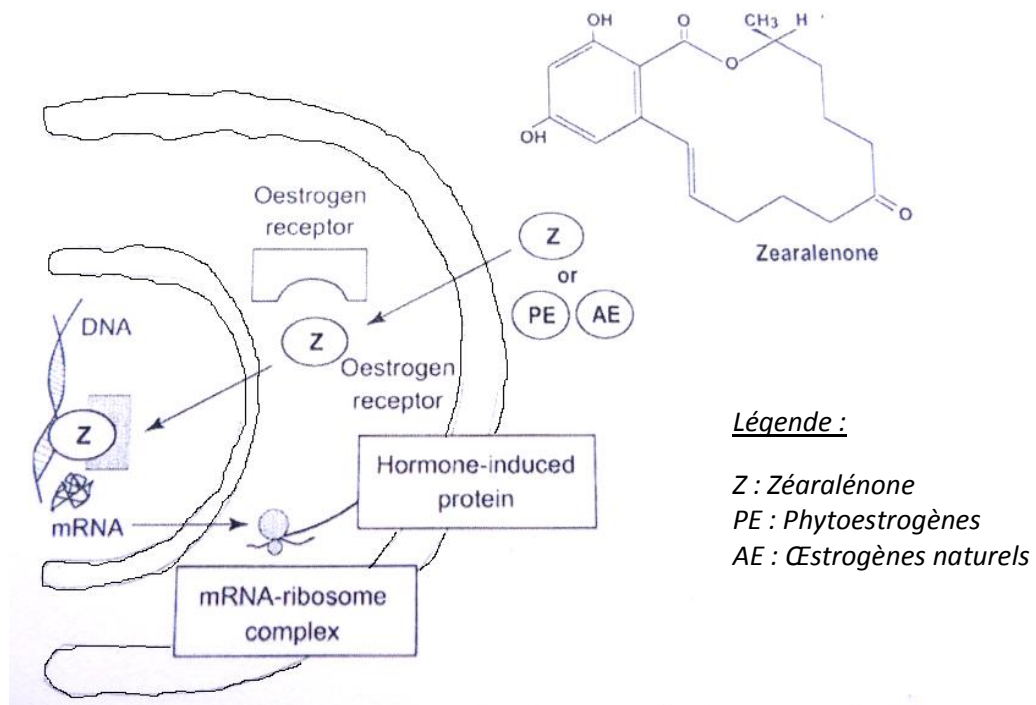


Figure 29 : Mécanisme d'action de la zéaralénone (DIAZ, 2005)

La zéaralénone, tout comme les phytoestrogènes et les œstrogènes naturels, traverse passivement la membrane cellulaire et vient se fixer sur les récepteurs à œstrogène (ER α et ER β). Puis ce complexe est transféré dans le noyau et active la production d'ARNm codant pour des protéines exprimées en temps normal par le complexe récepteur/œstrogène (DIAZ, 2005). Elle perturbe donc le métabolisme des stéroïdes (KIESSLING K-H., 1984).

La zéaralénone est un antagoniste complet des ER α et un agoniste-antagoniste mixte des ER β . Ces deux types de récepteurs sont présents en grande quantité dans l'utérus, le foie, le rumen et le jéjunum.

Lors d'ingestion de zéaralénone, on note des modifications histologiques (cf. 3.b.) ainsi qu'une très forte augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour ER α dans le foie et dans l'utérus. Il n'y a aucune modification dans le rumen et dans le jéjunum.

Ainsi, il semble y avoir une relation étroite entre l'expression de l'ER α et les modifications histologiques.

Au contraire, lors de la présence de zéaralénone, l'expression de l'ER β est augmentée dans le jéjunum, mais sans modification histologique, ce qui laisse penser que l'ER β n'a aucune conséquence à ce niveau (DONG M., 2010)(a).

b) La zéaralénone et ses métabolites

La zéaralénone est rapidement absorbée après administration par voie orale (cf. III.D.). Elle va ensuite être métabolisée, dans le rumen principalement, puis dans le foie par les microsomes hépatiques.

Dès l'ingestion, la zéaralénone est majoritairement transformée, à plus de 90 %, par les micro-organismes du rumen, en α -zéaralénol, dont la toxicité est beaucoup plus forte que celle de la toxine mère (entre 3 à 100 fois selon les méthodes utilisées pour déterminer l'activité (DONG M., 2010)(b)) et en β -zéaralénol, dont l'affinité pour les récepteurs oestrogéniques est moindre, mais qui présente un fort effet inhibiteur sur la prolifération des cellules endométriales. Les concentrations en α -zéaralénol obtenues sont deux fois plus importantes que celles en β -zéaralénol (KLEINOVA M., 2002).

Ainsi, la bioconversion de la zéaralénone en α -zéaralénol est une réaction de bio activation alors que celle de la zéaralénone en β -zéaralénol est considérée comme une inactivation (MALEKINEJAD M., 2006).

Une partie de la zéaralénone non métabolisée dans le rumen, est ensuite absorbée et biotransformée dans les cellules rénales, hépatiques et les entérocytes, selon deux phases :

- Hydroxylation :

La zéaralénone est catalysée par les 3α - et 3β - hydroxyl stéroïde déshydrogénases (HSD), ce qui entraîne la réduction du groupement cétone en C_6 , et conduit à la formation d' α et/ou de β -zéaralénol (GAUMY J.L., 2001)(b). La 3α -HSD agit comme une oxydoréductase et est naturellement présente dans le foie, le cerveau, la prostate, le rein, le poumon et les gonades. La 3β -HSD agit comme une déshydrogénase et une isomérase et s'exprime principalement dans la prostate, le placenta, les glandes mammaires et l'endomètre. La production des deux métabolites principaux, l' α et le β -zéaralénol, est deux fois plus importante dans les microsomes que dans la membrane mitochondriale, ce qui montre que les enzymes sont principalement présentes dans les microsomes (HASSAN M., 2010; PFEIFFER E., 2007).

- Conjugaison :

Elle se fait par glucuronidation des molécules formées durant la première phase, catalysées par les uridine diphosphate glucuronyl transférases (UDPGT).

La conjugaison de l' α -zéaralénol avec l'acide glucuronique est meilleure que celle avec le β -zéaralénol ou la zéaralénone, et à de plus faibles concentrations, ce qui explique la présence prolongée de ce métabolite dans l'organisme via son intégration au cycle entéro-hépatique (HASSAN M., 2010).

La gluco-conjugaison effectuée par le foie, à l'origine de l'excrétion urinaire des mycotoxines, évite en partie l'excrétion par la voie lactée des toxines fongiques. Mais la présence simultanée de plusieurs toxines, souvent observée dans la nature, peut modifier le métabolisme de chacune d'elles et altérer leur mode d'excrétion (YIANNIKOURIS A., 2002).

Ainsi, chez les ruminants, la zéaralénone peut être transformée en α et β -zéaralénol par le rumen, principalement, mais aussi par le foie pour une petite partie. Lors de l'incorporation de la zéaralénone et de ses métabolites dans les cellules hépatiques, la glucuronidation concerne 65% de la zéaralénone, 47% de l' α -zéaralénol et 30% du β -zéaralénol (KLEINOVA M., 2002).

La zéaralénone possède de nombreux métabolites (α -zéaralénol, β -zéaralénol, α -zéaralanol ou zéranol, β -zéaralanol ou taléranol, zéaralanone, ...) mais les principaux sont l' α -zéaralénol et le β -zéaralénol (fig 30). En effet, même si l'on détecte la présence d' α et de β -zéaralanol sous forme libre et sous forme glucuronoconjuguée dans l'urine, cette biotransformation reste marginale par rapport à la réduction en zéaralénol (KLEINOVA M., 2002).

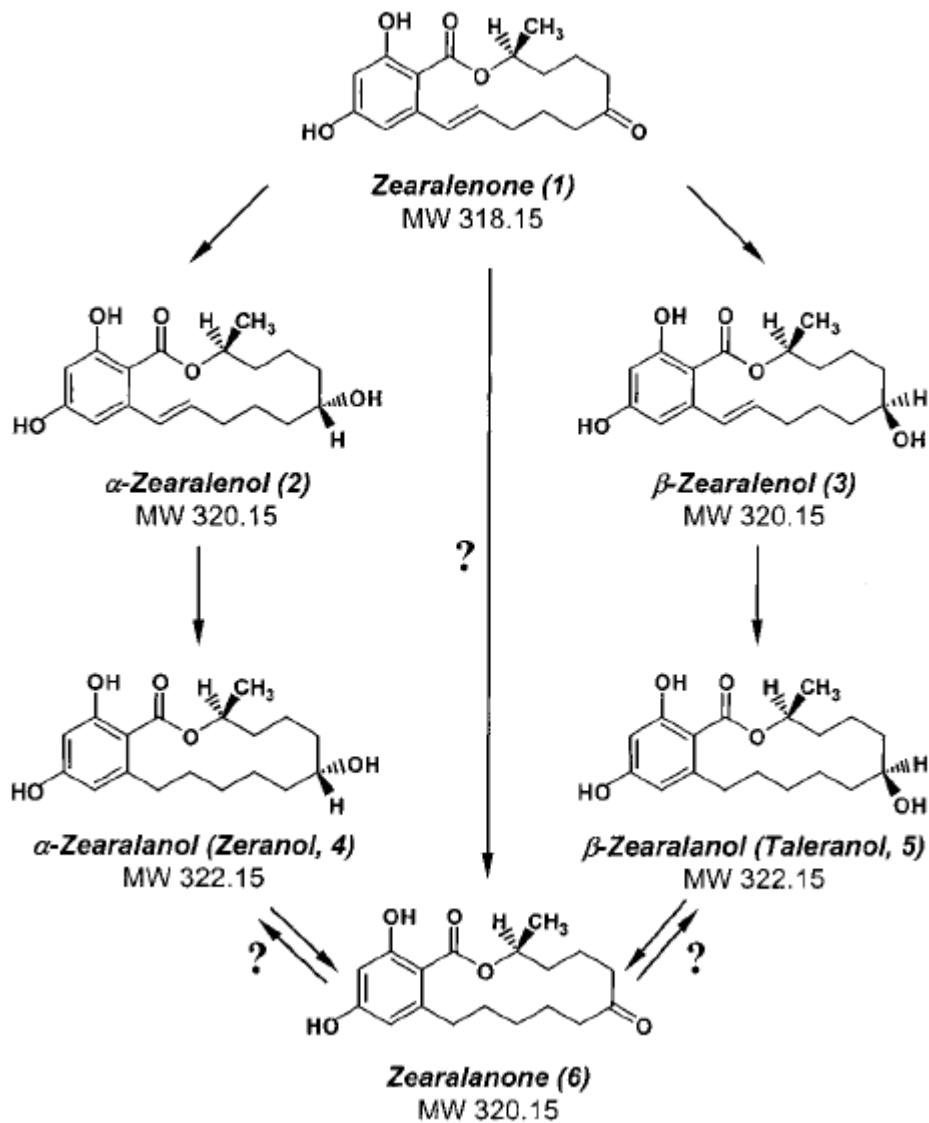


Figure 30 : La zéaralénone et ses métabolites (KLEINOVA M., 2002)

NB : La zéaralénone est synthétisée actuellement à grande échelle pour servir d'intermédiaire dans la production de l' α -zéaralanol ou zéranol (Ralgro®), utilisé en implant auriculaire pour les jeunes agneaux et les veaux allaitants comme agent anabolisant. L'utilisation de ce produit a été interdite au sein de l'Union Européenne en 1989, mais il reste autorisé en Amérique du Nord et en Nouvelle-Zélande.

Remarque : Le zéranol est formé par hydrogénation de l' α -zéaralénol et se retrouve dans la bile après une administration orale de zéaralénone. La concentration en α -zéaralénol est toujours 5 fois supérieure à celle en zéranol, ce qui permet de faire la distinction en des animaux qui auraient ingéré de la zéaralénone et ceux qui auraient reçu des hormones de croissance (KLEINOVA M., 2002).

c) Les voies d'élimination de la zéaralénone

(1) *Généralités sur la métabolisation des xénobiotiques*

Les xénobiotiques, dont font partie les mycotoxines et donc à fortiori la zéaralénone, sont des substances possédant des propriétés toxiques, même à très faible concentration.

L'absorption et l'excrétion des xénobiotiques impliquent différents organes, en particulier le foie et le rein (JARD, 2009).

Dans l'organisme, ces molécules subissent une étape de métabolisation avant d'être excrétées par les voies urinaires et fécales. En effet, toute substance étrangère à l'organisme s'élimine progressivement grâce à l'intervention de systèmes multienzymatiques conduisant à la formation de métabolites plus hydrophiles, facilitant ainsi leur excrétion par les urines et/ou la bile (fig 31) (STEIBLEN, 1996).

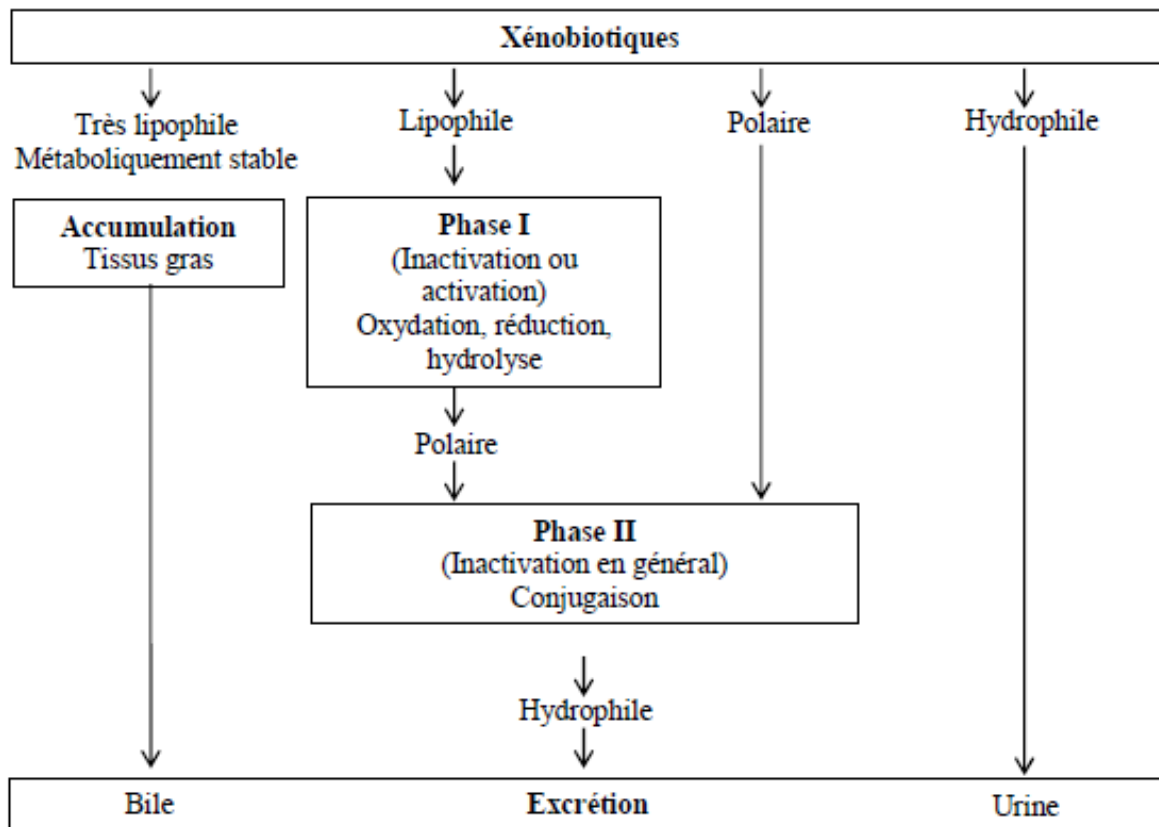


Figure 31 : Voie générale de métabolisation et d'excrétion des xénobiotiques (JARD, 2009)

(2) Excrétion urinaire, biliaire et fécale de la zéaralénone

L'excrétion de la zéaralénone et de ses métabolites se fait par voie urinaire, biliaire et fécale, selon des proportions différentes (tab XIII).

Tableau XIII : Métabolisme comparé de la zéaralénone : distribution des métabolites dans l'urine et les matières fécales (GAUMY J.L., 2001)(b)

Espèce animale	Urine *			Matières fécales *		
	Zéaralénone	α -zéaralénol	β -zéaralénol	Zéaralénone	α -zéaralénol	β -zéaralénol
Bovin	29	20	51	25	12	58
Porc	63	32	5	91	9	ND
Rat	93	4	3	97	ND	3

* : en % de la quantité excrétée

En règle général, après administration orale, l'excrétion urinaire est plus efficace pour les mycotoxines hautement absorbées et métabolisées, telles que la zéaralénone, alors que l'excrétion fécale résulte d'un manque d'absorption par le tractus gastro-intestinal ou d'une grande efficacité d'élimination des toxines ou de leurs métabolites par le système biliaire (YIANNIKOURIS A., 2002).

Mais la voie biliaire ne doit pas être négligée pour la zéaralénone. Lors d'une étude en Allemagne en 2002, 97 échantillons de bile de bovins sur 108 testés contenaient de la zéaralénone ou l'un de ses dérivés (MEYER K., 2002).

Chez les ruminants, on détecte 68% de β -zéaralénol, 24% d' α -zéaralénol et 8% de zéaralénone dans la bile.

En effet, le cycle entéro-hépatique et l'excrétion biliaire jouent un rôle important dans l'élimination de cette toxine. La zéaralénone, après glucuronidation, est en grande partie excrétée par la bile puis réabsorbée et métabolisée par les cellules de la muqueuse intestinale avant d'entrer dans le foie via la veine porte (ZINEDINE A., 2007).

Remarque : Les taux de zéaralénone et de ses métabolites relevés dans le foie et dans la bile augmentent avec les doses ingérées.

(3) Excrétion dans le lait

La zéaralénone et ses métabolites sont également éliminés par voie lactée.

Le maximum d'excrétion est situé entre 2 et 3 jours après ingestion (PRELUSKY D.B., 1990) et les résidus sont proportionnels à la quantité de mycotoxine administrée. Mais les taux de transfert dans le lait sont très inférieurs à 1%.

En effet, lors d'une étude, des vaches ont reçu des doses de 1,6 et 8g de zéaralénone et seulement 0,008% et 0,016% respectivement ont été retrouvés dans le lait (DIAZ, 2005).

Des expériences semblables menées en 2002 ont-elles aussi montré que la zéaralénone et ses métabolites sont très peu excrétés dans le lait (tab XIV).

Tableau XIV : Résidus de mycotoxines dans le lait de vache recevant des aliments contaminés ou des doses orales de toxines (YIANNIKOURIS A., 2002)

Les doses sont exprimées en mg/kg de masse corporelle, en concentration (ppm) dans le régime alimentaire, en mg ou g pour les doses orales journalières.

Mycotoxine	Dose	Durée de l'exposition (j)	Formes excrétées dans le lait	Concentration dans le lait (ppb)
ZEN	25 ppm	7	ZEN α -zéaralénol β -zéaralénol	481 508 370
ZEN	40 ppm	21	ZEN α -zéaralénol	2,5 3,0
ZEN	1,8 g et 6g	1	ZEN α -zéaralénol β -zéaralénol	4,0 et 6,1 1,5 et 4,0 4,1 et 6,6

De plus, une administration unique d'une grande quantité de zéaralénone (250 ppm dans l'aliment) apporte huit fois moins de métabolites dans le lait qu'une administration prolongée (7 jours) d'une quantité dix fois moindre de zéaralénone (GAUMY J.L., 2001)(b).

Il n'y a donc pas de risque réel en santé humaine lors d'ingestion de produits laitiers mais il faut tout de même bien garder en mémoire que ce passage par voie lactée n'est pas anodin pour le jeune puisqu'il est plus sensible aux mycotoxicoses que l'adulte.

3. Conséquences sur l'organisme d'une consommation chronique de zéaralénone

a) Signes cliniques

La zéaralénone possède une toxicité aigüe relativement faible. Par exemple, une étude a montré que la LD 50 orale était supérieure à 2-20 g/kg poids corporel chez les rats, souris et cochon d'inde (DE ANDRES F., 2008).

Ici, nous présenterons uniquement la toxicité chronique de cette molécule qui est la seule pouvant être rencontrée dans le cadre de mycotoxicose naturelle.

La zéaralénone est une mycotoxine oestrogénique non stéroïdienne responsable d'une hypersécrétion d'oestrogènes causant de nombreux problèmes de reproduction chez différentes espèces animales.

En effet, elle entraîne une infertilité, un hyperoestrogénisme (vulve tuméfiée pouvant aller jusqu'au prolapsus, œdème du vagin pouvant dégénérer en vulvo-vaginite, développement précoce des glandes mammaires, sécrétions vaginales, diminution de la production de lait), la féminisation des jeunes mâles par diminution de la production de testostérone, une

atrophie testiculaire, de la morbinatalité ainsi que des avortements (FANGEAT, 2008; LYNCH, 2005).

Yang et al. ont montré que, chez des souris, la zéaralénone et l' α -zéaralénol interfèrent avec le processus de spermatogénèse, par diminution de la synthèse et de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (YANG J., 2007).

Cette mycotoxine réduit le taux de survie embryonnaire et le poids fœtal (ZINEDINE A., 2007). Chez les bovins, elle entraîne des avortements précoces, principalement entre 30 et 90 jours post-insémination (KALLELA K., 1984).

Mais la zéaralénone a peu d'effets immunosuppresseurs comparée à la toxine T-2 et au DON (DIAZ, 2005).

b) Lésions microscopiques

La zéaralénone et ses métabolites ont été classés par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) dans le groupe 3 (agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme), en tant qu'agent génotoxique et induisant des transformations de l'ADN de cultures de lymphocytes de bovins in vitro.

Elle entraîne diverses lésions microscopiques, sur de nombreux organes. Tout d'abord, il a été observé une dégénérescence des cellules de l'endomètre, une diminution du nombre de corps lutéaux, une atrésie folliculaire conduisant à des cycles œstraux irréguliers ainsi qu'une diminution des quantités de LH et de progestérone sécrétées affectant la morphologie des tissus utérins. Chez les truies, des doses croissantes de zéaralénone augmentent proportionnellement la taille de l'épithélium vaginal (MacDOUGALD O.A., 1990).

De plus, la zéaralénone a des effets hématotoxiques. Elle entraîne une diminution des temps de coagulation ainsi que des modifications de l'hématocrite, de la numération plaquettaire,...

On observe aussi une hépatotoxicité avec augmentation des paramètres hépatiques (aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alcaline phosphatase (ALP), créatinine et bilirubine). Une ingestion prolongée de cette mycotoxine a pour conséquence une augmentation de la taille des hépatocytes ainsi qu'une infiltration lymphocytaire dans le foie, les reins et l'utérus (photo 5) (DONG M., 2010)(a).

Un rapport datant de 2007 montre que la zéaralénone a pour cibles les mitochondries et les lysosomes, et qu'elle induit une peroxydation lipidique, des morts cellulaires et des inhibitions de synthèse de protéines et d'ADN. En effet, la zéaralénone entraîne l'apoptose cellulaire par fragmentation d'ADN ainsi que l'arrêt des cycles cellulaires, caractérisé par une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M. Notons que le fait d'ajouter de la vitamine E lors de la prise de zéaralénone permet de diminuer la fragmentation de l'ADN ainsi que le nombre de corps apoptotiques après 24 heures d'incubation (DIAZ, 2005).

En outre, la zéaralénone entraîne une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques et d'échanges de chromatides ainsi qu'une diminution de l'index mitotique et de la viabilité cellulaire des lymphocytes de bovins (LIOI M.B., 2004).

Des lames d'histologie provenant d'organes prélevés sur des chèvres ayant reçues de la zéaralénone par voie intraveineuse à des doses de 1,2 et 2,4 mg/kg de poids corporel (fig 32) illustrent ces lésions :

- a) Coupe de foie avec gonflement des hépatocytes et infiltration lymphocytaire dans l'espace porte.
- b) Coupe de foie avec infiltration lymphocytaire modérée autour des canaux biliaires.
- c) Coupe de rein avec exsudation séreuse intra-cavitaire dans la capsule de Bowman.
- d) Coupe de rein avec infiltration lymphocytaire focale du bassinnet.
- e) Coupe d'utérus avec infiltration lymphocytaire modérée de la muqueuse.

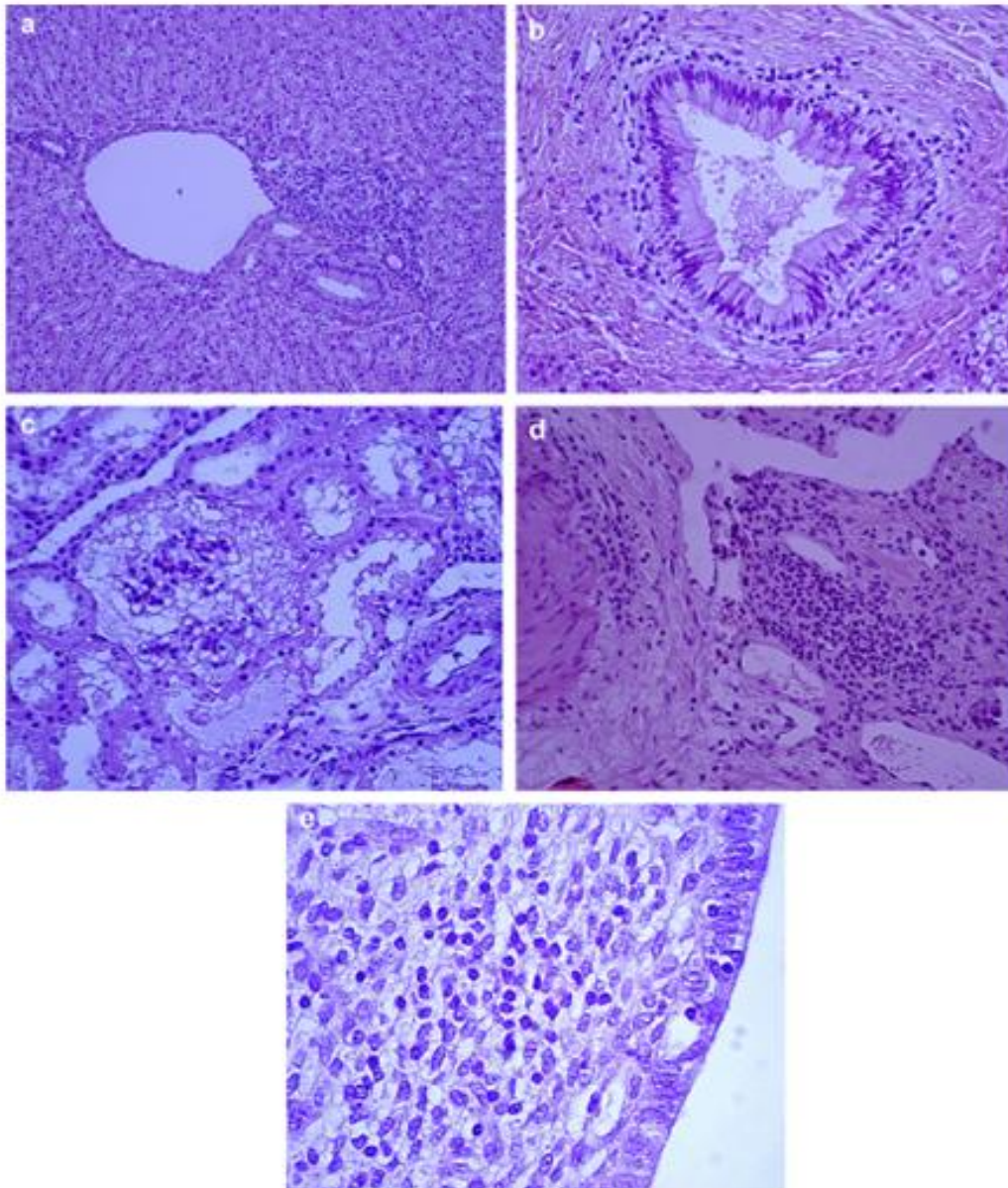


Figure 32 : Coupes histologiques d'organes de chèvres ayant reçues de la zéaralénone par voie intraveineuse (DONG M., 2010)(a)

Remarque : On suspecte actuellement la zéaralénone d'avoir un impact sur la régulation de la thyroïde par liaison aux protéines de transport des hormones thyroïdiennes (JECFA, 2000).

B. Une sensibilité à la zéaralénone différente selon l'espèce considérée

1. Distinction entre les espèces sensibles et peu sensibles

Il existe de grandes différences de sensibilité au pouvoir toxique de la zéaralénone selon les espèces animales (fig 33). De nombreux mécanismes sont en jeu dans cette disparité mais ceci s'expliquerait en partie par la voie principale de transformation hépatique utilisée.

En effet, les espèces produisant principalement de l' α -zéaralénol, dont l'activité oestrogénique est supérieure à celle de la molécule mère, sont plus sensibles à la zéaralénone que celles qui excrètent essentiellement un autre métabolite (MALEKINEJAD M., 2006).

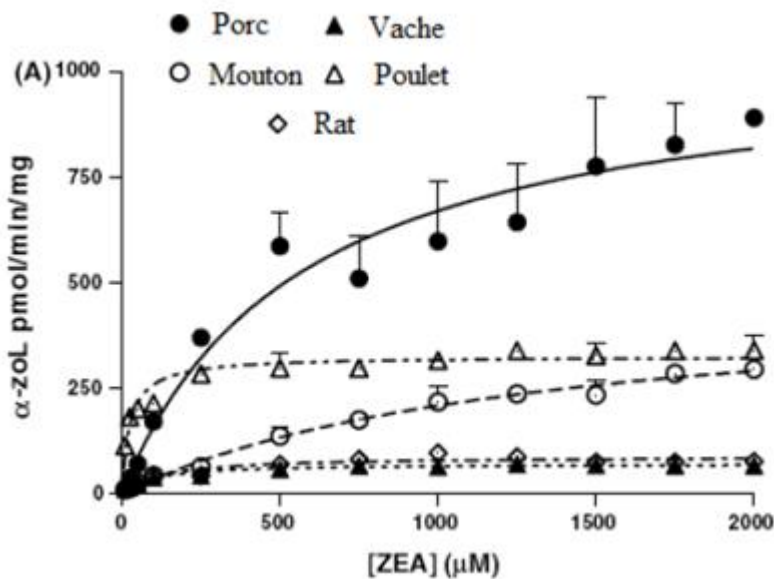


Figure 33 : Biotransformation de la zéaralénone en α -zéaralénol par les microsomes hépatiques de différentes espèces (MALEKINEJAD M., 2006)

Le porc est l'espèce dont les microsomes hépatiques produisent le plus d' α -zéaralénol à partir de la molécule mère.

Ainsi, on définit des espèces sensibles et des espèces peu sensibles à l'action de la zéaralénone. Le porc est l'espèce la plus sensible à cette mycotoxine.

L'affinité de l' α -zéaralénol pour les récepteurs à œstrogènes est la meilleure chez les porcs ; des doses de 1 ppm de zéaralénone suffisent pour induire un syndrome oestrogénique chez les porcs (GAUMY J.L., 2001)(a). De plus, la quantité la plus importante d' α -zéaralénol est produite par les microsomes hépatiques du porc ($V_{\max} = 795.8 \pm 122.7 \text{ pmol/mg/min}$).

Au contraire, les autres espèces sont moins sensibles.

Le risque d'intoxication chez les volailles d'élevage est considéré comme presque nul. C'est dans cette espèce que la quantité la plus importante de β -zéaralénol est produite ($V_{\max} = 1524 \pm 29.7 \text{ pmol/mg/min}$).

Des poules nourries avec 800 mg/kg de poids corporel de zéaralénone ne présentait aucun symptôme mais la mycotoxine a été détectée dans leurs œufs, ce qui prouve l'importance des contrôles réguliers pour la protection du consommateur (DIAZ, 2005). De même, des béliers nourris avec de l'aliment contaminé à 12 mg de zéaralénone pendant huit semaines n'ont pas présenté de modification de l'éjaculat, en terme de quantité, de mobilité et de normalité des spermatozoïdes (MILANO G.D., 1991).

Il faut bien noter que chez les bovins, peu de zéaralénone et de ses métabolites sont incorporés au foie (cf. III.A.2.b.).

De plus, il existe aussi des variations interspécifiques dans le taux de glucuronidation, qui est saturable à faibles concentrations chez les bovins, les moutons, les volailles et les rats mais pas chez les porcs. Ainsi, les différences significatives entre les pourcentages de glucuronidation de la zéaralénone, de l' α -zéaralénol et du β -zéaralénol laissent penser qu'il n'y a pas seulement une différence d'affinité pour le substrat selon l'espèce mais aussi la présence de différentes isoformes d'uridine diphosphate glucuronyl transférase (UDPGTs) (MALEKINEJAD M., 2006).

2. Cas particulier des ruminants ; devenir et bioconversion de la zéaralénone chez les bovins

Ce qui différencie les ruminants, et donc les bovins, des monogastriques est la présence d'une flore ruminale très active dans la dégradation de la zéaralénone (elle est transformée à plus de 90% dans le rumen).

Des tests *in vitro* ont montré que l'essentiel de la dégradation de la zéaralénone a lieu pendant la première heure d'incubation dans le rumen (AFSSA, 2009; FANGEAT, 2008; YIANNIKOURIS A., 2002).

La principale bactérie capable de dégrader la zéaralénone est *Butyrivibrio fibrisolvens*. Mais ce sont surtout les protozoaires qui agissent car, dans le cas de cette mycotoxine, ils sont neuf fois plus efficaces que les bactéries (fig 34) pour la dégrader avant son absorption dans le sang et son passage dans les organes vitaux (GAUMY J.L., 2001)(b).

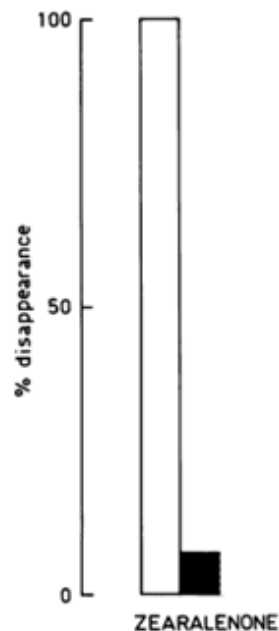


Figure 34 : Pourcentage de dégradation de la zéaralénone par les protozoaires (blanc) et les bactéries (noir) contenus dans le fluide ruminal de bovins, d'après (KIESSLING K-H., 1984).

C'est donc en grande partie grâce à leur flore ruminale que les bovins sont moins sensibles à la zéaralénone que d'autres espèces, comme les porcs par exemple.

En effet, la réduction de la zéaralénone en α et β -zéaralénol par les protozoaires augmente la polarité de la toxine et modifie donc son absorption et son excrétion. En effet, les métabolites étant plus hydrosolubles que la molécule mère, cela diminue leur absorption par le tube digestif et augmente leur excrétion via le cycle entéro-hépatique puis finalement dans l'urine. Ainsi, cela limite les contacts entre les toxines et les tissus des ruminants.

Les enzymes hépatiques (déshydrogénases) sont donc plus disponibles pour le métabolisme des stéroïdes (DIAZ, 2005).

Mais on manque de données chez les ruminants puisqu'aucune étude, à ma connaissance, n'a été faite sur les taux d'absorption au niveau intestinal de la zéaralénone et de ses métabolites dans cette espèce.

Cependant, tout ceci est à nuancer car, dans le cas de la zéaralénone, on ne peut pas parler de détoxification puisqu'elle est transformée principalement, dans le rumen, en α -zéaralénol dont la toxicité est plus forte que la toxine de départ.

Les ruminants ne peuvent donc pas être considérés comme résistants à la zéaralénone, comme en témoignent les signes cliniques qui peuvent être observés lors d'ingestion chronique de rations contaminées.

En effet, la présence de l' α -zéaralénol dans l'organisme est prolongée, par rapport à celle du β -zéaralénol, par conjugaison avec l'acide glucuronique et son intégration au cycle entéro-hépatique (HASSAN M., 2010) (cf III.A.2.b.).

Par ailleurs, les temps d'excrétion de la mycotoxine et de ses métabolites sont plus long chez les ruminants que chez les monogastriques ; les organes cibles sont donc exposés plus longtemps, même si l'absorption par le tractus digestif est moindre pour l' α et le β -

zéaralénol (DONG M., 2010)(a). Et plus la quantité initiale en zéaralénone est importante, plus la dégradation est longue.

Plusieurs facteurs peuvent augmenter la sensibilité des bovins à la zéaralénone (HILDEBRAND B., 2012).

Tout d'abord, le fonctionnement du rumen peut être perturbé par un déséquilibre de la flore ruminale. En effet, on sait que les micro-organismes du rumen (protozoaires, bactéries) sont sensibles aux variations physico-chimiques du contenu ruminal et notamment au pH (WHITLOW L.W., 2005). Dans ce cas, une plus grande quantité de zéaralénone sera absorbée par le tractus digestif et entrera dans la circulation générale, entraînant plus de perturbations endocriniennes que chez un bovin sain.

De plus, le rumen est moins efficace pour un niveau d'ingestion élevé, pour une vitesse d'ingestion élevée ou lors de transit rapide. En effet, plus la durée d'incubation est longue, plus la quantité de mycotoxine décomposée dans le fluide ruminal est importante (11 % en 4 heures, 29 % en 24 heures et 38 % en 48 heures) (GAUMY J.L., 2001 (b); KALLELA K., 1982).

Ainsi, parmi les bovins, on détermine des animaux dits sensibles. Ce sont les jeunes animaux (rumen non fonctionnel), les fortes laitières (niveau d'ingestion élevé, transit rapide, pourcentage élevé en concentrés) et les animaux en péripartum (trou immunitaire, transition alimentaire, déficit énergétique) (ARZUL P., 2010).

Remarque : De la zéaralénone peut être formée à partir de l'un de ses "précurseurs", la zéaralénone-glycoside, qui est hydrolysée en glucose et en zéaralénone. Ce composé n'étant pas recherché dans les analyses de routine, il pourrait être impliqué dans certains cas de mycotoxicoses (GAUMY J.L., 2001)(b).

3. Cas particulier de l'homme

La zéaralénone a été reconnue comme un perturbateur endocrinien mais son effet sur l'homme n'est pas avéré, même si cette mycotoxine est de plus en plus pointée du doigt.

a) Episodes de contamination chez l'homme

Dans les années 80, les autorités de Porto Rico ont fortement suspecté l'implication de la zéaralénone dans des phénomènes de puberté précoce de plusieurs milliers de jeunes enfants car cette mycotoxine avait été mise en évidence dans les analyses sanguines de certains d'entre eux. Les principaux symptômes étaient de la gynécomastie et une puberté précoce (STEIBLEN, 1996).

(1) *Contamination par ingestion de céréales*

Aujourd'hui encore, malgré les normes imposées, l'homme reste exposé à la zéaralénone.

Par exemple, en 2005, une étude, en France, a montré que, sur 245 échantillons d'aliments à base de céréales, "prêts à consommer", 5 (2%) ont des niveaux de zéaralénone supérieurs à la limite de détection, dont 2 supérieurs à la limite maximale de 50 µg/kg fixée par la

Commission européenne. Ainsi, 2,5% des enfants de 3 à 14 ans et 31% de la population végétalienne dépasse la DJT fixée pour la zéaralénone (tab XV) (AFSSA, 2009).

Tableau XV : Exposition alimentaire moyenne de la population française à la zéaralénone (AFSSA, 2009)

Population	Exposition moyenne (µg/kg p.c./j)
Population totale adulte	0,027
Adultes hommes	0,029
Adultes femmes	0,024
Enfants (3 à 15 ans)	0,042

La même année, sur 4918 échantillons de céréales testés dans neuf pays européens, 32% contenaient de la zéaralénone.

Plusieurs études ont été réalisées dans plusieurs pays européens, afin d'évaluer la contamination des aliments par la zéaralénone, elles sont répertoriées ci-dessous (tab XVI) (ZINEDINE A., 2007).

Tableau XVI : Contamination des aliments par de la zéaralénone dans différents pays européens (ZINEDINE A., 2007)

Country	Commodity	Range (mg/kg)	References
<i>Europe</i>			
Bulgaria	Wheat	Up to 0.12	Vrabcheva et al. (1996)
Croatia	Maize grain	Mean of 1.70	Domijan et al. (2005)
Finland	Feeds and grains	0.022–0.095	Hietaniemi and Kumpulainen (1991)
Germany	Wheat	0.001–8.04	Müller et al. (1997a)
Germany	Barley	0.002–0.311	Müller et al. (1997b)
Germany	Wheat	0.017–0.104	Schneuwis et al. (2002)
Germany	Wheat, corn, oat products	0.002–0.018	Schollenberger et al. (2005)
Germany	Wheat	Mean of 0.015	Schollenberger et al. (2006)
Germany	Corn	Up to 0.860	Schollenberger et al. (2006)
Germany	Oats	Up to 0.021	Schollenberger et al. (2006)
Germany	Corn by-products	Up to 1.362	Schollenberger et al. (2006)
Germany	Corn plants	Up to 0.553	Schollenberger et al. (2006)
Germany	Corn silage	Up to 1.790	Schollenberger et al. (2006)
Germany	Soya meal	Up to 0.211	Schollenberger et al. (2006)
Hungary	Mouldy stored com	0.01–11.8	Fazekas et al. (1996)
Italy	Corn	0.004–0.15	Visconti and Pascale (1998)
Italy	Maize	Mean of 0.453	Pietri et al. (2004)
The Netherlands	Wheat	0.020–0.231	Tanaka et al. (1990)
The Netherlands	Corn feed	Up to 3.1	Veldman et al. (1992)
Poland	Wheat	0.01–2	Perkowski et al. (1990)
Scotland	Barley stored (3 month–1 year)	2.1–26.5	Gross and Robb (1975)
Slovakia	Poultry feed mixture	0.003–0.086	Labuda et al. (2005)
Switzerland	Wheat	0.01–0.121	Bucheli et al. (1996)
Switzerland	Wheat	0.01–0.018	Noser et al. (1996)
UK	Corn feeds	0.02–1.8	Scudamore et al. (1998)
UK	Corn	0.04–1.8	Scudamore et al. (1998)
Yugoslavia	Oats	0.03–0.086	Hietaniemi and Kumpulainen (1991)
Yugoslavia	Barley	0.021–0.03	Hietaniemi and Kumpulainen (1991)
Yugoslavia	Corn	0.043–10	Balzer et al. (1977)
Yugoslavia	Dairy cattle feed	0.14–0.96	Skrinjar et al. (1995)

(2) Contamination par ingestion de viande et de produits dérivés d'animaux

Comme la biotransformation et l'excrétion de la zéaralénone sont rapides, la viande et les produits dérivés d'animaux semblent peu contaminés et donc peu dangereux pour le consommateur (MINERVINI F., 2005).

Par exemple, on ne retrouve ni zéaralénone ni ses métabolites dans les muscles, les reins, le foie, la vessie et le gras en région dorso-lombaire de bovins ayant ingérés 0,1 mg de zéaralénone/kg d'aliment/j (ZINEDINE A., 2007).

b) Dose journalière admissible chez l'homme

Pour la zéaralénone, la dose journalière admissible (DJA) chez l'homme a été calculée à partir d'une Dose Sans Effet Hormonal (DSEH). Celle-ci a été obtenue chez des guenons adultes ovariectomisées, en utilisant comme réponse la kératinisation vaginale.

La DSEH pour l' α -zéaralénol est de 225 $\mu\text{g}/\text{kg PV}/\text{j}$ chez des singes Rhésus traités oralement pendant 10 jours. Une DSEH inférieure à 50 $\mu\text{g}/\text{kg PV}/\text{j}$ a été obtenue chez des guenons *Cynomolgus* au cours d'une étude de 90 jours. Bien que moins oestrogénique que l' α -zéaralénol, la zéaralénone a, par extrapolation, une DSEH $\leq 50 \mu\text{g}/\text{kg PV}/\text{j}$, aucune étude spécifique n'ayant été menée avec ce composé. La valeur du coefficient de sécurité retenue dans cette évaluation est de 500.

Ainsi, la DJA proposée chez l'homme pour la zéaralénone est de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel/j soit 7 $\mu\text{g}/\text{j}$ pour un individu moyen de 70 kg.

Si en médecine vétérinaire l'affection est souvent considérée comme bénigne après disparition relativement rapide et totale des signes cliniques suite à la suppression de l'aliment contaminé, l'excrétion de métabolites réduits bioactifs doit être prise en compte. C'est le principe de précaution, qui amène à proposer un délai de commercialisation de plusieurs semaines pour les produits des animaux ayant consommé des aliments connus comme étant fortement contaminés (GAUMY J.L., 2001)(b).

c) Carcinogénicité de la zéaralénone

Depuis 1983, la zéaralénone est considérée par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) comme un composé potentiellement carcinogénique.

En 1998, Tomaszewski *et al.* ont mesuré la zéaralénone dans l'endomètre de 49 femmes. Ils ont observés 27 adénocarcinomes, 11 hyperplasies endométriques et 11 endomètres prolifératifs normaux pour lesquels les valeurs de zéaralénone étaient respectivement, dans chacun de ces groupes, de 48 ± 6 , $167 \pm 18 \text{ ng/ml}$ et inférieur à la limite de détection. Dans 8 cas de tissus endométriques hyperplasiques et 5 cas de tissus néoplasiques, la zéaralénone n'a pas été détectée.

Les différentes études n'ont donc pas permis de conclure de manière définitive à l'implication de la zéaralénone ou du zéaralanol dans les troubles observés (SHIER, 1998).

Mais 11 ans plus tard, en 2009, il a été montré que les œstrogènes et la zéaralénone ont la capacité de diminuer de 80% l'expression de l'ARNm qui permet la suppression du gène candidat à l'expression du cancer du sein (YE W., 2009).

Ainsi, on associe aux molécules à effets oestrogéniques (œstrogènes, zéaralénone et métabolites) une recrudescence des cancers du sein, de la prostate, des testicules et la chute de la fertilité masculine (DUQUESNOY, 2005).

C. Des seuils toxiques chez les bovins très difficiles à déterminer

1. Quelques résultats expérimentaux

Les études concernant la sensibilité des bovins à la zéaralénone sont contradictoires. En voici quelques exemples (tab XVII).

Tableau XVII : Recueil de cas de signes cliniques observés chez des bovins recevant des rations contaminées en zéaralénone

Concentration en ZEA (en mg/kg de MS de ration)	Signes cliniques observés chez les bovins	Références
0,4 à 1,98	Diminution de la production de lait après consommation de la ration pendant 7 jours	Mirocha et al. 1974
	Aucun effet	Shreeve et al. 1979
14	Augmentation du nombre d'inséminations artificielles de 1,2 à 4	Mirocha et al. 1965
10	Avortements entre le 1 ^{er} et le 3 ^{ème} mois de gestation et plusieurs inséminations artificielles sont nécessaires	(KALLELA K., 1984)
300 (pendant 8 semaines)	Hyperœstrogénisme, diarrhées, infertilité, chute de production de lait et effet anabolisant (réduction du besoin en nourriture avec augmentation de la teneur en eau et une baisse du taux de lipides de la carcasse)	(YIANNIKOURIS A., 2002)
1,5	Comportement d'oestrus pendant 2 à 5 jours sans synchronisation avec le cycle ovarien ou survenant au 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestre de gestation. Développement mammaire chez les génisses impubères.	(COPPOCK R.W., 1990)
ZEA pure à 99% (1,6; 3,1; 6,25; 12,5 et 25) pendant deux cycles oestriques	Aucun signe clinique. La seule anomalie décelable était une diminution de la taille des corps jaunes à la palpation transrectale	(WEAVER G.A., 1986)

Sur le terrain, il faut faire attention aux interprétations hâtives car les dysfonctionnements digestifs et métaboliques liés à l'utilisation de rations très riches en énergie et en protéines peuvent également intervenir dans l'explication de l'infertilité des animaux. Et une diminution des quantités d'aliment ingéré se traduira inévitablement par une baisse de la production laitière.

En outre, le seuil d'apparition est très variable et dépend de l'association de la zéaralénone à d'autres toxines et du type de régime de l'animal (HAURAY, 2000; YIANNIKOURIS A., 2002).

Il est donc difficile aujourd'hui de préciser la part entre une ration mal équilibrée et une ration contaminée par de la zéaralénone dans les troubles de la reproduction.

Remarque : Chez des taurillons implantés au zéranol, Staigmiller et al. (1985) ont observé une diminution de la circonférence scrotale, du poids des testicules, de la sécrétion de testostérone, du nombre d'animaux capables de produire un éjaculat à 14 mois et une augmentation des anomalies du pénis. Si ces perturbations sont réversibles après retrait de l'implant, la diminution de la qualité de la semence est persistante. Cette dernière serait due à l'adénomyosis et à la formation de granulome dans la queue de l'épididyme sous l'action du zéranol.

Chez les génisses, les effets associés au zéranol sont variables d'une étude à l'autre : aucun, augmentation du diamètre pelvien, augmentation de l'intensité des chaleurs pré-pubertaires, augmentation du nombre de chaleurs sans ovulation et diminution de la fertilité (DUQUESNOY, 2005).

2. Un seuil toxique très différent selon les auteurs

Comme les études sur la toxicité de la zéaralénone sont contradictoires, il n'y a aucun consensus quant au seuil toxique de cette mycotoxine pour ce qui est des bovins.

En effet, des auteurs considèrent que des taux de zéaralénone de 1 à 5 mg/kg de MS d'aliment ont des effets néfastes sur l'organisme alors que d'autres estiment même que 0,5 voire 0,01 mg/kg de MS suffisent.

Arzul (ARZUL P., 2010), Driehuis (DRIEHUIS F., 2008) et l'AFSSA (AFSSA, 2009) ont chacun déterminé un seuil de toxicité pour la zéaralénone chez les bovins (fig 35) : il y a un facteur 40 entre les seuils extrêmes.

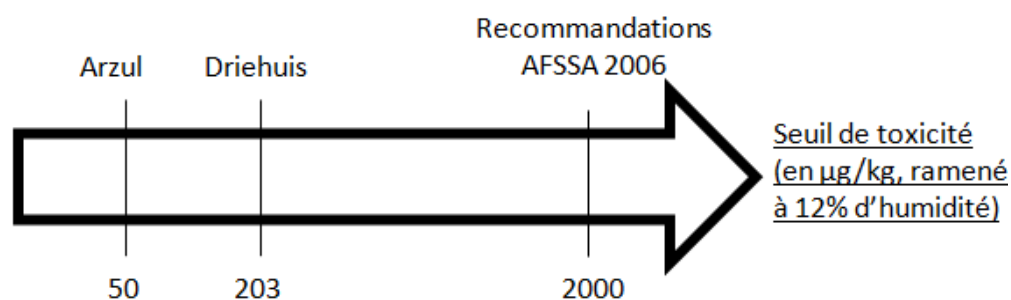


Figure 35 : Seuil toxique de la zéaralénone selon différents auteurs

D. Etat des connaissances sur la cinétique d'excrétion urinaire de la zéaralénone dans quatre espèces parmi les animaux d'élevage

La cinétique d'excrétion de la zéaralénone n'est pas connue chez les bovins mais plusieurs études ont été réalisées dans d'autres espèces.

1. Chez les porcsins

Chez le porc, il n'y a pas de données sur l'excrétion de la zéaralénone après ingestion d'un aliment naturellement contaminé.

Par contre, lors d'injection intraveineuse de bolus de zéaralénone (1mg/kg), le pic d'excrétion se situe à 2,73h post-injection. Il faut attendre quatorze jours après la dernière injection pour que les concentrations en zéaralénone et α -zéaralénol dans la bile, le foie et l'urine soient en-dessous des limites de détection de l'HPLC. On considère alors que la mycotoxine a été complètement éliminée par l'animal (fig 36 et 37).

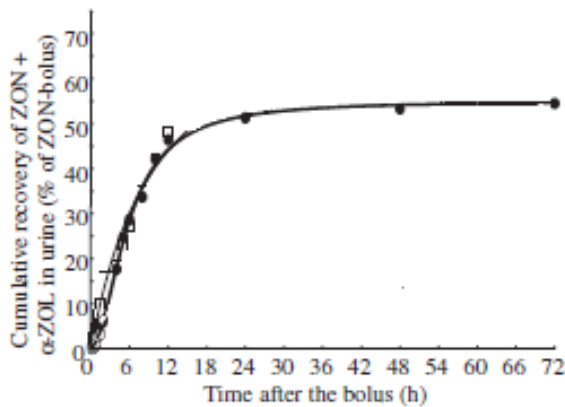


Figure 36 : Excrétion cumulée de la zéaralénone et de l' α -zéaralénol dans l'urine de porcs (en pourcentage de bolus)
(DANICKE S., 2005)

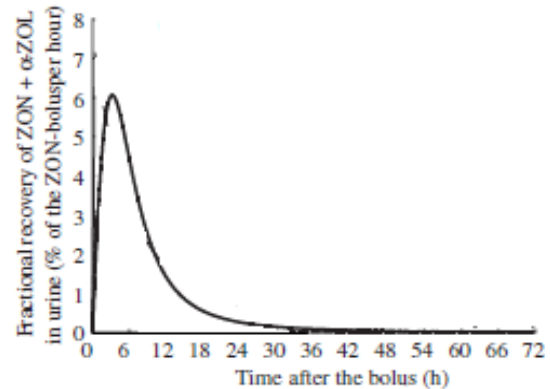


Figure 37 : Excrétion fractionnée de la zéaralénone et de l' α -zéaralénol dans l'urine de porcs (en pourcentage de bolus/heure)
(DANICKE S., 2005)

On remarque donc que, chez le porc, la plus grande partie de l'excrétion se situe entre 6h et 12h post-injection, sous forme de zéaralénone et d' α -zéaralénol (DANICKE S., 2005).

2. Chez les ovins

Les métabolites les plus excrétés dans l'urine des ovins sont l' α -zéaralénol et le β -zéaralénol.

Si l'on distribue oralement 5mg de zéaralénone à des ovins, voici ce que l'on obtient dans les prélèvements urinaires (tab XVIII) :

Tableau XVIII : Concentration en zéaralénone et ses métabolites retrouvés dans l'urine d'ovins nourris avec une dose orale de zéaralénone de 5 mg (MILES C.O., 1996).

time (h)	zearalenone (1)		α -zearalenol (2)		β -zearalenol (3)		α -zearalanol (4)		β -zearalanol (5)	
	m/z 462	m/z 466	m/z 536	m/z 540	m/z 536	m/z 540	m/z 538	m/z 542	m/z 538	m/z 542
predose	13.5	0.47	0.00	0.00	1.02	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00
0-2	9.22	8.90	0.25	11.88	0.52	13.94	0.00	0.80	0.00	0.54
2-4	2.80	2.62	0.00	5.60	0.17	5.76	0.06	0.32	0.00	0.29
4-8	2.92	2.83	0.08	9.31	0.50	12.31	0.00	0.42	0.00	0.50
8-24	7.61	5.20	0.36	17.11	0.98	26.29	0.10	0.73	0.00	0.97

On remarque que le maximum d'excrétion se situe entre 0 et 2h après l'ingestion et qu'il y a un second pic entre 8h et 24h (MILES C.O., 1996).

Dans une autre étude, de la zéaralénone est administrée à des brebis à des doses de 0 ; 1,5 ; 3,0 ; 6,0 ; 12,0 et 24,0 mg/animal/jour pendant 10 jours, en débutant à J7 de l'œstrus, avant mise à la reproduction. On observe alors une chute du taux d'ovulation, une diminution de la durée du cycle œstral ainsi qu'une augmentation du temps d'œstrus. Si on fait la même expérience en débutant à 5 jours après l'accouplement, le traitement à la zéaralénone n'a aucun effet sur la reproduction.

Ainsi, seules les brebis ingérant un aliment contaminé avant la mise à la reproduction présenteront des problèmes de fertilité (SMITH J.F., 1990).

3. Chez les caprins

En 2010, DONG et al. ont obtenu des temps de demi-vie de distribution et d'élimination de 3,15 et 28,58 heures respectivement après injection de zéaralénone en intraveineuse à la concentration de 1,2 mg/kg de poids corporel (afin d'éviter sa dégradation par les micro-organismes du rumen).

Les urines ont été collectées avant l'administration de zéaralénone puis à 3, 8, 24, 32, et 48 heures après administration.

De la ZEA, α -ZOL, et β -ZOL on été détecté à partir de 3h et une grande quantité de zéaralénone et de ses métabolites ont été excrété pendant 24 heures. Les taux de ZEA, α -ZOL and β -ZOL dans le plasma varient de 76% à 85%, ceux dans l'urine de 70% à 83%, ceux dans les fécès de 59% à 67% et ceux dans le foie de 67% à 70%.

Les taux de α -ZAL, β -ZAL and ZAN dans le plasma et dans l'urine varient de 60% à 79% (fig 38 et 39).

Le ratio de ZEA, α -ZOL et β -ZOL était à peu près constant à 1,9:1:2,6 (DONG M., 2010)(a).

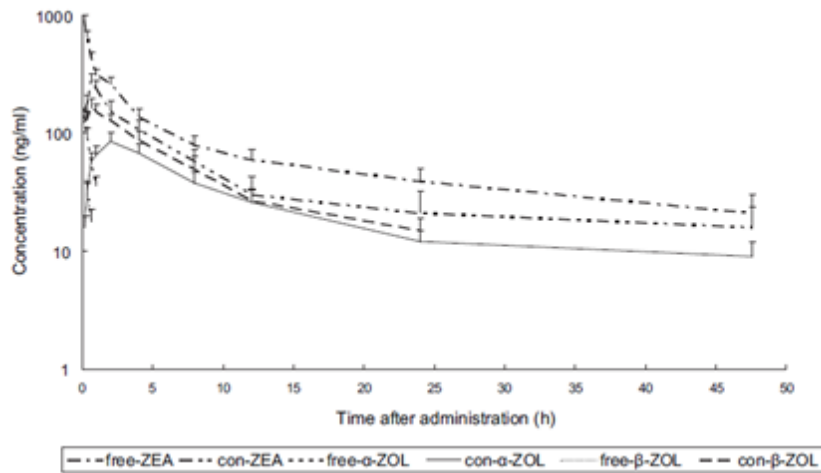


Figure 38 : Concentrations plasmatiques de zéaralénone et de ses métabolites libres et conjugués, au cours des 48 heures suivant l'administration intraveineuse unidose de zéaralénone à 1,2 mg/kg de poids corporel chez des chèvres (DONG M., 2010)(a).

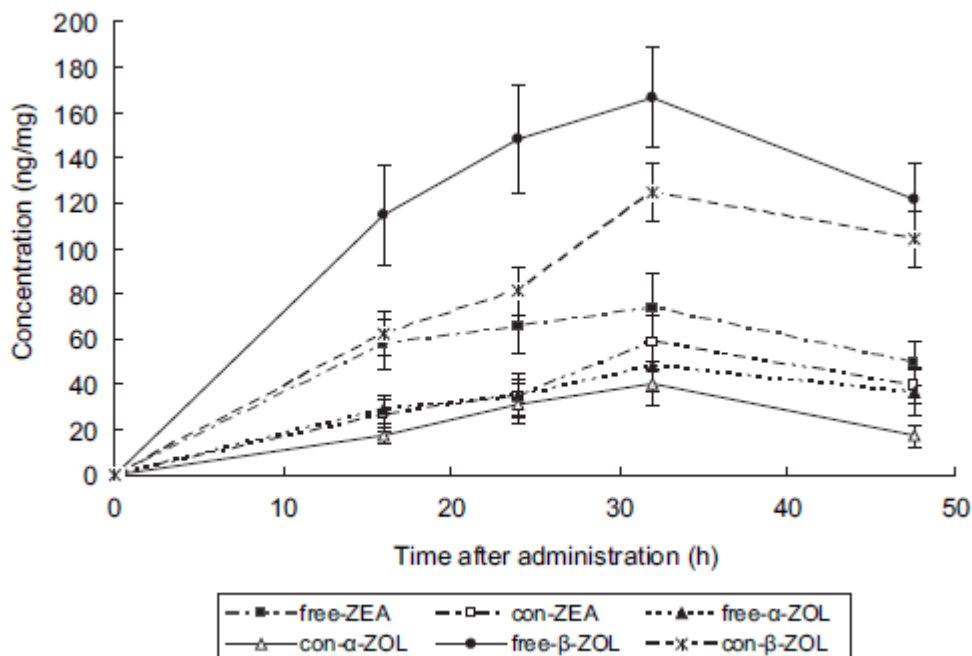


Figure 39 : Excrétion des formes conjuguées et libres de zéaralénone, d'α-zéaralénone et de β-zéaralénone dans les fécès de chèvres (DONG M., 2010)(a).

Ainsi, la zéaralénone est éliminée dès son injection et son pic d'élimination dans les fécès se situe 30 heures post-injection.

4. Chez les bovins

Les études sur l'excrétion urinaire de la zéaralénone chez les bovins sont assez peu nombreuses.

En 1999, Moschini et al ont montré que l'essentiel de la dégradation de la zéaralénone a lieu pendant la première heure d'incubation dans le rumen (AFSSA, 2009).

Lorsqu'un bovin ingère de la zéaralénone ou l'un de ses métabolites, on retrouve presque la totalité dans ses urines.

En effet, si l'on compare par HPLC la concentration urinaire de zéaralénone et de ses métabolites à celle distribuée, on obtient un résultat compris entre 78% et 108% (tab XIX) (DE ANDRES F., 2008).

Tableau XIX : Détermination de la zéaralénone et ses métabolites dans les urines de 3 bovins par analyses HPLC (DE ANDRES F., 2008)

Samples	β -ZAL (ng mL ⁻¹)			β -ZOL (ng mL ⁻¹)			α -ZAL (ng mL ⁻¹)			α -ZOL (ng mL ⁻¹)			ZAN (ng mL ⁻¹)			ZON (ng mL ⁻¹)		
	Added	Found	R (%)	Added	Found	R (%)	Added	Found	R (%)	Added	Found	R (%)	Added	Found	R (%)	Added	Found	R (%)
Bovine 1	5	5.1	102	5	5.4	108	5	5	100	5	3.9	78	5	4.9	98	5	4.4	88
Bovine 2	10	10.2	102	10	10.7	107	10	10	100	10	9.4	94	10	9.9	99	10	8.7	87
Bovine 3	20	20.3	101.5	20	21.1	105.5	20	22.4	112	20	18	90	20	19.8	99	20	18.3	91.5

Dans une étude en 2002, cinq génisses ont reçu, pendant 84 jours, un aliment contaminé à 2740 μ g/animal/jour de zéaralénone. Leur urines ont été prélevées tous les 5-6 jours et ont été comparées à un groupe témoin n'ayant pas été en contact avec la mycotoxine (tab XX et fig 40) (KLEINOVA M., 2002).

Tableau XX : Concentrations urinaires et hépatiques en zéaralénone et ses métabolites chez des génisses nourries avec de l'aliment contaminé, avec un implant de zéranol ou appartenant au groupe contrôle (KLEINOVA M., 2002).

group		zearalenone	α -zearalenol	β -zearalenol	zeranol	taleralanol	zearalanone	increase of wt (kg)	dose of active compound
zearalenone	urine ^a (μ g/L)	5-8	3-5	20-65	2-3	2-3	tr	142.5 \pm 10	daily: 2740 μ g of zearalenone
	liver ^c (μ g/kg)	tr-1.2	tr-1.2	5-11.5					
control	urine ^b (μ g/L)	tr		tr				94.4 \pm 12	daily: 158 μ g of zearalenone
	liver ^c (μ g/kg)			tr					

^a None of the analytes were detected in any of the investigated muscle tissue samples. ^b Traces in urine = concentrations between 0.1 and 0.5 μ g/L (limits of detection) and between 0.5 and 1.0 μ g/L (limits of quantification). ^c Traces in liver = concentrations between 0.1 and 1.0 μ g/kg (limits of detection) and between 0.5 and 3.0 μ g/kg (limits of quantification).

Ainsi, 80% de la zéaralénone distribuée a été transformée en β -zéaralénol principalement et en α -zéaralénol, selon le ratio 1 : 8. Au contraire, l' α -zéaralanol et le β -zéaralanol sont excrétés en plus faibles quantité et selon le ratio 1 : 1 (KLEINOVA M., 2002).

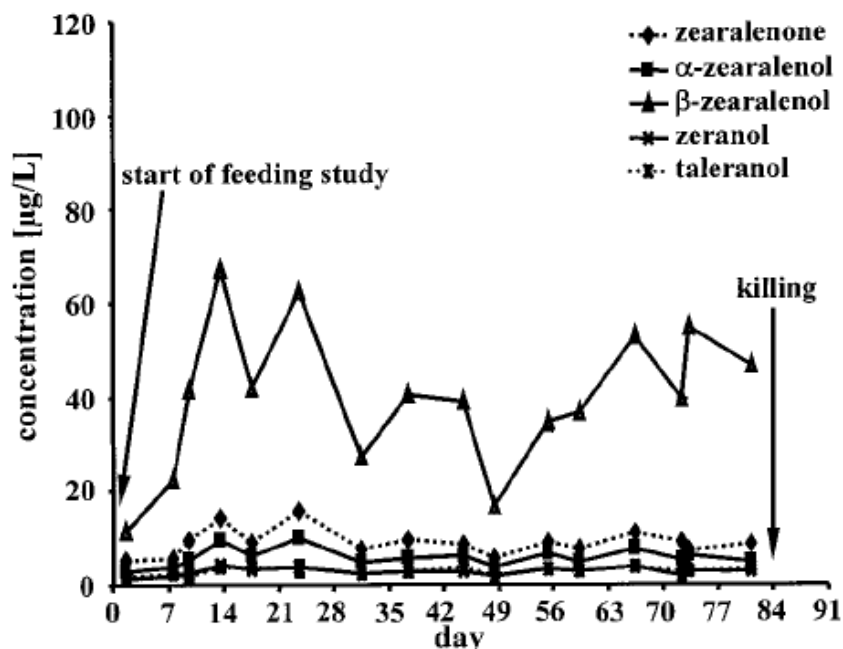


Figure 40 : Concentration urinaire moyenne en zéaralénone et ses métabolites en fonction du temps chez des génisses nourries avec 2kg d'avoine comportant 1370 µg/kg de zéaralénone (KLEINOVA M., 2002)

Dès le début de l'ingestion, il y a excrétion de zéaralénone et de ses métabolites, le maximum d'excrétion étant entre J14 et J24. Puis les concentrations urinaires diminuent légèrement jusqu'à la fin de l'étude (KLEINOVA M., 2002).

Le β-zéaralénol est le métabolite excrété en grande majorité dans les urines des bovins. Or, c'est l'α-zéaralénol qui est retrouvé principalement dans le rumen. Des différences d'absorption, de conjugaison, etc entre les deux métabolites principaux entreraient en jeu pour expliquer cela mais le mécanisme précis n'est pas connu à ce jour.

Voyons à présent quelles sont les méthodes permettant de diminuer la concentration en zéaralénone d'une ration contaminée.

E. L'adsorption de la zéaralénone

Plusieurs procédés de détoxification ont été testés mais aucun ne semble pouvoir éliminer complètement la zéaralénone présente dans un aliment.

Par ailleurs, les auteurs ne sont pas tous d'accord quant au procédé à utiliser (fig 41).

Processes described for binding, detoxification or degradation of ZEA		
Process	Observation	References
<i>Biological process</i>		
Mannan-oligosaccharides derived from the cell wall of <i>S. cerevisiae</i> 1026	Binding capacity of about 80% of ZEA	Devegowda et al. (1996)
Mixed bacterial culture	Total degradation of ZEA. No ZEA or ZEA-like products were detected	Megharaj et al. (1997)
Ruminants protozoa	90–100% of ZEA metab to α -ZEA and to a lesser degree to β -ZEA	Kiessling et al. (1984)
Lactonohydrolase from <i>Clonostachys rosea</i> IFO 7063	Conversion of ZEA to less toxic compounds	Takahashi-Ando et al. (2002)
<i>L. rhamnosus</i> GG and <i>L. rhamnosus</i> LC705	Binding of ZEA	El-Nezami et al. (2002)
Lactic acid bacteria	Reduction of 68–75% in 4 days of fermentation in maize	Mokoena et al. (2005)
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	Degradation of ZEA to non-toxic metabolites	Molnar et al. (2004)
<i>Gliocladium roseum</i>	Metabolization of 80–90% ZEA to two isomeric compounds that are less toxic than ZEA	El-Sharkawy and Abul-Hajj (1988)
<i>Physical process</i>		
Montmorillonite	Adsorption of 108 mg/g	Lemke et al. (1998)
Montmorillonite	Adsorption of 0.19 mg/g	Ramos et al. (1996)
Bentonite	Adsorption of 0.11 mg/g	Ramos et al. (1996)
Sepiolite	Adsorption of 0.07 mg/g	Ramos et al. (1996)
Mg trisilicate	Adsorption of 0.02 mg/g	Ramos et al. (1996)
Cholestyramine	Adsorption of >0.3 mg/g	Ramos et al. (1996)
Crospovidone	Adsorption of 0.3 mg/g	Ramos et al. (1996)
Cross-linked polyvinylpyrrolidone	Adsorption of 0.5–2.1 mg/g	Alegakis et al. (1999)
Activated carbon	Binding 100% ZEA (pH 3 and 7.3)	Bueno et al. (2005)
Extrusion Cooking	Reduction of 83% of ZEA	Ryu et al. (1999)
<i>Chemical process</i>		
Ozone (O ₃)	Total degradation of ZEA	McKenzie et al. (1997)
H ₂ O ₂ (10%) at 80 °C for 16 h	83.9% of degradation of ZEA	Abd Alla (1997)

Figure 41 : Les différents procédés de dégradation de la zéaralénone (ZINEDINE A., 2007)

Pour certains, le charbon activé semble être un bon candidat pour cette détoxification. En effet, Bueno et al. ont testé 5 adsorbants in vitro (charbon activé, bentonite, talque, grès et sulfate de calcium) et ont eu les meilleurs résultats avec le charbon activé, capable d'adsorber à 100% la zéaralénone (pH 3 et 7.3) à des concentrations de 0.1, 0.25, 0.5, et 1% (BUENO D.J., 2005).

Pour d'autres, la décontamination la plus efficace vis-à-vis de la zéaralénone semble être l'emploi de formaldéhyde, puis d'hydroxyde d'ammonium. Ces substances détruisent partiellement la zéaralénone dans la farine de maïs à la température de 50° C, dans des proportions respectives de 94 % et 64 %. Il n'y aurait pas toutefois de destruction dans le maïs en grain (GAUMY J.L., 2001)(b).

Remarque : Les spores d'*Aspergillus* de la section Nigri sont capables d'adsorber des mycotoxines dont la zéaralénone. Cependant, il semble délicat de proposer comme moyen universel de décontamination d'un aliment l'ajout de spores.

Il n'y a donc pas de consensus quant au produit à utiliser pour dégrader la zéaralénone mais plusieurs procédés existent. A chacun de se faire sa propre idée...

En conclusion de cette première partie, des mycotoxines de familles variées peuvent contaminer les céréales et les fourrages et donc se retrouver dans l'alimentation des animaux mais aussi dans celle de l'homme.

En cas de suspicion de mycotoxicose, la démarche consiste à écarter l'aliment douteux et en prélever un échantillon afin de le faire analyser. Ensuite, si les résultats reviennent positifs, il faudra choisir entre l'élimination de l'aliment incriminé et l'utilisation de capteurs sur le lot restant.

La zéaralénone est une mycotoxine particulière, puisque c'est un analogue des œstrogènes endogènes et qu'elle est la seule à avoir des effets prouvés sur la fertilité. Elle a une toxicité chronique surtout et les effets les plus graves seront ceux sur la descendance des animaux qui ont été en contact avec elle. Mais il n'y a pas de consensus quant à sa limite de toxicité ; des études complémentaires sont donc nécessaires.

Intéressons-nous maintenant à la partie expérimentale de notre étude : un essai d'utilisation d'un test ELISA de détection de la zéaralénone dans les urines, le kit « Ridascreen FAST Zearalenon SC ».

PARTIE II : DEMARCHE EXPERIMENTALE

La zéaralénone est une mycotoxine produite par différentes espèces de *Fusarium*. Ce champignon peut contaminer plusieurs types de céréales comme le maïs, le blé, le sorgho,... En 2009, la contamination par la ZON en Europe centrale (et donc en France) a été estimée à 25%, ce qui est non négligeable.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, cette mycotoxine peut provoquer de nombreux problèmes économiques chez les bovins lorsqu'elle est consommée de façon chronique. En effet, elle se fixe de façon compétitive sur les récepteurs à œstrogènes, ce qui entraîne des troubles de la reproduction (infertilité, oestrogénisme, féminisation des jeunes mâles par diminution de la production de testostérone, morbinatalité et avortement) (BAILLY, 2008).

Depuis 2009, l'AFSSA a établi le niveau d'attention de la zéaralénone dans les céréales chez les bovins laitiers à 0,3 mg/kg de matière sèche (AFSSA, 2009).

Les animaux les plus touchés sont les vaches en période de transition, les fortes productrices et les sujets de remplacement de moins de 6 mois.

Afin de pouvoir prévenir ces problèmes sanitaires et économiques, il est important de doser cette mycotoxine.

Nous nous intéresserons ici au dosage de la zéaralénone dans les urines de bovins adultes, selon la technique ELISA.

I. Les différentes méthodes d'analyse des mycotoxines disponibles

Depuis quelques années, les laboratoires mettent en place des kits permettant de faire des analyses rapides d'échantillons d'aliment pour détecter la présence de mycotoxines. La majorité de ces tests fonctionne grâce à une méthode immunoenzymatique de type ELISA.

Mais, même si cette technique est plus rapide et moins coûteuse que les analyses chromatographiques, elle reste moins fiable que les méthodes de référence.

A. Analyse chromatographique des mycotoxines

1. Généralités

Toutes les méthodes de référence mises en place par les laboratoires utilisent l'analyse chromatographique. Elles sont basées sur des réactions antigène-anticorps (Ag-Ac). Cela implique une préparation des échantillons, les grains ne pouvant pas être analysés entiers.

Ces méthodes sont très sensibles mais coûtent cher en général.

Par ailleurs, la métabolisation de la toxine mère en un ou plusieurs composés fait qu'il est souvent nécessaire de rechercher plusieurs molécules (BAILLY, 2008).

Les étapes de la chromatographie sont les mêmes pour toutes les techniques et doivent respecter des normes françaises et européennes :

- Prélèvement d'un échantillon le plus homogène et le plus représentatif possible, broyé très finement (0,5 mm).
- Extraction de 20 à 50g d'échantillon à l'aide d'un mélange de solvant à base d'eau, de méthanol et d'acide nitrile (1 à 2h)
- Filtration de la solution. On obtient un mélange mycotoxines/impuretés que l'on purifie sur colonne d'immunoaffinité ou sur cartouche SPE.
- Evaporation de la solution afin de concentrer la teneur en mycotoxines dans le résidu final qui est alors redissous et réinjecté dans le système chromatographique (ARVALIS, 2010).

Il existe différentes techniques (fig 42), toutes basées sur la séparation des molécules selon leur taille puis leur détection en utilisant leur propriétés physiques (absorption, UV, fluorescence) ou leur masse atomique (BAILLY, 2008).

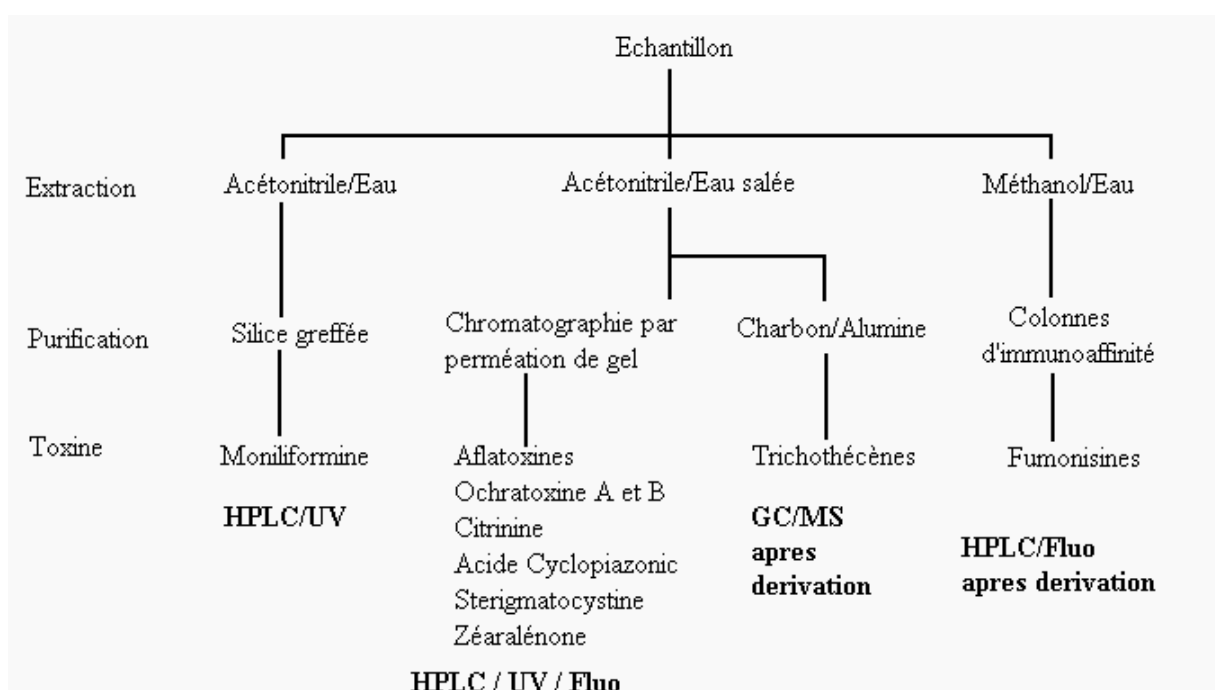


Figure 42 : Les différentes méthodes d'analyse chromatographique pour le dosage des mycotoxines en laboratoire (FANGEAT, 2008)

2. Dosage des mycotoxines dans les aliments

Actuellement, il y a 3 techniques d'analyse des mycotoxines par chromatographie à partir des aliments :

- HPLC FLD (par fluorescence)
- GCMS (chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse)
- HPLC/MS/MS (High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry /Mass Spectrometry, chromatographie kit couplée à une spectrométrie de masse).

L'HPLC/MS/MS existe depuis 2002 et est de plus en plus utilisée car elle a une excellente sensibilité et une très bonne spécificité. De plus, la préparation des échantillons est plus simple et l'analyse est multi mycotoxines, ce qui implique un gain de temps et donc de coût. En effet, elle permet l'identification de plus de 28 mycotoxines dans une matière végétale avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Elle est proposée à un tarif d'environ 150€ (ARZUL P., 2010)

Afin de doser les mycotoxines dans l'aliment, on fait un dosage multi-résidus dans un mélange acétonitrile/eau suivi d'une purification optionnelle et sans dérivation (transformation des composés non volatils en composés volatils afin de pouvoir réaliser une chromatographie gazeuse) qui est une étape délicate. Toutefois, le coût de l'appareil constitue un investissement important et son utilisation demeure complexe (ARVALIS, 2010; PLASENCIA J., 1990).

3. Dosage des mycotoxines dans les urines

a) L'urine, un fluide judicieux pour la détection de la zéaralénone

La zéaralénone est principalement excrétée par voie urinaire. Il est donc pertinent de la doser à partir de l'urine des bovins.

Des études menées notamment en Nouvelle Zélande montrent que les taux urinaires de ZEA et de ses principaux métabolites, l' α et la β -zéaralénone, peuvent être utilisés afin d'évaluer avec précision la quantité ingérée de zéaralénone (FANGEAT, 2008).

Ainsi, les concentrations de zéaralénone et de ses métabolites obtenues dans les échantillons urinaires des bovins sont des marqueurs de l'exposition des animaux à cette mycotoxine.

b) Les méthodes disponibles

On dose les mycotoxines qui sont excrétées dans les urines notamment grâce à la méthode de chromatographie liquide couplée avec une spectrométrie de masse.

Par ailleurs, de nouvelles techniques sont en plein essor, comme les chromatographies basées sur :

- la fluorescence par polarisation (le complexe Ag-Ac n'est pas fixé sur un support solide mais mesuré par une différence de vitesse de rotation qui entraîne une polarisation de la lumière différente)

- le principe du « lab on chip » (miniaturisation de toutes les étapes du dosage des mycotoxines regroupé sur une puce, d'où la possibilité de détecter plusieurs mycotoxines en même tps) (ARVALIS, 2010).

Selon le type d'analyse, les taux retrouvés à la fin sont entre 86 et 102% de ceux présents au départ (JODLBAUER J., 2000).

B. Analyses ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et mycotoxines

1. Généralités sur l'ELISA

L'ELISA est un procédé d'immuno absorption enzymatique qui repose sur le principe d'une réaction entre antigène (molécule à doser) et anticorps pour former un complexe antigène – anticorps.

En effet, des antigènes purifiés et biochimiquement caractérisés sont accolés au fond des puits et sont utilisés comme phase solide. Si l'échantillon est positif, les anticorps spécifiques dans l'échantillon de sérum dilué se lieront aux antigènes couplés à la phase solide.

Il existe plusieurs classifications possibles pour les tests ELISA, en voici deux.

On peut distinguer les tests ELISA :

- "Monospécifique" (immuno-dosages enzymatiques avec un seul antigène) qui fournit un dosage quantitatif *in vitro* pour la détection des anticorps.

- "Profil" qui permet un dosage semi-quantitatif *in vitro* pour la détection de différents anticorps sur une seule barrette de microplaque.

- "Pool", dont la phase solide est coatée avec un mélange d'antigènes et qui est utilisé pour la détection semi-quantitative des anticorps dont la spécificité doit être analysée ensuite par des dosages monospécifiques (BIO ADVANCE, 2011).

On peut aussi parler d'ELISA de type :

- "Sandwich" : la couleur développée est proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon.

- "Compétition", directe ou indirecte : la couleur développée est inversement proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011).

2. Choix de l'ELISA : avantages et inconvénients

a) Avantages

L'ELISA est une méthode de détection assez simple, pour un personnel avec un peu d'entraînement, qui, par sa banalisation, pourrait permettre au vétérinaire d'établir un diagnostic rapide et de répondre aux exigences des éleveurs qui souhaitent la mise en place de mesures curatives à très court terme.

Ainsi, il n'y aurait plus besoin d'attendre les résultats des laboratoires qui sont très longs et donc très coûteux en pertes pour l'éleveur. En effet, les délais pour une chromatographie liquide couplée avec une spectrométrie de masse sont de 15-20 jours, alors que faire un test ELISA prend quelques heures, 45 minutes minimum.

De plus, une petite quantité d'urine (0,5 mL) suffit pour utiliser le test ELISA et la séquence d'extraction ne demande pas un matériel de laboratoire très sophistiqué.

En outre, les résultats obtenus sont visuels (fig 43), les plaques de lecture permettant d'obtenir des données quantifiées et d'améliorer les limites de détection.

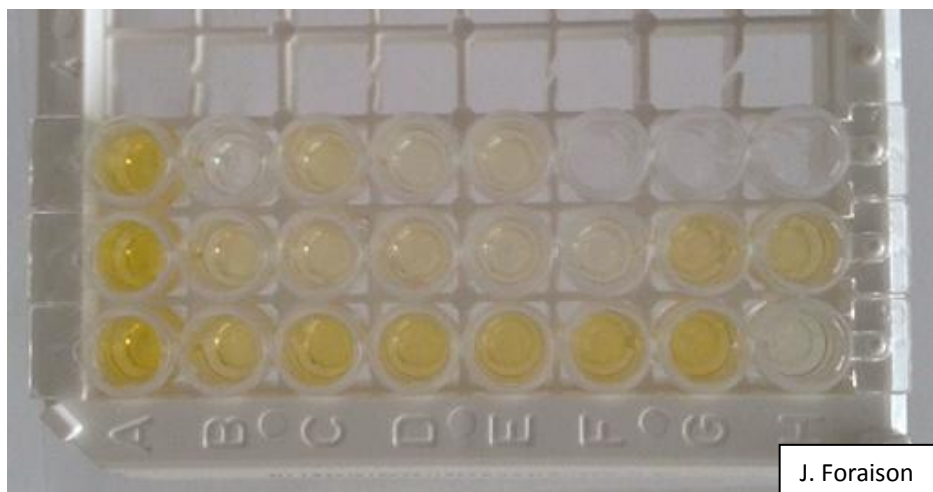


Figure 43 : Coloration des puits de la plaque de microtitration, visible à l'œil nu.

L'ELISA reconnaît tous les analogues de la zéaralénone, contrairement à l'HPLC qui détecte chaque métabolite séparément.

NB : Même si les analyses par chromatographie ont de meilleures sensibilités et spécificités que l'ELISA, Takagi et al. ainsi que Liu et al. ont montré qu'il y avait une bonne corrélation entre l'ELISA et l'HPLC, même si les valeurs absolues des taux de mycotoxines obtenues sont différentes. Il est donc possible d'utiliser ce test comme une alternative à l'HPLC (LIU Y., 2007; TAKAGI M., 2011).

b) Inconvénients

Contrairement aux méthodes chromatographiques, les kits ELISA ont une mauvaise spécificité. Ceci est dû en partie aux réactions croisées : les molécules chimiquement proches de la mycotoxine recherchée peuvent être dosées en même temps que cette dernière. Elles sont à l'origine de la surestimation des résultats donnés par un kit. En effet, des études faites au Québec ont montré qu'on pouvait surévaluer la teneur en DON de 0,3 ppm (LEFEBVRE D., 2003).

Le pourcentage de réactions croisées varie en fonction de la marque du kit.

Par ailleurs, un kit vaut pour une seule mycotoxine et ses métabolites, contrairement à la LC-MS chromatographie liquide associée à une détection par spectrométrie de masse qui permet de doser jusqu'à 28 mycotoxines en même temps.

De plus, la présence d'impuretés dans les échantillons peut modifier les résultats en créant des interférences avec la mycotoxine à doser (DIAZ, 2005). Par exemple, les impuretés présentes dans l'urine réduiraient la capacité des anticorps à fixer les antigènes (LIU Y., 2007).

En outre, le test ELISA demande un environnement de laboratoire avec une élimination contrôlée des déchets et résidus.

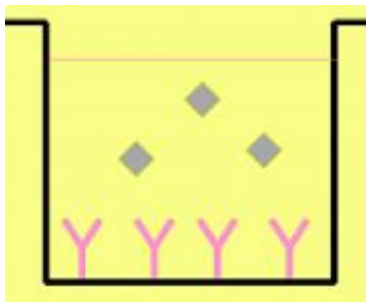
Une autre limite à l'ELISA est l'obtention possible de "faux positifs" et/ou de "faux négatifs" (DRAGSBAEK RASMUSSEN A., 2000).


Ainsi, avant d'utiliser un test, il faut en connaître la qualité et les limites. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser ces kits en complément des méthodes chromatographiques. Ainsi, si un échantillon est positif après analyse rapide, il est bon de le valider par chromatographie.

Remarque: Des recherches sont en cours afin de créer un test ELISA multi-mycotoxines, basé sur un unique anticorps monoclonal (BURMISTROVA N.A., 2009).

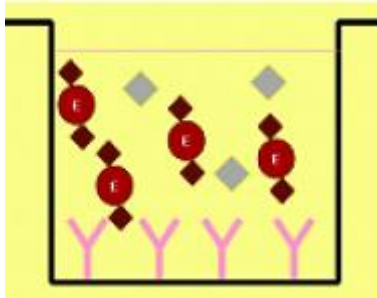
3. Étapes de l'ELISA type compétition indirecte


Nous présenterons uniquement cette méthode (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011) car c'est celle-ci qui sera utilisée par la suite.

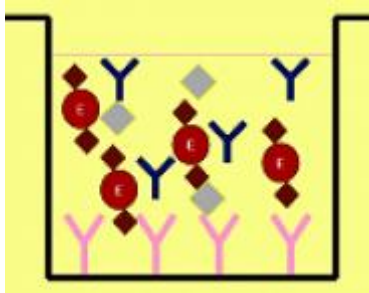



Etape 1 : Les échantillons () sont introduits dans les tubes ou micro-puits dont les parois sont recouvertes d'anticorps anti-IgG.

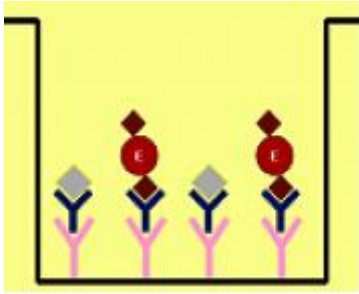
Ces anticorps anti-IgG sont spécifiques des anticorps dirigés contre la molécule à détecter.



Etape 2 : le conjugué enzymatique () est ajouté, en quantité égale dans chaque tube ou micro-puit.

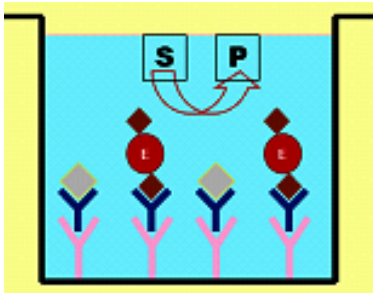


Etape 3 : L'anticorps () dirigé contre la molécule à détecter est ajouté, en quantité égale dans chaque tube. La réaction de compétition commence.

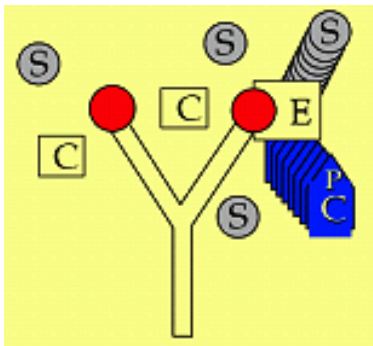


Etapes 4 et 5 : Après une période d'incubation, les tubes subissent plusieurs lavages. Seules les molécules et/ou conjugué enzymatique qui se sont liées aux anticorps et ensuite aux anticorps anti-IgG resteront fixées sur les parois. Le lavage permet d'éliminer certains interférents qui peuvent influencer le résultat du test au moment de la détection.

La quantité de conjugué enzymatique restant dans le tube sera inversement proportionnelle à la quantité de molécules présentes dans l'échantillon étalon, ajoutées au début du test.

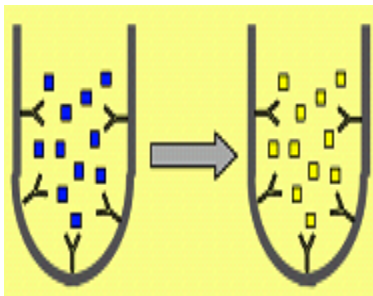


Etape 6 : Ajouter le substrat / chromogène



Etape 7 : Durant l'incubation, l'enzyme va catalyser la conversion des molécules du substrat (S) qui à son tour va réagir avec les molécules du chromogène (C) dont la couleur vire de l'incolore au bleu.

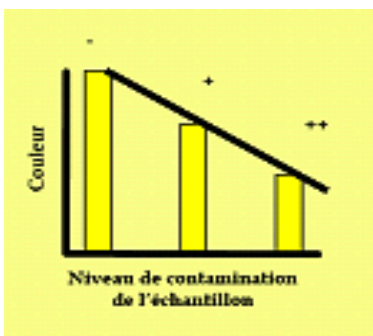
Chaque molécule d'enzyme catalyse la conversion de milliers de molécules de substrat en produit réagissant avec le chromogène.



Etape 8 : Après une étape d'incubation, une solution « stop » est ajoutée. La réaction de conversion est arrêtée immédiatement et la couleur vire du bleu au jaune.

La densité Optique (DO) de la solution est alors mesurée à 450 nm.

L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle au niveau de la contamination.



Etape 9 : Révélation

4. Les tests Ridascreen® Zearalenon disponibles

Le fabricant, Ridascreen, propose deux types de tests pour l'analyse de la zéaralénone : un test « normal » et un test « fast ».

Ces tests ELISA permettent de doser environ 80% de la zéaralénone présente dans l'échantillon initial.

Ils sont basés sur un dosage immunoenzymatique compétitif pour l'analyse quantitative de résidus de zéaralénone dans les céréales, l'alimentation animale, la bière, le sérum et l'urine pour le test « normal » et uniquement dans les céréales pour le test « fast ».

La période d'incubation est de 2h30 pour le test « normal » alors qu'elle est seulement de 15 minutes pour le test « fast ».

Nous débiterons donc notre étude par le kit le plus rapide, en voyant si on peut valider le test « fast » sur les échantillons d'urine. La préparation de l'échantillon se fera alors par chromatographie de purification, sur colonne C18.

Format : microplaques

Spécificité (déterminée par l'analyse des réactions croisées entre les différentes mycotoxines) :

- Zéaralénone : 100 %
- α -Zéaralénol : 41.6 %
- Zéranol : 27.7 % (interdit d'utilisation en Europe, depuis 1989 (MILES C.O., 1996))
- β -Zéaralénol : 13.8 %

Principe du test :

Les puits de la plaque de microtitration sont sensibilisés à l'aide d'anticorps anti-zéaralénone. Les solutions étalons ou les échantillons et le conjugué enzymatique sont ajoutés dans les puits de réaction. La zéaralénone et son conjugué enzymatique entrent en compétition pour la liaison aux sites spécifiques de fixation de l'anticorps anti-zéaralénone. Après incubation, les puits sont lavés pour éliminer toutes les molécules non fixées. Le substrat de l'enzyme (péroxyde d'urée) et le chromogène (tétraméthylbenzidine) sont ensuite ajoutés et l'ensemble est laissé à incuber. Le conjugué fixé transforme le chromogène en un produit bleu. L'addition de solution « stop » conduit à un changement de coloration du bleu au jaune. La densité optique (DO) est mesurée à 450 nm. La couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration en zéaralénone de l'échantillon.

Chaque kit permet de réaliser 96 mesures pour le « normal » et 48 pour le « fast » et est composé de :

- 1 plaque de microtitration de puits coatés avec des Ac anti-zéaralénone
- 6 solutions étalons (0 ppt (étalon zéro), 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt et 4050 ppt de zéaralénone en solution aqueuse) pour le « normal » et 1 solution à 0 ppb pour le « fast ».
- 1 flacon de conjugué : zéaralénone couplé à la peroxydase concentrée
- 1 flacon de substrat/chromogène
- 1 flacon de solution stop
- 1 flacon de tampon de dilution dans le test « normal »

Équipement nécessaire :

- lecteur de plaque ou de barrettes de microtitration : spectrophotomètre (450 nm)
- broyeur
- agitateur
- entonnoir et fiole jaugée de 100 ml
- papier filtre Whatman N°1 ou équivalent
- centrifugeuse
- évaporateur rotatif ou autre équipement permettant l'évaporation de solvants
- pipettes Pasteur
- pipettes graduées
- micropipettes variables

Réactif : Méthanol

Matériel nécessaire pour la préparation des échantillons :

- Glucuronidase/arylsulfatase d'*Helix pomatia*
- 50 mM d'une solution tampon d'acétate de sodium à pH 4,8
- 20 mM de tampon Tris à pH 8,5 / méthanol (80/20)
- colonnes RIDA® C18

Conditions de stockage :

Le kit doit être maintenu à une température comprise entre 2 et 8°C et ne doit en aucun cas être congelé.

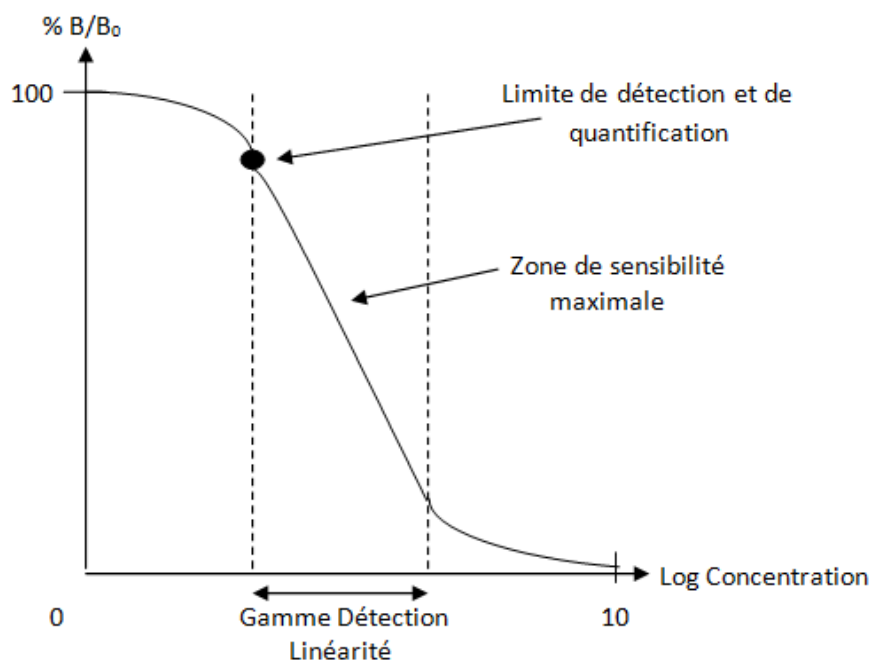
La zéaralénone est photosensible, il faudra donc enfermer les tubes dans du papier aluminium.

Analyse de l'échantillon : cf. II.B.2.a.

5. Résultats

a) Lecture des résultats

La lecture des microplaques ELISA se fait à l'aide d'un spectrophotomètre (fig 44).



$$B/B_0 \% = \frac{\text{DO standard ou échantillon (B)}}{\text{DO étalon 0 ppb ou ppm (B}_0)} \times 100$$

Figure 44 : Courbe d'activité enzymatique ELISA "compétition" (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011)

b) Validation des résultats

La droite de calibration est obtenue par la gamme étalon dont le nombre de points doit comporter au moins 5 niveaux. Il est important de ne pas éliminer de points puisque les critères de validation du kit vont être établis sur cette base.

Il est conseillé de valider le maximum de critères suivants :

- Le coefficient de corrélation doit être $\geq 0,98$
- La valeur calculée des étalons doit avoir une déviation inférieure à 15 % par rapport à la valeur théorique
- La valeur du 50 % d'inhibition (= quantité de toxine nécessaire pour diviser par 2 la DO de l'étalon 0) doit se trouver à ± 25 % de la valeur théorique
- La valeur de B/Bo doit avoir une déviation < 15 % par rapport à la valeur calculée.

c) Calculs de la concentration en zéaralénone de l'échantillon

Dans les kits ELISA "par compétition", l'antigène à doser (étalon ou échantillon) entre en compétition avec une quantité connue d'Ag marqués par une enzyme pour se lier avec les Ac spécifiques fixés sur la plaque de microtitration.

On a une relation inversement proportionnelle entre le signal de DO obtenu et la quantité d'Ag contenu dans l'échantillon (fig 45).

Ainsi, plus il y a d'Ag dans l'échantillon, plus le signal DO est faible car l'affinité de l'anticorps est plus grande vis à vis de l'Ag libre que vis à vis de l'Ag marqué (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011).

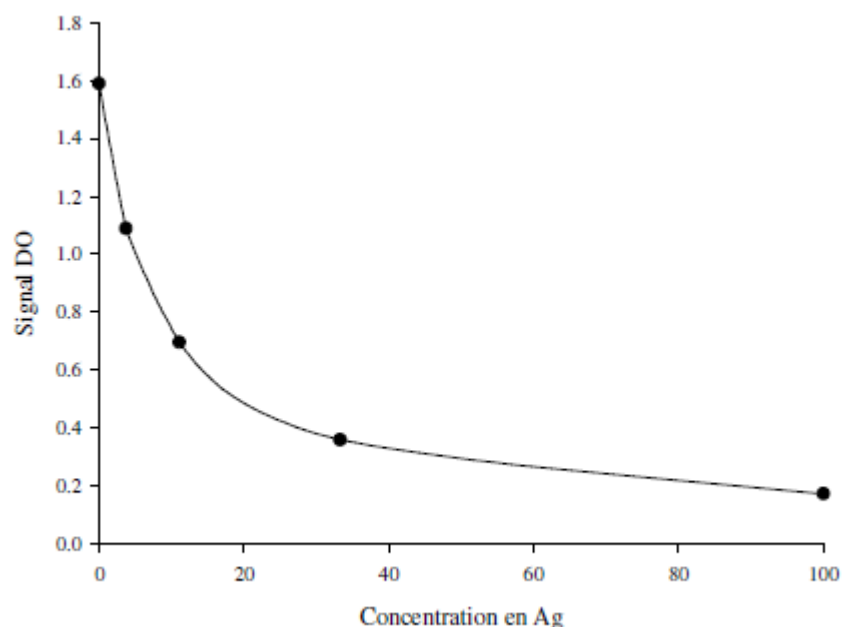


Figure 45 : Relation entre le signal DO et la concentration en Ag dans un test ELISA par compétition (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011)

Le principe général consiste à établir une courbe étalon avec des solutions contenant des concentrations connues d'Ag. Le fabricant fournit une série de dilutions successives afin d'obtenir des concentrations finales différentes d'un facteur 2 ou 3.

Concernant la DO, l'étalon zéro est alors égal à 100 % et les autres valeurs de DO sont exprimées en pourcentage de cette valeur (B/Bo %). Les valeurs calculées pour les étalons sont représentées sur papier semi-logarithmique, en fonction de la concentration en zéaralénone en ng/kg (fig 46).

La concentration de zéaralénone en ng/kg correspondant au pourcentage d'activité de chaque échantillon peut être lue sur la courbe d'étalonnage.

Afin d'obtenir la concentration de zéaralénone en ng/kg en fonction de l'échantillon, un facteur de dilution doit être appliqué. Pour l'urine, celui-ci est de 1.

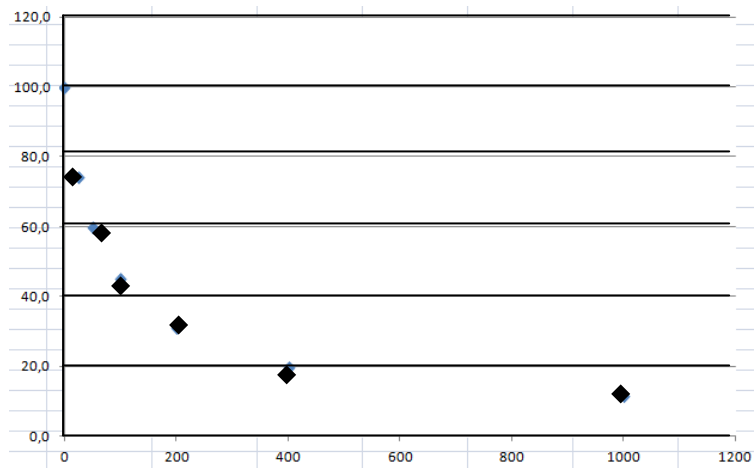


Figure 46 : Concentration en zéaralénone en fonction de B/Bo %

On va ensuite linéariser la courbe en utilisant une représentation qui consiste à utiliser en ordonnées la fonction logit (B)= log (B/Bo-B).

En rentrant les valeurs données par le fabricant, on obtient une courbe d'équation :

$$y = -0,839x + 3,7004$$

On trace alors la fonction $\log (B/Bo-B) = f(\log [ZEA])$, qui permet d'obtenir la concentration par le développement suivant :

$$\ln(B/(Bo-B)) = \log it = -0,839 (\log [ZEA]) + 3,7004$$

$$\text{Soit } \ln [ZEA] = (\ln(B/(Bo-B)) - 3,7004) / -0,839$$

$$\text{Soit } [ZEA] = \exp((\ln (B/Bo-B)-3,7004 / -0,839))$$

On obtient donc une droite à partir de laquelle on peut directement calculer les concentrations en zéaralénone obtenues (fig 47).

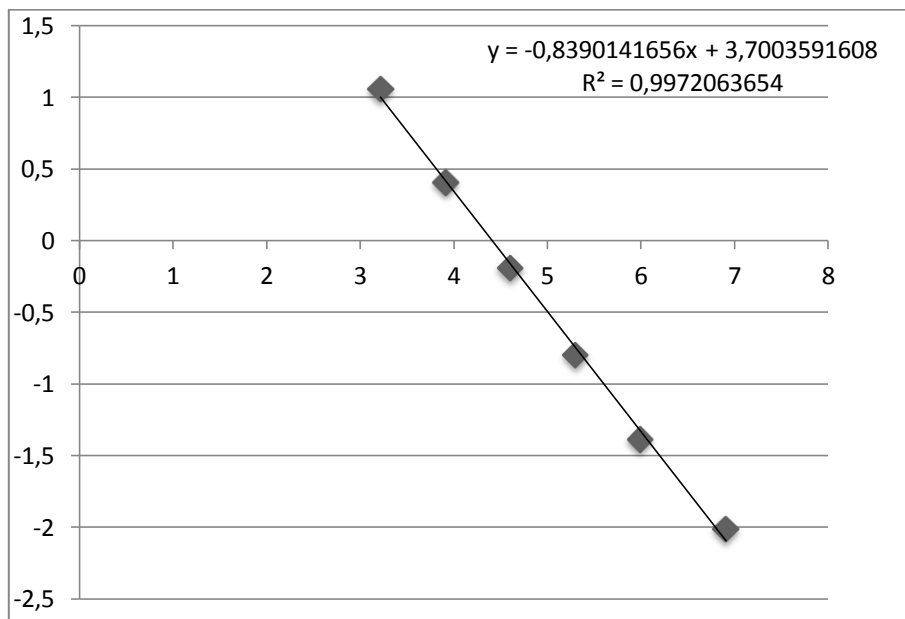


Figure 47 : Courbe étalon de log it en fonction de log [ZEA]

La concentration en mg/kg (ppm) ou en µg/kg (ppb) correspondant au pourcentage d'activité de chaque échantillon, peut être lue directement sur la courbe étalon. Il est important que la valeur de B/Bo s'inscrive dans la portion 20-80 %. Si un coefficient de variation inférieur à 25 % est requis, il convient de travailler uniquement dans la portion 40-60 %.

d) Acceptabilité des mesures

(1) *Limite de répétabilité*

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus avec la même méthode, par le même opérateur utilisant le même appareillage dans le même intervalle de temps, sur 2 prises d'essai d'un même échantillon, ne doit pas dépasser 20 %.

(2) *Limite de reproductibilité*

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus avec la même méthode sur 2 prises d'essai d'un même échantillon soumis à des conditions autres que celles de répétabilité, ne doit pas dépasser 30 % (INSTITUT DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES AGROALIMENTAIRES DES CEREALES, 2011).

II. Expérimentation

A. Introduction

La zéaralénone est une mycotoxine qui est rapidement absorbée et métabolisée, elle est éliminée principalement dans les urines où elle peut être dosée. On y retrouve toujours plus de 85% de la zéaralénone distribuée initialement dans l'aliment (DE ANDRES F., 2008). L'essentiel de la dégradation a lieu pendant la première heure d'incubation dans le rumen sous l'action des protozoaires (MOSCHINI M., 1999).

A ce jour, on ne connaît toujours pas la durée d'excrétion chez les bovins mais on sait que chez les cochettes, la quasi-totalité de l'excrétion urinaire de la zéaralénone et de ses métabolites se fait en 48 heures.

Différentes méthodes ont été développées pour doser la ZON et ses métabolites mais elles sont complexes. C'est pourquoi nous voulons valider une méthode d'analyse simple sur des échantillons urinaires, qu'il serait possible de réaliser sur le terrain, au cabinet vétérinaire, à un coût abordable.

B. Matériel et méthodes

1. Plan expérimental

a) Animaux utilisés

Pour cette étude, nous avons sélectionné sept vaches laitières de poids moyen 677kg [600kg-850kg]. Il y a 6 Montbéliardes et 1 Prim'Holstein (n°1818). Cinq vaches sont tarées, une est fraîchement vêlée (n°6126) et une est pleine (n°1278)

Chaque lundi, les poids des animaux sont évalués au ruban barymétrique. Les mesures sont toujours effectuées par le même opérateur et avec le même matériel. Le premier jour de l'expérience, la vache dont le numéro de boucle est le 1652, est pesée sur la balance (610 kg) et au ruban (620 kg). On obtient une différence de 10kg : on considère donc le ruban comme fiable.

Un examen clinique sera réalisé chaque matin sur tous les animaux (prise de température et vérification de la motricité du rumen).

En cas de cystite, l'animal sera sorti de l'expérience et sera traité au Marbocyl® 10%.

b) Ration distribuée

Les animaux sont nourris avec du foin à volonté (MS = 90,1%), 500g/j d'un mélange orge/tourteau (3/4, 1/4) et 50g/j de minéral 152 (10-10).

Les vaches sont chacune dans un box, il n'y a donc pas de compétition alimentaire et la ration est entièrement prise. Tout le long de l'expérience, il n'y aura ni changement de milieu, ni de ration, afin de ne pas créer de biais.

Un échantillon de foin a été prélevé au début de l'expérimentation et a été envoyé au LDA22 pour une recherche complète de mycotoxines, afin de nous assurer qu'il n'y avait pas de mycotoxine(s) qui serait(ent) venue(s) s'ajouter à celle que nous distribuions. Ont été testés les trichothécènes de type A, B et D, la zéaralénone et ses métabolites (α -zéaralanol, β -zéaralanol, α -zéaralénol et β -zéaralénol), les fumonisines, les alcaloïdes de l'ergot, les aflatoxines, les ochratoxines, la patuline ainsi que la monoliformine, l'acide ténuazonique, le verruculogen, l'acide cyclopiazonique, la citrinine et la stérigmatocystine. Le résultat a été le suivant : négatif pour toutes les mycotoxines.

c) Planning de l'expérience

L'expérimentation comprendra 3 périodes de mesures.

Le premier prélèvement urinaire sera réalisé avant toute ingestion de zéaralénone et constituera notre témoin pour les échantillons récoltés avant la 1^{ère} période. Pour les échantillons prélevés juste avant les périodes 2 et 3, ils permettront de vérifier que toute la zéaralénone de la période précédente a bien été éliminée.

Les bovins recevront un bolus de zéaralénone, le matin, pendant trois jours, en plus de leur ration normale. Ensuite, une ration non contaminée (sans bolus) sera distribuée pendant quatre jours.

Cette séquence sera réalisée trois fois de suite, avec trois concentrations de zéaralénone différentes : 0,02 mg/vache/jour pour la 1^{ère} semaine, 1 mg/vache/jour pour la 2^{ème} semaine et 1,3 mg/vache/jour pour la 3^{ème} semaine (fig 48).

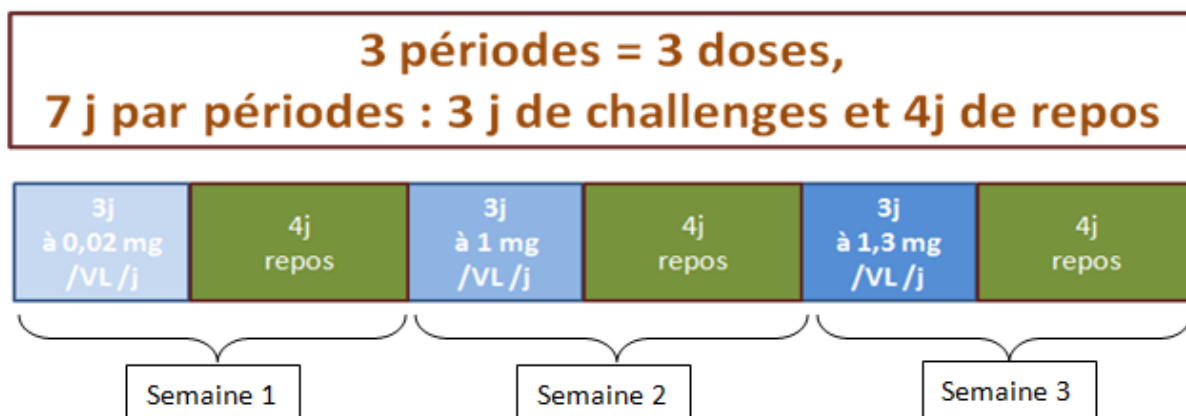


Figure 48 : Planning de distribution de la zéaralénone au cours de l'expérience

Les prélèvements urinaires seront effectués tous les jours, à heures fixes. Les vaches seront prises au cornadis. Pendant une période d'une heure, l'expérimentateur attendra les mictions spontanées pour recueillir de l'urine. Ces mictions pourront être stimulées par massage doux de la zone périnéale. Si après cela, certaines vaches n'ont pas uriné, un sondage urinaire sera réalisé.

Remarque : Une vache laitière de 700 kg urine en moyenne 24L par jour [8L-59L] (KHELIL-ARFA H., 2011).

d) Planning d'une période

Chaque période de 7 jours est composée de 3 jours de challenge suivis de 4 jours de repos (fig 49).

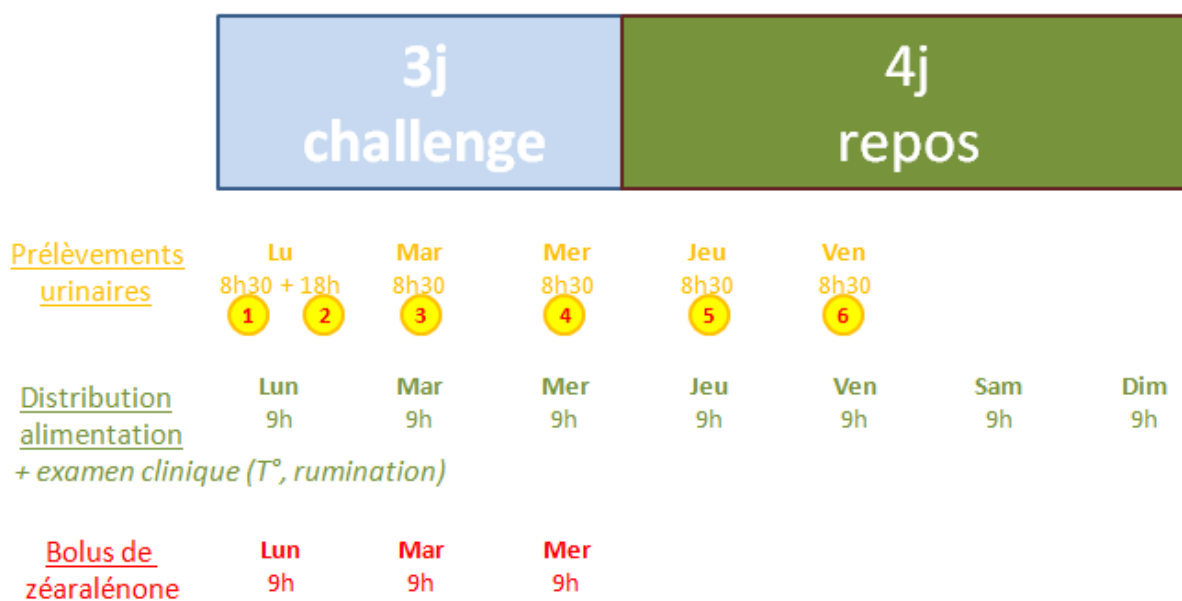


Figure 49 : Description du planning d'une période de l'expérimentation

- Challenges : Durant ces périodes, les vaches recevront quotidiennement, en plus de la ration habituelle, un bolus de zéaralénone de :

- * 0,02 mg/vache/jour pendant la première période
- * 1 mg/vache/jour pendant la deuxième période
- * 1,3 mg/vache/jour pendant la troisième période

- Repos : Les vaches reçoivent leur ration seulement.

Arzul considère que le seuil toxique de la zéaralénone est de 0,7 mg/vache/jour (ARZUL P., 2010). Les doses de 1 mg et 1,3 mg ont été choisies proches de cette limite. Puis nous avons pris une valeur très basse (0,02 mg) afin d'évaluer la sensibilité du test ELISA.

La dose de zéaralénone souhaitée aura été préalablement préparée dans une gélule et sera administrée à l'aide d'un lance-bolus.

La récolte d'urine se fera 2 fois par jour le premier jour de chaque période, à 8h30 et 18h, puis à 8h30 les autres jours. L'urine sera récupérée dans des pots droits de 40 ml placés très rapidement dans une glacière fermée. Comme la zéaralénone est photosensible, tous les tubes seront recouverts de papier aluminium.

Afin de tester la résorption des gélules in vivo, nous avons donné 4 gélules vides à une génisse dont l'euthanasie était prévue le lendemain pour des raisons médicales n'ayant aucun lien avec notre expérience. A l'autopsie, il ne reste aucune trace de gélules dans l'appareil digestif. Les gélules sont donc rapidement détruites dans le rumen et la zéaralénone est en circulation dans l'organisme dans un laps de temps assez court après l'administration orale forcée.

e) Préparation des bolus de zéaralénone

Nous avons commandé 2 pots de 25mg chacun de zéaralénone.

On dilue les 25 mg de ZON dans 25ml de méthanol, ce qui nous donne une solution A à 1mg/ml. On prend 1 ml de cette solution A et on le dilue dans 49ml de méthanol, ce qui nous donne une solution B à 0,02mg/ml.

C'est cette solution B qui est utilisée pour la première semaine de l'expérience : on donne 1ml/vache/j pendant les 3 jours de challenge.

La deuxième semaine, on donne 1ml/vache/j de la solution A pendant les 3 jours de challenge.

A la fin des deux semaines, on a utilisé 22 ml de solution A, il nous reste donc 3ml de disponible.

On dilue le deuxième pot de 25mg de zéaralénone dans 25ml de méthanol et on a donc 28ml de solution A disponible.

La troisième semaine, on donne 1,3ml/vache/j de cette solution A pendant les 3 jours de challenge.

2. Analyses de laboratoire

Nous avons utilisé le test « Ridascreen® FAST Zearalenon SC », marque déposée de R-Biopharm AG (certifié ISO 9001).

a) Traitement préliminaire de l'échantillon d'urine

1. Diluer 0,5 ml d'urine avec 3 ml de tampon acétate (50mM, pH 4,8) puis ajouter 8 µl de glucuronidase/arylsulphatase d'*Helix pomatia* et laisser incuber 3 heures à 37°C.

2. Purifier 3,5 ml d'urine hydrolysée à l'aide de RIDA® C18 column.

Le débit sera d'une goutte par seconde.

3. Rincer la colonne avec 3 ml de méthanol à 100% puis équilibrer la colonne avec 2 ml de tampon Tris (20 mM, pH 8,5) contenant 20% de méthanol.

4. Appliquer 3,5 ml d'urine hydrolysée.

5. Rincer la colonne avec 2 ml de tampon Tris (20 mM, pH 8,5) puis avec 3 ml de méthanol à 40%.

6. Sécher la colonne en injectant de l'air ou un courant d'azote pendant 1 minute.

7. Eluer doucement l'échantillon (débit de 15 gouttes par minute) avec 1 ml de méthanol à 80% puis laisser évaporer à sec l'éluât à une température maximum de 60°C.

8. Redissoudre le tout dans 50 µl de méthanol puis ajouter 450 µl de tampon 1 et mélanger jusqu'à homogénéisation complète.

Utiliser 50µl par puit.

b) Analyse de l'échantillon urinaire

1. Installer sur le cadre un nombre suffisant de puits pour traiter tous les étalons et les échantillons (2 puits par échantillon ou étalon). Noter les positions des étalons et des échantillons.
2. Ajouter 50 μ l de chaque solution étalon ou échantillon préparé en double dans les puits correspondants.
3. Ajouter 50 μ l de conjugué enzymatique dilué dans chaque puits, mélanger en effectuant des mouvements circulaires de la plaque sur la paillasse et incuber pendant 10 minutes à température ambiante (20 - 25 °C) à l'abri de la lumière.
4. Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement contre du papier absorbant (3 fois) pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 250 μ l d'eau distillée. Vider les puits de nouveau selon le même protocole. Répéter l'opération deux fois.
5. Ajouter 100 μ l de substrat / chromogène dans chaque puits. Mélanger en effectuant des mouvements circulaires de la plaque sur la paillasse et incuber 30 minutes à température ambiante (20 - 25 °C) à l'abri de la lumière.
6. Ajouter 100 μ l de solution stop dans chaque puits. Agiter doucement en effectuant un mouvement circulaire de la plaque sur la paillasse et mesurer la D.O. à 450 nm contre l'air. Lire dans les 10 minutes suivant l'addition de la solution stop.

C. Résultats et discussion

1. État de santé des animaux

Aucun animal n'a présenté de signes cliniques durant les trois semaines de l'expérimentation. Les courbes de températures ne révèlent pas d'anomalie particulière, sauf pour la vache n°6126 à J3 et J4 mais cet animal est toujours resté en bon état général (fig 50).

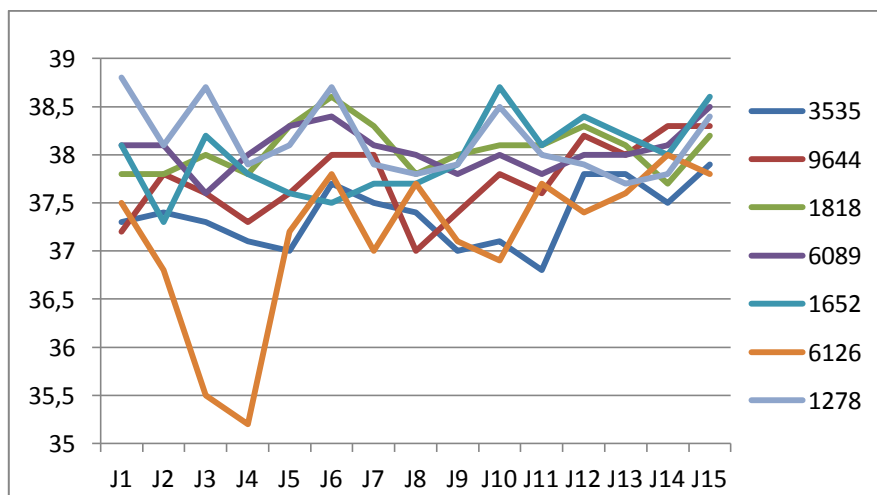


Figure 50 : Evolution de la température rectale des vaches durant la totalité de l'expérimentation.

2. Résultats obtenus avec le test « Fast »

Nous n'avons fait que deux séries de mesures car cela a suffi à conclure sur l'utilisation de ce test rapide pour la détection de la zéaralénone dans l'urine. Nous avons pris les urines de la vache n°9644. Les résultats sont les suivants (fig 51).

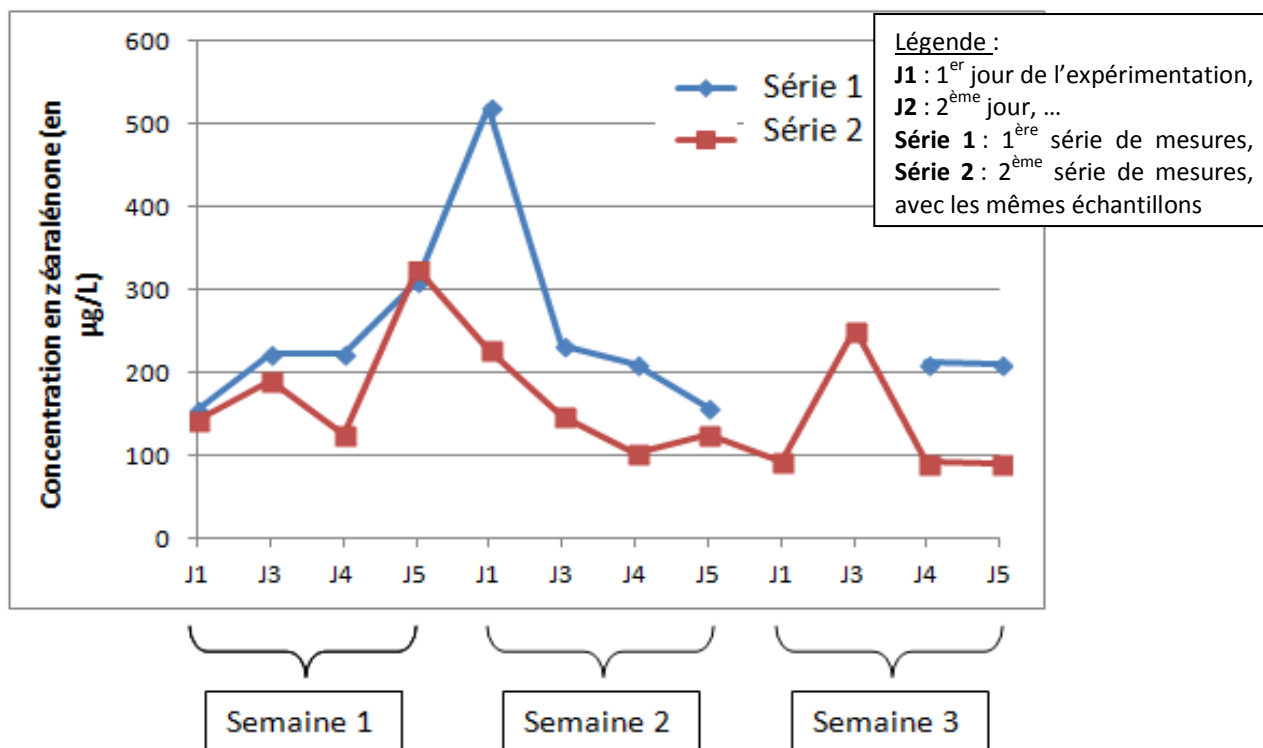


Figure 51 : Résultats de 2 séries de mesures avec le test Fast

On remarque que les mesures ne sont pas cohérentes. En effet, les résultats devraient montrer des valeurs plus basses à J4 et J5 qu'à J1 et J3 car les animaux ne reçoivent de la zéaralénone que pendant les trois premiers jours de la semaine. Par ailleurs, les valeurs de J1 et J3 de la semaine 2 devraient être plus élevées que celles de la semaine 1, et idem pour celles de la semaine 3 par rapport aux résultats de la semaine 2 ; car les animaux sont nourris avec des doses croissantes de mycotoxine au fil du temps.

De plus, les deux courbes devraient se superposer puisqu'elles correspondent aux mêmes échantillons analysés en double, ce qui n'est pas le cas.

D. Conclusion

Le kit Ridascreen® FAST Zearalenon SC n'est pas validé sur l'urine. En effet, il donne des résultats aléatoires et non cohérents par rapport aux doses distribuées. Il ne peut donc pas être utilisé pour la détection de la zéaralénone dans l'urine des bovins.

De plus, le fabricant vend cela comme un test simple pour les laboratoires, mais il ne peut être utilisé que dans ce cadre là et pas par un vétérinaire lambda. En effet, les kits ELISA demandent beaucoup trop de manipulations pour être utilisés sur le terrain. Par ailleurs, ces tests sont difficilement reproductibles pour un manipulateur peu expérimenté.

PERSPECTIVES ENVISAGEES

Il serait intéressant, pour poursuivre la première partie de cette étude, de réitérer les mesures avec le kit « RIDASCREEN Zearalenon » qui est validé pour la détection de la zéaralénone dans les urines des bovins.

Cela permettrait de savoir si on peut mettre en évidence une relation entre la concentration ingérée en zéaralénone et celle excrétée dans les urines à l'aide du test ELISA, mais aussi à partir de quelle dose ingérée on a une sensibilité du test ELISA, et notamment si à la plus faible concentration réputée pour provoquer des troubles en élevage, on détecte quelque chose dans les urines avec le test ELISA.

Par ailleurs, il serait intéressant de savoir combien de temps après le début de l'ingestion de la zéaralénone, ses métabolites peuvent être détectés au niveau urinaire, et aussi combien de temps après l'arrêt de la consommation de zéaralénone on peut la détecter dans les urines.

Enfin, des essais permettant de savoir si l'on peut simplifier l'utilisation du kit ELISA en vue d'une utilisation plus large et moins coûteuse par suppression des étapes de purification/concentration seraient les bienvenus.

Au final, l'utilisation à grande échelle de ce test permettrait de réaliser une enquête épidémiologique sur la prévalence de l'intoxication à la zéaralénone sur le territoire français afin de palier le manque de données certain dans ce domaine.

CONCLUSION GENERALE

La consommation de mycotoxines a un impact direct chez les animaux (diminution des performances zootechniques), ainsi que chez les hommes lors d'ingestion de céréales contaminées (troubles digestifs, cancers, désordres endocriniens...). Mais l'intoxication peut aussi être indirecte chez l'homme, par consommation de viande, de lait ou d'œufs provenant d'animaux ayant ingérés des mycotoxines. Des méthodes visant à l'adsorption de mycotoxines présentes dans un aliment existent, mais elles ne sont pas efficaces à 100%. D'où l'importance d'agir en amont : identifier précocement les mycotoxines dans les aliments, les animaux et les produits animaux, et éliminer les stocks contaminés.

Notre étude a consisté en une évaluation d'un test ELISA (Ridascreen® FAST Zearalenon SC) permettant de mettre en évidence dans l'urine des bovins, une mycotoxine peu connue mais pourtant fréquente dans leurs rations, la zéaralénone, et d'envisager l'utilisation pratique de ce test sur le terrain. Cette mycotoxine se fixe de façon compétitive sur les récepteurs à œstrogènes, entraînant des troubles de la reproduction lorsqu'elle est consommée de façon chronique : infertilité, oestrogénisme, féminisation des jeunes mâles par diminution de la production de testostérone, mortalité et avortement.

Pour cela, nous avons mené notre expérimentation sur 7 vaches laitières pendant 3 semaines. Pour chacune de ces 3 semaines, les 7 vaches recevaient une administration orale d'une dose de zéaralénone, une fois par jour pendant 3 jours, puis aucune administration pendant les 4 jours suivants. Pour la semaine n°1, la dose avalée quotidiennement par chaque vache était de 0,02 mg de zéaralénone. Pour la semaine n°2, cette dose a été augmentée à 1 mg/vache, puis enfin 1,3 mg/vache pour la semaine n°3. Les urines étaient récupérées une à deux fois par jour, soit par miction naturelle, soit par sondage urinaire.

Les résultats des tests ELISA ont révélés des concentrations incohérentes par rapport aux doses distribuées. D'autre part la répétition des analyses a fourni des résultats aléatoires. Ainsi, ce test ELISA sur lequel nous avons travaillé ne peut pas être utilisé pour la détection de la zéaralénone dans l'urine des vaches. De plus, ce kit n'est pas simple à mettre en œuvre et doit être, selon nous, réservé aux laboratoires.

Néanmoins, il existe un second kit disponible, qui lui est validé pour une utilisation sur les urines des bovins, mais qui est aussi plus long à mettre en place.

Thèse de Mme FORAISON Jessica

**Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire**

Loïc CORMUN



**Le Directeur Général
VetAgro Sup**

Par déléation
Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Le Président de la thèse



Vu et permis d'imprimer

Lyon, le **30 MAI 2013**

**Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY**



BIBLIOGRAPHIE

- AFSSA. 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final*. 308 p.
- AKSOY A., YAVUZ O., DAS Y.K., GUVENC D., MUGLALI O.H. 2009.** Occurrence of aflatoxin B1, T-2 toxin and zearalenone in compound animal feed. *Journal of animal and veterinary advances*. Vol 8, pp. 403-407.
- ANCEAU C., GOFFAUX M.J. 2005.** Préserver la qualité des céréales au cours du stockage. *Les nouvelles du printemps .2^{ème} trimestre*, pp. 22-24.
- ANIMAL FEED NEWS. 2008.** *Mycotoxins in ruminants. All About Feed*. [en ligne] URL : <http://www.allaboutfeed.net/Home/General/2008/4/Mycotoxins-in-ruminants-AAF002443W/>, page consultée le 10 décembre 2012.
- ARVALIS, Institut du végétal. 2010.** Prévenir et gérer le risque fusariotoxines. 3^{ème} séminaire mycotoxines, Paris. [en ligne] URL : http://www.arvalis-tv.fr/fr/evenements/82_colloque-mycotoxines-2010, page consultée le 3 mai 2012.
- ARZUL P., ALVES DE OLIVEIRA L. 2010.** *Les mycotoxines, leur impact en élevage laitier*. Journées nationales des GTV, Lille. pp. 639-643.
- BAILLY J.D., BAILLY S., LE BARS J. 2006.** Les altérations fongiques de l'ensilage de maïs et leurs conséquences, conduite à tenir. *Bulletin des GTV 035*. pp. 37-41.
- BAILLY, J.D. 2008.** *Troubles de la reproduction chez les ruminants : rôle possible des moisissures et des mycotoxines*. Journées nationales des GTV, Nantes. pp. 985-993.
- BIO ADVANCE. 2011.** ELISA Sérologie Infectieuse : Principe du test. [en ligne] URL : <http://www.bio-advance.fr/index.php/principe-du-test-elisa-si.html>, page consultée le 10 mai 2012.
- BIOMIN. 2009.** Mycotoxin report. 1st + 2nd Quarter, *rapport final*. 2 p. [en ligne] URL : http://www.centrollabthai.com/web/uploadfiles/pdf/MycotoxinReport_20090825.pdf, page consultée le 20 mars 2012.
- BUENO D.J., DI MARCO L., OLIVIER G., BARDON A. 2005.** In vitro binding of zearalenone to different adsorbents. *Journal of Food Protection*. Vol 68, pp. 613-615.
- BURMISTROVA N.A., GORYACHEVA I.Yu, BASOVA E.Yu, FRANKI A-S., ELEWAUT D., VAN BENEDEN K., DEFORCE D., VAN PETEGHEM C., DE SAEGER S. 2009.** Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol 395, pp. 1301-1307.
- Centre De Developpement Du Porc Du Quebec. 2002.** Les mycotoxines et le système immunitaire porcin. [en ligne] URL : http://www.cdpc.ca/getattachment/Information-sur-le-secteur-porcin/Mycotoxine/Sensibilite-de-l-animal/Etat-de-sante/syst_immun.pdf.aspx, page consultée le 15 août 2011.
- CEROM, Centre de recherche sur les grains inc. 2003.** *La ventilation: un outil pr la conservation des grains. Notes N°3.01*.
- CEROM, Centre de recherche sur les grains inc. 2002.** *Ventilateurs et systèmes de ventilation pour les grains. Bulletin technique séchage et entreposage N°5.05*.

CHARMLEY E., TRENHOLM H.L., THOMPSON B.K., VUDATHALA D., NICHOLSON J.W.G., PRELUSKY D.B., CHARMLEY L.L. 1993. Influence of level of Deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *Journal of Dairy Science*. Vol 76, pp. 3580-3587.

CINQ-MARS, D. 2004. Les mycotoxines dans les fourrages... sont-elles présentes avant la récolte ? *Agri Réseau*. pp. 1-3. [en ligne] URL : <http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/documents/Mycotoxines.pdf>, page consultée le 18 avril 2012.

Commission du CODEX ALIMENTARIUS, Recommandation 2003/598/CE. 2003. Code d'usages pour la prévention et la réduction de la contamination par la patuline du jus de pomme et du jus de pomme utilisé comme ingrédient dans la fabrication d'autres boissons. *Fiche technique, Journal officiel de l'Union européenne du 12.08.2003*. L 203/54-59.

CONSOGLOBE. 2012. Le bio, dangereux ou bon pour la santé ? [en ligne] URL : <http://www.consoglobe.com/bio-dangereux-sante-2174-cg/2>, page consultée le 05 septembre 2012.

COPPOCK R.W., MOSTROM M.S., SPARLING C.G., JACOBSEN B., ROSS S.C. 1990. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Veterinary and Human Toxicology*. Vol 32, pp. 246-248.

DANICKE S., SWIECH E., BURACZEWSKA L., UEBERSCHAR K.H. 2005. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Vol 89, pp. 268–276.

DE ANDRES F., ZOUGAGH M., CASTANEDA G., RIOS A. 2008. Determination of zearalenone and its metabolites in urine samples by liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon nanotube-modified electrode. *Journal of Chromatography A*. Vol 1212, pp. 54-60.

DIAZ, D. (ed) 2005. *The Mycotoxin blue book*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 26,40,105-109,147,160,198-199,238-240,289-291,300.

DONG M., HE X.J., TULAYAKUL P., LI J.Y., DONG K.S., MANABE N., NAKAYAMA H., KUMAGAI S. 2010 (a). The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goat. *Toxicon*. Vol 55, pp. 523–530.

DONG M., TULAYAKUL P., LI J.Y., DONG K-S., MANABE N., KUMAGAI S. 2010 (b). Metabolic Conversion of Zearalenone to alpha-Zearalenol by Goat Tissues. *Journal of Veterinary Medicine Science*. Vol 72, pp. 307–312.

DRAGSBAEK RASMUSSEN A., BJERG NIELSEN M., PIECHNIK V. 2000. Zéaralenone and metabolites in urine samples analysed for zéranol. *Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Danish Veterinary and Food Administration*. 8 p.

DRIEHUIS F., SPANJER M.C., SCHOLTEN J.M., Te GIFFEL M.C. 2008. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science*. Vol 91, pp. 4261-4271.

DUQUESNOY, N. 2005. Les substances naturelles à effet oestrogénique dans l'alimentation des ruminants : revue de la littérature. *Annales de Médecine Vétérinaire*. Vol 149, pp. 202-212.

- DUVAL, J. 1994.** L'ergot du seigle, Projet pour l'agriculture écologique : *Agro-bio-340-03*.
- FANGEAT, L. 2008.** Les mycotoxines chez les bovins. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon*. 149 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003.** Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003. *Étude FAO : Alimentation et nutrition n°81*. 188 p.
- FOURNIER A., LEMELIN M. 2000.** Du maïs à surveiller. *Agri réseau*. pp. 1-2. [en ligne] URL : <http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/Documents/bov36-2.htm>, page consultée le 03 mars 2012.
- FOURNIER, A. 2006.** Redoutables mycotoxines. *Le bulletin des agriculteurs*. pp. 37-40.
- GAUMY J.L., BAILLY J.D., BERNARD G., GUERRE P. 2001 (a).** Zéaralénone : origine et effets chez les animaux d'élevage. *Revue Médecine vétérinaire*. Tome 152, Vol 2, pp. 123-136.
- GAUMY J.L. BAILLY J.D, BURGAT V., GUERRE P. 2001 (b).** Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de Médecine Vétérinaire*. Tome 152, Vol 3 pp. 219-234.
- GOUSSE R., BERNARD C-R., WEIL A. 1973.** Oestrogénisme d'origine alimentaire en élevage, la F-2 (ou zéaralénone). *Industries de l'Alimentation Animale* . Vol 11, pp. 11-19.
- GRANCHER, D. 2011.** *Mycotoxines : mythe ou réalité? Démarche diagnostique*. GTV Rhône Alpes, Lyon. pp. 78-81.
- HASSAN M., FATEMEH R., KOBRA B. 2010.** Zearalenone is bioactivated in the river Buffalo (*Bubalus bubalis*): hepatic biotransformation. *Tropical animal health and production*. Vol 42, pp. 1229-1234.
- HAURAY, K. 2000.** Avortements d'origine alimentaire chez les bovins. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire, Toulouse*. 114 p.
- HILDEBRAND B., BOGUHN J., DAENICKE S. 2012.** Effect of *Fusarium* toxin-contaminated triticale and forage-to-concentrate ratio on fermentation and microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. Vol 96, pp. 307-318.
- Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales. 2011.** Mycotoxines : Guide d'utilisation des kits immunoenzymatiques format microplaques (kits ELISA). 31 p.
- JARD, G. 2009.** Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. *Thèse pour le diplôme de doctorat de l'Université de Toulouse*. 195 p.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2000.** Safety evaluation of certain food additives. *Seventy-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Genève*.
- JODLBAUER J., ZOLLNER P., LINDER W. 2000.** Determination of zeranol, taleranol, zearalenone, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*. Vol 51, pp. 681 - 687.
- Recommandation 2006/576/CE. 2006.** Recommandation concernant la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à l'alimentation animale. *Journal officiel de l'Union européenne du 17 août 2006*.

- KALLELA K., ETTALA E. 1984.** The oestrogenic fusarium toxin zearalenone in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nord Vet med.* Vol 36, pp. 305-309.
- KALLELA K., VASENIUS L. 1982.** The effects of rumen fluid on the content of Zearalenone in animal fodder. *Nord Vet Med.* Vol 34, pp. 336-339.
- KHELIL-ARFA H., BOUDON A., MAXIN G., FAVERDIN P. 2011.** Prédiction des flux d'eau consommée et excrétée par les vaches laitières en conditions de thermoneutralité. 18^{ème} Journées 3R (Rencontre Recherche Ruminants), Séance : Alimentation. Centre des Congrès de la Villette. pp. 117-120.
- KIESSLING K-H., PETTERSSON H., SANDHOLM K., OLSEN M. 1984.** Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone, and three Trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Applied and environmental microbiology.* Vol 47, pp. 1070-1073.
- KLEINOVA M., ZOLLNER P., KAHLBACHER H., HOCHSTEINER W., LINDNER W. 2002.** Metabolic profiles of the mycotoxin Zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver and muscle of heifers. *Journal of Agricultural and food chemistry.* Vol 50, pp. 4769-4776.
- LAUMONNIER, G. 2006.** Analyses de fourrages, applications à l'ensilage de maïs; méthodes, données classiques, données fournies par les firmes d'aliments. *Bulletin des GTV 035.* Juillet pp. 42-43.
- LEFEBVRE D., BLAIS C., ARSENEAU D. 2003.** La contamination des aliments par les mycotoxines, un problème en 2003. *Agri Réseau.* pp. 1-4. [en ligne] URL : [http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/Documents/CRAAQ%20Contamination%20myco toxines.pdf](http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/Documents/CRAAQ%20Contamination%20myco%20toxines.pdf), page consultée le 17 novembre 2012.
- LIOI M.B., SANTORO A., BARBIERI R., SALZANO S., URSINI M.V. 2004.** Ochratoxin A and zearalenone : a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis.* Vol 557, pp. 19-27.
- LIU Y., ZHANG C., YU X., ZHANG Z., ZHANG X., LIU R., LIU X., GONG Z. 2007.** Development and evaluation of immunoassay for zeranol in bovine urine. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* Vol 8, pp. 900-905.
- LYNCH, G.P. 2005.** Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *Journal of dairy science.* Vol 55, pp. 1243-1255.
- MacDOUGALD O.A., THULIN A.J., WELDON W.C., PESTKA J.J., FOGWELL R.L. 1990.** Effects of immunizing gilts against zearalenone on height of vaginal epithelium and urinary excretion of zearalenone. *Journal of Animal Science.* Vol 68, pp. 3713-3718.
- MALEKINEJAD M., MAAS-BAKKER R., FINK-GREMMELS J. 2006.** Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The veterinary journal.* Vol 172, pp. 96-102.
- MEYER K., USLEBER E., DIETRICH R. 2002.** Zearalenone metabolites in bovine bile. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* Vol 53, pp. 115-117.
- MILANO G.D., ODRIOZOLA E., LOPEZ T.A. 1991.** Lack of effect of a diet containing zearalenone on spermatogenesis in rams. *Veterinary Record.* Vol 129, pp. 33-35.

MILES C.O., ERASMUSON A.F., WILKINS A.L., TOWERS N.R., SMITH B.L., GARTHWAITE I., SCAHILL B.G., HANSEN R.P. 1996. Ovine Metabolism of Zearalenone to alpha-Zearalanol (Zeranol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 44, pp. 3244-3250.

MINERVINI F., GIANNOCCARO A., CAVALLINI A., VISCONTI A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters*. Vol 159, pp. 272-283.

MOSCHINI M., MASOERO F., BERTUZZI T. 1999. In vitro rumen metabolism of zearalenone. *A.S.P.A. 13th congress, Piacenza*. pp. 363-365.

Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA). 2008. Fiche technique : L'aération des grains. *ISSN 1198-7138*. 5 p. [en ligne] URL : <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/fact/87-053.htm>, page consultée le 09 mars 2012.

PFEIFFER E., HEYTING A., METZLER M. 2007. Novel oxidative metabolites of the mycoestrogen zearalenone in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*. Vol 51, pp. 867-871.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. 1999. Chapitre 1 : Définition et origines des mycotoxines, pp. 3-14. Dans : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Section de l'Alimentation et de la Nutrition. Ed. TEC & DOC, Paris, 457 p.

PLASENCIA J., MIROCHA C.J., PAWLOSKY R.J., SMITH J.F. 1990. Analysis of zearalenone and alpha-zearalanol in urine of ruminants using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Association Official Analytical Chemistry*. Vol 73, pp. 973-980.

PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., LAWRENCE G.A., SCOTT P.M. 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *Journal of Environmental Science and Health*. Vol 25, pp. 87-103.

ROUSSEAU, C. 2006. Utilisation pratique de l'ensilage de maïs dans l'alimentation des vaches laitières. *Bulletin des GTV 035*. pp. 64-70.

ROUSSEL M., LEMARCHAND M., BERNARD M., DREYFUS J. 2007. Fiche technique du service régional de la protection des végétaux de Haute-Normandie : la Patuline. pp. 1-3. [en ligne] URL : http://draaf.haute-normandie.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/FT_patuline_cle458ff7.pdf, page consultée le 05 septembre 2012.

SHIER, W.T. 1998. Oestrogenic mycotoxins. *Revue de médecine vétérinaire*. Vol 146, pp. 599-604.

SMITH J.F., DI MENNA M.E., MCGOWAN L.T. 1990. Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *Journals of reproduction and fertility*. Vol 89, pp. 99-106.

STEIBLEN, G. 1996. Génotoxicité de la zéaralénone : implication du récepteur Ah. *Thèse d'exercice en pharmacie*.

TABUC, C. 2007. Etude fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. *Thèse pour le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest, Toulouse*. 190 p.

- TAKAGI M., UNO S., KOKUSHI E., SHIGA S., MUKAI S., KURIYAGAWA T., TAKAGAKI K., HASUNUMA H., MATSUMOTO D., OKAMOTO K., SHAHADA F., CHENGA T., DEGUCHI E., FINK-GREMMELS J. 2011.** Measurement of urinary zearalenone concentrations for monitoring natural feed contamination in cattle herds: On-farm trials 1. *Journal of Animal Science*. Vol 89, pp. 287-296.
- WEAVER G.A., KURTZ H.J., BERHENS J.C., ROBINSON T.S., SEGUIN B.E., BATES F.Y., MIROCHA C.J. 1986.** Effect of the zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary research*. Vol 47, pp. 1395-1397.
- WHITLOW L.W., HAGLER Jr. W.M. 2008.** Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle : Effects, Prevention and Treatment. *WCDS Advances in Dairy Technology*. Vol 20, pp. 195-209.
- WHITLOW L.W., HAGLER Jr. W.M., HOPKINS B.A., DIAZ D.E. 2005.** Mycotoxins : Occurrence in Feeds, Effects on Dairy Cattle, Prevention and Treatment. *North Carolina State University, Raleigh, NC*, pp. 1-17.
- WHITLOW, W. 2001.** La contamination des aliments par les mycotoxines: un facteur de stress additionnel pr les bovins laitiers. *Symposium sur les bovins laitiers, St-Hyacinthe, "Des défis? Des solutions!"*. CRAAQ.
- YANG J., ZHANG Y., WANG Y., CUI S. 2007.** Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicology in Vitro*. Vol 21, pp. 558–565.
- YE W., XU P., THRELFALL W.R., JEN R., LI H., LIN S-H., KUO C-T., LIN Y.C. 2009.** Zeranol enhances the proliferation of pre-adipocytes in beef heifers. *Anticancer Research*. Vol 29, pp. 5045-5052.
- YIANNIKOURIS A., JOUANY J-P. 2002.** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA, Production animale*. Vol 15, pp. 3-16.
- ZAIN, M. 2011.** Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of saudi chemical society*. Vol 15, pp. 129-144.
- ZINEDINE A., SORIANO J.M., MOLTO J.C., MANES J. 2007.** Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulation and intake of zearalenone : an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical toxicology*. Vol 45, pp. 1-18.

FORAISON Jessica

Excrétion urinaire des mycotoxines chez les bovins : essai d'utilisation d'un test ELISA de détection de la Zéaralénone dans les urines

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 21 juin 2013

RESUME :

Notre étude a consisté à tester la validité du kit « RIDASCREEN FAST Zearalenon SC » sur les urines de bovins. Ce test ELISA permet de détecter la présence de zéaralénone, une mycotoxine ayant des conséquences néfastes sur la fertilité et entraînant la féminisation des mâles. En vue d'évaluer ce test, nous avons utilisé 7 vaches laitières à qui nous avons distribué 3 concentrations différentes de zéaralénone : 0,02mg/vache ; 1mg/vache et 1,3mg/vache. L'expérimentation s'est déroulée sur 3 semaines, durant lesquelles nous avons donné des bolus de mycotoxines une fois par jour pendant trois jours, puis les quatre jours suivants, les animaux ne recevaient que leur ration. Les urines étaient récupérées tous les jours, soit par miction naturelle, soit par sondage urinaire. Chaque matin, l'état sanitaire des animaux était évalué, notamment par prise de la température rectale et par auscultation ruminale. Aucune anomalie majeure n'a été détectée au cours de cette expérience. Les échantillons ont été conservés congelés, à l'abri de la lumière et les tests ELISA ont été réalisés par nos soins. Les résultats obtenus sont aléatoires, puisque non répétables, et non cohérents par rapport aux doses distribuées. Par ailleurs, ces tests sont difficilement reproductibles pour un manipulateur peu expérimenté.

En conclusion, kit Ridascreen® FAST Zearalenon SC n'est pas validé sur l'urine. Il ne peut donc pas être utilisé pour la détection de la zéaralénone dans l'urine des bovins. De plus, le fabricant vend cela comme un test simple pour les laboratoires, mais il ne peut être utilisé que dans ce cadre là et pas par un vétérinaire lambda. En effet, beaucoup trop de manipulations sont nécessaires pour que ce kit soit utilisé sur le terrain.

MOTS CLES :

- Mycotoxines
- Bovins
- Excrétion urinaire
- Zéaralénone

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Frédéric BERARD

1^{er} Assesseur : Monsieur le Professeur Loïc COMMUN

2^{ème} Assesseur : Monsieur le Professeur Laurent ALVES DE OLIVEIRA

DATE DE SOUTENANCE : Le 21 juin 2013

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Les Granges
73800 LES MOLLETES