



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale

Rapport final

Mars 2009

◆ **Coordination rédactionnelle**
Jean Marc Fremy

◆ **Coordination éditoriale**
Carole Thomann

PREAMBULE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) s'est saisie de l'évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale.

En 1998, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) avait rédigé un rapport qui faisait le point sur les mycotoxines. De nombreuses questions venant des industriels et des consommateurs mais également des scientifiques sont régulièrement soulevées sur la toxicité des mycotoxines. Si pour certaines de ces mycotoxines, les propriétés toxicologiques commencent à être bien connues, pour d'autres, leur impact toxique est contesté ou mal identifié.

L'objectif de cette autosaisine de l'Afssa est de procéder à une revue des connaissances et d'approfondir plus particulièrement certains aspects, notamment l'impact des mycotoxines sur l'alimentation et la santé animales.

Un groupe de travail inter-comités a été chargé de cette revue, focalisée sur les mycotoxines ayant un impact sur la santé humaine et/ou animale. En se fondant sur les données bibliographiques récentes et les dernières évaluations réalisées par différentes instances internationales, ce rapport détaillé présente pour chaque mycotoxine : les méthodes d'analyse, les facteurs favorisant leur production à partir du développement des moisissures, leurs propriétés toxicologiques, leurs effets sur la santé humaine et l'exposition de l'homme au travers des denrées végétales, animales et des produits finis, leurs effets sur la santé animale l'exposition des animaux au travers de leur alimentation et le transfert dans les produits animaux, les données de contamination des denrées humaines et animales disponibles ainsi que la réglementation. Ce rapport détaillé inclut l'ensemble de la bibliographie analysée.

En accord avec les Comités d'experts spécialisés "Résidus et contaminants chimiques et physiques" et "Alimentation animale", il a été décidé de proposer une restitution de ce travail sur les mycotoxines en deux temps :

- un rapport préliminaire synthétique paru fin 2006 présentant :
 - un état actualisé des connaissances sur chaque mycotoxine étudiée incluant une estimation de l'exposition alimentaire de la population française ;
 - des recommandations en termes de recherche destinées à améliorer nos connaissances sur les dangers de certaines de ces toxines et leur transfert dans les produits animaux ;
 - des recommandations, le cas échéant, sur le bien-fondé de mise en œuvre de plans de surveillance et/ou de contrôle et la mise au point de techniques analytiques plus sensibles ;
- ce rapport détaillé, dans lequel, outre tous les aspects du rapport préliminaire synthétique traités mais cette fois de façon développée et actualisée, est présentée une évaluation de l'exposition des animaux aux mycotoxines au travers de leur alimentation.

Composition du groupe de travail

Présidence :

Pierre GALTIER Laboratoire Pharmacologie-Toxicologie INRA – Toulouse

Membres du Comité d'experts spécialisé "**RESIDUS ET CONTAMINANTS CHIMIQUES ET PHYSIQUES**"

Pierre GALTIER Laboratoire Pharmacologie-Toxicologie, INRA – Toulouse
Bruno LE BIZEC LABERCA, Ecole Nationale Vétérinaire – Nantes
Jean-Charles LEBLANC PASER – DERNS - AFSSA - Maisons-Alfort
Isabelle OSWALD Laboratoire Pharmacologie-Toxicologie, INRA – Toulouse

Membres du Comité d'experts spécialisé "**ALIMENTATION ANIMALE**"

Christine BUREL Laboratoire d'Etudes et de Recherches Avicoles et Porcines
AFSSA – Ploufragan
Michel ETIENNE UMR Systèmes d'élevage, nutrition animale et humaine, INRA -
Saint-Gilles
François GROSJEAN Arvalis, Institut du Végétal – Paris
Jean-Pierre JOUANY Unité de recherche sur les herbivores, INRA - Clermont-Ferrand
Bernard-Marie PARAGON Ecole Nationale Vétérinaire – Maisons-Alfort

Autres experts

Sylviane DRAGACCI LERQAP - AFSSA – Maisons-Alfort
Jean-Marc FREMY UERPC – DERNS - AFSSA - Maisons-Alfort
Philippe GUERRE Ecole Nationale Vétérinaire – Toulouse
Virginie HOSSEN LERQAP- Unité TOP - AFSSA – Maisons-Alfort
Françoise JANIN AFSSA – DS - Maisons-Alfort
Dominique PARENT-MASSIN Laboratoire de toxicologie alimentaire, Université de Bretagne
occidentale – Brest
Daniel THOUVENOT Ecole supérieure de microbiologie et sécurité alimentaire – Brest

Coordination scientifique

Jean-Marc FREMY UERPC – DERNS - AFSSA - Maisons-Alfort
Sophie GALLOTTI UERPC – DERNS - AFSSA - Maisons-Alfort
Alexandra TARD PASER – DERNS - AFSSA – Maisons-Alfort

Rédaction du produit de l'expertise

La rédaction des chapitres a été organisée en tâches transversales confiées à des rédacteurs pour certains thèmes spécifiques* et la coordination a été confiée à certains membres dont les noms sont mentionnés en début de chapitre.

*Christine BUREL (poissons), Sylviane DRAGACCI (méthodes analytiques), Michel ETIENNE (porcins), Jean-Marc FREMY (effets des procédés, méthodes analytiques, réglementation), François GROSJEAN (alimentation animale), Jean-Pierre JOUANY (ruminants), Pierre GALTIER (données toxicologiques), Philippe GUERRE (volailles), Bruno LE BIZEC (méthodes analytiques), Jean-Charles LEBLANC (exposition humaine), Bernard-Marie PARAGON (animaux de compagnie et de loisirs), Dominique PARENT-MASSIN (données toxicologiques), Isabelle OSWALD (données toxicologiques), Daniel THOUVENOT (facteurs influençant la toxogénèse), Alexandra TARD (exposition animale).

Sigles

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
SCF : Scientific Committee of Food (Comité scientifique européen de l'alimentation humaine)
AESA/EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments/European Food Safety Authority
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
CE : Commission Européenne

DHT : Dose Hebdomadaire Tolérable
DHTP : Dose Hebdomadaire Tolérable provisoire
DJT : Dose Journalière Tolérable
DMT : Dose Maximale Tolérable
LOAEL : Dose minimale avec un effet nocif observé (Lowest observed adverse effect level)
NOAEL : Dose sans effet nocif observé (No observed adverse effect level)
NOEL : Dose sans effet observé (No observed effect level)
DL50 : Dose létale 50 : dose d'une substance qui entraîne la mort de 50 % des animaux

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer (acronyme anglais IARC)
Classement établi par le centre international de recherche sur le cancer (Préambule des monographies CIRC – 19 janvier 1999)

- Groupe 1 : L'agent (le mélange) est cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 2A : L'agent (le mélange) est probablement cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont probablement cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 2B : L'agent (le mélange) est peut-être cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont peut-être cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 3 : L'agent (le mélange, les circonstances d'exposition) ne peut être classé quant à sa cancérigénicité pour l'homme (les études ne peuvent pas être interprétées en terme de présence ou d'absence d'effet cancérigène en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes, ou aucune donnée expérimentale de cancérigénicité n'est disponible).
- Groupe 4 : L'agent (le mélange) n'est probablement pas cancérigène pour l'homme.

A_w : activité de l'eau
g : gramme
ng : nanogramme
µg : microgramme
p.c. : poids corporel (homme, animal)
p.v. : poids vif (animal)

NEB : Néphropathie Endémique des Balkans (BEN en anglais)

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
RIA : Radio Immuno Assay (dosage radio-immunologique)
CPG ou GC : chromatographie en phase gazeuse (Gas chromatography)
SM ou MS : spectrométrie de masse (Mass spectrometry)
UV : ultra-violet
ECD : détecteur à capture d'électrons (electron capture detector)
CCM : chromatographie sur couche mince
CLHP ou LC : chromatographie liquide haute performance (Liquid chromatography)
CIA : chromatographie d'immuno affinité
LOQ : limite de quantification (limit of quantification)
LOD : limite de détection (limit of detection)

ADN : acide désoxyribonucléique
ARNt : acide ribonucléique de transfert

Sommaire

INTRODUCTION	8
LES AFLATOXINES	13
- Propriétés physico-chimiques	13
- Méthodes d'analyse	14
- Facteurs influençant la teneur en aflatoxines dans les denrées	15
- Devenir et propriétés toxicologiques	17
- Exposition de l'homme aux aflatoxines par voie alimentaire	23
- Exposition animale et transfert dans les produits animaux	24
- Réglementation	42
- Surveillance et contrôle	43
- Conclusion et recommandations	44
LES OCHRATOXINES	45
- Propriétés physico-chimiques	45
- Méthodes d'analyse	46
- Facteurs influençant la teneur en ochratoxine A dans les denrées	48
- Devenir et propriétés toxicologiques	51
- Exposition de l'homme à l'ochratoxine A par voie alimentaire	59
- Exposition animale et transfert dans les produits animaux	62
- Réglementation	74
- Surveillance et contrôle	75
- Conclusion et recommandations	75
LES TRICHOHECENES	77
- Propriétés physico-chimiques	77
- Méthodes d'analyse	79
- Facteurs influençant la teneur en trichothécènes dans les denrées	81
- Devenir et propriétés toxicologiques	84
- Exposition de l'homme aux trichothécènes par voie alimentaire	97
- Exposition animale et transfert dans les produits animaux	99
- Réglementation	122
- Surveillance et contrôle	123
- Conclusion et recommandations	124
LA ZEARALENONE	126
- Propriétés physico-chimiques	126
- Méthodes d'analyse	127
- Facteurs influençant la teneur en zéaralénone dans les denrées	128
- Devenir et propriétés toxicologiques	129
- Exposition de l'homme à la zéaralénone par voie alimentaire	133
- Exposition animale et transfert dans les produits animaux	135
- Réglementation	145
- Surveillance et contrôle	146
- Conclusion et recommandations	146
LES FUMONISINES	148
- Propriétés physico-chimiques	148
- Méthodes d'analyse	149
- Facteurs influençant la teneur en fumonisines dans les denrées	150
- Devenir et propriétés toxicologiques	151
- Exposition de l'homme aux fumonisines par voie alimentaire	159

- Exposition animale et transfert dans les produits animaux-----	160
- Réglementation -----	174
- Surveillance et contrôle -----	175
- Conclusion et recommandations -----	175
LA PATULINE-----	178
- Propriétés physico-chimiques -----	178
- Méthodes d'analyse -----	178
- Facteurs influençant la teneur en patuline dans les denrées -----	179
- Devenir et propriétés toxicologiques -----	181
- Exposition de l'homme à la patuline par voie alimentaire -----	186
- Exposition animale et transfert dans les produits animaux-----	187
- Réglementation -----	188
- Surveillance et contrôle -----	189
- Conclusion et recommandations -----	189
LES AUTRES MYCOTOXINES-----	190
les toxines de <i>Claviceps purpurea</i> -----	192
La citrinine-----	197
Les toxines d' <i>Alternaria</i> -----	202
L'acide cyclopiazonique-----	207
Les toxines trémorgènes d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> -----	212
Les sporidesmines -----	218
Les stachybotryotoxines -----	221
Les toxines d'endophytes -----	225
Les phomopsines-----	230
CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS GENERALES-----	235
ANNEXE 1 Analyses des mycotoxines dans les aliments -----	244
ANNEXE 2 Exposition animale : méthodologie de calcul -----	261

Introduction

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures (champignons microscopiques) pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seuls une trentaine possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, grains, fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés contenant ces matières premières destinés à l'alimentation humaine et animale.

Les mycotoxines sont produites par des moisissures appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (tableau 1).

Tableau 1 : Mycotoxines et moisissures productrices associées retrouvées en alimentation humaine et/ou animale

	Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Mycotoxines réglementées ou en cours de réglementation	Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
	Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i>
	Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssochlamys nivea</i>
	Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
	Trichothécènes (groupes A et B)	<i>Fusarium langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>
	Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> .
	Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. fusiformis</i>
Autres mycotoxines	Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
	Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i>
	Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i>
	Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
	Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
	Stachybotryotoxines	<i>Stachybotrys chartarum</i>
	Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrème B)	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>
	Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberrelum</i> <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>	

Les moisissures toxigènes

Deux groupes de champignons (ou moisissures) toxigènes (producteurs de mycotoxines) peuvent être distingués. Le premier groupe est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant la ou les mycotoxine(s) sur les plantes au niveau du champ: il sera question de « toxines de champs ». L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte ; on les qualifiera de « toxines de stockage ». Ainsi, des champignons du sol ou des débris de plantes peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions le permettent.

Des moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs, de l'humidité (activité en eau A_w supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires pouvant être contaminés. Les aliments concernés peuvent être classés en deux grands groupes : les aliments et produits d'origine végétale, et par transfert ceux d'origine animale. Parmi les produits et aliments d'origine végétale, les céréales et leurs produits dérivés (y compris les produits de fermentation tels que les bières) présentent un facteur de risque compte tenu de la fréquence de contamination et de leur consommation importante en Europe quel que soit le régime alimentaire. Les autres produits d'origine végétale sont les fruits (y compris leur jus et leurs produits de fermentation tels que les vin et cidre et leurs dérivés secs), les épices, le café et le cacao et les jus et produits de fermentation). Des produits et aliments d'origine animale tels que le lait, le sang, les abats et tout ce qui en dérive doivent retenir l'attention, du fait qu'ils peuvent contenir des traces de mycotoxines ou des métabolites des mycotoxines contenues dans les aliments ingérés par les animaux d'élevage.

Plusieurs espèces fongiques sont utilisées depuis des siècles pour la préparation d'aliments en occident et en extrême-orient dans l'élaboration de condiments ou de produits comme les fromages et les salaisons et, de ce fait, doivent répondre à des critères stricts de sécurité.. De nouvelles utilisations de micromycètes sont freinées par la crainte de présence de mycotoxines. Autrefois sélectionnées sur la base de l'absence de toxicité observable, elles sont aujourd'hui passées au crible pour détecter des gènes de toxigenèse.

Les mycotoxines

Les mycotoxines peuvent être classées en polycétoacides, terpènes, cyclopeptides et métabolites azotés selon leur origine biologique et leur structure. On peut aussi classer les mycotoxines plus simplement selon leurs principaux effets toxiques. On distingue parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire les aflatoxines, les ochratoxines et l'ochratoxine A en particulier, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone et les trichothécènes et tout spécialement le déoxynivalénol. Il convient de remarquer que dans un groupe structural de toxines, la toxicité peut varier considérablement d'une toxine à une autre et que le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même, mais peut aussi provenir de ses métabolites.

Les mycotoxines et le risque pour le consommateur

La toxicité de ces contaminants naturels peut être aiguë ou chronique vis à vis des organismes consommant des denrées alimentaires contaminées.

Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée (exposition unique à une forte dose), mais il demeure exceptionnel en Europe d'être exposé à des doses toxiques en une seule ingestion d'aliments contaminés, provoquant ainsi une « mycotoxicose » aiguë.

Historiquement, la mycotoxicose humaine la plus anciennement connue est l'ergotisme. Il s'agit d'une pathologie également appelée "feu de Saint-Antoine", "feu sacré" ou "mal des ardents". Elle est provoquée par les toxines de *Claviceps* élaborées par l'ergot de seigle et se présentait sous la forme de délires, prostrations, douleurs violentes, abcès, gangrènes des extrémités aboutissant à des infirmités graves et incurables. Des épidémies ont sévi du 8^{ème} au 16^{ème} siècle en raison des conditions d'alimentation misérables des populations, en particulier la consommation de farines contaminées par les sclérotes de ces champignons. En France, le dernier épisode se serait produit en 1951 à Pont Saint-Esprit, dans le Gard.

Les effets chroniques (exposition répétée à de faibles voire très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence de ces toxines.

Les effets toxiques sont de nature variée (tableau 2). Certaines toxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent œstrogéniques (zéaralénone), immuno/hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (toxines trémorgènes). Certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes.

Tableau 2 : Effets des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 + M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par des cytochromes P450 Conjugaison aux Glutathion-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP Détoxification par les peptidases
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse <i>in vitro</i>	Inhibition indirecte d'enzymes
Trichothécènes (groupes A et B)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Zéaralénone	Fertilité et Reproduction	Liaison aux récepteurs œstrogéniques Bioactivation par des déshydrogénases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

Pour les consommateurs humains, un autre type de risque est indirect car induit par la présence possible de résidus dans les productions issues des animaux de rente exposés à une alimentation contaminée par les mycotoxines. Ces résidus correspondent à la toxine elle-même et/ou à des métabolites bioformés conservant les propriétés toxiques du composé parental. Les espèces d'élevage peuvent donc constituer un vecteur de ces toxines ou de leurs métabolites dans des productions telles que les abats, le lait ou le sang. C'est le cas notamment de l'aflatoxine B1, dont le métabolite l'aflatoxine M1 est retrouvé dans le lait des mammifères lorsque ceux-ci ont ingéré des aliments contaminés par l'aflatoxine B1.

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.

De plus, il est à considérer la capacité que peut avoir une même moisissure à produire différentes mycotoxines. A l'inverse une même mycotoxine pourra être produite par plusieurs espèces et genres de moisissures (voir tableau 1). Ainsi, plusieurs toxines d'une même famille structurale ou présentant des structures différentes peuvent se retrouver dans le même produit alimentaire et, *a fortiori*, dans une ration composée de divers ingrédients alimentaires : on parle alors de multicontamination. Cette situation naturelle pose des interrogations sur les interactions toxiques qui peuvent s'opérer et ainsi pourrait se traduire par un effet antagoniste ou encore additif ou synergique. Cet aspect toxicologique est peu documenté et ne sera évoqué que pour certaines mycotoxines produites par les mêmes moisissures.

Les mycotoxines et le risque pour l'animal

Les animaux monogastriques d'élevage, porcs et volailles sont particulièrement exposés aux mycotoxicoses du fait de l'importance de la part des céréales dans leur alimentation et de l'absence du réservoir ruminal contenant des microorganismes capables de dégrader les toxines avant leur absorption intestinale. La sensibilité des volailles aux aflatoxines a été d'ailleurs à l'origine de la découverte de ces toxines après un épisode brutal d'hépatotoxicité létale survenu en 1960 dans des élevages de dindes en Grande-Bretagne. Ce fait a été à l'origine de la mise en évidence de la relation moisissures-toxines-pathologies et du développement de la mycotoxicologie moderne. De même, de nombreux cas de néphropathie chez le porc signalés quelques années plus tard au Danemark ont conduit à la découverte du caractère contaminant naturel de l'ochratoxine A dans l'orge et de la qualification de son pouvoir toxique.

En France, en dehors de cas sporadiques correspondant à des accidents aigus observables dans différentes espèces animales, l'essentiel des problèmes est lié à une contamination chronique par les fusariotoxines (trichothécènes, zéaralène, fumonisines) des aliments produits en France ou importés. Les problèmes ponctuels dus à l'importation de matières premières contaminées justifient des procédures de surveillance et de contrôle. Enfin, le développement des techniques de conservation des fourrages à la ferme sous forme humide (ensilages¹, balles rondes enrubannées) et l'utilisation d'aliments humides comme les drêches et les pulpes de betterave peuvent également constituer un risque de développement des moisissures et de présence de mycotoxines

Evaluation du risque mycotoxique

Issues d'une contamination généralement reconnue comme d'origine végétale, les mycotoxines constituent un problème très actuel de qualité et de sécurité sanitaire des aliments. Si la mise en place de réglementations est déjà intervenue à propos des aflatoxines et de l'ergot en alimentation humaine et animale, de l'ochratoxine A, de la patuline, du déoxynivalénol, de la zéaralène et des fumonisines en alimentation humaine, elle est en préparation pour l'ochratoxine A, le déoxynivalénol, la zéaralène et les fumonisines en alimentation animale.

Le risque mycotoxique est d'origine naturelle, l'homme n'en maîtrisant pas la survenue qui est liée aux conditions climatiques notamment. Le risque est pernicieux car la contamination fongique est difficilement contrôlable et peut être multiple en raison de la présence possible de plusieurs mycotoxines dans le même produit ou la même ration alimentaire, comme indiqué plus haut.

Le risque mycotoxique et les défis environnementaux du XXI^e siècle

L'évolution constatée au début du XXI^e siècle des pratiques culturales comme l'extension du mode de production biologique, l'émergence de la production de biocarburants, l'extension du non-labour et celles consécutives au changement climatique n'est pas sans avoir un impact sur l'évolution de l'attention portée à l'évaluation du risque mycotoxique via à la fois l'alimentation humaine et l'alimentation animale.

L'un des principaux enjeux environnementaux passés en revue lors de la réunion du « Grenelle de l'environnement » d'octobre 2007, est la diminution de l'usage des pesticides. Parmi eux les fongicides sont majoritaires en terme de quantité et sont passés en livraisons de plus de 60 000 à moins de 40 000 tonnes de 1999 à 2005³. Le cas du mode de production biologique restreint le recours aux traitements fongicides mais requiert des pratiques agricoles évitant la contamination par les moisissures telles que la rotation des cultures, le travail du sol, l'antécédent cultural, la faiblesse des apports azotés et la non utilisation des régulateurs de croissance. Les données disponibles de 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. Cet aspect, ayant été traité dans un rapport de l'Afssa en 2003, ne sera pas repris dans ce document². Néanmoins, le souhait du triplement de la surface en agriculture biologique d'ici 2010 (1,8% des surfaces agricoles en 2005)³ est à considérer (voir « recommandations »). Sur la même problématique, en protection de l'attaque des insectes (notamment la pyrale sur le maïs) effectuant des lésions favorables à la contamination par des moisissures et en alternative à l'usage des insecticides, peut s'opérer par lutte biologique.

¹ Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires. Rapport Afssa 2004. www.afssa.fr

² Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique. Rapport Afssa 2003. www.afssa.fr

³ source Agreste, Journal « Le Monde » du 25 octobre 2007, p.24

Elle recourt à l'utilisation de trichogrammes, insectes parasitant les œufs de pyrale ou encore d'un champignon entomopathogène du sol parasitant les larves de pyrale. Cette lutte peut s'opérer, pour les pays autorisant ce genre de pratiques par l'utilisation de variétés de maïs transgéniques contenant un gène de *Bacillus thuringiensis* (Bt) codant la synthèse de protoxines (non toxiques pour l'homme et les vertébrés) qui, ingérées par les insectes pyrale ou sésamie, sont transformées par leurs sucs digestifs en toxines bloquant leur appareil digestif. La question des avantages et inconvénients liés à l'usage du maïs Bt ayant été étudiée précédemment et relatée dans un rapport Afssa en 2004, ne sera pas reprise dans ce présent document¹.

L'un des moyens pour limiter la modification du climat est la réduction des gaz à effet de serre (GES). En signant le protocole de Kyoto, les pays européens se sont engagés à réduire leurs émissions de GES de 8% par rapport à 1990 d'ici 2008-2012. En France, les transports représentent 26% des émissions totales de GES. Ce secteur dépend à 98% de la ressource fossile. La Commission Européenne considère ainsi que « les biocarburants constituent les seuls substituts directs aux énergies fossiles disponibles à échelle significative sans adaptation des moteurs et l'un des seuls leviers –avec la réduction de consommation- de réduction à grande échelle d'émissions de GES »². La Directive 2003/30/CE³ relative à la promotion des biocarburants a établi des objectifs indicatifs d'incorporation des biocarburants dans les carburants fossiles. Il est prévu une extension des surfaces dédiées à la production des matières premières - la betterave, le blé et le maïs - pour la fabrication d'éthanol dans les prochaines années. La fabrication de bioéthanol générerait alors des co-produits (drèches et pulpes) à destination de l'alimentation animale⁴.

Enfin le 4^{ème} rapport du GIEC⁵ en 2007 établit que pour l'Europe « les scénarios du climat indiquent un réchauffement significatif, plus grand en hiver pour le Nord et en été pour l'Europe méridionale et centrale » et qu'« il est projeté une augmentation au Nord et une diminution au Sud de la moyenne annuelle des précipitations ». Des conséquences sont attendues en pratiques agricoles telles que « des variétés qui sont cultivées principalement en Europe méridionale (maïs, tournesol et soja) deviendront possibles plus au Nord et à plus haute altitude au Sud » mais que « l'augmentation de la survenue de certaines conditions extrêmes (stress hydrique durant la floraison, pluies à l'ensemencement ou la récolte) affecterait le rendement de production ». Ces scénarios et projections ne sont pas sans avoir de relation directe ou indirecte avec l'évaluation du risque mycotoxique.

Objectif de ce document

Ce document présente une revue des connaissances disponibles sur les mycotoxines présentant un risque pour la santé humaine et/ou animale.

Chaque chapitre traite d'une mycotoxine ou d'une famille de mycotoxines, de ses propriétés physico-chimiques, toxicologiques, des facteurs de développement de la (ou des) moisissure(s) toxigène(s), des méthodes d'analyses, des effets sur la santé humaine et/ou animale au travers des données épidémiologiques, lorsqu'elles existent, des données de contamination des denrées alimentaires et d'une estimation de l'exposition alimentaire de la population française métropolitaine et des espèces animales ainsi que d'un point réglementaire. Des recommandations sont effectuées sur la conduite de travaux destinés à améliorer les connaissances sur les dangers de certaines de ces toxines et leur transfert dans les produits animaux, et le cas échéant, sur le bien-fondé de la mise en œuvre de plans de surveillance et/ou de contrôle ainsi que de la mise au point de techniques analytiques plus sensibles.

¹ OGM et alimentation : peut-on identifier et évaluer des bénéfices pour la santé ? Rapport Afssa, juin 2004

² Communication de la Commission au Conseil et au Parlement Européen – COM (2006)- 10 janvier 2007

³ Directive du Conseil et du Parlement Européen du 8 mai 2003

⁴ Livret « Filière bioéthanol : Etat des lieux et perspectives », France betteraves/Passion céréales, avril 2007

⁵ Groupement Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change), United Nations, Fourth Assessment report, chapter 12 « Europe », Novembre 2007, Co-Prix Nobel de la Paix 2007

chapitre 1 Les aflatoxines

coordination : Jean-Marc Fremy et Sylviane Dragacci

Introduction

L'investigation menée lors de la "maladie X du dindon", qui a sévi en 1960 en Angleterre, a permis de mettre en évidence la présence d'une toxine dans la nourriture de ces volailles, comportant des tourteaux d'arachide. Des études conduites sur la matière première qui avait été contaminée par une moisissure du genre *Aspergillus* aboutirent à la caractérisation des aflatoxines (Asao *et al*, 1963).

Ces travaux furent à l'origine de la découverte des toxines de moisissures ou mycotoxines. Comme il est courant de compléter ou d'assurer la ration alimentaire du bétail laitier par des tourteaux d'arachide ou un mélange de graines oléagineuses, l'éventuel passage des aflatoxines dans le lait a été très vite recherché. Dès 1963, il est démontré que, chez les vaches laitières, l'aflatoxine B1 (AFB1), représentant majeur du groupe des aflatoxines, absorbée lors de l'ingestion de tourteaux contaminés, est partiellement métabolisée en un dérivé, communément appelé "Milk Aflatoxin 1" ou aflatoxine M1 (AFM1) (Allcroft et Carnaghan, 1963). Cela a fait entrevoir que les aflatoxines, et par extension des mycotoxines, peuvent atteindre l'alimentation de l'homme non seulement par voie directe "végétal - homme" ou pseudo-directe "végétal - produits végétaux transformés - homme", mais aussi en empruntant un cheminement complexe le long des chaînes alimentaires : végétal - alimentation animale - produits animaux et dérivés - homme. L'aflatoxine est reconnue comme étant l'un des plus puissants cancérigènes d'origine naturelle.

1. Propriétés physiques et chimiques

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires (Figure 1). Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et méthanol), elles sont assez facilement extraites. Sous lumière ultra-violette (UV longs), elles sont fluorescentes (bleue pour les AFB "blue" et verte pour les AFG "green", l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve) (Asao *et al*, 1965).

Figure 1 : Structure chimiques des aflatoxines B, G et M1



AFB1 : formule brute : C₁₇H₁₂O₆

	Masse molaire : 312,3 g/mol
AFB2 :	formule brute : C ₁₇ H ₁₄ O ₆ Masse molaire : 314,3 g/mol
AFG1 :	formule brute : C ₁₇ H ₁₂ O ₇ Masse molaire : 328,3 g/mol
AFG2 :	formule brute : C ₁₇ H ₁₄ O ₇ Masse molaire : 330,3 g/mol
AFM1 :	formule brute : C ₁₇ H ₁₂ O ₇ Masse molaire : 328,3 g/mol

2. Méthodes d'analyse (voir principes généraux en Annexe 1)

Des procédures d'échantillonnage spécifiques à certaines matrices ont été élaborées. Dans les produits végétaux, la qualité de l'échantillonnage est primordiale compte tenu de leur contamination par les aflatoxines habituellement très hétérogène. Ainsi, dans le cadre des aliments pour animaux, la méthode AOAC 977.16 et les normes ISO 6497:2002 et pr NF EN ISO 6498 :1998 décrivent des modes de prélèvements permettant une représentativité du lot global par l'échantillon. Concernant l'alimentation humaine, le règlement (CE) n° 401/2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées. Pour les produits laitiers, l'échantillonnage est indiqué aussi au règlement (CE) n° 401/2006.

Les méthodes analytiques consacrées aux aflatoxines peuvent être classées selon trois technologies : celles strictement physico-chimiques ou immunologiques et celles combinant les deux principes.

2.1 Méthodes physico-chimiques

Elles sont les premières approches développées et basées sur des systèmes chromatographiques pour la séparation et la détection (qualitative ou semi quantitative) voire le dosage (quantitatif). La chromatographie sur couche mince (CCM) date des années 1970. La caractérisation des signaux par simple lecture visuelle ou densitométrique donne accès respectivement à des informations semi-quantitatives et quantitatives (méthodes AOAC 980.20 et 993.17). L'AFB1 peut ainsi être mesurée à des concentrations comprises au mieux entre 5 et 10 µg/kg. Sur le même principe, une méthode visant l'aflatoxine M1 (AFM1) dans le lait a été validée par l'AOAC (980.21) et normalisée (IDF/ISO 111:1982). Plus récemment, une méthode consacrée à la recherche de l'AFB1 dans l'aliment du bétail a été publiée (ISO 6651:2001). Le remplacement de la CCM par la chromatographie liquide haute performance (CLHP) a permis à la fois d'abaisser les limites de détection des méthodes d'un facteur 10 minimum et d'améliorer significativement la spécificité de la mesure. De nouvelles méthodes ont alors été validées pour le dosage des aflatoxines dans les grains (AOAC 990.33), l'alimentation du bétail (ISO 14718:1998 et ISO 17375:2006) et pour l'analyse plus ciblée de l'AFM1 dans le lait (IDF 111A:1990). L'utilisation d'un détecteur fluorimétrique permet alors la quantification de l'AFM1 à partir de 0,015 µg/L.

2.2 Méthodes immuno-chimiques

Basées sur l'utilisation d'anticorps anti-toxines, elles permettent le dépistage rapide des aflatoxines dans un grand nombre d'échantillons sans équipement lourd. Les plupart de ces méthodes sont celles utilisant un marqueur enzymatique, ou dites « Enzyme Immuno-Assay (EIA) » et surtout « Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ». Cette dernière approche a été appliquée au dosage de l'AFB1 dans les aliments et les grains et de l'AFM1 dans le lait. Des kits commerciaux ont été validés par l'AOAC comme par exemple celui référencé AOAC 989.06 dédié au dosage de l'AFB1 dans les aliments pour animaux. En revanche, malgré la mise au point de méthodes ELISA pour la dosage de l'AFM1 (Fremy et Chu, 1984) il convient de noter l'absence à ce jour de kit ELISA validé selon le protocole harmonisé ISO/AOAC/IUPAC pour le dosage de l'AFM1 dans les produits laitiers. Néanmoins, un guide ISO (14675) a été établi donnant aux spécifications minimales que devrait respecter un kit ELISA pour l'analyse de cette aflatoxine dans les produits laitiers (IDF, 1999). Plus largement, l'AOAC a édicté des règles pour la caractérisation des anticorps utilisés dans les méthodes immuno-chimiques (Fremy et Usleber, 2003).

2.3 Méthodes par chromatographie d'immuno-affinité (CIA)

Utilisant les anticorps anti-toxines, la CIA s'applique à la purification sélective des aflatoxines à partir d'extraits alimentaires. Cette technologie, en combinaison avec les techniques de séparation et détection-dosage (CCM ou CLHP) a permis d'améliorer à la fois sélectivité et limites de détection. De

telles techniques combinées ont été appliquées à l'AFB1, aussi bien pour l'alimentation du bétail (AOAC 2003.02), que pour l'alimentation humaine (AOAC 991.31 ou Norme NF EN 12955 pour maïs, arachides brutes et beurre d'arachide ; (AOAC 999.07 ou Norme NF EN 14123 pour cacahuètes, pistaches, figues et paprika en poudre ; AOAC 2000.16 pour aliments pour bébés). L'extrait purifié est soumis ensuite à une analyse CLHP. D'autres méthodes analytiques validées ont utilisé cette combinaison CIA-CLHP et ont été appliquées à l'AFM1 ; il s'agit notamment de l'IDF 171:1995 – ISO 14501 pour la poudre de lait, et de l'AOAC 2000.08 pour les laits liquides, les deux méthodes affichant des limites de quantification en deçà de la limite réglementaire fixée à 0.05 µg/L. Citons la méthode validée référencée IDF 190.2003 – ISO 14674 utilisant le principe de la CIA combiné à une détection par CCM qui est appliquée également à l'AFM1 dans les laits liquides et en poudre.

2.4 Evolution des méthodes

Les données communiquées par les laboratoires participant à des essais circulaires organisés par les réseaux WHO/IARC et le FAPAS/CSL-UK permettent d'établir la tendance suivante : concernant l'AFB1 dans le maïs, l'utilisation de la CCM a significativement reculé entre 1978 (90% des techniques), 1989 (43%) et 2002 (7%) ; la CLHP à l'inverse a vu son utilisation s'accroître considérablement (respectivement 5%, 36% et 77%). Enfin la technique ELISA, non appliquée en 1978, est restée entre 1989 et 2002 utilisée par 7% des participants. Concernant la recherche de l'AFM1 dans le lait, un recul de l'usage de la CCM s'est confirmé (37% en 1989 à 4% en 2002), alors que la CLHP s'est nettement imposée (35% à 89%) et l'ELISA stabilisé (9%). Cette évolution technologique a permis une amélioration de la performance des méthodes en particulier au regard de la précision. Pour illustration, alors qu'en 1978 l'indice de satisfaction indiquait 50% pour une teneur en AFB1 de 14,0 µg/kg dans un échantillon de maïs, l'indice était de 82% en 2002 pour des échantillons moins concentrés (6,8 µg.kg⁻¹). Le même constat a été établi pour l'AFM1 dans le lait en poudre, avec un indice de satisfaction de 43% en 1989 pour une teneur de 0,49 µg/kg contre 74% en 2002 pour une teneur de 0,26 µg/kg (Honma *et al.*, 2004).

3. Facteurs influençant la teneur dans les denrées

Les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 sont susceptibles d'être produites par certaines souches d'espèces appartenant au genre *Aspergillus* telles que *A. flavus* pouvant produire les aflatoxines B1 et B2, *A. parasiticus* et *A. nomius* (rencontrée rarement) pouvant produire, en plus, les aflatoxines G1 et G2. *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton, tandis qu'*A. parasiticus* est présent surtout dans les graines d'arachide (Davis et Diener, 1983).

3.1 facteurs de développement fongique et de production d'aflatoxines

Les conditions les plus favorables pour un développement d'*A. flavus* et une production d'aflatoxines sont une activité en eau (A_w) de 0,84-0,86 et une température comprise entre 25 et 40 °C (Christensen *et al.*, 1973). Ces proliférations fongiques et les productions d'aflatoxine ont lieu au champ et au cours du stockage. Au champ, les insectes attaquent la surface des grains facilitant l'accès de la moisissure aux structures internes qui contiennent les nutriments et augmente le risque de contamination de la partie comestible. Un tel scénario ne concerne pas seulement les zones tropicales et les cultures d'arachide mais aussi les zones tempérées et certaines cultures comme le maïs, lors de saisons particulièrement chaudes et sèches. Un maïs récolté en 2003 (été caniculaire) dans un pays d'Europe méridionale, a présenté une contamination par l'AFB1, inhabituelle sous cette latitude et révélée par la présence d'AFM1 dans le lait de vache (RASFF, 2003). Un tel cas (mêmes céréale et pays) s'est reproduit en 2005. Une enquête réalisée aux Etats-Unis en 1988, qui était également une année inhabituellement chaude et sèche dans la zone septentrionale (7 états du Middle West), a montré que 8% des maïs récoltés dans cette zone contenaient des aflatoxines (Russell *et al.*, 1991).

A l'inverse des céréales et des graines de protéagineux ou d'oléagineux, la contamination des fourrages et des ensilages par les mycotoxines a été peu étudiée. Ceci s'explique par la faible importance des échanges commerciaux des fourrages qui sont principalement produits, conservés et consommés à la ferme. La contamination des fourrages commence au champ et se poursuit au cours des étapes de récolte, de séchage, de manutention et de stockage. Une grande partie de l'inoculum fongique est apportée par la terre au moment de la récolte, les poussières et les restes de végétaux de la récolte précédente.

Les moisissures n'ont pas toujours les conditions optimales pour se développer et produire les mycotoxines. C'est le cas des fourrages conservés au sec et dans lesquels les moisissures ne peuvent que survivre sous forme de spores. C'est le cas aussi des fourrages pour lesquels Lacey (1975) a montré que les conditions de pH acide ($\text{pH} \leq 4$) de l'ensilage ne sont pas favorables à la croissance d'*A. flavus* et donc à la production d'AFB1.

Peu d'études ont été réalisées sur l'effet des conservateurs d'ensilage à l'égard du développement des moisissures et de leurs productions de toxines. En laboratoire, des études ont montré que certains conservateurs (p-méthyl et p-propyl hydroxy-benzoate, acide benzoïque, acide sorbique) peuvent activer *in vitro* la production d'aflatoxines (Bauer *et al.*, 1983 ; Gareis *et al.*, 1984 ; Sanchis *et al.*, 1988). Par contre sur le terrain, lors de l'ensilage, selon la dose d'acide sorbique employée, le développement d'*A. flavus* peut être retardé (concentration d'acide sorbique = 0,05% dans l'ensilage) ou totalement inhibé (concentration d'acide sorbique = 0,1%) (Gareis *et al.*, 1984). En revanche, l'acide propionique n'a pas d'effet sur la production d'AFB1. Randby (1996), a montré qu'un conservateur homologué pour ses effets sur les profils fermentaires de l'ensilage (pH, concentration en acides gras courts, acide lactique, ammoniac) n'est pas forcément efficace contre un développement fongique en surface ou sur le front d'attaque du silo (. Ce critère est à prendre en compte pour l'autorisation des additifs d'ensilage.

Bien que les aflatoxines ne soient pas considérées comme des mycotoxines majeures des fourrages conservés, elles ont pu être détectées dans certains foin ou ensilages (Le Bars, 1976 ; Kalac et Woolford, 1982 ; Whitlow et Hagler, 2002). La présence d'*A. flavus* a pu être identifiée dans des foin mal séchés ayant chauffé (Pelhate, 1987). Bien que la production d'aflatoxines n'ait pas été démontrée après la mise en silo, leur présence dans le maïs au moment de la récolte entraînera une contamination de l'ensilage de maïs puisque ces toxines sont stables dans les conditions physico-chimiques de conservation de l'ensilage.

Par ailleurs, l'exposition prolongée à l'air du front d'attaque du silo peut favoriser le développement d'*A. flavus* et augmenter le niveau de toxines dans cette partie du fourrage qui est distribuée aux animaux.

3.2. Impact des procédés technologiques sur la teneur en toxine

Les aflatoxines sont peu sensibles à la plupart des traitements thermiques (stérilisation, pasteurisation, congélation) ou de séchage (déshydratation, lyophilisation), à l'exception de la torréfaction.

Certains procédés technologiques modifient la teneur initiale en aflatoxines dans la matière première pour aboutir, selon la matrice et le procédé, soit à une quasi élimination soit au contraire à une concentration de la teneur en aflatoxines dans le produit fini ou l'aliment transformé. Seules des études appropriées et spécifiques à chaque traitement de transformation permettent de connaître le taux de dilution ou de concentration au niveau du produit transformé par rapport à la teneur initiale en aflatoxines.

Quelques cas de variation de la teneur en aflatoxines au cours de certains procédés technologiques sont cités ci-après.

3.2.1 Maïs

Les procédés de transformation du maïs modifient la teneur initiale en AFB1. Avec la voie humide (amidonnerie) le gluten, le germe et l'amidon contiennent ainsi respectivement 13 à 17%, 6 à 10% et 1% de la teneur initiale des grains (Bennett et Anderson, 1978). Avec la voie sèche (semoulerie) les teneurs les plus hautes sont retrouvées dans le germe et le son et la plus basse dans la farine (Scott, 1984).

3.2.2 Brasserie

En brasserie, les études expérimentales (contaminations artificielles) à partir du malt d'orge, du maïs, de sorgho et du blé montrent que, selon les études et les mélanges de céréales utilisés, le procédé réduit les niveaux d'aflatoxines dans la bière jusqu'à 5 à 27 % de la teneur initiale (Chu *et al.*, 1975, Steiner et Lanzlinger, 1978).

3.2.3 Graines oléagineuses

Le procédé de torréfaction des arachides de bouche (cacahuètes) est efficace pour réduire de 50 à 80% la teneur initiale en aflatoxines (Lutter *et al.*, 1982).

Lors du procédé d'extraction d'huile, les aflatoxines B et G se retrouvent majoritairement dans les tourteaux (tourteaux de soja, arachide, coton...) et minoritairement dans l'huile brute. Les traitements ultérieurs de raffinage de l'huile éliminent les traces d'aflatoxines.

En ce qui concerne les tourteaux destinés à l'alimentation animale, des procédés de détoxification à base d'ammoniac associé ou non au formol permettent d'éliminer jusqu'à 95% de la teneur initiale en aflatoxine B1. Cette opération ne peut pas être utilisée comme procédé de décontamination pour un produit destiné à l'alimentation humaine directe (Règlement 1881/2006). Néanmoins ce type de décontamination peut avoir des conséquences en alimentation humaine : lorsque ces aliments ainsi traités sont administrés à des vaches, la teneur en aflatoxine M1, métabolite de l'AFB1 excrétée dans le lait (voir ci-après), est réduite par rapport à celle du lait des vaches ayant reçu les aliments non traités (Viroben *et al.*, 1983 ; Fremy et Quillardet, 1985 ; Fremy *et al.*, 1987 ; Hoogenboom *et al.*, 2001).

3.2.4 Lait et produits laitiers

L'AFB1 absorbée par une vache laitière est excrétée dans le lait sous forme d'AFM1 (voir § 4.1). L'influence des procédés de transformation du lait en divers produits laitiers sur la teneur en AFM1 est décrite dans la revue de Galvano *et al.* (1996b).

Les procédés de stérilisation et de pasteurisation, même suivis d'une réfrigération, n'affectent pas la teneur en AFM1 par rapport à celle du lait cru. Lors du procédé de séchage, l'AFM1 se retrouve en totalité dans la poudre, avec un facteur de concentration de 10 du fait de l'élimination de l'eau.

Lors de l'écémage, 90% de la teneur initiale en AFM1 du lait reste dans le lait écrémé et 10% passe dans la crème. Lors du barattage l'AFM1 se retrouve en quasi-totalité dans l'eau de barattage et de lavage (babeurre) et pas dans le beurre. Lors de la transformation du lait écrémé ou du babeurre en poudre, la totalité de l'AFM1 se retrouve dans la poudre (Fremy et Dragacci, 1999).

En technologie fromagère, une variabilité de répartition de la teneur en AFM1 est observée selon la particularité du procédé de caillage:

Pour le caillage totalement lactique (type yaourt), l'émission de lactosérum étant faible, la répartition de la teneur en AFM1 entre yaourt et lactosérum est de 90/10. Durant la conservation réfrigérée, une perte supplémentaire d'une dizaine de % est estimée (Govaris *et al.*, 2002).

Pour les caillages de type lactique-présure, l'AFM1 se répartit entre le caillé et le lactosérum, par exemple, pour le caillage mi-lactique - mi-présure (fromages à pâte molle type Brie) : 50% dans le caillé et 50% dans le lactosérum, pour le caillage 40% lactique - 60% présure : 40% dans le caillé et 60% dans le sérum. Dans le caillé, la quantité initiale d'AFM1 change peu mais peut évoluer en terme de concentration selon les procédés ultérieurs de préparation fromagère (pressage, affinage...) (Fremy et Dragacci, 1999).

Dans le lactosérum, comme pour le lait, un facteur de concentration en AFM1 de 10 s'applique lors de la fabrication de lactosérum en poudre. Lorsque le procédé d'ultrafiltration est appliqué au lactosérum, l'AFM1 montre une plus grande affinité pour la partie protéique que pour le lactose (Mendoza et Venacio, 2005).

4. Devenir et Propriétés toxicologiques

Le JECFA a publié sa plus récente évaluation des risques dus aux aflatoxines B et G dans son 49^e rapport (WHO Technical report series, 1998) et ceux dus à l'Aflatoxine M1 dans son 56^e rapport (WHO Technical report series, 2001). A cette occasion, il a examiné les études effectuées depuis l'évaluation de l'IARC en 1993. Les données et conclusions mentionnées dans cette section sont largement tirées de ces rapports du JECFA et de l'IARC.

4.1 toxicocinétique

4.1.1 Chez les mammifères

Les aflatoxines sont absorbées au niveau du duodénum (Kumagai, 1989). Chez les animaux monogastriques, l'absorption pourrait représenter près de 90% de la dose administrée (Gregory *et al.*,

1983). Après absorption, les aflatoxines sont véhiculées dans l'organisme après fixation sur les protéines plasmatiques. C'est le cas de l'AFB1 liée à l'albumine. La présence de cet adduit dans le sérum peut servir de bio-indicateur d'exposition (Chapot et Wild, 1991).

Les aluminosilicates (Phillips *et al.*, 1988) peuvent interagir avec l'aflatoxine en formant des complexes qui ne sont pas absorbés dans le tube digestif des animaux. De nombreuses publications montrent que ces produits et leurs apparentés peuvent atténuer les effets toxiques des aflatoxines chez le bétail (Guerre, 2000), ce qui explique l'intérêt des composés adsorbants en alimentation animale. Les propriétés adsorbantes des charbons activés ont également été observées, mais en raison de la coloration noire qu'ils donnent aux aliments, ces composés sont essentiellement utilisés à titre curatif (Galvano *et al.*, 1996a). Enfin, les parois de bactéries lactiques en particulier de propionibactéries (Gratz *et al.*, 2005) ainsi que les parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* possèdent un effet adsorbant *in vitro* et *ex vivo* (Yiannikouris *et al.*, 2006) s'accompagnant d'une diminution de la toxicité des aflatoxines *in vivo* (Stanley *et al.*, 1993, Raju et Devegowda, 2000). Il convient toutefois de signaler que l'utilisation de ligands en vue de détoxifier des aliments contaminés par des mycotoxines n'est pas prévue en 2007 par la réglementation Européenne (Règlement CE 1831/2003).

Les aflatoxines, en particulier l'AFB1 qui a été la plus étudiée, subissent un métabolisme hépatique rapide se déroulant en deux phases (Eaton et Gallagher, 1994) (voir Figure 2):

- Une phase I de biotransformation qui met en jeu les enzymes mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP). Les CYP2a5 et CYP3a interviennent chez la souris, alors que les CYP1A2 et 3A4 sont plutôt impliqués chez les primates sub-humains. La voie dominante de l'activation *in vivo* de l'AFB1 dans le foie humain se ferait par le CYP1A2 au travers des réactions d'oxydation formant par hydroxylation l'AFM1 et par époxydation l'AFB1 8,9-époxyde. Le CYP3A4 dont l'action serait moins prépondérante, se trouve impliqué dans la formation par hydroxylation de la 3 α -hydroxy-AFB1 (AFQ1) et plus modestement dans la synthèse de l'AFB1 8,9-époxyde. Dans cette phase deux autres métabolisations enzymatiques de l'AFB1 interviennent : une O-déméthylation pour former l'AFP1 et une réduction de la fonction cétone en C1 (via une NADPH réductase) pour former l'aflatoxicol (AFOL). Les métabolites AFM1, AFP1 et AFQ1 sont éliminés dans les urines des mammifères exposés à l'AFB1. Seule l'AFM1 est éliminée dans le lait. La présence de ces métabolites dans les urines et de l'AFM1 dans le lait et dans le sérum, peut servir de bio-indicateur d'exposition (voir § 5.3).
- Une phase II du métabolisme concerne le devenir de l'AFB1 8,9-époxyde. Elle comprend la conjugaison de l'AFB1 8,9-époxyde au glutathion par des glutathion S-transférases (GST). Une conjugaison à l'acide glucuronique des métabolites hydroxylés aboutit à la formation de glucurono-conjugués. Elle comporte aussi l'association de l'AFB1 8,9-époxyde aux acides nucléiques (ADN), engendrant la toxicité dont notamment la génotoxicité et la cancérogénicité (voir plus loin). Le site de formation d'adduits à l'ADN se situe en position N7 de la guanine (Cullen et Newberne, 1994). La présence d'adduits à l'ADN dans les urines, montrant l'initiation d'un processus de réparation du génome, consécutif à son altération, peut être aussi utilisée comme indicateur d'exposition (voir § 5.4). Cette alternative de devenir de l'AFB1 8,9-époxyde entre glucurono-conjugaison et association à l'ADN, se traduit selon l'espèce animale et selon des situations particulières (déficit physiologique du foie, apport très important en toxines, polymorphisme des GST...) une variabilité de la sensibilité aux aflatoxines.

4.1.2 Chez les volailles

Le métabolisme et surtout la bioactivation hépatique de l'AFB1 en AFB1-8,9-époxyde et en aflatoxicol joueraient un rôle déterminant dans l'apparition ultérieure de lésions hépatiques. Une forte bioactivation pourrait expliquer la plus grande sensibilité des canards aux aflatoxines alors que les cailles seraient plus résistantes en raison de faibles capacités métaboliques. Les voies métaboliques de phase II se déroulent de manière similaire à ce qui est décrit chez les mammifères : conjugaison de l'époxyde au glutathion, conjugaison à l'acide glucuronique des métabolites hydroxylés. Si la répartition entre espèces aviaires des enzymes de phase II est moins étudiée que celle de phase I, il semble que le niveau d'expression des GST soit déterminant pour expliquer les différences de sensibilités à l'AFB1 entre les espèces d'oiseaux (Klein *et al.*, 2002).

4.1.3 Chez les poissons

Des études menées chez des espèces aquatiques indiquent aussi des différences inter-espèces dans le métabolisme de l'aflatoxine dans l'organisme après ingestion.

Une étude toxicocinétique menée chez le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) a montré, après administration orale d'AFB1 (250 µg/kg p.v.), qu'elle est fortement liée aux protéines plasmatiques (95%). Les concentrations des métabolites sont maximales après 4 heures, allant de 596 µg/L dans le plasma à 40 µg/kg dans le muscle et disparaissent rapidement après 24 heures : la concentration dans le plasma est de 32 µg/L et inférieure à 5 µg/kg dans le muscle. Il est à noter que l'excrétion rénale et biliaire compte pour moins de 5% de la dose administrée indiquant une absorption incomplète. Chez ce modèle poisson chat ces données de toxicocinétique indiquent l'accumulation très faible d'AFB1 et de ses métabolites dans les tissus (Plakas *et al.*, 1991).

A l'opposé, l'étude de Larsson *et al.* (1992) a montré une accumulation plus élevée chez la truite arc-en-ciel de cette toxine et de ses métabolites dans le foie, le rein, les rosettes nasales, les caeca pyloriques, la mélanine uvéale et l'humeur aqueuse des yeux.

La réduction de l'AFB1 en aflatoxicol (AFOL) par une AFB1-reductase NADPH-dépendante cytosolique est une voie métabolique classique chez les poissons (Eaton et Ramsdell, 1991). A la différence des métabolites hydroxylés (AFM1 et AFQ1), l'AFOL conserve un potentiel mutagène en raison de l'oxydation microsomale redonnant de l'AFB1 à partir de laquelle de l'AFB1 époxyde peut être à nouveau généré (Bailey *et al.*, 1994). L'AFOL peut également être excrété dans la bile après glucurono-conjugaison (Loveland *et al.*, 1979). Ainsi, la production d'AFOL représente une voie possible de détoxification (glucuronoconjugué excrété) mais aussi une possible voie de retour vers l'AFB1 époxyde. Des études ont comparé, le métabolisme de l'AFB1 chez la truite arc-en-ciel et le poisson chat (Plakas *et al.*, 1991). Chez ce dernier l'AFB1 est faiblement oxydée dans les microsomes des hépatocytes : peu d'AFB1 8,9-époxyde est produit et l'AFB1 est rapidement réduite en AFOL, et la voie de détoxification est privilégiée. A l'opposé, les microsomes des hépatocytes de la truite activent cette toxine (production d'AFB1 8,9-époxyde) à un taux 6 fois plus élevé, alors que la production d'AFOL est 40-65 fois plus faible. Ces résultats suggèrent que le manque d'activation d'AFB1, contribue à la résistance du poisson chat à la toxicité et à l'hépatocarcinogénicité de l'AFB1 (Gallagher et Eaton, 1995).

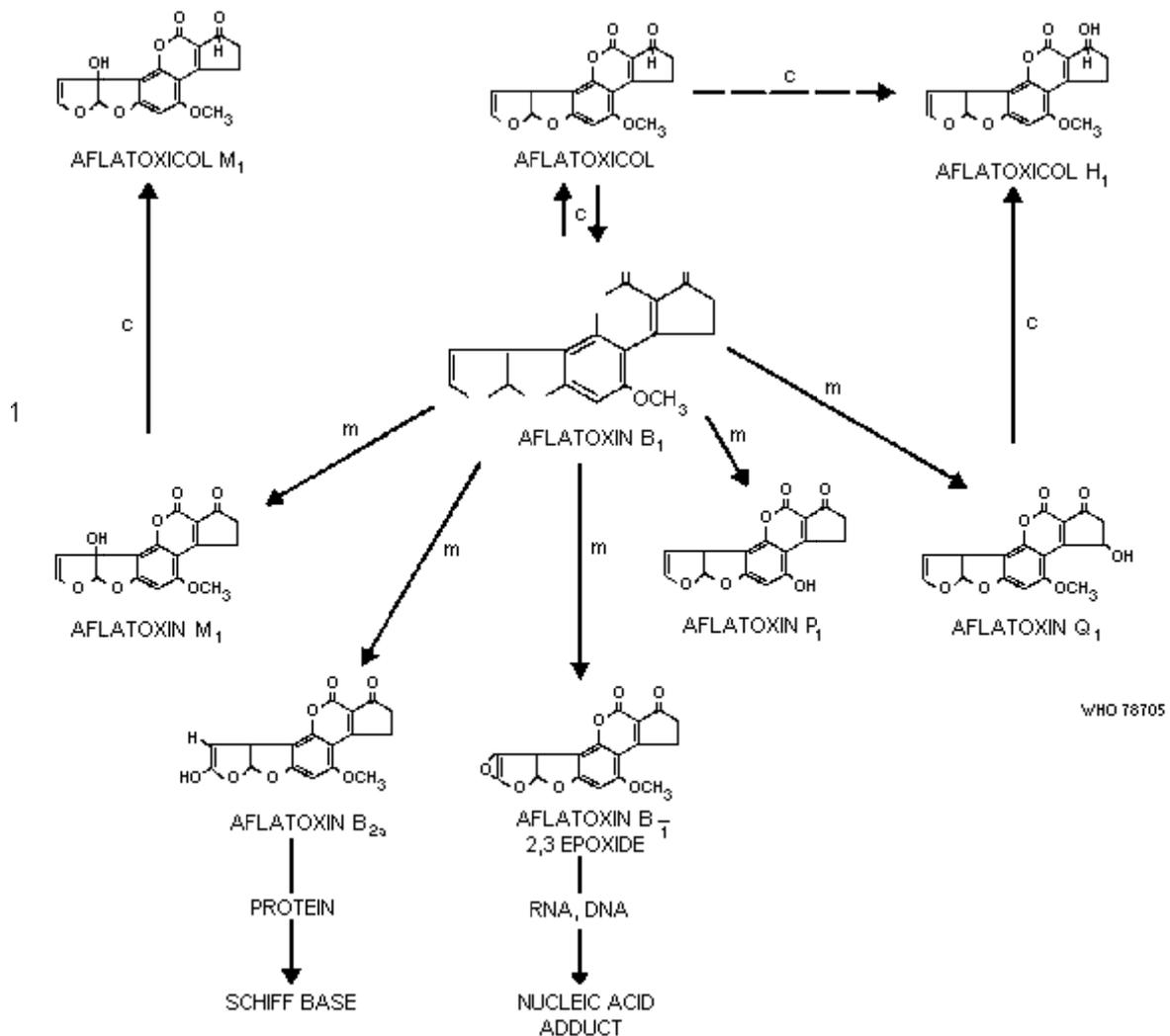


Fig. 2. Aflatoxin B₁ metabolism in the liver.

Figure 2 : Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie
 (rapport de l'IPCS, Environmental Health Criteria N°11, WHO, 1979, Fig.2)

4.2 toxicité aiguë

Les études de toxicité aiguë montrent une grande variabilité d'une espèce animale à une autre : ainsi la DL50 varie de 0,3 mg/kg p.c. pour le caneton à 9 mg/kg p.c. pour la souris (Patterson et Allcroft, 1970). Chez le caneton, l'administration de 100 µg d'AFB1 entraîne en 12 heures la survenue d'hémorragies et de nécrose hépatocytaire en région périportale. Une prolifération des canalicules biliaires est constatée 48 à 72 heures après l'administration. L'AFB1 est la plus toxique suivie en ordre décroissant par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité aiguë est généralement fatale pour les animaux avec observation lors de l'autopsie d'un foie décoloré et augmenté de volume. Lorsque l'animal survit, on observe un ictère avec présence d'ascite et dans le foie des hépatocytes vacuolés et une prolifération des canalicules biliaires. Les reins présentent des glomérulonéphrites et les poumons sont congestionnés. Les signes comportementaux les plus caractéristiques avant la mort sont une démarche chancelante, de la nervosité et des spasmes musculaires (Allcroft et Carnaghan, 1963).

Chez le porc, des études expérimentales d'aflatoxicose aiguës ont été conduites (Cysewski *et al.*, 1968 ; Miller *et al.*, 1982) : la manifestation clinique observée après administration unique de 1,2 à 1,98 mg d'AFB1/kg p.v. (sous forme de toxine purifiée ou d'un mélange d'aflatoxines) est un épisode hémorragique sévère : les autopsies ont montré des hémorragies internes massives (Meissonnier *et*

al., 2005). L'histologie révèle une forte atteinte hépatique et l'exploration des activités enzymatiques spécifiques du foie sur des prélèvements sanguins confirme le tableau lésionnel. Les activités phosphatases alcalines, aspartate amino-transférases et ornithine-carbamyl-transférases sont augmentées et l'activité gamma-glutamyl-transférase reste stable (Cysewski *et al.*, 1968 ; Miller *et al.*, 1982). Chez des porcs exposés à une dose quotidienne de 0,2 mg d'AFB1/kg p.v. pendant 5 jours. Les observations recueillies sont plus proches des manifestations d'une intoxication chronique que des manifestations aiguës (Osuna et Edds, 1982a,b,c).

Les études menées chez les poissons ont montré une grande différence inter-espèces dans la sensibilité à l'aflatoxine. Ainsi, le saumon coho (*Onchorhynchus kisutch*), la carpe indienne (*Labeo rohita*) et le poisson chat sont plus résistants à l'aflatoxine que la truite arc-en-ciel (Bauer *et al.*, 1969, Hendricks, 1994, Gallagher et Eaton, 1995 ; Sahoo et Mukherjee, 2001b). En injection intrapéritonéale, la DL50 est obtenue à une dose environ 15 fois plus élevée chez la carpe que chez la truite (11,5 vs 0.81 mg/kg p.v.) (Sahoo et Mukherjee, 2001b) et la toxicité orale aiguë est 20 fois plus élevée chez la truite que chez le poisson chat (0,5 mg/kg d'aliment pour la truite et 10-15 mg/kg d'aliment chez le poisson chat) (Jantrarotai et Lovell, 1990). En effet, chez le poisson chat une toxicité sub-létale n'a été observée qu'à partir d'une dose de 10 mg/kg p.v., incluant une réduction de la croissance, une anémie et des nécroses hépatiques (Hendricks, 1994).

4.3 Toxicité chronique

4.3.1 génotoxicité

La génotoxicité des aflatoxines a une grande variabilité entre les espèces en raison de la proportion variable d'AFB1 métabolisée en 8,9- époxyde hautement réactif par rapport aux AFM1 et AFQ1, bien moins toxiques (Cullen et Newberne, 1994). L'AFB1-époxyde a une durée de vie courte, mais est hautement réactif et est considéré comme le principal métabolite génotoxique par fixation à l'ADN. La liaison covalente sur des sites critiques de l'ADN induit des mutations. Les mutations les plus étudiées intéressent le gène de suppression tumorale p53 et l'oncogène *ras* (Eaton et Gallagher, 1994).

La variabilité de l'activité inter-espèces et même inter-individus d'expression des isoformes de GST serait elle aussi un facteur influençant la sensibilité à l'AFB1 : la glutathion-S-transférase (GST) par formation d'un conjugué éliminé par voie biliaire permet la détoxification de l'AFB1-époxyde en limitant la formation d'adduit à l'ADN.

Concernant les autres aflatoxines, les études expérimentales sont assez limitées. La métabolisation de l'AFB2 par l'intermédiaire d'une conversion en AFB1 induit une liaison sur l'ADN, mais ne provoque pas de mutation génique. Néanmoins le caractère mutagène de l'AFB2 a été observé chez la bactérie. L'AFG1 induit des altérations chromosomiques et est mutagène chez la bactérie. Les données expérimentales sur la mutagénicité et la génotoxicité spécifiques de l'AFG2 sont quasi inexistantes. L'AFM1 est un agent génotoxique, mais son caractère cancérigène apparaît bien plus faible que celui de l'AFB1 (voir § suivant).

4.3.2 Pouvoir cancérigène

L'organe cible est le foie. Lors des études initiales entreprises chez l'animal exposé sur une longue période, la dose d'AFB1 engendrant des tumeurs du foie varie selon les espèces : de 10 à 30 µg/kg d'aliment pour les poissons et les oiseaux, ou de 15 à 150 000 µg/kg d'aliment pour les mammifères (Wogan, 1992), pouvant s'expliquer par des différences dans l'équipement enzymatique du foie (voir paragraphe 4.1).

De nombreuses études menées pendant les années 70 et 80 avaient montré le caractère hautement cancérigène hépatique de l'AFB1 (JECFA, WHO, 1999). L'AFB1 possède le plus fort potentiel cancérigène de toutes les aflatoxines. Les différences dans la biotransformation d'AFB1 sont un critère déterminant dans la variabilité de réponses entre les espèces animales à l'effet carcinogène de l'AFB1. Ainsi, la truite arc-en-ciel est extrêmement sensible à la toxicité et à l'effet hépatocarcinogène de l'AFB1, alors que le saumon coho et le poisson chat le sont beaucoup moins (Hendricks, 1994 ; Gallagher et Eaton, 1995) : l'époxidation de l'AFB1 est moindre chez le saumon coho que chez la truite et la liaison de l'AFB1 à l'ADN est 56 fois plus élevée chez la truite arc-en-ciel que chez saumon coho après une injection intra-péritonéale d'AFB1 et 18 fois plus élevée par ingestion orale d'AFB1.

Les autres voies métaboliques et l'élimination d'AFB1 sont similaires chez les deux espèces, ce qui suggère que seule l'époxydation médiée de l'AFB1 par les enzymes des cytochromes et sa liaison préférentielle sur l'ADN contribuent à la différence de cancérogénéité observée.

Le potentiel cancérogène expérimental de l'AFM1 est 10 fois moindre que celui de l'AFB1 même chez des espèces sensibles telles que la truite « Arc en Ciel » et le rat « Fischer » (JECFA, WHO, 2001).

Le CIRC lors de son évaluation en 1993 conclut qu'il y a «une suffisante évidence de la cancérogénéité de l'AFB1 », «une suffisante évidence de la cancérogénéité en expérimentation animale et une inadéquate évidence de la cancérogénéité chez l'homme de l'AFM1 », «une suffisante évidence de la cancérogénéité en expérimentation animale de l'AFG1 », « une évidence limitée de la cancérogénéité en expérimentation animale de l'AFB2 », et « une inadéquate évidence de la cancérogénéité de l'AFG2 ».

Le potentiel cancérogène peut être influencé par d'autres facteurs hépatotoxiques tels que l'alcool, le tabac ou des agents infectieux. La cancerogénéité hépatique reliée à l'AFB1 est substantiellement plus élevée chez les porteurs de virus de l'hépatite B (HBV) (0,3 cas par an / 100 000 individus par ng d'AFB1/kg de p.c. et par jour) que chez les non porteurs (0,01 cas par an / 100 000 individus par ng d'AFB1/kg de p.c. et par jour) en se basant sur le dosage de l'antigène de surface du virus dans le sang (HBsAg- et HBsAg+). Ainsi, une vaccination anti HBV pourrait diminuer le risque et affaiblir la prévalence de cancer hépatique pour les populations exposées à la fois à l'HBV et l'AFB1. Certaines observations montrent la possibilité qu'il en soit de même pour l'HCV (JECFA, WHO, 1999 et 2001).

4.3.3 immunotoxicité

Les effets immunomodulateurs et immunotoxiques des aflatoxines ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs espèces animales y compris les poissons (Meissonnier *et al.*, 2006 ; Ottinger et Kaatari, 2000). Les aflatoxines affectent la réponse inflammatoire. Elles inhibent plusieurs fonctions des macrophages telles que la phagocytose, la production de radicaux oxygénés et la sécrétion de cytokines, mais aussi le chimiotactisme des neutrophiles et l'activité des cellules « Natural Killers » (Bondy et Pestka, 2000). Concernant la réponse immunitaire spécifique, les effets des AFs sur la production d'anticorps sont variables dans les différentes espèces animales. Une exposition prolongée à des concentrations élevées de toxines est généralement nécessaire pour induire une réduction significative des concentrations d'anticorps plasmatiques. L'effet immunotoxique le plus marqué des aflatoxines s'observe sur l'immunité à médiation cellulaire (Marin *et al.*, 2002 ; Theumer *et al.*, 2003). En effet, les aflatoxines entraînent une atrophie des organes lymphoïdes, une diminution de l'hypersensibilité retardée en réponse à des mitogènes, une altération de la prolifération lymphocytaire et une modification de la production de cytokines (Raisuddin *et al.*, 1993, Otim *et al.*, 2005, Meissonnier *et al.*, 2006).

Les effets immunosuppresseurs des aflatoxines conduisent, chez les animaux recevant une alimentation contaminée, à une augmentation de la sensibilité aux infections microbiennes (bactérienne, parasitaire et virale) et à une diminution de l'efficacité vaccinale (Oswald *et al.*, 2005). Des études épidémiologiques menées sur des populations humaines exposées de façon chronique à de fortes doses d'aflatoxines montrent que cette mycotoxine a des propriétés hépatocarcinogènes chez les adultes en particulier lorsqu'elle est associée à l'infection par le virus de l'hépatite B. Chez les enfants, une altération de la croissance et des anomalies immunitaires ont également été observées (Turner *et al.*, 2003 ; Gong *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2005) (voir § 5.1.2).

4.3.4. autres effets

L'AFB1 affecte la reproduction. Expérimentalement chez la souris, lors d'une intoxication chronique (0,05 µg/kg p.c. pendant 14 jours), Sinha et Dharmshila (1994) ont observé des anomalies du nombre et de la morphologie des spermatozoïdes. Le porcelet exposé aux aflatoxines pendant sa vie intra-utérine montre à la naissance dans le plasma, une diminution des taux de protéines totales et d'albumine, une augmentation des triglycérides et du cholestérol ainsi que des transaminases plasmatiques.

4.4 Valeur Toxicologique de Référence

En 1993, le CIRC a classé l'AFB1 dans le groupe 1, l'AFM1 dans le groupe 2B et l'AFG1 dans le groupe 3. Le JECFA et le SCF n'ont pas fixé de dose journalière tolérable (DJT) pour les aflatoxines². En effet, ces substances présentant 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).

Cependant, en se fondant sur des données épidémiologiques, le JECFA (49^e rapport, 1998), considère qu'en Europe, l'ingestion de 1 ng d'aflatoxines/kg p.c./j augmenterait l'incidence du cancer du foie de 0,013 cancer par an pour 100 000 personnes. Cette incidence globale est un indice composite calculé à partir de deux incidences observées, l'une chez les populations HBsAg+ qui représenteraient 1 % de la population européenne (0,3 cancer par an pour 100 000 personnes par ng d'aflatoxines/kg p.c./j) et l'autre chez les personnes HbsAg- (0,01 cancer par an pour 100 000 personnes par ng d'aflatoxines/kg p.c./j).

5. Exposition humaine aux aflatoxines

5.1 Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

5.1.1 Intoxication aiguë

Les effets se manifestent par une hépatite aiguë, Les symptômes cliniques typiques mais non spécifiques incluent jaunisse, dépression, anorexie, et diarrhée. La mortalité a atteint 25% lors d'intoxications en Inde (Krishnamachari *et al.*, 1975). Deux syndromes humains d'étiologie indéfinies ont été reliés à l'ingestion d'aliments contaminés par les aflatoxines car aucune autre cause n' a pu être identifiée et parce que ces mycotoxines ont été trouvées chez les patients : le Kwashiorkor et le syndrome de Reye.

Le Kwashiorkor associe hypoalbuminémie et immunosuppression. Le syndrome de Reye associe encéphalopathie et dégénérescence graisseuse des viscères. Néanmoins ces cas ayant été observés chez des populations en malnutrition, le métabolisme des aflatoxines peut être modifié (CAST, 2003). La dernière intoxication aiguë reconnue s'est déroulée d'avril à septembre 2004 dans les provinces du centre et de l'est du Kenya durant laquelle 341 cas ont été diagnostiqués conduisant à 123 décès (CDC, 2004). A la suite de cet épisode, l'OMS a tenu un atelier de travail en 2005 sur la stratégie de santé publique à adopter afin de prévenir l'exposition aux aflatoxines.

5.1.2 Intoxication chronique

La plupart des études épidémiologiques tendent à montrer l'existence d'une corrélation entre une exposition chronique à l'aflatoxine via le régime alimentaire et une prévalence du cancer primitif du foie. Néanmoins, cette relation est modulée par d'autres facteurs qui influencent ce risque de cancer, notamment l'infection virale à l'hépatite B (HBV). La majorité des études épidémiologiques étayant la relation aflatoxine - cancer du foie provient d'Asie du Sud-Est, de Chine, d'Afrique Occidentale et Equatoriale, régions du globe où la prévalence de l'HBV et de l'AFB1 sont élevées. En Amérique Latine, la prévalence du cancer primitif du foie et de l'infection à l'HBV est faible alors que l'exposition à l'AFB1 est élevée. La conduite de nouvelles études épidémiologiques dans les régions dites à risque a été recommandée par le JECFA en intégrant pour certains pays des campagnes de vaccination anti-HBV. Lorsque ces études auront été réalisées, une ré-évaluation des risques pour l'homme des aflatoxines pourra être effectuée.

Chez les enfants dans certaines régions africaines, une altération de la croissance et de quelques paramètres immunitaires a également été observée (Turner *et al.*, 2003 ; Gong *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2005).

² Cependant, en 1997, des valeurs indicatives calculées en utilisant des modèles d'extrapolation mathématiques de quantification du risque (avec des facteurs de sécurité de 2000 à 5000) ont été proposées par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) telles que 0,15 ng/kg p.c./j pour l'AFB1 ou 0,20 ng/kg p.c./j pour l'AFM1.

5.2 Exposition de la population Française

Une étude de la ration alimentaire totale (EAT, 2004) a été entreprise en 2000, afin de connaître le niveau de consommation et d'exposition de la population française générale et végétarienne aux aflatoxines à partir d'aliments « prêt à consommer » (Leblanc *et al.*, 2005).

Les résultats montrent qu'aucun échantillon sur les 78 analysés en aflatoxines B1, B2, G1 et G2 ainsi qu'aucun des 70 analysés pour la recherche d'aflatoxine M1 n'a été retrouvé à un niveau supérieur aux limites de détection, et donc à celui des limites réglementaires communautaires en vigueur (CE, 2001).

Le tableau 1 récapitule les apports moyens et au 95^{ème} percentile de consommation pour différents types de populations françaises.

Tableau 1 : Estimation des apports alimentaires moyens et des forts consommateurs (P95) pour différents types de population en aflatoxines B1,B2, G1 et G2 et en aflatoxine M1 (EAT, 2004)

Type de population		Apport moyen (ng/kg p.c./j)	Apport au P95 (ng/kg p.c./j)	% d'individus pouvant dépasser la "limite maximale" ¹	Apport moyen (ng/kg p.c./j)	Apport au P95 (ng/kg p.c./j)	% d'individus pouvant dépasser la "limite maximale" ¹
		AFB1, B2, G1 et G2			AFM1		
Population générale	Adultes (15 ans et +)	0,12	0,35	0,01	0,09	0,21	0
	Enfants (3-14 ans)	0,32	0,89	3,4	0,022	0,55	0,2
Population végétarienne (15 ans et +)	Ovolactovégétariens	0,60	1,60	16,2	0,10	0,20	0
	Lactovégétariens	0,40	0,90	2,6	0,10	0,30	0
	Végétaliens	0,90	2,10	23,0	0	0	0

¹ : limite maximale fixée par le JECFA et le SCF à 1 ng/kg p.c./j

A titre de comparaison, la Tâche européenne SCOOP européenne³ de 1997 a estimé l'exposition moyenne de la population française à l'aflatoxine B1 à 1,3 ng/kg p.c./j et à l'aflatoxine M1 à 0,4 ng/kg p.c./j. Les aliments les plus contributeurs à cette exposition sont, en raison de leur forte consommation, les céréales et les produits céréaliers pour l'aflatoxine B1, et le lait et la poudre de lait pour l'aflatoxine M1.

5.3 Suivi de l'exposition humaine : biomarqueurs

L'AFM1 et l'AFQ1 ont été retrouvées dans les urines humaines et l'AFM1 dans le lait maternel. Bien que la teneur de ces métabolites, rapportée au niveau d'exposition en AFB1 ne soit pas connue, le dosage de l'AFM1 dans l'urine (Zhu *et al.*, 1987) et dans le lait maternel (Wild *et al.*, 1987) au sein de populations humaines constitue un indicateur simple d'exposition de ces populations.

La mesure d'adduits de l'AFB1 à l'albumine sérique est un indicateur de l'intoxication (Wild *et al.*, 1992 et 1996). La détection des adduits à l'ADN dans les urines, montrant l'initiation d'un processus de réparation du génome, consécutif à son altération, peut être aussi utilisée comme indicateur quantitatif d'exposition des populations aux aflatoxines. Mais de telles analyses sont difficiles à mettre en œuvre. Elles permettent néanmoins de compléter le dosage de l'AFM1 excrétée et de confirmer l'exposition aux aflatoxines par l'alimentation.

6. Exposition animale :

6.1 Effets sur la santé animale et transfert dans les produits animaux

6.1.1 Les porcins

Plusieurs cas d'aflatoxicose aiguë survenus en élevage ont été décrits (Tableau 2). La mort des

³ SCOOP reports on Tasks 3.2.1. (1997). Risk Assessment of Aflatoxins by the population of EU members states

animaux est le plus souvent survenue en quelques heures après un épisode hémorragique sévère. Les autopsies ont montré des hémorragies internes massives et l'examen histologique du tissu hépatique une nécrose centrolobulaire importante. Des cas d'aflatoxicose chronique ont été observés dans des états du sud des Etats-Unis (« *corn belt* ») pour des teneurs en aflatoxines de 1 à 3,5 mg/kg d'aliment consommé pendant un mois. Elles se traduisent par des diminutions de prise alimentaire et de gain de poids dès les premiers jours, une asthénie puis, pour les cas sévères, coma et mort. L'autopsie révèle un foie pâle ou décoloré, parfois cirrhotique. L'examen histologique montre des hépatocytes gonflés et vacuolés, une hyperplasie des canalicules biliaires, et une fibrose, voire une nécrose pour les cas sévères (Meissonnier *et al.*, 2005).

Les effets d'une exposition de longue durée à des aliments contaminés par les aflatoxines chez le porc ont également été explorés à titre expérimental avec comme tableau clinique des diminutions de la prise alimentaire et du gain de poids ainsi que des lésions hépatiques (Tableau 2). Une étude toxicologique sur des porcelets de 10 à 15 kg, recevant pendant vingt huit jours une alimentation à 1, 2, 3 et 4 mg d'AFB1/kg d'aliment montre outre un gain de poids réduit, une altération des activités enzymatiques sériques marqueurs de lésions hépatiques d'autant plus précoces que les doses d'aflatoxines administrées sont élevées, avec chronologiquement une augmentation significative de l'aspartate amino-transférase puis des phosphatases alcalines (Harvey *et al.*, 1988). L'augmentation des gamma-glutamyl-transférase n'a été observée que pour les animaux exposés aux fortes doses (3 et 4 mg/kg d'aflatoxines).

Plusieurs travaux *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo* ont montré les effets des aflatoxines sur l'immunité du porc avec pour conséquence une augmentation de la sensibilité aux infections à *Treponema* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* et *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Joens *et al.*, 1981, Cysewski *et al.*, 1978). Une diminution de la réponse vaccinale a également été observée dans certaines études (Cysewski *et al.*, 1978, Marin *et al.*, 2002).

6.1.2 Les volailles

Les aflatoxines ont été découvertes à l'occasion d'un épisode toxique survenu dans des élevages de dinde en 1960, en Angleterre (Turkey X disease). Comme dans la plupart des espèces animales, la cible principale est le foie et les manifestations de l'intoxication sont variables selon la durée d'exposition et la dose, une forme aiguë et une forme chronique pouvant être observées. La toxicité des aflatoxines est également très différente selon l'espèce et l'âge des animaux, le caneton d'un jour est le plus sensible, la caille la plus résistante.

Les formes aiguës d'intoxication ne sont en général pas observées dans les conditions d'élevage.

La forme chronique de l'intoxication est la plus fréquente. Elle fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés pendant plusieurs semaines (minimum 1 semaine). Les manifestations cliniques observées sont dominées par une diminution des performances (diminution du GMQ, chute de ponte) associée à des hémorragies et des défauts de pigmentation des carcasses. Les lésions hépatiques sont les plus caractéristiques. Une hyperplasie nodulaire avec fibrose et prolifération des canalicules biliaires est observée chez le canard, la dinde, le poulet. Ces lésions sont observées pour des doses de l'ordre de 0,1 mg/kg d'aliment chez le canard, 0,3 à 0,5 mg/kg d'aliment chez la dinde et 0,5 à 2 mg/kg d'aliment chez le poulet. Lors d'exposition prolongée pendant plusieurs semaines (souvent plus de 10), la fibrose hépatique s'accompagne de tumeurs et une toxicité embryonnaire peut apparaître. Ces troubles sont accompagnés de différentes altérations biochimiques et hématologiques. On note une diminution des concentrations sériques en protéines, cholestérol, triglycérides et une augmentation des concentrations en gammaglutamyl transférases, phosphatases alcalines, sorbitol déshydrogénases et transaminases. Enfin, une altération des défenses immunitaires est observée mais qui varie avec la dose d'exposition aux aflatoxines et le moment d'exposition à l'agent infectieux (pendant ou après l'exposition aux aflatoxines).

Lors de diminution des performances zootechniques, l'éventuelle implication des mycotoxines sur les productions aviaires est souvent évoquée en l'absence d'autre cause explicative. Ce comportement est sans doute en partie lié aux observations conduites par Hamilton (1984) chez le poulet en croissance. Cet auteur est le premier à avoir démontré une altération des performances des animaux lors d'exposition à de faibles doses. Lorsque le critère retenu pour parler d'un impact sur la santé est un ralentissement de croissance, un niveau de 1250 µg/kg d'aliment en aflatoxine est nécessaire. Si on se base sur la présence d'altérations hématologiques et biochimiques des effets sont observables à partir de 625 µg/kg. Une analyse plus poussée de l'impact des faibles contaminations sur l'indice de

conversion alimentaire (effet considéré significatif à 1% de variation) et sur la croissance (effet considéré significatif à 2% de variation) révèle qu'un aliment contaminé à hauteur de 30 µg/kg entraîne des pertes dans 30% des cas alors qu'un niveau de contamination de 6 µg/kg occasionne des effets dans 2% des cas. Hamilton (1984) recommande que l'aliment pour poulet ne dépasse pas 10 µg/kg d'aflatoxines.

Transfert dans les produits animaux

La persistance à l'état résiduel de l'AFB1 et de ses métabolites dans l'organisme semble variable selon les espèces et selon les études. Ces variations ne sont pas toutes explicables par des différences de métabolisme entre espèces, il semble que les méthodes de détection utilisées ainsi que les procédures d'extraction de la toxine et de ses métabolites soient déterminantes. Les données disponibles dans la plupart des publications sont souvent insuffisantes pour réellement pouvoir comparer les méthodes entre elles. Il a été donc choisi de présenter ici des résultats parmi les plus probants dans un tableau de synthèse (tableau 3). Le foie et les reins contiennent des quantités plus élevées de toxines et/ou de métabolites que les muscles, en dehors du gésier qui est directement exposé. La caille semble un vecteur plus important de résidus que les autres espèces d'oiseaux. La poule serait un vecteur plus important de résidus que le poulet, une excrétion dans les œufs étant également possible, au moins lors d'exposition à des doses élevées.

Tableau 2– Conditions d'intoxication par les aflatoxines chez le porc et tableau clinique.

Animaux	Aliments et toxines	Contamination alimentaire	Durée d'exposition	Observations	Auteur
Episodes d'aflatoxicose aiguë					
380 porcs (truies, charcutiers)	Aliments avariés porcs Aflatoxines	À partir du contenu stomacal : AFB1 : 0,6 à 5 mg/kg AFB2 : 0,1 à 0,5 mg/kg	du ration unique	<i>Mortalité</i> : 80 animaux en 3 jours <i>Clinique</i> : Hémorragie, trouble de l'équilibre et digestifs, décompensation sévère et rapide <i>Autopsie</i> : Hémorragie interne, oedèmes pulmonaire et hépatique, nécrose hépatique	Ketterer <i>et al.</i> , 1982
17 porcs	Arachides moisies Aflatoxines	AFB1 > 20 mg/kg AFB2 > 2 mg/kg AFG1 > 12 mg/kg AFG2 > 1 mg/kg	ration unique	<i>Mortalité</i> : 8 animaux en 1 semaine	Ketterer <i>et al.</i> , 1982
60 porcs (3 mois)	Arachides moisies Aflatoxines	AFB1 > 10 à 20 mg/kg AFB2 > 0,5 mg/kg AFG1 > 10 à 20 mg/kg AFG2 > 0,5 à 1 mg/kg	4 jours	<i>Mortalité</i> : 8 animaux en 5 jours <i>Foie</i> : Stéatose hépatique, hyperplasie des hépatocytes, infiltration leucocytaire et centrolobulaire	Ketterer <i>et al.</i> , 1982
Etudes expérimentales d'intoxication aiguë					
Porcelets (11 à 21 kg)	AFB1 ou AFB1 57%, AFG1 37%, AFB2 3%	1,98 mg/kg poids administration unique, per os	3 à 72 heures	<i>Clinique</i> : diminution de la prise alimentaire et troubles musculaires <i>Foie</i> : nécrose hépatique, infiltration leucocytaire, hémorragie hépatique ; la sévérité des lésions augmente avec le temps	Cysewski <i>et al.</i> , 1968
Porcelets (12 - 15 kg)	AFB1 81%, AFG1 19%	1,2 mg/kg poids administration unique, per os	24 à 72 heures	<i>Foie</i> : dégénérescence hépato-cellulaire, infiltration de leucocytes, stéatose, altération du contenu glycogéno-lipidique	Miller <i>et al.</i> , 1982

Animaux	Aliments et Toxines	Contamination	Durée exposition	Observations	Auteur
Episodes d'aflatoxicose chronique					
Porcs (élevage animaux)	de 250 Maïs AFB1 AFB2	Ration alimentaire : 0,8 mg/kg AFB1 + 0,2 mg/kg AFB2	1 mois environ	<i>Mortalité</i> : 30 porcs dans le mois <i>Clinique</i> : Ictère généralisé <i>Foie</i> : stéatose hépatique, infiltration leucocytaire dans le foie, hyperplasie des hépatocytes	Hayes <i>et al.</i> , 1978
71 porcs (3mois)	Sorgho Aflatoxines Ochratoxine	AFB1 3 mg/kg AFB2 0,4 mg/kg AFG1 5 mg/kg AFG2 0,9 mg/kg OTA 0,1 mg/kg	3 semaines	<i>Mortalité</i> : 4 porcs <i>Clinique</i> : diminution de la prise alimentaire <i>Foie</i> : stéatose hépatique, hyperplasie des hépatocytes et canalicules biliaires	Ketterer <i>et al.</i> , 1982
600 porcs l'engraissement	à Maïs Aflatoxines (non détaillées)	AF 2,5 à 3,5 mg/kg dans l'aliment	1 mois	<i>Mortalité</i> : 400 porcs dans le mois <i>Clinique</i> : anorexie, perte de poids, troubles digestifs et de l'équilibre, décompensation sévère et rapide <i>Foie</i> : hypertrophie, nécrose et fibrose hépatique	Coppock <i>et al.</i> , 1989
Etudes expérimentales d'intoxication chronique					
Porcs	AFB1	0,14 mg/kg ; 0,28 mg/kg ou 0,41 mg/kg	Période de croissance de 20 à 70 kg	<i>Clinique</i> : diminution du gain de poids <i>Histologie du foie</i> : hépatocytes vacuolés et anisocaryose dans les zones périportales ; prolifération des canalicules biliaires	Duthie <i>et al.</i> , 1966
Porcs (50 - 55 kg)	AFB1 74%, AFG1 19%, AFB2 7%	0,4 mg/kg ; 0,75 mg/kg ou 1,5 mg/kg	66 jours	<i>Clinique</i> : diminution de la prise alimentaire et du gain de poids <i>Foie</i> : nécrose hépatique et prolifération des canalicules biliaires	Southern <i>et al.</i> , 1979
Porcs (12 kg)	AFB1 88%, AFG1 2%, AFB2 9%, AFG2 1%	1 mg/kg 2 mg/kg 3 mg/kg 4 mg/kg	28 jours	<i>Clinique</i> : diminution de la prise alimentaire et du gain de poids aggravée avec l'augmentation des doses ; à 3 et 4 ppm les animaux asthéniques <i>Foie</i> : précocité des lésions avec l'augmentation des doses, stéatose/cholestase hépatique, infiltration leucocytaire, fibrose, nécrose, hyperplasie des canalicules biliaires	Harvey <i>et al.</i> , 1988

Tableau 3 : Conditions d'intoxication par les aflatoxines chez les volailles

Espèce	Régime	Tissu	Teneur	Commentaire	Ref
Dinde	50 et 150 µg/kg 11sem ^a	foie	0,02-0,09 et 0,11-0,23	AFB1 + AFM1	Richard <i>et al.</i> , 1986
		reins	0,02-0,04 et 0,11-0,21	AFB1 + AFM1	
		gésier	0,04-0,16 et 0,01-0,12	AFB1 (AFM1<0,01)	
	50 et 150µg/kg 11sem puis aliment indemne 1sem	foie	<0,01	AFB1 et AFM1	
		reins	<0,01	AFB1 et AFM1	
		gésier	0,04-1,9 et 0,09-0,24	AFB1 (AFM1<0,01)	
Caille	3 000µg/kg 8j ^b	foie	7,83 ± 0,49 et 5,31 ± 0,22	AFB1 libre et conjuguée	Bintvihok <i>et al.</i> , 2002
			22,34 ± 2,40 et 10,54 ± 0,42	Métabolites libres et conjugués	
		muscle	0,38 ± 0,03 et <0,03	AFB1 libre et conjuguée	
			0,82 ± 0,05 et 0,32 et 0,08	Métabolites libres et conjugués	
Canard	3 000µg/kg 8j ^b	foie	0,52 ± 0,04 et 0,44 ± 0,16	AFB1 libre et conjuguée	
			2,74 ± 0,15 et 3,81 ± 0,25	Métabolites libres et conjugués.	
		muscle	<0,03 et <0,03	AFB1 libre et conjuguée	
			0,21 ± 0,09 et 0,14 et 0,05	Métabolites libres et conjugués	
Poulet	3 000µg/kg 8j ^b	foie	0,15 ± 0,09 et 0,10 ± 0,01	AFB1 libre et conjuguée	
			1,54 ± 0,36 et 0,93 ± 0,04	Métabolites libres et conjugués.	
		muscle	<0,03 et <0,03	AFB1 libre et conjuguée	
			0,11 ± 0,02 et 0,08 et 0,05	Métabolites libres et conjugués	
Poule	3 000µg/kg 8j ^b	foie	0,34 ± 0,03 et 0,23 ± 0,08	AFB1 libre et conjuguée	
			2,38 ± 0,36 et 4,04 ± 0,10	Métabolites libres et conjugués	
		muscle	<0,03 et <0,03	AFB1 libre et conjuguée	
			0,14 ± 0,04 et 0,11 ± 0,04	Métabolites libres et conjugués	
Poule pondeuse	10 000µg/kg 7j ^c	oeufs	0,28 ± 0,10 et 0,38 ± 0,11	AFB1 et AF totales	Qureshi <i>et al.</i> , 1998
Poule pondeuse	8 000ppb 7j ^d	foie	0,49 ± 0,28 et 0,20 ± 0,09	AFB1 et AF totales	Trucksess <i>et al.</i> , 1983a
		reins	0,32 ± 0,18 et 0,10 ± 0,04 et 0,05 ± 0,02	AFB1 et AF totales et AFM1	
		muscle	0,08 ± 0,03	AF totales	
		oeufs	0,24 ± 0,07 et 0,25 ± 0,09	AFB1 et AF totales	
Poule pondeuse	2 500µg/kg 4sem	foie	4,13 ± 1,95	AFB1	Zaghini <i>et al.</i> , 2005
		oeufs	<0,5 et < 0,01	AFB1 et AFM1	
Poulet	55µg/kg 9j	foie	0,26 et 0,02	AFB1 et AFM1	Madden <i>et Stahr</i> , 1992
	4 448µg/kg 9j	foie	1,52 et <0,1	AFB1 et AFM1	

^a Des données sont disponibles à 13 semaines, elles ne suggèrent pas une accumulation

^b Des données sont disponibles à 11 jours, elles ne suggèrent pas une accumulation

^c Des données sont disponibles à 14 jours, elles ne suggèrent pas une accumulation

^dLa distribution d'un aliment indemne pendant 7 jours entraîne une disparition quasi-totale de l'AFB1 et de ses métabolites

Tableau 5 : Conditions d'intoxication aiguë par les aflatoxines chez les poissons et crevettes et tableau clinique.

Animaux	Aliments et Contamination alimentaire	Durée d'exposition	Observations	Auteur	
Episodes d'aflatoxicose sur le terrain					
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	AFB1 (tourteau de coton naturellement contaminé)	0,5 µg/kg dans l'aliment	<i>Cancer</i> : augmentation importante des cancers du foie	Ashley <i>et al.</i> (1965) ; Sinnhuber <i>et al.</i> (1965)	
Etudes expérimentales aiguës					
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (50g)	AFB1	0,5-1,0 mg/kg aliment	10 jours	<i>Mortalité</i> : 50% des truites (DL50)	Lee <i>et al.</i> (1991)
Carpe indienne (<i>Labeo rohita</i>) (35 g)	AFB1	7,5-13,75 mg/kg poids administration par injections	10 jours	<i>Mortalité</i> : après 48h, dose dépendante (20-60%) <i>Clinique</i> : diminution de la prise alimentaire, léthargie, perte d'équilibre. <i>Foie</i> : nécrose, hémorragie <i>Branchies</i> : nécrose, hémorragie. <i>Cerveau</i> : congestion, méningite. <i>Cœur</i> : dégénérescence, inflammation. <i>Rein</i> : nécrose, dégénérescence. <i>Muqueuse intestinale</i> : mue.	Sahoo <i>et Mukherjee</i> (2001a)
Carpe indienne (<i>Labeo rohita</i>) (35g)	AFB1	1,25-2,50 mg/kg poids administration journalière par injections	90 jours	<i>Clinique</i> : Cachexie, pigmentation sombre des écailles. <i>Foie</i> : lésions préneoplastiques	Sahoo <i>et Mukherjee</i> (2001b)
Poisson (<i>Ictalurus punctatus</i>)	chat AFB1	10 mg/kg aliment	70 jours	<i>Mortalité</i> : augmentation forte de la mortalité <i>Clinique</i> : gain de poids réduit <i>Autopsie</i> : lésions modérées de certain organes.	Jantrarotai <i>et Lovell</i> (1990)

Poisson (<i>Ictalurus punctatus</i>) (31g)	chat	FB1 (maïs naturellement contaminé)	80-720 aliment	mg/kg	98 jours	<i>Mortalité</i> : forte mortalité à partir de 320 mg/kg aliment <i>Clinique</i> : gain de poids diminué à partir de 80 mg/kg aliment.	Lumlertdacha et Lovell (1995)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	du Nil	AFB1	1,9 aliment	mg/kg		<i>Clinique</i> : gain de poids réduit. <i>Foie</i> : lésions hépatiques	Chavez- Sanchez <i>et al.</i> (1994)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	du Nile	AFB1	0,1-0,2 aliment	mg/kg	70 jours	<i>Mortalité</i> : 17% à partir de 0,2 mg/kg aliment <i>Clinique</i> : gain de poids réduit à partir de 0,1 mg/kg aliment	El-Banna <i>et al.</i> (1992)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	du Nile	AFB1	0,25-100 aliment	mg/kg		<i>Clinique</i> : gain de poids réduit, hémocrite réduite à partir de 0,25 mg/kg aliment <i>Foie</i> : Nécroses hépatiques à partir de 100 mg/kg aliment.	Tuan <i>et al.</i> (2002)
Walleye (<i>Stizostedion vitreum</i>)	jaune <i>vitreum</i>	AFB1	0,05-0,1 aliment	mg/kg	30 jours	<i>Mortalité</i> : 8% à 100 ng/kg <i>Clinique</i> : Léthargie après 15 jours <i>Foie</i> : dégénérescence	Hussain <i>et al.</i> (1993)
Crevette tigrée (<i>Penaeus monodon</i>) (3,5 mois)	noire (<i>Penaeus monodon</i>)	AFB1	0,005-0,02 mg/kg aliment		10 jours	<i>Mortalité</i> : + 20% <i>Clinique</i> : gain de poids diminué (-46-59%) <i>Hépatopancréas</i> : lésions <i>Hémolymphe</i> : changements biochimiques	Bintvihok <i>et al.</i> (2003)
Etudes expérimentales d'intoxications chroniques							
Truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	arc-en-ciel	AFB1	0,08-0,5 par balnéation (embryons lors de l'exposition)	mg/L	15-60 min d'exposition et 9-24 mois de suivi des animaux	<i>Réponse immunitaire</i> : Fonction immunitaire affectée à long terme (au moins 2 ans) à partir de 0,5 mg/L, production et prolifération en Ig élevée, populations des leucocytes affectées. <i>Cancer</i> : augmentation des cancers du foie (62-66%) à partir de 0,08 mg/L, l'incidence augmente avec la température d'élevage.	Hendricks <i>et al.</i> (1980) Bailey <i>et al.</i> (1988) Ottinger <i>et</i> Kaattari (2000),
Truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	arc-en-ciel	AFB1	0,02 aliment	mg/kg	4 semaines d'exposition et 1 an de suivi des animaux	<i>Cancer</i> : augmentation des cancers du foie (62%).	Bailey <i>et al.</i> (1988)
Saumon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	coho	AFB1	0,5 par balnéation (embryons lors de l'exposition)	mg/L	15 min d'exposition et 1 an de suivi des animaux	<i>Cancer</i> : augmentation des cancers du foie (9%).	Bailey <i>et al.</i> (1988)

Saumon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	coho	AFB1	5 mg/kg aliment	4 semaines d'exposition et 1 an de suivi des animaux	Cancer : augmentation des cancers du foie (5%).	Bailey et al. (1988)
Carpe indienne (<i>Labeo rohita</i>) (30-50g)		AFB1	1,25-5,00 mg/kg poids administration unique par injection	60-90 jours	Réponse immunitaire : Diminution de la réponse non spécifique (concentrations sériques en protéines totales et en albumine réduites, augmentation du ratio A:G, activités bactéricides du sérum et des lysozymes et de phagocytose des neutrophiles réduites) et de la réponse spécifique (titre d'agglutination bactérien contre <i>Edwardsiella tarda</i> et nombre d'anticorps réduits) dès 1,25 mg FB1/kg poids, augmentation de la mortalité après inoculation avec <i>Edwardsiella tarda</i> ou avec <i>Aeromonas hydrophila</i> .	Sahoo et Mukherjee (2001a) Sahoo et Mukherjee (2001b) Sahoo et Mukherjee (2003)
Poisson (<i>Ictalurus punctatus</i>) (31g)	chat	FB1 (maïs naturellement contaminé)	0,3-80 mg/kg aliment	98 jours	Réponse immunitaire : augmentation de la mortalité après inoculation avec <i>Edwardsiella ictaluri</i> à partir de 80 mg/kg aliment, production d'anticorps réduite à partir de 20 mg/kg aliment.	Lumlertdacha et Lovell (1995)

6.1.3 Les ruminants

Devenir des aflatoxines dans le rumen

L'addition d'AFB1 à la concentration de 9,5 ng/mL dans le contenu ruminal ne modifie pas la digestion *in vitro* de la luzerne ni la production des acides gras volatils (Auerbach *et al.*, 1998). En revanche, une diminution nette de la capacité digestive de l'écosystème microbien ruminal a été observée *in vitro* aux concentrations en AFB1 de 1 µg/mL (-50% de la quantité de luzerne digérée) et de 10 µg/mL (-67% de la quantité de luzerne digérée) (Westlake *et al.*, 1989).

Les résultats des études concernant la biodégradation de l'AFB1 et l'effet de la toxine sur l'écosystème microbien ruminal divergent. Les essais conduits *in vitro* indiquent soit une disparition importante de l'AFB1 pouvant atteindre 42% selon Engel et Hagemester (1978), soit une dégradation très faible voire nulle de la toxine au cours de la digestion ruminale (Mathur *et al.*, 1976 ; Kiessling *et al.*, 1984 ; Westlake *et al.*, 1989). Des métabolites de l'AFB1 comme l'aflatoxicol et l'AFM1 ont pu être identifiés *in vivo* dans le contenu ruminal (Trucksess *et al.*, 1983b). Une étude réalisée *in vitro* dans des conditions de simulation correcte du rumen et utilisant de la ¹⁴C-*AFB1*, a montré que seul l'aflatoxicol est produit par les microorganismes du rumen (Auerbach *et al.*, 1998). La radioactivité de l'aflatoxicol ne représentait que 0,6% de la radioactivité initiale.

Face à ces données disparates sur la dégradation de l'AFB1 dans le rumen, la sensibilité moindre des ruminants à l'AFB1, si elle existe, pourrait s'expliquer par la présence d'autres facteurs de détoxication, au niveau du foie par exemple...mais cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée expérimentalement.

Effet des aflatoxines sur l'état sanitaire des ruminants

Chez les bovins adultes, des signes cliniques d'intoxication apparaissent lors d'un régime présentant une contamination de 1,5 à 2,23 mg d'AFB1/kg d'aliment, et de plus de 50 mg/kg d'aliment chez les petits ruminants (Miller et Wilson, 1994). Les modifications des paramètres biologiques sanguins observées traduisent une altération des fonctions hépatiques. On observe alors une diminution des quantités d'aliments ingérés et une baisse significative de la production chez la vache laitière. Les effets immunosuppresseurs des aflatoxines affectent également les ruminants, ce qui les rend plus sensibles aux infections et diminue la résistance acquise par la vaccination.

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA-EFSA) atteste que la teneur réglementaire de 0,020 mg d'AFB1/kg d'aliment (Directive 2002/32/EC) n'a aucun effet sur la santé des ruminants. Toutefois, l'Autorité précise qu'une exposition longue à de concentrations faibles d'AFB1, pourrait conduire à des fibroses hépatiques et des tumeurs du foie : ces conditions auraient été à l'origine de la formation de carcinomes hépatiques chez des moutons élevés en dehors de la zone européenne. Le Panel scientifique chargé d'évaluer les risques dus à la présence d'AFB1 dans les ingrédients alimentaires des animaux indique qu'il n'est pas possible de définir une dose sans effet (NOEL) à partir des données scientifiques disponibles. Il note toutefois que la marge entre la dose toxique (> 1,5 mg/kg d'aliment complet) et la valeur haute des doses limites réglementaires (0,02 mg/kg d'aliment complet) est suffisamment large pour éviter tout risque de toxicité chez les animaux (AESA-EFSA, 2004).

Effet des aflatoxines sur les performances zootechniques des animaux

Selon Helferich (1984) et Helferich *et al.* (1986a, 1986b), la présence d'AFB1 à une concentration de 60 à 300 µg/kg d'aliment complet dans la ration de bovins ou de chèvres laitières ne modifie pas la quantité d'aliment ingéré par les animaux. En revanche, la dose de 600 µg/kg d'aliment complet a significativement diminué la quantité d'aliment ingéré par les bovins à l'engraissement. Applebaum *et al.* (1982) ont montré que la distribution d'AFB1 pure à raison de 13 mg/jour n'a pas modifié les quantités ingérées par des vaches laitières, alors qu'une dose identique apportée sous forme d'un extrait d'*A. parasiticus* contenant un mélange d'aflatoxines les a significativement diminuées. Ce résultat indique qu'une multicontamination amplifie l'effet négatif des toxines sur l'ingestion des aliments par rapport à une contamination unique.

L'association d'une diminution des quantités ingérées à une baisse de la valeur nutritionnelle des aliments conduit à une réduction de la quantité de nutriments consommés. Si, comme cela est vraisemblable, la digestion ruminale et intestinale ainsi que l'absorption digestive et le métabolisme sont également affectés, la part de nutriments mis à la disposition des ruminants serait donc réduite par la présence d'aflatoxines. En conséquence, la production animale sera affectée. Ainsi, Garret *et*

al. (1968) ont montré que le gain de poids de bovins en croissance était significativement diminué par un niveau d'apport de 700 µg d'AFB1/kg d'aliment complet. Un effet toxique sur le foie a été observé au cours de cette expérimentation dès le niveau de 100 µg/kg d'aliment complet. Le passage d'une ration alimentaire contenant 120 µg d'AFB1/kg à une ration ne contenant pas de toxine a amélioré la production laitière des vaches de 25% (Guthrie, 1979). Masri *et al.* (1969) et Patterson et Anderson (1982) ont également observé une diminution de la production laitière chez des vaches recevant des aliments contaminés avec des aflatoxines. Les auteurs ont noté une sensibilité à l'AFB1 variable selon les individus, la production laitière diminuant de manière significative pour certaines vaches alors qu'elle n'était pas modifiée pour d'autres. Il faut noter que les essais zootechniques ont été généralement conduits sur un nombre réduit d'animaux (< 10 par essai) et avec des teneurs en aflatoxines dépassant les concentrations réglementaires.

Transfert des aflatoxines dans le lait

Suite à l'administration d'une dose orale d'AFB1, ses métabolites sont rapidement retrouvés dans l'urine et dans le lait, alors que la part excrétée dans les fèces est faible, ce qui confirme l'absorption élevée et rapide de l'AFB1 par le tube digestif et son métabolisme dans le foie. Les produits issus du métabolisme de l'AFB1 et de l'AFB2 qui se retrouvent dans le lait sont l'AFM1 et, à un degré moindre, l'AFM2. Ces métabolites correspondent à des formes hydroxylées de chacune des molécules parentes. Kiermeier (1973), Fremy et Quillardet (1985) et Whitlow *et al.* (2000) ont montré que les aflatoxines apparaissent dans le lait environ 12 heures après une administration orale d'AFB1. La concentration dans le lait atteint un maximum en 24 à 48 heures et la clairance est très rapide puisque les aflatoxines disparaissent du lait 4 jours après leur retrait des aliments (Fremy et Quillardet, 1985 ; Frobish *et al.*, 1986). Ce résultat confirme l'extrême rapidité de l'absorption et du métabolisme des aflatoxines chez le ruminant.

Le passage dans le lait constitue pour l'animal un moyen de se protéger contre les toxines. Des études de transfert conduites chez des vaches produisant 10 à 20 litres de lait par jour ont mis en évidence des taux de transfert très faibles : 0,5 à 0,6% (Harvey *et al.*, 1991, Galvano *et al.*, 1996b). *A contrario*, un taux de transfert élevé de 6,2% a été mesuré chez des vaches produisant plus de 40 litres de lait par jour (Veldman *et al.*, 1992). La majorité des auteurs s'accorde pour attribuer un taux de transfert moyen dans le lait de l'ordre de 1,7 % mais celui-ci peut varier à l'échelle d'un troupeau de 1 à 6 % (Viroben *et al.*, 1983 ; Fremy et Quillardet, 1985 ; Frobish *et al.*, 1986 ; Van Egmond, 1989). Ce taux de transfert peut aussi varier entre individus, d'un jour à l'autre ou d'une traite à l'autre, puisqu'il dépend vraisemblablement de facteurs physiologiques et métaboliques qui pouvant eux-mêmes être affectés par les toxines ou par d'autres facteurs multiples. Ainsi, la nature du régime, le niveau de contamination, l'état sanitaire de l'animal, la capacité de l'individu à détoxifier, le stade physiologique et le niveau de production interviennent vraisemblablement dans le déterminisme du transfert de l'AFM1 dans le lait.

Le tableau 4 simule des situations de production laitière (base d'une vache de 650 kg) avec différents types de régimes alimentaires français (source INRA, Jouanny, communication personnelle) prenant en compte les teneurs maximales réglementaires de contamination en AFB1 pour estimer les teneurs en AFM1 qui en résulte dans le lait.

Nature du fourrage	Prod lait (kg/j)	Quantités d'aliments ingérées* (kg/j)			Quantités AFB1 ingérées** (µg/j)		Taux de transfert***	AFM1 dans lait	
		Fourrage	Maïs Grain	Tourteau de soja	Ration Totale	Concentrés		(µg/j)	(µg/kg lait)
Ensilage de maïs	30	15,3	4,4	2,3	110,0	33,5	1,7	1,8	0,06
	40	15,0	9,5	2,8	136,5	61,5	3	4,09	0,10
	50	14,7	8,8	4,4	139,5	66,0	6	8,37	0,17
Ensilage d'herbe	30	17,4	3,5	0,78	-	21,4	1,7	0,35	0,01
	40	16,8	9,2	0,80	-	50,0	3	1,50	0,04

Tableau 4 : Simulations de la teneur en AFM1 du lait de vache issu de différentes rations alimentaires françaises selon le niveau de production pour une vache de 650 kg de p.v. (source INRA, Jouany, communication personnelle)

	50	16,5	12,5	0,82	-	66,5	6	3,99	0,08
Foin	30	16,3	8,0	0,19	-	40,9	1,7	0,69	0,02
	40	16,0	12,6	0,73	-	66,6	3	2,00	0,05
	50	15,8	11,0	2,3	-	66,5	6	4,00	0,08
Pâturage	30	19,9	1,2	0	-	6,0	1,7	0,10	0,01
	40	18,8	7,2	0	-	36,0	3	1,10	0,03
	50	18,2	12,8	0	-	64,0	6	3,84	0,08

* poids bruts corrigés pour une teneur en humidité de 12% de chaque ingrédient y compris les fourrages

** la valeur limite de concentration en AFB1 (5 µg/kg d'aliment à 12% d'humidité) (directive 2002/32/CE du 7 mai 2002) a été appliquée aux aliments potentiellement contaminables (tourteau de soja, maïs grain, ensilage de maïs). L'ensilage d'herbe, le foin et l'herbe pâturée ont été considérés comme exempts d'aflatoxine B1

*** le taux de transfert maximum a été appliqué : 6 % pour les animaux à production de 50 kg/l (EFSA Journal, 2004), 3 % pour les animaux ayant une production de 40 kg/l et 1,7 % pour les animaux à production de lait à 30 kg/l (van Egmond, 1989)

En considérant le scénario le plus défavorable d'une vache forte productrice (produisant plus de 40 litres de lait par jour) ingérant une quantité importante d'aliments complémentaires contaminés à la limite maximale réglementaire de 5 µg AFB1/kg et un ensilage de maïs lui-même contaminé à la même teneur, avec un taux de transfert de l'AFB1 de 6 % dans le lait, il est possible de dépasser la teneur maximale de 0,05 µg et de 0,025 µg AFM1/L dans le lait destiné à l'alimentation des adultes et des enfants, respectivement. Cette possibilité s'amenuise lorsque l'on considère d'autres régimes alimentaires (à base d'herbe pâturée, d'ensilage d'herbe, ou de foin), à faible probabilité d'être contaminés, et des niveaux de production plus faibles, pour lesquels les taux de transfert sont dans la fourchette inférieure.

Les laits de grand mélange commercialisés pour la consommation courante présentent un risque moindre de contamination en AFM1 par rapport à ceux prélevés sur des exploitations laitières individuelles, selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AES-A-EFSA, 2004).

Au vu de ces considérations, l'EFSA a estimé que la réglementation s'appliquant aux aliments complémentaires pour vaches laitières (5 µg d'AFB1/kg) est en cohérence avec la teneur limite réglementaire de 0,05 µg d'AFM1/L pour le lait destiné au consommateur adulte (EFSA, 2004). Il faut toutefois rappeler que la teneur limite réglementaire est fixée à 0,025 µg d'AFM1/kg pour les laits destinés à l'alimentation infantile.

Le nombre réduit de données concernant le taux de transfert de l'AFB1 dans le lait des ovins et des caprins laitiers, rend ce raisonnement difficilement extrapolable à ces productions animales. Toutefois, le groupe d'Experts Européens (EFSA, 2004) conclut que le lait de brebis contiendrait, en moyenne, davantage d'aflatoxine M1 que le lait de vache.

Transfert des aflatoxines dans les tissus des ruminants

Aucune trace d'AFB1 ou d'AFM1 n'a pu être détectée dans les muscles ou le gras de bovins en croissance (250 kg) ayant consommé des aliments contenant 600 µg/kg d'AFB1 pendant une période continue de 155 ou 170 jours suivie d'une période de retrait de 2 semaines (Helferich *et al.*, 1986b). Des lésions hépatiques légères ont toutefois été mises en évidence chez 9 des 10 animaux traités avec la dose de 600 µg/kg d'aliment complet. Un essai conduit sur vaches recevant des doses journalières de 535 µg/kg d'aliment complet pendant 14 jours a donné des résultats semblables (Hoversland *et al.*, 1973). Des traces d'AFB1 ont toutefois été détectées dans le muscle cardiaque et dans les reins des animaux. Shreeve *et al.* (1979) ont confirmé l'absence d'AFB1 et d'AFM1 dans les muscles de vaches laitières ayant reçu une ration alimentaire naturellement contaminée en AFB1 à la dose de 20 µg/kg d'aliment complet pendant 7 ou 11 semaines. Le foie ne recelait pas de résidu toxique alors que les reins contenaient de l'AFM1.

6.1.4 Les carnivores domestiques.

Si les animaux de compagnie et de loisirs ne diffèrent pas fondamentalement des autres animaux domestiques quant aux circonstances et aux conséquences du risque lié aux mycotoxines, ils présentent cependant une différence notable : celle de la durabilité de l'action toxique inhérente à leur désormais très longue espérance de vie. Pour ces espèces, c'est tout autant l'impact de consommation de faibles doses sur de très longues périodes avec apparition de tumeurs hépatiques et d'une susceptibilité accrue aux infections, que le risque ponctuel lié à des contaminations massives associés à un tableau clinique plus explicite d'hépatite nécrosante, qu'il s'avère particulièrement pertinent de connaître.

Bien avant que la maladie X du dindon soit identifiée avec certitude comme étant la première manifestation d'aflatoxicose animale dans la décennie 1960, plusieurs épisodes mortels d'hépatite d'étiologie inconnue avaient été décrits chez le chien sous le nom d'hépatite X (Seibold, 1953 ; Newberne *et al.*, 1955). La symptomatologie et l'anatomopathologie très proches entre ces 2 entités cliniques a conduit *a posteriori* à attribuer les désordres observés dans les élevages canins à une consommation probable d'AFB1. La confirmation expérimentale en a été faite en 1960 par Newberne *et al.* Depuis lors plusieurs cas d'aflatoxicose naturelle ont été décrits chez le chien (mais aucun chez le chat). La DL50 est estimée entre 0,5 et 1,5 mg/kg p.c. chez le chien et entre 0,3 et 0,6 mg/kg p.c. chez le chat.

Différentes enquêtes épidémiologiques récentes laissent à penser que les carnivores domestiques (chiens et chats) pourraient être potentiellement exposés au risque toxicologique lié à la présence d'AFB1 dans les aliments secs contenant des céréales ou des tourteaux. Un échantillon de 35 aliments secs pour chiens et de 35 aliments secs pour chats disponibles sur le marché britannique a fait l'objet d'une recherche des différentes aflatoxines (seuil de détection 0,5 µg/kg). L'AFB1 n'a été identifiée que dans un seul aliment pour chats et à un taux très faible (2,1 µg/kg) (Scudamore *et al.*, 1997).

Une enquête analogue conduite sur 19 échantillons d'aliments secs pour chiens et 16 d'aliments secs pour chats disponibles sur le marché mexicain sous 12 marques différentes (Sharma et Marquez, 2001), a révélé au contraire une présence quasi systématique d'AFB1 identifiée dans 79% des aliments pour chiens et 100% des aliments pour chats ! Des niveaux élevés ont été mesurés dans 3 aliments pour chats (46,1 ; 30,8 et 22,2 µg/kg) et 2 aliments pour chiens (39,7 et 27 µg/kg). Deux aliments (un pour chiens et un pour chats) totalisaient pour l'ensemble des aflatoxines des valeurs de 72,4 et 59,7 µg/kg).

Maia et Bastos de Sequeira (2002) ont réalisé un travail comparable sur 45 échantillons d'aliments secs pour chiens et 25 échantillons d'aliments secs pour chats disponibles sur le marché brésilien. Les conclusions en furent plus rassurantes : seulement trois aliments pour chiens et un aliment pour chats se sont révélés contenir de l'AFB1 à un niveau plus acceptable (respectivement : 17, 15, 25 et 16 µg/kg).

Deux enquêtes récentes ont été conduites sur des aliments pour chiens en Turquie. Gunsen et Yaroglu (2002) ont analysé 18 aliments secs. Trois sur 18 ont présenté des valeurs supérieures à 10 µg/kg (dont un à 20 µg/kg). Basalan *et al.* (2004) ont analysé 21 aliments secs pour chiens qui en moyenne dosaient 6,7 µg/kg mais dont aucun ne présentait de valeur supérieure à 10 µg/kg.

En décembre 2005, une société américaine, fabriquant des aliments secs pour chiens et chats, a procédé au rappel de produits finis élaborés dans son unité de fabrication de Caroline du Sud, suite à la survenue de mortalité sur des chiens (au moins 100 décès selon l'université de Cornell – communication personnelle) consécutivement à l'utilisation de maïs américains récoltés fin 2005 et contaminés par de l'AFB1 (Muirhead, 2006). Selon le rapport de la FDA (cité par le JAVMA, 2006, 228(6), p. 829), 16 lots d'aliments ont révélé des taux d'AFB1 supérieurs à 20 ppb, un échantillon atteignant les taux record de 376 µg/kg, voire de 598 µg/kg selon Stenske *et al.* (2006). Cette contamination exceptionnelle a résulté de l'utilisation de quatre livraisons de maïs dont la contamination en AFB1 allait de 90 à 1851 µg/kg.

Dans les conditions naturelles, les aflatoxicoses sont généralement des intoxications aiguës (quelques jours) ou subaiguës (quelques semaines), et plus rarement des intoxications suraiguës (quelques heures) (Bastianello *et al.*, 1987 ; Bailly *et al.*, 1997).

Comme déjà évoqués, les premiers cas d'intoxication de chiens par les aflatoxines ont été rapportés aux Etats-Unis dans la décennie 1950 sous le nom d'hépatite X. Il ne s'est agi alors que d'une suspicion *a posteriori*, aucune identification de l'agent causal n'ayant pu être faite. Cependant pour au moins un des épisodes (Newberne *et al.*, 1955), l'origine alimentaire n'a pas fait de doute dans la

mesure où les auteurs ont pu reproduire les symptômes et les lésions à partir des aliments incriminés. En 1960, Newberne *et al.* relient pour la première fois les cas d'hépatite X du Chien à une possible contamination des aliments par de l'aflatoxine en reproduisant expérimentalement l'affection.

Plusieurs publications sont venues depuis lors confirmer que les chiens pouvaient ainsi constituer une cible privilégiée suite à la consommation le plus souvent de pain ou d'aliments secs moisis (Chaffee *et al.*, 1969 ; Ketterer *et al.*, 1975 ; Krishnamachari *et al.*, 1975 ; Liggett et Colvin, 1986). Le descriptif des symptômes est à chaque fois assez concordant et réunit anorexie, vomissement, dépression puis ictère ; et à l'autopsie : hépatite nécrosante, hémorragies intestinales. L'évolution est le plus souvent mortelle. La confirmation est généralement apportée par l'identification de l'aflatoxine soit dans les tissus (foie et reins), soit dans les aliments (de 0,3 à 0,5 mg/kg dans les cas subaigus ; 6 à 7 mg/kg dans les cas aigus), soit encore dans les vomissures (jusqu'à 100 mg/kg). Plus récemment en France, il a été rapporté sur un groupe de chiens appartenant à un boulanger, une intoxication collective suraiguë suite à la consommation accidentelle et limitée dans le temps de pâte à pain moisie fortement contaminée par de l'aflatoxine B1 (15 mg/kg) (Bailly *et al.*, 1997). La symptomatologie a été dans ce cas dominée par des manifestations convulsives, mais des lésions d'hépatite nécrosante ont été retrouvées chez un des animaux concernés dont l'euthanasie a été demandée par le propriétaire.

Entre 1975 et 2005, 11 épisodes d'aflatoxicose ont été rapportés aux USA dont un en 1998 qui a touché 48 chiens (Stenske *et al.*, 2006). Les dizaines d'animaux concernés par le dernier épisode toxique décrit aux USA en décembre 2005 suite à la consommation d'un aliment industriel contaminé par du maïs ont reproduit le même tableau symptomatique : léthargie, anorexie, vomissement, puis en moins de 4 jours, ictère, méléna, hématurie. L'évolution a été le plus souvent mortelle avec un dysfonctionnement hépatique majeur marqué par une élévation considérable des transaminases, une hyperbilirubinémie et un temps de prothrombine fortement prolongé.

En définitive, si les cas décrits dans la littérature, notamment les plus récents, se rapportent plus à des accidents toxicologiques ponctuels sans grande signification épidémiologique, il n'en demeure pas moins que par sa sensibilité à l'action hépatotoxique des aflatoxines (dès 0,1 mg/kg d'aliment voire moins), l'espèce canine constitue une cible à risque lors de l'utilisation alimentaire de céréales, de coproduits céréaliers ou de coproduits d'oléagineux trop fortement contaminés par les aflatoxines. Le respect des teneurs maximales autorisées (directive 2003/100/CE du 31 octobre 2003) fixant à 10 µg/kg la teneur maximale en aflatoxine B1 des aliments pour carnivores, offre une très large sécurité pour la santé du Chien et plus encore sans doute pour celle du Chat du fait de la part plus réduite des ingrédients à risque dans son alimentation, aucun cas d'intoxication n'ayant été rapporté dans cette dernière espèce. Les résultats des analyses faites sur les aliments secs produits et commercialisés dans certains pays, ainsi que l'épisode toxique récent montrent que le risque potentiel est cependant réel et nécessite de la part des industriels une vigilance de tous les instants.

6.1.5 Les équidés

Différentes enquêtes épidémiologiques récentes laissent à penser que les équidés pourraient également être potentiellement exposés au risque toxicologique lié à la présence d'AFB1 dans les aliments. Deux enquêtes récentes ont été conduites sur des aliments pour chevaux en Turquie. Gunsen et Yaroglu (2002) ont analysé 20 aliments composés. Deux d'entre eux ont présenté des valeurs supérieures à 10 µg/kg. Basalan *et al.* (2004) ont également analysé 20 aliments composés pour chevaux qui en moyenne dosaient 2 µg/kg mais dont aucun ne présentait de valeur supérieure à 10 µg/kg.

La sensibilité des équidés face à la consommation d'aliments contaminés par les AFB est assez peu documentée. Asquith (1985, cité par Vesonder *et al.*, 1991) situe à 54,8 µg/kg le seuil de contamination le plus bas associé à des manifestations cliniques. Quelques cas d'intoxications naturelles sont rapportés, confirmant ainsi l'exposition de cette espèce consommatrice traditionnelle de céréales et de protéagineux.

Le remplacement dans une formule d'aliment industriel de riz (trop cher) par du tourteau d'arachide et du maïs (moins chers mais de médiocre conservation) avec pour conséquence la présence d'un taux résiduel d'AFB (B1 + B2) de 400 µg/kg a conduit à un épisode d'aflatoxicose subaiguë avec une forte mortalité dans un effectif de chevaux (Angsubhakorn *et al.*, 1981). Une autre intoxication naturelle a été décrite aux USA en 1991 par Vesonder *et al.* (1991). Trois chevaux moururent d'une hépatite nécrosante grave après avoir consommé du maïs contaminé par 130 µg/kg d'AFB (B1 + B2).

Les différents tableaux cliniques rapportés (ataxie, hyperthermie, anorexie, ictère, hémorragies) sont en tous points conformes à celui observé lors d'intoxications expérimentales conduites durant 39 jours sur des poneys (0,075 à 0,3 mg/kg pv) la mort survenant en 12 à 16 jours pour la dose la plus élevée (Cysewski *et al.*, 1982). Avec un apport de 2 mg/kg pv les signes rapportés sont analogues mais la mortalité survient beaucoup plus rapidement (en 76 heures selon Bortell *et al.*, 1983).

Si les cas décrits dans la littérature sont, pour la plupart, anciens, il n'en demeure pas moins que tous soulignent la sensibilité particulière des équidés à l'action hépatotoxique des aflatoxines (dès 54,8 µg/kg d'aliment selon Asquith (1985) cité par Vesonder *et al.*, (1991)). Cette espèce constitue une cible à risque lors de l'utilisation de céréales, de coproduits céréaliers ou de coproduits d'oléagineux trop fortement contaminés par les aflatoxines pour la fabrication d'aliments composés notamment sur l'exploitation. Le respect des normes maximales de contamination prévues par la réglementation (directive 2003/100/CE du 31 octobre 2003) fixant à 10 µg/kg la teneur maximale en aflatoxine B1 des aliments pour équidés, offre une marge sécurité certaine pour la santé de chevaux. Les résultats des analyses faites sur les aliments produits et commercialisés dans certains pays montrent cependant qu'un risque potentiel existe, nécessitant de la part des industriels une grande vigilance.

6.1.6 Les poissons

Aflatoxicoses observées en élevage (voir Tableau 5)

Au début des années 1960, l'AFB1 a été rendue responsable d'une forte incidence de cancers du foie dans les élevages de truites arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) aux USA. La cause était un tourteau de coton contaminé (Ashley *et al.*, 1965 ; Sinnhuber *et al.*, 1965) ayant conduit une concentration en AFB1 de 0,5 µg/kg dans l'aliment. Cet épisode a éveillé l'intérêt des scientifiques pour la sensibilité des poissons, et notamment la truite, à l'AFB1. Les symptômes associés aux aflatoxicoses chez les poissons comprennent des branchies pâles, une capacité de coagulation du sang diminuée, une anémie et enfin des performances de croissance réduites. Ces effets peuvent passer inaperçus, mais causer cependant une réduction des performances zootechniques et donc des pertes économiques.

Etudes expérimentales menées sur les poissons (voir Tableau 5)

Les signes cliniques observés expérimentalement chez les poissons dépendent de la dose et de la durée d'exposition. Une exposition chronique (1,25-2,25 mg/kg p.v. par injections intra-péritonéales) entraîne des lésions prénéoplastiques au niveau du foie, accompagnées de modifications au niveau de certains organes tels que la rate, l'intestin, les branchies et le pancréas. En cas de toxicité aiguë (7,5 -13,75 mg/kg p.v. par injection intra-péritonéale), anorexie et mortalité sont observées. Les autres symptômes répondant à des doses élevées d'AFB1 sont des atteintes nécrotiques et vasculaires (hémorragies) du foie, des branchies, de l'intestin et des gonades, mais également des méningites, des congestions du cerveau, une dégénérescence et une réaction inflammatoire au niveau du cœur, une dégénérescence et une atteinte nécrotique des tubules du rein et une fonte de la muqueuse intestinale (Jantrarotai *et al.*, 1990 ; Sahoo et Mukherjee., 2001b).

L'importance des aflatoxicoses dépend de l'âge et de l'espèce des poissons (Tableau 5). Les alevins sont plus sensibles que les adultes et la truite arc-en-ciel est un des animaux les plus sensibles (DL50 : 0,81 mg/kg p.c.) alors que les espèces d'eaux chaudes comme le poisson chat (DL50 : 11,5 mg/kg p.c.) sont moins sensibles aux aflatoxines (Jantrarotai *et al.*, 1990). Mais même si les poissons d'eaux chaudes ont une sensibilité moindre, 10 mg/kg d'AFB1 environ dans l'aliment suffisent à causer une diminution des performances de croissance et des lésions tissulaires chez le poisson chat (Jantrarotai et Lowell, 1990) et la carpe indienne (Sahoo *et al.*, 2001a) et 0,1 mg/kg d'aliment chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (El-Banna *et al.*, 1992 ; Chavez-Sanches *et al.*, 1994). Un effet immuno-modulateur de l'AFB1 a également été observé chez les espèces de poissons étudiées, mais à des concentrations en aflatoxines très variables selon les espèces : à partir de 0,02 mg AFB1/kg d'aliment chez la carpe indienne (Sahoo et Mukherjee, 2001a et b et 2003; Sahoo *et al.*, 2001) ou à partir de 20 mg/kg chez le poisson chat (Lumlertdacha et Lovell, 1995). Quant aux concentrations en AFB1 nécessaires pour induire un cancer hépatique, elles varient également très fortement selon les espèces : 0,02 mg/kg pour la truite arc-en-ciel ou 5 mg/kg chez le saumon coho par exemple (Bailey *et al.*, 1988).

Chez les poissons, une exposition à l'AFB1 entraîne une réduction de la capacité de phagocytose des macrophages chez le tilapia du Nil (El-Enbaawy *et al.*, 1994), la suppression de l'activité bactéricide

du sérum, de la fonction neutrophile, de la réponse humorale immune et des niveaux de globulines chez la carpe indienne (exposition chronique) (Sahoo et Mukherjee, 2001a), une réduction de la mémoire des cellules B chez les embryons de truite arc-en-ciel (Arkoosh et Kaatari, 1987) et enfin une suppression de la production d'immunoglobuline et de la prolifération des lymphocytes chez la truite arc-en-ciel adulte (Ottinger et Kaatari, 1998). Une injection intra-péritonéale d'AFB1 (1,25 mg/kg p.v.) chez la carpe indienne produit une lymphocytolyse massive dans les organes hématopoïétiques (Sahoo *et al.*, 2001, Sahoo et Mukherjee, 2001a). Une exposition embryonnaire à l'AFB1 résulte en une dysfonction immune à long terme (au minimum 2 ans), caractérisé par un taux élevé de prolifération et de production d'immunoglobulines et par un impact différentiel sur les populations de leucocytes. Il est suggéré que l'AFB1 provoque une réduction de la capacité des réponses immuno-régulatrices des cellules B et T (Ottinger et Kaatari, 2000). Le potentiel immunosuppresseur a aussi été observé lors d'expérimentations chez le rat : immunité cellulaire affectée lors d'une intoxication sub-chronique et orale à partir de 300 et 600 ng AFB1/kg p.c. et pouvoir phagocitaire perturbé lors d'une intoxication par inhalation (JECFA, WHO, 1998)

Chez les crevettes, plusieurs études ont montré que l'AFB1 peut causer une réduction des performances de croissance, une digestibilité des aliments diminuée, des désordres physiologiques et des altérations tissulaires, principalement au niveau de l'hépatopancréas (Boonyaratpalin *et al.*, 2001 ; Bintvihok *et al.*, 2003). Toutefois les données sont contradictoires selon les études en ce qui concerne les doses efficaces. Dans un cas, 0,02 mg/kg dans l'aliment suffisent à induire de la mortalité, des altérations tissulaires au niveau de l'hépatopancréas et des changements biochimiques de l'hémolymphe (Bintvihok *et al.*, 2003), alors qu'une autre étude (Boonyaratpalin *et al.*, 2001) a montré que des doses de 0,05-0,1 mg/kg n'affectent pas la croissance des crevettes juvéniles (effet noté à 0,5-2,5 mg/kg), des doses de 0,5-1 mg/kg d'aliment n'affectent pas le taux de survie (effet noté à 2,5 mg/kg).

Risque d'exposition des poissons à l'aflatoxine B1

L'AFB1 et l'AFB2 peuvent contaminer des matières premières susceptibles d'être incorporées dans les aliments pour poissons, telles qu'elles ou après avoir été transformées. Certaines espèces de poissons d'élevage sont plus exposées que d'autres du fait de leur type d'alimentation. Ainsi, le poisson chat d'élevage a un risque d'exposition élevé par le biais de son alimentation pouvant contenir jusqu'à 25% de tourteau de coton, matière première typiquement contaminée par des aflatoxines (Lovell, 1984). L'environnement de la crevette noire tigrée thaïlandaise l'expose également à une alimentation pouvant contenir des aflatoxines, à cause des conditions climatiques des pays de production favorisant leur biosynthèse (Bintvihok *et al.*, 2003).

Transfert dans les tissus animaux

Compte-tenu des données de toxicocinétique (cf. § toxicocinétique), il existe un potentiel très faible pour l'accumulation d'AFB1 et de ses métabolites dans les tissus comestibles (muscles) de poissons chat ayant consommé de l'aliment contaminé. En revanche, l'étude de Larsson *et al.* (1992) chez la truite arc-en-ciel suggère une accumulation dans les tissus non comestibles, mais pas dans les muscles. Chez la crevette noire tigrée thaïlandaise, aucune trace d'AFB1 ou de ses métabolites n'a été trouvée dans le muscle après une ingestion de 20 µg d'AFB1/kg d'aliment pendant 10 jours (Bintvihok *et al.*, 2003). Ces données suggèrent un risque toxicologique faible pour le consommateur.

6.2. Exposition animale

La méthodologie générale est décrite en annexe 2

6.2.1 Données de contamination

A partir de données de différentes origines (voir annexe 2), 1232 valeurs de contamination ont été recueillies, réparties sur 67 types d'aliments. Cependant, de nombreuses valeurs sont inutilisables car effectuées sur des aliments non définis clairement (composition inconnue) tels qu'« aliments complets », « compléments », ou aliments dont l'intitulé n'est pas suffisamment précis : « fourrages bovins » ou « déshydratés », « autres céréales » ou encore des analyses sur un mélange de produits : « arachides et tourteaux d'arachides ».

Pour de nombreuses matières premières, on dispose de moins de 5 données, voire souvent d'une seule donnée, celles-ci n'ont pas été intégrées dans le tableau 6a et dans le calcul de l'exposition.

Au total, une fois ces analyses retirées, il reste 908 valeurs de contamination qui ont été regroupées pour former 13 groupes d'aliments.

Tableau 6a : Répartition des données de contamination en l'aflatoxine B1 par groupe de matières premières (n>= 5)

	Nombre de données	% < LOD	% > LOQ
blé	7	100,0	0,0
corn gluten feed	40	52,5	27,5
maïs	159	90,6	8,8
manioc	6	83,3	0,0
pois	20	100,0	0,0
sarrasin	5	100,0	0,0
soluble de distillerie	9	11,1	22,2
son	7	100,0	0,0
tourteau d'arachide	286	1,4	97,9
tourteau de colza	6	100,0	0,0
tourteau de coton	14	7,1	92,9
tourteau de palmiste	173	89,6	5,8
tourteau de soja	122	77,0	15,6
tourteau de tournesol	54	35,2	51,9
Total	908	53,9	41,5

La limite de ces données tient au pourcentage important des valeurs non détectées (ND) parmi les résultats d'analyses (53,9%). En effet, le traitement par l'un ou l'autre des scénarii tel que défini dans la méthodologie générale de calcul de l'exposition générale (cf annexe II) a une importance considérable compte-tenu du fait que cela va affecter la valeur de plus de 1 donnée sur 2.

41.5% des valeurs sont quantifiées et serviront à l'estimation selon le 2^{ème} scénario.

Les deux estimations (minimale calculée et au 75^{ème} percentile des teneurs > LOQ, comme décrit dans la méthodologie générale) sont comparées aux limites maximales fixées pour les aliments complets par la Directive 2002/32/CE modifiée par la Directive 2003/100 (voir tableau en annexe 2).

6.2.2 Calcul de l'exposition

Les calculs de contamination des rations sont les suivants (les tableaux détaillés des résultats sont en annexe 2 « Exposition animale : Méthodologie générale »):

Pour les herbivores, ruminants (notamment bovins)

L'exposition n'a pas été calculée ; en effet, les régimes comportent pour une très large part des matières premières pour lesquelles nous ne disposons pas ou pas suffisamment de données de contamination en l'aflatoxine B1: fourrages, pâturages ou encore ensilages de maïs pour ce qui concerne le régime retenu (cf annexe 2 « Exposition animale : Méthodologie générale »).

- Pour les volailles (Tableau 6b)

Tableau 6b : Calculs de contamination en l'aflatoxine B1 des rations destinées aux volailles

		contamination minimale calculée		contamination des positifs			Dir 2002/32/CE valeurs limites (en µg/kg)
		en µg/kg d'aliment	part de la ration (en %)	au p75 en µg/kg d'aliment	au p95	part de la ration (en %)	
Poulet standard	démarrage	0.156	93.3	0.448	5.237	53.3	10
	croissance	0.163	93.2	0.387	4.377	43.2	20
	finition	0.132	84.6	0.274	3.031	29.6	20

	retrait	0.097	84.0	0.202	2.349	23.9	20
Poulet label	démarrage	0.163	96.4	0.624	5.487	65.2	10
	croissance	0.144	96.7	0.638	4.374	60.6	20
	finition-retrait	0.158	96.8	0.611	4.072	57.4	20
Poule pondeuse	démarrage	0.168	94.1	0.544	4.646	56.2	10
	croissance	0.149	94.3	0.485	3.649	47.7	20
	repro-entretien	0.155	95.0	0.472	3.378	45.5	20
	pondeuse	0.159	88.9	0.568	4.334	54.0	20
Dinde	démarrage	0.172	88.0	0.420	6.371	57.1	10
	croissance 1	0.156	84.8	0.289	4.882	41.8	20
	croissance 2	0.158	89.4	0.291	4.590	40.5	20
	finition 1	0.145	87.9	0.369	4.296	42.9	20
	finition 2	0.135	87.5	0.198	2.930	26.6	20
	finition 3	0.096	81.2	0.180	2.394	22.9	20
Pintade	démarrage	0.195	93.8	0.792	6.625	81.1	10
	croissance	0.160	86.3	0.806	5.497	76.3	20
	finition-retrait	0.164	87.4	0.892	5.643	82.4	20
Canard Barbarie	canard démarrage	0.127	92,1	0.390	3.685	42,1	10
	canard croissance	0.113	93,2	0.365	2.819	36,2	20
	canard finition	0.093	89,3	0.295	1.886	27,4	20
Canard prêt à gaver	élevage	0.140	95,0	0.563	4.180	55,0	10
	gavage	0.158	98,0	1.225	4.704	98,0	20

La part de la ration (exprimée en pourcentage) susceptible de contenir des aflatoxines utilisée dans le calcul de l'exposition varie selon les scénarii :

- dans le cas de la contamination minimale calculée, elle correspond aux matières premières pour lesquelles on a des données (même si elles sont ND),
- dans le cas des scénarii contamination aux percentiles élevés (p75 et p95) des teneurs positives, elle correspond aux matières premières pour lesquelles les teneurs sont supérieures à la LOD.

Aux 95^{ème} percentiles de contamination pour les volailles jeunes (valeur limite à 10 µg/kg d'aliment), la valeur de contamination de la ration calculée atteint la moitié de cette limite (pour une ration prise en compte variant de 42 à 81%).

Dans les autres cas, la contamination par les aflatoxines des aliments pour les volailles, en France, se révèle largement inférieure aux limites imposées par la réglementation européenne.

- Pour les porcs (Tableau 6c)

Tableau 6c : Calculs de contamination en l'aflatoxine B1 des rations destinées aux porcins

Porcins	contamination minimale calculée		contamination des positifs			Dir 2002/32/CE valeurs limites (en µg/kg)
	en µg/kg d'aliment	part de la ration (en %)	au p75 en µg/kg d'aliment	au p95	part de la ration (en %)	
1er âge	0.092	64.0	0.484	2.618	42.5	10.0
2ème âge	0.095	63.5	0.256	2.095	26.0	10.0
croissance corpen	0.167	68.8	0.261	1.912	25.4	20.0
finition corpen	0.149	79.0	0.269	1.032	21.5	20.0
truires gestantes	0.170	63.3	0.350	1.456	24.4	20.0
truires allaitantes	0.128	54.6	0.223	1.743	21.1	20.0

Comme pour les volailles, la contamination des aliments pour porcins par les aflatoxines en France se révèle largement inférieure à la réglementation européenne pour l'estimation moyenne et au p75. L'estimation au 95^{ème} percentile de contamination des valeurs positives atteint 20% de la valeur limite pour les jeunes porcs, alors que seuls 26 à 42% de la ration totale est prise en compte.

L'interprétation de ces résultats doit être effectuée avec prudence en raison du nombre limité de données disponibles pour des groupes entiers de matières premières. Ainsi, pour les jeunes porcs, le scénario minimal calculé tenant aussi compte des valeurs ND, ne prend en compte au maximum que 64% de la ration. Ces premières estimations ne peuvent être que des approximations à compléter avec l'obtention de données complémentaires.

7. Réglementation

Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et de la directive 2002/32 (et ses modifications) sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux, des teneurs maximales ont été fixées pour les aflatoxines (tableaux 7a et 7b).

Tableau 7a : Teneurs maximales en aflatoxines (en µg/kg) en alimentation humaine

Aflatoxines	Matrice	Teneur maximale en µg/kg
Aflatoxine B1	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs	de 2, 5 ou 8 selon le produit et son stade de transformation
	Céréales	2 ou 5 selon le produit et son stade de transformation
	Certaines épices	5
	Préparations à base de céréales pour enfants en bas âge	0,1
Aflatoxines B1+B2+G1+G2	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs	de 4, 10 ou 15 selon le produit et son stade de transformation
	Céréales	4 ou 10 selon le produit et son stade de transformation
	Certaines épices	10
Aflatoxine M1	Lait	0,05
	Préparations pour enfants en bas âge	0,025

Tableau 7b : Teneurs maximales en aflatoxine B1 (en µg/kg) en alimentation animale

Types d'aliments	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Toutes les matières premières des aliments pour animaux	20
Aliments complets pour bovins, ovins et caprins à l'exception de :	20
- aliments complets pour bétail laitier	5
- aliments complets pour veaux et agneaux	10
Aliments complets pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complets	10
Aliments complémentaires pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments complémentaires pour bétail laitiers, veaux et agneaux)	20
Aliments complémentaires pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complémentaires	5

8. Surveillance et contrôle en France

Dans le cadre 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-), les aflatoxines sont recherchées régulièrement chaque année dans des centaines d'échantillons. Les prélèvements sont effectués aussi bien au moment de l'importation que sur le marché . Les lots non conformes à la réglementation (voir teneurs limites au § ci dessus) sont rejetés à l'importation ou retirés du marché . Bien que les denrées prélevées au sein des catégories d'aliments réglementées soient de nature et d'origine variables selon les années, il peut néanmoins être dégagé les grandes tendances de conformité suivantes :

Aflatoxines B et G

Concernant les produits céréaliers (semoules et farines de blé, de maïs, pains, biscottes, biscuits, riz, céréales pour petit déjeuner) parmi les dizaines d'échantillons analysés annuellement, aucune non conformité n'a été relevée, sauf en 2005 où une farine de maïs biologique en provenance d'Europe du sud s'avérait contenir 7,5 µg d'AFB1/kg. Ce lot, retiré du marché, conforte l'émergence récente de la possibilité, déjà observée en 2003 lors de la canicule, de présence d'AFB1 dans le maïs originaire de la zone méridionale de l'Europe. Pour les cas des préparations à base de céréales pour enfants en bas âge, aucune non conformité n'a été relevée.

Concernant les fruits secs et graines oléagineuses (fruits à coque tels que amandes, pistaches, noix, noisettes ; graines oléagineuses telles que l'arachide ; fruits séchés tels que figes, dattes, abricots, raisins), parmi les 200 à 350 prélèvements annuels (361 en 2007 dont 115 échantillons de figes), 10-12% des échantillons dépassent les limites réglementaires. Cette proportion de non conformité est d'ailleurs observée pour chacune des 3 sous-catégories: les fruits à coques et arachides, les figes, et les autres fruits séchés.

Concernant les épices (piments doux et forts, poivre, muscade...) parmi la trentaine de prélèvements annuels, 1 à 2 échantillons se trouvent au-delà de la limite réglementaire, celui de 2006 (un piment fort) présentait une teneur moyenne de 20 µg d'AFB1/kg.

Aflatoxine M1

Concernant le lait, parmi une centaine au moins de prélèvements annuels, les résultats des analyses montrent une conformité à la teneur maximale réglementaire de 0,05 µg/L.

L'aflatoxine M1 a été recherchée plus spécifiquement entre 1995 et 2005 dans le lait et la poudre de lait destinés aux adultes, ainsi que dans les laits infantiles. L'AFM1 a été quantifiée dans 10% des échantillons de lait infantile avec une contamination moyenne de 0,0019 µg/L. La contamination des laits de consommation est de 0,0028 µg/L en moyenne. Dans les deux types de lait, les limites réglementaires ne sont jamais dépassées. La poudre de lait est plus contaminée (0,03 µg/kg) mais sa dilution/reconstitution conduit à une concentration dans la préparation finale voisine de celle du lait liquide (soit 0,003 µg/kg) et donc conforme à la réglementation.

9. Conclusion - Recommandations

Le groupe des aflatoxines et son représentant principal l'aflatoxine B1 (tant en termes de teneur et de fréquence dans les aliments à risque que d'impact toxique) est le groupe de mycotoxines le mieux étudié et le plus réglementé. L'aflatoxine B1 est à ce jour la seule mycotoxine identifiée comme cancérigène avéré chez l'homme. Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'aflatoxine B1 était retrouvée sous la forme de son métabolite M1 dans le lait.

Les mesures réglementaires en vigueur dans l'Union Européenne sont parmi les plus sévères. Même si ces études et ces réglementations ont permis de diminuer le risque à un niveau très faible, ces mesures doivent être poursuivies pour maintenir une maîtrise de ce risque à un niveau faible. Plus précisément, la conduite des plans de contrôle visant à contrôler l'application des mesures législatives prises au sein de l'Union européenne est à maintenir et cela aussi bien au stade des matières premières végétales, notamment fruits secs et arachides, qu'au stade des produits finis ou dérivés tels que le lait. En ce domaine, la provenance des échantillons est une information d'intérêt à maintenir pour l'interprétation des données issues de ces plans.

De plus il est recommandé

- au niveau de la surveillance : un programme de surveillance orienté sur le maïs, en ciblant par exemple une région suivie sur plusieurs années, ce qui permettrait de surveiller les teneurs en aflatoxines en fonction des conditions climatiques. En effet, l'évolution climatique observée en Europe pourrait conduire à des conditions de température et d'humidité davantage favorables à la prolifération d'espèces toxigènes et à la possibilité de production d'aflatoxines dans certaines régions méridionales de la France.
- au niveau de la prévention : les mesures réglementaires peuvent être contraignantes pour certains acteurs professionnels notamment pour ceux des pays en voie de développement qui abritent une grande part des zones à "risque aflatoxines". De ce fait, ces mesures sont à accompagner par l'établissement de guides de bonnes pratiques à appliquer à la production et à la transformation. C'est l'accent mis par certaines instances internationales dans leurs travaux actuels, lesquels doivent donc être encouragés.
- au niveau des connaissances relatives au devenir chez les animaux d'élevage : il serait intéressant de réaliser des études de transfert dans les œufs et la viande chez les volailles, ainsi que dans le lait chez les petits ruminants. En outre, des études complémentaires chez les vaches fortes productrices viseront à confirmer le taux de transfert dans le lait, n'étant actuellement établi qu'à partir d'une seule étude.

Références bibliographiques : voir document spécifique

Chapitre 2 L'ochratoxine A

Coordination : Dominique Parent Massin et Pierre Galtier

Introduction

Les ochratoxines sont des métabolites de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* ou *Penicillium*. Leur présence est liée au climat, particulièrement lors de la récolte, et aux conditions de stockage après récolte. Parmi les 9 ochratoxines décrites, seules l'ochratoxine A et très rarement l'ochratoxine B ont été retrouvées sur des produits végétaux. Compte tenu de la prévalence et de la toxicité de l'ochratoxine A (OTA), seule cette dernière sera traitée.

L'ochratoxine A est produite sous les climats froids et tempérés par *Penicillium verrucosum* et par *Aspergillus carbonarius* et en régions chaudes et tropicales par *Aspergillus ochraceus*. *Penicillium verrucosum*, spécifiquement associé aux céréales stockées, est très commun en Europe du Nord et au Canada. *Aspergillus ochraceus* est le champignon le plus commun dans le café vert et les épices. Il est également retrouvé sur les graines de cacao, le soja, les cacahuètes, le riz et le maïs. Quant à *Aspergillus carbonarius*, il est susceptible entre autres de contaminer le raisin.

Bien que les infections fongiques puissent avoir lieu avant et après récolte, la synthèse de l'ochratoxine A se fait surtout lors du stockage. Les denrées alimentaires à haut risque de contamination par l'ochratoxine sont les céréales (maïs, orge, blé, sorgho, avoine et riz). D'autres denrées peuvent être contaminées comme les graines de cacao, le vin, le jus de raisin, la bière, des épices et la viande de porc. Les aliments pour animaux peuvent aussi être contaminés par l'ochratoxine A, les abats (sang, rognons) d'animaux ayant consommé de tels aliments peuvent alors présenter des résidus d'OTA.

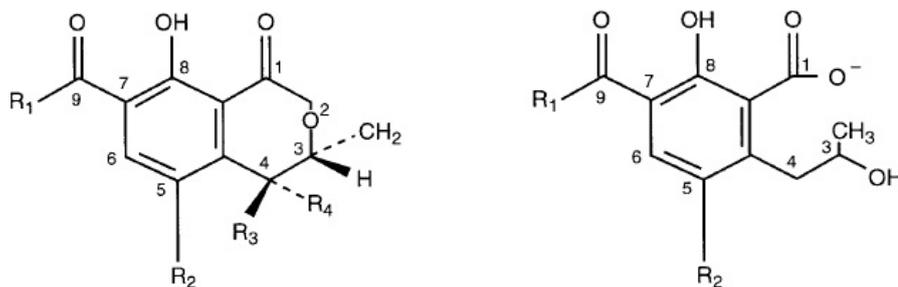
L'ochratoxine A est connue pour sa néphrotoxicité. Elle serait l'un des facteurs potentiels à l'origine de troubles rénaux chez l'homme connus sous le nom de Néphropathie Endémique des Balkans (NEB). Elle s'avère également immunotoxique, tératogène et neurotoxique. Son pouvoir cancérigène est établi chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'homme.

1 Propriétés physiques et chimiques de l'ochratoxine A

L'OTA a été isolée pour la première fois à partir d'*Aspergillus ochraceus* en 1965 par van der Merwe *et al.* Par la suite, elle a été identifiée comme contaminant du maïs aux USA en 1969, puis dans l'ensemble du monde (Weindenburner, 2001).

L'OTA est la *N*-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1oxo-1*H*-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-L-phénylalanine. Sa formule brute est C₂₀H₁₈ClNO₆. Son numéro de CAS est 303-47-9 (figure 2).

Différents dérivés de l'OTA ont été identifiés, notamment les ochratoxines B et C qui sont respectivement l'analogue déchloré et l'ester éthylique de l'OTA (Weindenburner, 2001) (figures 1 et 2).



Nom	Abréviation	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Ochratoxine A	OTA	Phénylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	OTB	Phénylalanyl	H	H	H	H
Ochratoxine C	OTC	Phénylalanyl, éthyl ester	Cl	H	H	H
Ochratoxine α	OT α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OT β	OH	H	H	H	H
4 <i>R</i> -Hydroxyochratoxine A	OTA-OH	Phénylalanyl	Cl	H	OH	H
4 <i>S</i> -Hydroxyochratoxine A	OTA-OH	Phénylalanyl	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxine A	OTA-OH	Phénylalanyl	Cl	H	H	OH
Ochratoxine A ouverte	OP-OTA	Phénylalanyl	Cl	-	-	-

Figure 1 : Structure des différentes ochratoxines et de leurs métabolites : à gauche, ochratoxine et ses analogues (voir le tableau) ; à droite, forme ouverte de l'ochratoxine A (OP-OTA)

L'OTA pure est un solide blanc cristallisé, de masse moléculaire de 403,8 g/mol (CIRC, 193). C'est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1. A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle devient soluble et stable dans une solution aqueuse de carbonate monosodique (0,1 M, pH 7,4) ainsi que dans les solutions alcalines aqueuses.

Le spectre d'absorption UV de l'OTA varie en fonction du pH et de la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500/mol.cm dans le méthanol. Dans les mêmes conditions, ce coefficient est de 6400 pour la 4(R)-OH-OTA, un métabolite de l'OTA, alors que l'OT α absorbe à 338 nm avec un coefficient de 5600 et l'OTB absorbe à 318 nm avec un coefficient de 6500. Dans le carbonate monosodique (0,1 M ; pH 7,4) l'OTA a un maximum d'absorption à 378 nm avec un coefficient d'extinction de 14700.

Sous excitation à 340 nm, l'ochratoxine A est fluorescente, avec un maximum d'émission à 428 nm sous sa forme non ionisée et à 467 nm sous sa forme ionisée.

En raison de sa structure, l'OTA se révèle stable au stockage.

2 Méthodes d'analyse (voir principes généraux en Annexe 1)

Le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires.

De nombreux ouvrages, les rapports annuels de « Association of Official Analytical Chemists » (premier numéro de chaque année du J. of AOAC) et des articles de synthèse traitent des méthodes analytiques consacrés aux mycotoxines en général et à l'OTA en particulier (Scott, 1991, 1993 et 1995 ; Betina, 1993 ; Lawrence et Scott, 1993 ; Chu, 1991 et 1992 ; Cole, 1986).

Les innovations récentes concernent principalement les techniques de purification et l'instrumentation. L'approche consistant en la purification par colonne d'immunoaffinité (CIA) et mesure par chromatographie liquide couplée à la fluorimétrie est devenue la méthode la plus répandue. La chromatographie sur couche mince et la technique ELISA restent utilisées bien que plus

rarement, leurs performances étant significativement en retrait. L'introduction généralisée de la spectrométrie de masse pour la mesure des résidus et des contaminants n'épargnera pas l'OTA tout au moins en approche de confirmation. De la même manière, bien que non encore généralisées, les techniques s'appuyant sur les bio-senseurs trouveront leur place en technique de dépistage. Les limites de quantification sont aujourd'hui de l'ordre de 0,03 µg/L pour le vin et la bière et de 0,3 à 0,6 µg/kg pour la plupart des autres aliments.

2.1 Extraction

L'extraction repose très souvent sur l'utilisation d'un mélange de solvant - matrice dépendant - impliquant solvants aqueux et organiques. Une méthode IUPAC/AOAC pour la mesure de l'OTA dans l'orge utilise un mélange chloroforme – acide phosphorique (Battaglia *et al.*, 1996). Pour le café vert (AOAC, 1990) ou encore le vin (Zimmerli et Dick, 1995), le chloroforme a été utilisé avec succès. Pour l'extraction de l'OTA dans le blé, des mélanges plus complexes ont été utilisés tels que toluène/HCl/MgCl₂, CHCl₃/ethanol/acide acétique ou encore CH₂Cl₂/H₃PO₄. Pour des raisons de protection de l'environnement, les solvants chlorés sont progressivement remplacés. Le *tert*-butylméthylether (TBDME) a déjà prouvé son efficacité pour l'extraction de l'OTA dans les aliments pour bébés (Burdaspal, 1997). Des mélanges méthanol/eau ou encore acétonitrile/eau ont également été utilisés dans des méthodes plus récemment validées (Entwisle, 2000).

2.2 Purification

L'utilisation des colonnes d'immunoaffinité représente l'état de l'art pour la purification d'échantillons contenant de l'OTA. L'échantillon peut être appliqué directement sur la colonne d'immunoaffinité ; c'est le cas des échantillons de vins ou de bière pour lesquels une dilution avec du polyéthylène glycol ou du NaHCO₃ doit précéder l'application (Visconti *et al.*, 1999). Pour des échantillons plus complexes tels que le café torréfié, une étape de SPE (silice greffée par des groupements phényles) doit être prévue en amont pour éliminer la caféine, interférence perturbant la rétention de l'OTA sur la colonne. Les colonnes de silice pure sont également utilisées ; les solvants assurant l'éluion sont composés de toluène/acide acétique ou encore toluène/acétone/acide formique. Enfin, des phases stationnaires reposant sur le principe de l'empreinte moléculaire (MIP) émergent actuellement, leur sélectivité est équivalente à celles des colonnes d'immunoaffinité à anticorps polyclonaux.

2.3 Séparation et détection

Les immuno-essais, tout particulièrement l'ELISA et la RIA, sont des techniques appliquées en dépistage dans une minorité de laboratoires. Elles ont été utilisées pour doser l'OTA dans des échantillons de rein de porc ou de lait (Morgan *et al.*, 1986 ; Rousseau *et al.*, 1987 ; Valenta *et al.*, 1993 ; Kuhn *et al.*, 1995 ; Valenta *et al.*, 1996).

La chromatographie couche mince (CCM) est aujourd'hui moins utilisée que dans le passé pour déterminer la teneur en OTA dans les aliments, en raison de ses moindres performances en termes de spécificité et de sensibilité. La séparation est assurée en phase normale sur phase stationnaire type silice, avec des phases mobiles composées de solvants organiques chlorés (chloroforme) et d'alcool (méthanol ou éthanol), ou encore toluène/acétate d'éthyle. Sous irradiation UV, l'OTA est reconnaissable à sa couleur bleu-vert qui devient violette par traitement avec une solution alcaline, NaOH, NaHCO₃ ou NH₄OH et. La confirmation d'un échantillon suspect implique sa réextraction et la dérivation de l'extrait par BF₃-CH₃OH, ou HCl-CH₃OH (Zimmerli et Dick, 1995) ou H₂SO₄-CH₃OH (Takeda *et al.*, 1991) c'est-à-dire la conversion de l'OTA en son ester méthylique, avant dépôt en CCM ou injection en HPLC. Cette approche est celle retenue dans la méthode AOAC dédiée à la recherche d'OTA dans le maïs et l'orge (AOAC, 1997). Néanmoins, plusieurs auteurs soulignent les problèmes rencontrés pour confirmer de faibles concentrations en OTA dans des échantillons biologiques en particulier le lait (Miraglia *et al.*, 1995 ; Valenta et Goll, 1996).

Une des techniques les plus utilisées est la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique (HPLC-FD). L'appariement d'ions a été utilisé pour retenir l'OTA notamment pour son analyse dans le lait : elle permet de retenir l'OTA à pH 7,5 en introduisant un contre-ion qui forme un complexe avec l'ochratoxine dissociée (Breitholz, 1991). A ce pH alcalin, un déplacement de l'absorption de l'OTA est observé de 330 nm à 380 nm, associé à une amélioration du signal. De très faibles concentrations ont ainsi pu être détectées dans le lait (jusqu'à 0,02 ng.mL⁻¹). L'inconvénient majeur de cette approche réside dans la faible répétabilité associée aux temps de rétention de l'OTA en fonction de la composition de la phase mobile. Le principe de la phase inverse est en pratique privilégié avec des phases stationnaires de type C₁₈ et une phase mobile impliquant acétonitrile ou

méthanol associé à de l'acide acétique ou phosphorique dilué. En effet, comme l'OTA est un acide faible, il est nécessaire d'acidifier la phase mobile de manière à éviter toute traînée de pic et rétention aspécifique. L'acétonitrile est généralement préféré pour sa faible viscosité et sa meilleure efficacité de séparation. Reinhard et Zimmerli (1999) relatent l'efficacité comparée de plusieurs phases stationnaires en étudiant l'influence des conditions de pH et de température sur la rétention de l'OTA. En terme de limite de performance, les méthodes HPLC-FD sont applicables pour le dosage de l'OTA dans l'orge, le blé, le son et le seigle, à des concentrations au moins égales à 10 µg/kg (AOAC, 1992 ; Larsson *et al.*, 1996). Dans les aliments pour bébé, une limite de quantification de 0,008 µg/kg a été obtenue par dérivation post-colonne avec de l'ammoniac (Burdaspal, 1997 ; Zimmerli et Dick, 1995).

Alors que le couplage GC-MS s'est avéré mal adapté à l'analyse de l'OTA, le couplage LC-MS a démontré sa capacité à répondre aux attentes de la problématique, non pas en améliorant la sensibilité mais en délivrant des signaux plus spécifiques (Abramson, 1987 ; Rajakyla *et al.*, 1987). Dans ce cas l'utilisation d'étalons internes de structure chimique identique (marqués au (²H) ou (¹³C)) devient possible, ce qui contribue à l'amélioration des performances quantitatives de la méthode. En particulier, le couplage HPLC - spectrométrie de masse bidimensionnelle avec interface électrospray (LC-ESI-MS/MS) a démontré son efficacité vis-à-vis de l'HPLC-FL (Becker *et al.*, 1998 ; Zöllner *et al.*, 2000 ; Leitner *et al.*, 2002). Driffield *et al.* (2003) ont développé une approche LC-MS/MS sur système triple quadripolaire (ionisation électrospray), intégrant l'OTA et son métabolite OTα. Les limites de quantification ont été abaissées à 1 µg/kg pour des échantillons de foie de porc. Les intérêts majeurs de la technique sont une simplification de la préparation de l'échantillon, une automatisation de la mesure et du traitement du signal (détection, identification et quantification) sans besoin d'étape supplémentaire de confirmation, rendant compatible *in fine* la technique avec le haut débit d'analyse. Enfin, à court terme la LC-MS devrait devenir la technique de référence, en raison de sa capacité à s'adresser à tous les analytes quelles que soient leurs structures chimiques.

2.4 Méthodes de référence, essais interlaboratoires

Pour la détermination de l'OTA dans les graines, des méthodes officielles sont disponibles ; elles sont plus rares voire inexistantes dans les denrées d'origine animale.

Plusieurs méthodes d'analyse par CCM et HPLC ont été validées pour l'ochratoxine A à travers des études collaboratives (AOAC International, 2000). Quelques méthodes HPLC dédiées à l'aliment (comme les grains) ont été standardisées par le Comité Européen de Normalisation (CEN) (De Vreeze, 2003), lequel a également fixé des critères généraux de performance (CEN, 1999). Des matériaux de référence certifiés (European Commission's Joint Research Centre/Institute for Reference Materials and Measurements) ainsi que des solutions de référence calibrées sont aujourd'hui disponibles. Des tests d'aptitude internationaux sont organisés régulièrement par des organismes tels que le FAPAS® (Food Analysis Performance Assessment Scheme). Dans ce cadre, une étude récente (2003/2004) a clairement montré que la stratégie la plus communément retenue et appliquée par les laboratoires consiste en la combinaison d'une étape de purification par colonne d'immunoaffinité suivie d'une séparation par HPLC et détection par fluorimétrie. Les résultats rapportés par le FAPAS démontrent des scores de satisfaction atteignant 85 à 100 % pour des échantillons de céréales supplémentés en ochratoxine A entre 6,4 et 23,4 µg/kg. Ces résultats traduisent bien le niveau de performance des méthodes utilisées et la bonne maîtrise de leur application par les laboratoires.

3 Facteurs influençant la teneur en ochratoxine A dans les denrées

3.1 Moisissures toxigènes

D'abord décrite comme métabolite d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965), il a été montré depuis que l'OTA pouvait être produite par d'autres espèces d'*Aspergillus* (Ciegler, 1972; Hesseltine *et al.*, 1972), en particulier *A. carbonarius* (Heenan *et al.*, 1998 ; Moss, 1996 ; Varga *et al.*, 1996). *A. niger* produirait également de faibles taux d'OTA (Abarca *et al.*, 1994, Téren *et al.*, 1996). Accensi *et al.* (2004) ont recherché les espèces d'*Aspergillus* présentes dans les aliments pour animaux (153 échantillons de céréales et légumineuses et 147 échantillons d'aliments composés). 94,4 % des échantillons de légumineuses et 89,9 % des aliments composés étaient contaminés par des *Aspergillus* contre seulement 53,3 % pour les céréales. *A. niger var. niger* représentait 23 % des espèces isolées et *A. ochraceus*, 7,3 %. Mais seulement 3 souches sur 52 d'*A. niger* et une souche sur 20 d'*A. ochraceus* étaient productrices d'OTA.

Par la suite, les sources les plus importantes se sont révélées être des souches de *Penicillium verrucosum* (Scott *et al.*, 1970, Krogh *et al.*, 1973, Pitt, 1987) (anciennement nommé *P. viridicatum*).

La formation d'OTA dépend du pouvoir toxigène de la souche de moisissure, du type de substrat et de la localisation géographique. Les conditions de production de l'OTA sont propres à chaque moisissure et leurs maîtrises passent essentiellement par les bonnes pratiques de séchage et de stockage des grains et des fruits au sec.

3.2 Conditions de toxigenèse et voie de biosynthèse

La biosynthèse de l'ochratoxine A par les différentes moisissures productrices n'est pas élucidée, l'organisation des gènes codant pour cette mycotoxine est inconnue (Varga *et al.*, 2003), même si plusieurs polykétides synthases sont nécessaires à la biosynthèse de l'OTA dans *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003). La partie isocoumarine de l'OTA est probablement dérivée d'un squelette pentacétone.

Aspergillus ochraceus est décrit comme étant mésophile xérotolérant. Sa croissance est observée entre 8 et 37 °C avec un optimum entre 24 et 31 °C. Les conditions d'humidité les plus favorables sont toutefois de l'ordre d'une A_w de 0,5 à 0,95.

A. ochraceus est retrouvé dans divers produits alimentaires d'origine végétale peu hydratés comme les produits secs (haricots secs, graines de soja, épices, olives, fruits secs, noix de pécan, pistaches, cacahuètes et noisettes) et dans les céréales (riz, avoine, maïs). *A. ochraceus* a aussi été retrouvé dans des produits d'origine animale comme des fromages, salaisons, poissons ou viandes séchés.

Penicillium verrucosum croît lentement pour une faible activité en eau (A_w inférieur à 0,80) et à basse température, entre 0 et 31 °C avec un optimum à 20 °C, ce qui explique une distribution confinée aux zones tempérées ou froides. Les supports potentiels de développement de *P. verrucosum* sont les céréales en Europe Centrale, du Nord et au Canada. Cette moisissure est pratiquement inconnue dans les régions chaudes. La contamination est plus importante dans les pays d'Europe centrale, comme la Bulgarie (Petkova et Castegnaro, 1991).

La croissance d'*A. carbonarius* est négligeable à 10 °C quelle que soit la valeur de l'activité de l'eau. Généralement, sa croissance est plus importante à 30°C qu'à 37°C. La croissance optimale est obtenue à des températures comprises entre 25 et 35 °C et à une activité d'eau entre 0,93 et 0,985. La température optimale de production d'OTA est de 15°C alors qu'à la température optimale de croissance du champignon peu d'OTA est produite. L' A_w optimale pour la production d'OTA est comprise entre 0,93 et 0,98.

On peut aussi rencontrer l'OTA dans les fourrages conservés tels que les ensilages, les balles rondes enrubannées ou les foin mal conservés (Scudamore et Livesey, 1998) qui constituent la base des rations alimentaires des ruminants. Elle est souvent associée à une autre mycotoxine néphrotoxique, la citrinine (voir chapitre « Autres mycotoxines »).

3.3 Effet des pratiques utilisées lors de la production et du stockage et des procédés technologiques

3.3.1 Céréales

En Europe, la présence d'OTA dans les céréales est due à la croissance de *P. verrucosum* en condition humide lors du stockage. Les solutions pour éviter la présence d'OTA dans le grain passent par le contrôle du niveau d'humidité lors du remplissage du silo et au cours du stockage. Pendant la durée du stockage, la teneur en eau dépend du taux d'humidité à la mise en silo et de la température du lot. Plus la température du lot est élevée et plus le grain respire et libère de la vapeur d'eau. Or, d'une part, les grains sont habituellement récoltés chauds et, d'autre part, il peut s'établir dans le silo un gradient de température selon son exposition au soleil. Il importe donc de maintenir la température aussi basse que possible. Selon le taux d'humidité du grain, cet objectif peut être atteint par une ventilation adaptée ou par le séchage du grain. Dans le cas où le taux d'humidité des grains est supérieur à 18%, il y a lieu de procéder à un séchage. Le nettoyage (avant ou après stockage) devrait précéder toute commercialisation des grains. Cette opération conduit à séparer des grains nettoyés à teneur plus faible en OTA et des issues de nettoyage, à teneur plus élevée en OTA (Osborne *et al.* 1996), commercialisées sous différents noms pour l'alimentation animale. Ces issues de nettoyage contiennent des graines étrangères à l'espèce céréalière du lot, des petits grains et des grains cassés de cette espèce, des fragments de la plante tels que des pailles ou glumes et glumelles.

La répartition de l'OTA dans les fractions céréalières de meunerie a été peu étudiée et les résultats de la littérature sont contradictoires. Scudamore *et al.* (2003) et ITCF (1999) rapportent des teneurs dans les sons supérieures à celles de la farine, alors que Chelkowski *et al.* (1981) observent des teneurs semblables. Ce dernier résultat pourrait s'expliquer par une pénétration des *Penicillium* différente dans le grain selon la nature « soft/hard » des blés (Osborne *et al.*, 1996)

3.3.2 Bière

Après inoculation préalable de lots d'orge au moyen d'une souche toxigène de *P. verrucosum*, une étude du suivi du procédé de brasserie a été conduite par Baxter *et al.* (2001) à partir de grains naturellement contaminés à deux niveaux : 5,4 µg et 52 µg d'OTA / kg, la première contamination étant proche de la limite réglementaire proposée dans l'UE pour les céréales. La bière ainsi produite, contenait moins d'OTA que l'orge. En terme de concentrations, cela équivaut en OTA de 2% à 4% de celles du grain respectivement pour 5,4 µg et 52 µg d'OTA / kg. Ce constat est en accord avec des études plus anciennes menées à partir de grains supplémentés directement (1 à 10 mg/kg) en OTA (Gjertsen *et al.*, 1973 ; Chu *et al.*, 1975, Nip *et al.*, 1975) et pour lesquels 13 à 32% était restitué dans le produit final. Il est probable qu'une partie significative de l'OTA soit dégradée durant le brassage sous l'action d'enzymes protéolytiques (la coupure de la liaison peptidique de l'OTA la convertissant en OT α non toxique) et qu'une autre partie de l'OTA, du fait de sa faible solubilité dans l'eau reste dans le malt. Des teneurs résiduelles d'OTA ont été trouvées dans les issues d'orge maltée (drêches), les rendant impropres à leur utilisation en alimentation animale (Baxter *et al.*, 2001).

3.3.3 Café

Le café vert est susceptible d'être contaminé par l'OTA. La torréfaction réduit la teneur en ochratoxine de façon variable selon les études. En effet, des études montrent une réduction de 80 à 90% par traitement à 200°C pendant 20 minutes (Levi *et al.*, 1974 ; Gallaz et Stalder, 1976 ; Blanc *et al.*, 1996). En revanche Nehad *et al.* (2005), n'obtiennent qu'une réduction de 31%, par traitement expérimental à 180°C pendant 10 minutes à partir de café vert contaminé à un niveau de 29,4 µg/kg. Une réduction moyenne de 66,5 % des teneurs naturelles en OTA (0,64 à 8,05 µg/kg) dans 36 échantillons de café vert d'origines variées a été observée après torréfaction par Perez de Obanos *et al.* (2005).

Le procédé de solubilisation assure une réduction de 20% de la teneur résiduelle après torréfaction, portant ainsi à 13% la teneur résiduelle en OTA dans la poudre de café soluble par rapport à celle du café vert (Blanc *et al.*, 1996). Lors de la réalisation du café en boisson, la totalité de l'OTA est extraite à partir du café soluble (Stegen *et al.*, 1997). A partir des grains torréfiés moulus, l'ampleur de l'extraction est variable selon les procédés de types « expresso », « moka » et « filtre » avec respectivement 49%, 32% et 14% de réduction (Perez de Obanos *et al.*, 2005), montrant une diminution liée à la température et à la nature de l'extraction : percolation, décoction ou infusion.

3.3.3 Raisin

Dans les raisins, l'ochratoxine A est produite par les *Aspergillus* du groupe *nigrii*, particulièrement *Aspergillus carbonarius* et *A. niger*. Ces moisissures ne sont pas pathogènes pour la vigne. En revanche, les lésions faites aux fruits par les machines ou les insectes sont une cause de contamination et de développement ultérieur de ces moisissures.

Le jus de raisin est considéré comme une source d'exposition à l'OTA pour les enfants. Des valeurs comprises entre 1,16 et 2,32 µg/L ont été rapportées (Majerus *et al.*, 2000 ; Filali *et al.*, 2001).

Le niveau d'OTA dans les vins européens varie entre 0,01 et 3,4 µg/L. Il existe des régions spécifiques de contamination des vignobles par l'OTA. Ainsi, le bassin Méditerranéen est le plus touché ; de plus, le vin rouge serait plus concerné que le rosé ou le blanc (Burdaspal et Legarda, 1999 ; Majerus *et al.*, 2000 ; Markaki *et al.*, 2001 ; Pietri *et al.*, 2001).

Parmi les dérivés du raisin, c'est dans les raisins secs que les niveaux les plus élevés ont été rencontrés, ils peuvent dépasser 40 µg/kg (MacDonald *et al.* 1999 ; MAFF, 1999).

3.3.4 Salaisons

La consommation de produits carnés contaminés par les ochratoxines a été identifiée comme une source possible d'exposition humaine à l'OTA (JECFA, 2001). La mise en évidence de souches fongiques capables de produire de l'OTA sur les produits de salaisonnerie (Escher *et al.*, 1973, Tabuc *et al.*, 2004), ainsi que la caractérisation directe de la toxine sur ce type d'aliments (Jimenez *et al.*, 200 ; Chiavaro *et al.*, 2002) posent le problème de leur contamination directe. Après contamination par des souches toxigènes, la production directe d'OTA sur les produits de salaisonnerie semble

toutefois très faible, en dépit d'une grande stabilité de la toxine (Escher *et al.*, 1973 ; Bailly *et al.*, 2005).

4 Devenir et Propriétés toxicologiques de l'ochratoxine A

4.1 Toxicocinétique

Les facteurs affectant l'absorption, la distribution, le métabolisme (hydrolyse et hydroxylation) et l'excrétion de l'OTA chez plusieurs espèces animales ont été revus par Kuiper-Goodman et Scott (1989) et par Galtier (1991).

4.1.1 Absorption

L'OTA est d'abord absorbée dans l'estomac en raison de ses propriétés acides ($pK_a = 7,1$) mais l'absorption est aussi possible au niveau de l'œsophage. Le groupement hydroxyle joue un rôle important dans la mesure où pour un faible pH, la forme non ionisée favorise l'absorption de l'OTA (Marquardt et Frohlich, 1992). Néanmoins, le site majeur d'absorption de l'OTA est l'intestin grêle avec une absorption maximale au niveau du jéjunum proximal (Kuiper-Goodman et Scott, 1989 ; Marquardt et Frohlich, 1992). Elle est hydrolysée en OT α non toxique par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine ainsi que par les flores microbiennes (rumen des polygastriques et gros intestin chez toutes les espèces). Dans le cas des ruminants où cette détoxification survient avant l'absorption, elle réduit le risque de contamination par l'OTA des produits et notamment du lait, issus de ces animaux. Au niveau hépatique, l'OTA est transformée en des métabolites mineurs comme les 4R- et 4S-hydroxy-ochratoxine A (4-OH-OTA) et la 10-hydroxyochratoxine A. Les formes isomères de 4-OH-OTA sont considérées comme des métabolites de détoxification partielle.

4.1.2 Biotransformation (voir figure 3)

L'OTA est hydrolysée en OT α par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine dans les compartiments fermentaires pré-stomacaux des ruminants et du gros intestin des monogastriques. Les microsomes hépatiques de l'homme, du rat, du cochon et du lapin, incubés avec l'OTA produisent des métabolites mineurs comme les 4R- et 4S-hydroxyochratoxine A (4-OH-OTA) (Stormer *et al.*, 1981) ; en plus de ces deux métabolites, la 10-hydroxyochratoxine A est retrouvée dans les microsomes de lapin (Stormer *et al.*, 1983). Les formes isomères de 4-OH-OTA sont considérées comme des métabolites de détoxification (Omar *et al.*, 1996), bien que Creppy *et al.*, (1983) aient rapporté que la 4R-OH-OTA est aussi toxique que l'OTA.

Un autre métabolite de l'OTA a été identifié. Il s'agit de l'OP-OTA (forme ouverte d'OTA) dont le pouvoir toxique a été démontré par voie intraveineuse (Xiao *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2000) .

Il existe également des formes conjuguées d'OTA chez la souris (Roth *et al.*, 1988). Ainsi, une étude a identifié *in vitro* une forme conjuguée entre l'OTA et le glutathion (Dai *et al.*, 2002).

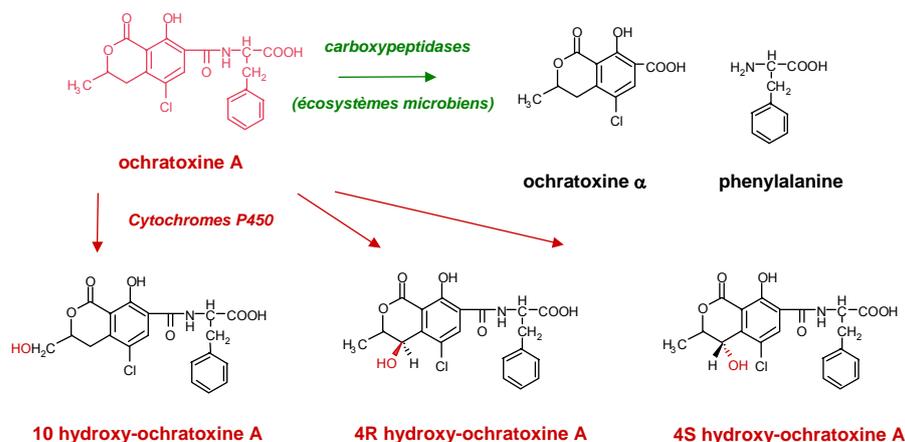


Figure 3 : Voies métaboliques de l'OTA

4.1.3 Distribution

La liaison de forte affinité de l'OTA aux protéines plasmatiques contribue au prolongement de son temps de demi-vie plasmatique.

L'OTA sous forme de di-anion possède deux sites de liaison à l'albumine sérique humaine dont une de haute affinité (sub-domaine IIA) (Il'ivech *et al.*, 2002). Il a été montré que des protéines de faible poids moléculaire (20 KDa) se lient plus spécifiquement à l'OTA que l'albumine, et qu'elles peuvent facilement traverser le glomérule permettant l'accumulation de l'OTA dans le rein (Stojkovic *et al.*, 1984). L'altération du cycle entérohépatique de l'OTA chez la souris et le rat par la cholestyramine, une résine liant les acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal, entraîne une diminution des concentrations plasmatiques d'OTA (Kerkadi *et al.*, 1998, 1999).

L'OTA existe sous forme de traces dans les érythrocytes (Galtier, 1978). La distribution dans les tissus de rat, porc, poulet et chèvre suit l'ordre suivant : rein > foie > muscle > tissu adipeux (Kuiper-Goodman et Scott, 1989). De l'OTA a été retrouvée dans le sang de cordon ombilical de femmes enceintes démontrant ainsi un passage transplacentaire chez la femme (Jonsyn *et al.*, 1995).

Une grande différence existe entre les temps de demi-vie plasmatiques de l'OTA selon les espèces. Par voie orale, il est de 35,5 jours chez l'homme (Studer-Rohr *et al.*, 2000) et chez les animaux : 21 à 25 jours chez le singe rhésus, 3 à 5 jours chez le porc, 3,2 jours chez le veau pré-ruminant, 2 à 5 jours chez le rat, 1 à 1,6 jours chez la souris, 8,2 heures chez le lapin, 6,7 heures chez la caille, 4,1 heures chez les poulets, et 0,7 heures chez la carpe (Hagelberg *et al.*, 1989).

4.1.4 Excrétion

L'excrétion biliaire et la filtration glomérulaire jouent un rôle très important dans la clairance plasmatique (Hagelberg *et al.*, 1989) et dans le métabolisme de l'OTA (Li *et al.*, 1997, 2000). Cette toxine est éliminée très lentement de l'organisme, alors que ses métabolites sont éliminés beaucoup plus rapidement (Li *et al.*, 2000). En général, l'OTA, l'Ota et l'OTB sont excrétées dans les urines chez le rat alors que l'OTA-OH est excrétée dans la bile (Li *et al.*, 1997). La réabsorption de l'OTA au niveau des tubules rénaux via des transporteurs anioniques favorise son retour dans le plasma et son accumulation rénale (Dahlmann *et al.*, 1998).

4.2 Toxicologie générale

4.2.1 Toxicité aiguë

La DL50 est de 30,3 mg/kg p.c. chez les rats mâles alors qu'elle est de 21.4 mg/kg p.c. pour les rats femelles. Les rats nouveau-nés sont considérablement plus sensibles que les rats adultes. Le chien et le porc sont les espèces les plus sensibles, la souris et le rat sont les moins sensibles. Chez les rats, la DL50 par voie intraveineuse est de 12,7 mg/kg p.c., de 12,6 mg/kg p.c. par voie intrapéritonéale et de 21,4 à 30,3 mg/kg p.c. par voie orale. L'administration orale simultanée de phénylalanine, partie non isocoumarinique de l'OTA, à raison de 100 mg/kg p.c. chez la souris, diminue la DL50 orale de 46 mg/kg p.c. à 71 mg/kg p.c. et les analogues structuraux de la phénylalanine ont le même effet (Moroi *et al.*, 1985, Baudrimont *et al.*, 2001). Chez le rat, 48h après l'administration orale d'une dose unique d'OTA (0,17 ou 22 mg/kg p.c.), des hémorragies multifocales dans de nombreux organes, des thrombi de fibrine dans la rate, dans le plexus choroïde du cerveau (Belmadini *et al.*, 1999), le foie, le rein et le cœur sont constatés. Ces lésions suggèrent une coagulation intra-vasculaire disséminée qui serait due à l'activation des systèmes intrinsèques et extrinsèques de coagulation. Les autres modifications sont une nécrose hépatique et lymphoïde, une entérite avec une atrophie des villosités affectant plus sévèrement le jéjunum ainsi qu'une néphrite. Les lésions myocardiques sont à relier au choc et à l'ischémie (Albassam *et al.*, 1987).

4.2.2 Toxicité subaiguë et chronique

Des rats mâles Wistar sevrés, exposés par voie orale pendant deux semaines, à une alimentation contenant respectivement 0 ; 2,4 ; 4,8 ; 9,6 et 24 mg/kg d'OTA montrent aux deux doses les plus élevées, des retards de croissance, une diminution de la consommation alimentaire et une augmentation de l'urémie. A la dose la plus élevée, le poids relatif des reins est augmenté. Des lésions dégénératives sur l'ensemble du système tubulaire et une diminution du volume d'urine émis sont observées quelles que soient les doses. Une éosinophilie et une caryomégalie des cellules du tube contourné proximal sont notées à toutes les doses (Munro *et al.*, 1974).

Au cours de la même étude (Munro *et al.*, 1974), des rats mâles et femelles Fischer ont reçu de l'OTA à des teneurs de 0, 1, 4 ou 16 mg/kg dans l'aliment, 5 jours par semaine, avec 12 administrations au total réparties sur 16 jours. Tous les rats ayant reçu 16 mg/kg d'OTA ont eu de la diarrhée et des écoulements nasaux, et sont morts avant la fin de l'étude. Pour toutes les doses d'OTA supérieures à 1 mg/kg, il y a eu une augmentation du poids des reins, du cœur et du cerveau, une atrophie du thymus, une nécrose de l'estomac et des surrénales hyperplasiques et hémorragiques.

Toujours chez le rat, des résultats similaires sont obtenus après administration intra-péritonéale d'OTA à 0, 0.75 et 2 mg/kg p.c./j pendant 5 à 7 jours. On note une diminution du poids corporel, une augmentation du flux urinaire, une protéinurie, une glucosurie et une altération du transport urinaire des substances organiques. L'augmentation de la protéinurie serait due à une interférence avec la réabsorption des protéines par les cellules des tubes contournés (Berndt et Hayes, 1979).

Chez des rats exposés pendant 13 semaines à des doses orales de 21, 70 et 210 µg/kg à raison de 5 administrations par semaine, Rached et al (2007) ont observé une prolifération des cellules du cortex rénal aux deux plus fortes doses. L'absence d'effet à la plus faible exposition a conduit ces auteurs à retenir une NOEL de 21 µg/kg/j chez le rat. Enfin, la prolifération cellulaire observée fournit des arguments en faveur d'un mécanisme épigénétique à seuil.

De nombreuses études de toxicité subaiguës et chroniques ont été conduites chez le porc, la volaille ou les animaux de compagnie, leurs résultats sont rapportés dans les chapitres correspondants.

4.2.3 Génotoxicité

Les premières évaluations de la génotoxicité de l'OTA utilisant des modèles bactériens ont donné des résultats négatifs (Bendele *et al.*, 1985 ; Kuiper-Goodman et Scott, 1989). En revanche, d'autres études ont montré que le test d'Ames de mutagenèse, ou le même le test de bioluminescence bactérienne (Sun et Stahr, 1993) n'est positif qu'avec l'OTA préalablement métabolisée en présence de culture hépatocytaire (Hennig *et al.*, 1991) ou de microsomes hépatiques (Obrecht *et al.*, 1999).

L'OTA est génotoxique dans le test de réparation de l'ADN chez *Escherichia coli* (Malaveille *et al.*, 1991 ; Malaveille *et al.*, 1994), elle augmente le taux d'échanges de chromatides sœurs (Follmann *et al.*, 1995) et elle induit la formation de micronoyaux dans les cultures de cellules de vésicules séminales ovines (Degen *et al.*, 1997).

En 1985, Creppy *et al.* ont montré que l'OTA induit des cassures mono-brin de l'ADN dans différents tissus ou cellules de souris *in vivo* et *in vitro*. Le traitement de souris et de rats par l'OTA induit la

formation d'adduits à l'ADN dans la rate, le foie et le rein selon un effet dose-dépendant. Le nombre d'adduits à l'ADN est surtout très élevé dans les reins et la vessie des souris traitées (Pfohl-Leskowicz, 1991 ; Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996 ; Petkova-Bocharova *et al.*, 1998). Les adduits à l'ADN ont aussi été observés dans plusieurs types de cultures cellulaires traitées avec l'OTA : cellules rénales de singe (Grosse *et al.*, 1995), cellules épithéliales bronchiques humaines (Grosse *et al.*, 1995) et cellules épithéliales porcines vésicales (Dorrenhaus et Follmann, 1997).

D'autres études contredisent le principe de la formation de métabolites réactifs (Gautier *et al.*, 2001) et supportent le rôle du stress oxydatif (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1993 ; Gillman *et al.*, 1999) et la formation d'hydroperoxydes (Omar *et al.*, 1990).

Enfin, des études ont conclu que l'OTA n'est pas mutagène dans le test d'Ames (Follmann et Lucas, 2003) et n'induit pas la formation d'adduits à l'ADN chez des rats traités avec 2 mg/kg p.c. pendant 2 semaines (Mally *et al.*, 2004). Additionnellement, dans une étude menée par Turesky (2005) chez des rats mâles, des adduits à l'ADN n'ont pas été détectés. Considérant les résultats négatifs de telles études, il est actuellement admis que les effets de l'OTA mesurés au cours d'études *in vivo* et *in vitro* tels que toxicité rénale régio-spécifique, lésions de l'ADN ou effets génotoxiques, seraient attribuables à un stress oxydatif cellulaire.

4.2.4 Pouvoir cancérigène

L'OTA est cancérigène chez le rongeur avec induction de tumeurs rénales, hépatiques, mammaires et testiculaires (Schwartz, 2002). Les lésions tumorales retrouvées au niveau rénal prédominent, ce qui est probablement une conséquence du fait que la cible primaire de l'OTA est l'épithélium des tubules proximaux au niveau du cortex interne et de la médulla externe (Kuiper-Goodman et Scott, 1989 ; Krogh, 1992). L'OTA est cancérigène chez la souris avec une dose TD50 (tumorigenic dose rate 50) de 4500 µg/kg p.c./j, et chez le rat avec une TD50 de 74 µg/kg p.c./j, montrant que le rat est beaucoup plus sensible aux effets cancérigènes de l'OTA (Kuiper-Goodman et Scott, 1989).

Chez l'homme, une corrélation positive entre l'exposition à l'OTA et la NEB ainsi qu'entre la distribution géographique de la NEB et l'incidence élevée des cancers de l'épithélium urothélial a été montrée (Nikolov *et al.*, 1996). Les concentrations sériques d'OTA mesurées sont plus élevées chez les patients atteints de la NEB et/ou du cancer de l'épithélium urothélial que chez les sujets non malades. L'OTA est classée dans le groupe 2B par le CIRC (1993) comme étant un cancérigène possible chez l'homme

4.2.5 Embryotoxicité et tératogénicité

Des souris CBA gestantes ont reçu, par gavage une suspension de maïs contaminé par de l'OTA à des doses de 0, 1, 2 ou 4 mg/kg p.c. les 8^{ème} et 9^{ème} jours de gestation ou à 4 mg/kg p.c. 2 jours avant l'accouplement et aux jours 2, 4, 6, 7, 10 et 14 de gestation. A J19, une mortalité prénatale de l'ordre de 20% a été observée dans les groupes ayant reçu 4 mg/kg p.c. à J7, J8 et J9. Des anomalies du système nerveux central, des yeux et du squelette axial doses-dépendantes ont été enregistrées chez les fœtus à J8 et J9. Les malformations les plus importantes et les plus communes sont celles affectant les structures crânio-faciales. Elles sont liées à une aplasie et une dysplasie des structures supérieures de la face et se manifestent par des exencéphalies, microcéphalies, anophtalmies et microophtalmies (Arora et Frolen, 1981 ; Singh et Hood, 1985).

Chez le rat, après deux administrations orales de 2,5 mg/kg p.c. d'OTA aux 8^{ème} et au 9^{ème} jours de gestation, une augmentation du nombre de résorptions fœtales, une diminution du nombre moyen de fœtus par femelle et une baisse du poids moyen des fœtus et du placenta ont été observées. De plus, une proportion statistiquement élevée de fœtus présentent des hémorragies superficielles et profondes ainsi que de la célosomie, ce qui prouve le caractère tératogène de l'OTA (Moré et Galtier, 1974).

4.3 Toxicité d'organes

4.3.1 Néphrotoxicité

Mécanismes d'action néphrotoxique

L'OTA est un puissant inhibiteur de l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) rénale *in vivo* (Meisner et Meisner, 1981), et en conséquence de la néoglucogenèse rénale. En outre, elle diminue l'activité respiratoire et de capture du Ca^{2+} par la mitochondrie, alors que la concentration calcique intracytosolique reste élevée (Aleo et al, 1991). Une augmentation de l'activité de la pompe à Ca^{2+} ATP-dépendante au niveau du reticulum endoplasmique du cortex rénal a été observée *in vivo*, ce qui permettrait de restaurer l'homéostasie calcique cytoplasmique (Rahimtula et Chong, 1991 ; Chong et Rahimtula, 1992). Cette augmentation de l'activité de la pompe à Ca^{2+} est incompatible avec l'hypothèse d'une peroxydation lipidique qui inhibe cette activité (Chong et Rahimtula, 1992).

L'OTA a plusieurs sites d'action tout au long du néphron. Elle n'agit pas majoritairement sur le tube proximal comme les autres néphrotoxines ; en revanche, il semble que les parties post-proximales du néphron constituent la cible principale lors d'une exposition aiguë (Gekle *et al.*, 1993).

Filtration glomérulaire

Une exposition chronique à l'OTA entraîne une réduction du débit sanguin rénal et par voie de conséquence une diminution de la filtration glomérulaire (Gekle et Silbernagl, 1996) alors qu'une exposition aiguë n'a pas d'effet mesurable sur ces paramètres hémodynamiques rénaux (Gekle et Silbernagl, 1996). Par ailleurs, à la suite d'une augmentation de la résistance artériolaire efférente, probablement médiée par l'angiotensine II, la pression capillaire glomérulaire s'élève conduisant à un endommagement du glomérule (Gekle et Silbernagl, 1993).

Tubule proximal

Le tubule proximal est surtout affecté lors d'une exposition chronique à l'OTA, laquelle dégrade les fonctions du tube proximal entraînant une glucosurie et une enzymurie (Gekle et Silbernagl, 1993 ; Dahlmann *et al.*, 1998). La réabsorption des protéines filtrées par endocytose peut aussi devenir défaillante, conduisant à une protéinurie (Gekle *et al.*, 1994).

L'excrétion rénale de l'OTA dans les urines se fait principalement par sécrétion tubulaire, vraisemblablement par un système de transport d'anions organiques (Sokol *et al.*, 1988), ce qui peut entraîner l'accumulation de l'OTA et le développement de la néphrotoxicité. Or, une exposition chronique à des concentrations nanomolaires d'OTA réduit l'activité des transporteurs d'anions, et la sécrétion propre de l'OTA augmentant ainsi sa toxicité (Sauvant *et al.*, 1998). Une multitude de transporteurs responsables du transport sang-lumière néphrotique ont été identifiés au cours de ces dernières années : hOAT1 (human organic anion transporter) (Tsuda *et al.*, 1999) et hOATⁿ (Cha *et al.*, 2001) situés sur la membrane baso-latérale du tube proximal, hOAT4 sur la membrane apicale responsable de l'absorption et de l'efflux de l'OTA (Babu *et al.*, 2002), oatp2 (organic anion transporting polypeptide) et mOAT2 (Kobayashi *et al.*, 2002) au niveau rénal et hépatique, OAT-K1 et OAT-K2 sur la membrane de la bordure en brosse du tube proximal et du tube collecteur (Takeuchi *et al.*, 2001). La réabsorption pH-dépendante de la toxine par un co-transporteur H^+ -dipeptide, ou bien pH-indépendante médiée par OAT-K1, et/ou par diffusion passive, réduit son élimination et augmente la toxicité (Zingerle *et al.*, 1997 ; Dahlmann *et al.*, 1998). Plusieurs substrats, comme l'aspartame (Baudrimont *et al.*, 1995 ; Tsuda *et al.*, 1999 ; Baudrimont *et al.*, 2001), préviennent la néphrotoxicité de l'OTA en inhibant la réabsorption et favorisant ainsi son excrétion.

Les parties post-proximales du néphron

L'exposition aiguë à l'OTA est responsable de la détérioration des fonctions tubulaires post-proximales. Elle conduit à une augmentation de l'excrétion du NaCl et une réduction de l'excrétion de K^+ et H^+ . A la suite d'une exposition prolongée, une polyurie se manifeste en raison de la diminution de la fonction de concentration des urines (Gekle *et al.*, 1993).

Des concentrations nanomolaires d'OTA ont un effet mitogène sur les cellules rénales (Gekle *et al.*, 1993 ; Gekle et Silbernagl, 1996). L'inhibition de la synthèse protéique ne semble pas expliquer cet effet puisque des concentrations de l'ordre de 10^{-5} M sont nécessaires dans ce cas (Gekle *et al.*, 1993). De fortes doses d'OTA conduisent à des mécanismes d'action non spécifiques, notamment l'inhibition de la synthèse protéique (Creppy *et al.*, 1984), la peroxydation lipidique (Rahimtula *et al.*, 1988) et l'inhibition de la respiration mitochondriale (Aleo *et al.*, 1991). Dans la plupart des cas, le mécanisme sous-jacent semble être différent selon les concentrations (Gekle *et al.*, 1998) (tableau 4) (Benesis *et al.*, 2000).

Tableau 1 : Différents effets de l'OTA sur le tube proximal et le tube collecteur (Gekle *et al.*, 1998).

	Tubule proximal	Tube collecteur
Faible dose	Inhibition non compétitive du système de transport des anions organiques Inhibition du système de transport des cations organiques Prolifération cellulaire et hypertrophie Diminution de la réabsorption des protéines	Blocage des canaux ioniques de la membrane plasmique et de l'échange Cl^-/HCO_3^- ⁵⁷ Altérations de l'homéostasie du pH et du Cl^- , et du transport transépithélial des électrolytes et H^+ ^{57,77} Activation de ERK1/2 ⁷⁷ Dédifférenciation cellulaire ⁷⁷
Forte dose	Diminution de la viabilité cellulaire Membrane plasmique perméable Inhibition de la synthèse d'ADN Inhibition de la synthèse protéique Inhibition de la prolifération cellulaire Détachement cellulaire et diminution générale du transport	Diminution de la viabilité cellulaire Membrane plasmique perméable Inhibition de la synthèse d'ADN Inhibition de la synthèse protéique Inhibition de la prolifération cellulaire Détachement cellulaire et diminution générale du transport

4.3.2 Hépatotoxicité

L'administration de 1,25 mg/kg p.c./j d'OTA par voie orale pendant 8 semaines à des rats sevrés entraîne une augmentation de la quantité de glucose hépatique et une diminution des glucides et du glycogène total (Suzuki *et al.*, 1975). L'activité des enzymes glycolytiques est réduite, alors que celle des enzymes de la néoglucogénèse augmentent. L'effet diabétogène de l'OTA serait dû à une inhibition de la synthèse de l'insuline ou une inhibition de son relargage par les cellules pancréatiques, une diminution de la glycolyse et de la glycogénèse et une augmentation de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse (Subramanian *et al.*, 1989).

Le premier mécanisme d'action décrit concerne le métabolisme de la phénylalanine (Phe). Il a été établi que l'OTA inhibe la synthèse des protéines chez plusieurs organismes procaryotes et eucaryotes *in vivo* et *in vitro* (Röchenthaler *et al.*, 1984 ; Dirheimer et Creppy, 1991), cet effet étant dû au groupement Phe de la toxine. L'inhibition de la synthèse protéique s'effectue au niveau post-transcriptionnel ; la compétition entre l'OTA et la phénylalanyl-ARNt-synthétase empêche l'élongation du peptide et par suite la traduction (Creppy *et al.*, 1979). Par ailleurs, l'OTA inhibe aussi la synthèse de l'ADN et de l'ARN (Creppy *et al.*, 1979 ; Meisner et Meisner, 1981 ; Creppy *et al.*, 1983).

Cependant, l'interaction de l'OTA avec la phénylalanyl-ARNt-synthétase n'est observée que pour des concentrations millimolaires d'OTA. McMasters et Vedani (1998) suggèrent que ce mécanisme n'induit probablement pas de risque toxique du fait que les concentrations retrouvées chez l'homme sont de l'ordre du nanomolaire.

Un autre mécanisme de toxicité proposé est la peroxydation lipidique induite *in vitro* par l'OTA dans des microsomes rénaux et hépatiques (Rahimtula *et al.*, 1988 ; Omar *et al.*, 1990) ou chez le rat traité avec 6 mg/kg p.v. d'OTA *in vivo* (Rahimtula *et al.*, 1988). *In vitro*, l'OTA induit une peroxydation lipidique dans les microsomes en présence de NADPH, d'ascorbate et du fer comme co-facteur (Omar *et al.*, 1990 ; Stormer et Hoiby, 1996). Le complexe OTA-Fe produit un radical hydroxyl toxique en présence de NADPH-cytochrome P450 réductase (Hasinoff *et al.*, 1990). De plus, les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène sont vraisemblablement impliqués dans les lésions rénales induites par l'OTA mais leur rôle direct est controversé (Baudrimont *et al.*, 1994).

En outre, les cytochromes P450 biotransforment l'OTA en métabolites qui stimulent la peroxydation lipidique (Aleo *et al.*, 1991 ; De Groene *et al.*, 1996 ; Castegnaro *et al.*, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz, 1998), ce qui peut perturber l'homéostasie calcique (Khan *et al.*, 1989 ; Hoehler *et al.*, 1996) et induire la mort cellulaire par apoptose (Petrik *et al.*, 2003). La peroxydation lipidique semble être la conséquence de l'inhibition de la synthèse protéique, qui peut réduire les systèmes enzymatiques responsables de la détoxification des radicaux oxygénés (Baudrimont *et al.*, 1997).

4.3.3 Immunotoxicité

Au niveau immunitaire l'un des effets les plus notables de l'OTA est la diminution de la taille des organes lymphoïdes (Bondy et Pestka, 2000 ; Al-Anati et Petzinger, 2006a). Une réduction de la taille du thymus, de la rate et des plaques de Peyer a été décrite chez plusieurs espèces ainsi que, chez le poulet, une diminution de la bourse de Fabricius (Singh *et al.*, 1990; Stoev *et al.*, 2000a). Cependant, on ignore si cela est dû à un mécanisme nécrotique ou apoptotique ; *in vitro*, l'OTA induit l'apoptose des lymphocytes humains et bovins (Assaf *et al.*, 2004a ; Lioi *et al.*, 2004) ainsi que celle des splénocytes murins (Atroschi *et al.*, 2000).

L'OTA peut induire l'apoptose dans les lymphocytes humains périphériques humains et dans une lignée leucémique lymphocytaire, Kit 225. Une chute du potentiel mitochondrial entraînant la perméabilisation de la mitochondrie serait responsable de la sortie du cytochrome c permettant la formation de l'apoptosome et le clivage par la suite de la procaspase-9 en caspase-9 active (fragment p35). Cette dernière va ensuite cliver la caspase-3 effectrice qui, à son tour, clivera la caspase-9 générant un autre fragment, le p37, lui permettant ainsi d'avoir une activité catalytique maximale (Assaf *et al.*, 2004a).

L'OTA agit également sur les cellules de la moelle osseuse. Une hypocellularité globale ainsi qu'une diminution des cellules souches pluripotentes (CFU-S) et des progéniteurs hématopoïétiques a été décrite par Boorman *et al.* (1984) chez la souris et par Froquet *et al.* (2003) chez l'homme. De plus, l'OTA entraîne une diminution du nombre de globules blancs chez le poulet avec une lymphopénie sévère et à un degré moindre une monocytopenie (Ayed *et al.*, 1991, Chang *et al.*, 1979; Dwivedi et Burns, 1984b). Chez la souris, d'autres études ont montré une diminution du nombre de lymphocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles sans modification du nombre total de globules blancs (Müller *et al.*, 1995). Chez le porc en croissance, l'OTA augmente le nombre de cellules sanguines totales mais diminue le pourcentage de lymphocytes (Müller *et al.*, 1999). Chez les rongeurs nouveaux-nés, on observe également une diminution du pourcentage de cellules spléniques CD4+ et CD8+ (Thuvander *et al.*, 1996c) et des CD4+ matures, ainsi qu'une augmentation des lymphocytes non matures CD4+/CD8+ (Thuvander *et al.*, 1996b).

En plus de modifier le nombre de cellules immunitaires présentes dans des tissus, l'OTA module la fonction de ces cellules. L'OTA altère la capacité de phagocytose des hétérophiles aviaires (Chang et Hamilton, 1980), des macrophages porcins et murins (Harvey *et al.*, 1994 ; Müller *et al.*, 1999) et d'une lignée macrophagique humaine (Müller *et al.*, 2003). Une diminution de l'activité des cellules NK a été également observée chez la souris et le rat Wistar, de même qu'une diminution de la production d'IFN (Luster *et al.*, 1987 ; Alvarez *et al.*, 2004). Cependant, dans d'autres études aucun effet sur l'activité des cellules NK murines n'a été observé (Thuvander *et al.*, 1995, 1996a,c ; Dortant *et al.*, 2001).

La mort cellulaire, par apoptose ou nécrose, conduit également à une réduction du nombre de cellules productrices d'anticorps dans les organes lymphoïdes et à une diminution des niveaux sériques d'immunoglobulines et d'anticorps spécifiques (Al-Anati et Petzinger, 2006a). Chez plusieurs espèces, l'exposition à l'OTA entraîne une diminution des anticorps spécifiques vis-à-vis de différents antigènes, notamment vis à vis de *Brucella abortus* et *Escherichia coli* chez la souris (Prior et Sisodia, 1982 ; Müller *et al.*, 1995), des globules rouges de moutons chez la souris et le poussin (Haubeck *et al.*, 1981; Creppy *et al.*, 1983 ; Thuvander *et al.*, 1995 ; Verma *et al.*, 2004), vis à vis de l'antigène viral PR8 chez le rat nouveau né (Thuvander *et al.*, 1996c), ou du vaccin de la maladie de Newcastle chez le poulet (Stoev *et al.*, 2000a ; Santin *et al.*, 2002). Les concentrations en immunoglobulines IgM et IgG ne sont diminuées chez les souris BALB/c immunisées avec les globules rouges de moutons que lors d'exposition à l'OTA ou à son métabolite 4R-OH-OTA, mais pas à l'OTA- α (Creppy *et al.*, 1983). Une réduction d'IgG, d'IgA, et d'IgM est également observée dans les tissus lymphoïdes et les sérums de poulet (Dwivedi et Burns, 1984a) et dans la bourse de Fabricius d'embryons de poussin (Harvey *et al.* 1987) sans aucune modulation des IgM. Chez le veau, une exposition orale à l'OTA ne module pas les concentrations en IgA, IgM, IgG1, et IgG2 spécifiques de bactéries environnementales et d'antigènes viraux (Patterson *et al.*, 1981). Ce résultat s'explique probablement par la résistance des bovins à l'exposition orale d'OTA due à sa détoxification par les micro-organismes du rumen (Galtier et Alvinerie, 1976).

La diminution de la réponse anticorps par l'OTA peut être à l'origine des échecs de vaccination décrits chez les poulets recevant le vaccin contre la maladie de Newcastle (Stoev *et al.*, 2000a ; Santin *et al.*, 2002). Cette diminution de la réponse anticorps pourrait également contribuer à l'augmentation de la

sensibilité aux infections observée chez les dindes et les poulets de chair qui après une ochratoxicose développent une inflammation des sacs aériens due à *Escherichia coli* (Hamilton *et al.*, 1982). De même, chez les poulets infectés expérimentalement avec une bactérie (*E. coli* O78) ou un parasite (*Eimeria tenella*) et nourri avec un aliment contaminé par l'OTA les altérations histologiques observées sur les organes immunitaires sont plus sévères que chez les animaux non exposés à la toxine (Kumar *et al.*, 2004 ; Stoev *et al.*, 2002b). L'exposition des souris à l'OTA réduit également leur taux de survie après infection expérimentale par *Pasteurella multocida* (Müller *et al.*, 1995). Enfin, chez le porc, l'ingestion d'aliment contaminé par l'ochratoxine A, entraîne l'apparition d'infection par *Salmonella Cholerae* suis, *Brachyspira hyodysenteriae* et *Campylobacter coli* (Stoev *et al.*, 2000b).

Les effets de l'OTA sur la synthèse des cytokines sont moins bien connus. Sur la synthèse d'IL-2, certaines publications montrent une induction, (Marin *et al.*, 1996), une diminution (Harvey *et al.*, 1992; Lea *et al.* 1989) ou une absence de réponse (Thuvander *et al.*, 1995, 1996a). Les effets de l'OTA sur les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1) sont plus constants et montrent généralement une augmentation de leur synthèse (Weidenbach et Petzinger, 2000 ; Heller *et al.*, 2002; Huttunen *et al.*, 2004; Al-Anati *et al.*, 2005). Ces cytokines pourraient être à l'origine de la diminution de la taille des organes lymphoïdes et des déplétions cellulaires précédemment décrites. Une autre étude montre cependant que la synthèse par les macrophages de TNF- α et d'IL-6 est réduite chez des souris exposées à la toxine pendant une longue période (17 semaines). La cytotoxicité cellulaire de l'OTA sur une longue période pourrait expliquer cette contradiction.

4.4 Valeurs toxicologiques de référence

L'OTA a été classée dans le groupe 2B (peut-être cancérigène pour l'homme) par le CIRC (1993).

Le Comité Scientifique européen de l'Alimentation Humaine (SCF, 1998), considérant le caractère cancérigène probable de l'OTA, sans que les données disponibles permettent d'identifier le mécanisme d'action qui induirait des tumeurs du tubule rénal chez le rat, a estimé qu'il convenait de réduire l'exposition alimentaire à une valeur de l'ordre de 5 ng/kg p.c./j. Cependant le SCF ne précise pas clairement si cette valeur doit être utilisée comme une dose journalière tolérable (DJT).

Après des évaluations en 1991 et 1996, le JECFA a confirmé en 2001 la Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire (DHTP) pour l'homme de 100 ng/kg de poids corporel par semaine (soit 14 ng/kg p.c./j). Le JECFA a considéré que des effets néphrotoxiques précédaient l'apparition de tumeurs rénales et a donc fixé la DHTP en se fondant sur des effets néphrotoxiques chez le porc observés dans une étude de toxicité subchronique (90 jours) où la plus petite dose identifiée est égale à 0,008 mg/kg p.c./j. Un facteur de sécurité de 500 a été appliqué à cette valeur.

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a revu à la hausse en 2006 la DHT de l'OTA à 120 ng/kg p.c./sem (EFSA, 2006), en se fondant sur les arguments suivants :

- Chez l'homme, certaines données épidémiologiques ont suggéré que l'OTA pourrait être impliquée dans la pathogenèse de certaines affections rénales, voire dans l'apparition de tumeurs rénales rares dans certaines régions endémiques de la péninsule balkanique. Ces données épidémiologiques demeurent néanmoins incomplètes et ne justifient en aucun cas la classification de l'OTA parmi les agents responsables de cancers rénaux chez l'homme.
- Des données issues du programme de recherche européen « OTA Risk assessment QL1-2001-016114 » montrent que les effets de l'OTA mesurés au cours de diverses études *in vivo* et *in vitro* (toxicité rénale régio-spécifique, lésions de l'ADN et effets génotoxiques) sont très probablement attribuables à un stress oxydatif cellulaire.
- L'utilisation de méthodologies nouvelles en chimie analytique n'a pas réussi à démontrer que l'OTA provoquait des adduits identifiables à l'ADN. En raison du manque d'arguments en faveur de l'existence de ce type d'adduits spécifiques à l'ADN, les experts de l'EFSA ont décidé de caractériser le danger en définissant une dose hebdomadaire tolérable (DHT).

Une dose minimale avec effet nocif observé (LOAEL) de 8 μ g/kg de poids corporel par jour pour les marqueurs précoces de toxicité rénale chez le porc (espèce animale la plus sensible) et un facteur de sécurité de 450 (afin de prendre en compte les incertitudes d'extrapolation des résultats

expérimentaux de l'animal à l'homme et la variabilité inter-espèces), ont permis de déterminer cette DHT de 120 ng/kg de poids corporel pour l'OTA.

5 Exposition humaine à l'ochratoxine A

5.1 Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

Dans plusieurs localités situées sur les bords d'affluents du Danube, en Bulgarie, Roumanie, Bosnie, Serbie, et Croatie, une incidence inhabituelle d'insuffisance rénale chronique a été décrite depuis 1956, concernant 10% à 30% de la population rurale des deux sexes. Cette néphropathie endémique, dite *Néphropathie Endémique des Balkans (NEB)*, réunit tous les critères d'une néphropathie tubulo-interstitielle chronique. Les signes cliniques sont ceux d'une insuffisance rénale progressive précédée par une anémie très marquée (Godin *et al.*, 1997 ; Tatu *et al.*, 1998). Le tableau clinique comporte une protéinurie tubulaire, une acidose tubulaire, une hyperuricémie et une hyperuricosurie, une diminution du volume des reins avec souvent des images de nécrose papillaire (Godin *et al.*, 1997). L'évolution insidieuse aboutit en 2 à 10 ans à l'insuffisance rénale terminale, sans hypertension artérielle.

La survenue de tumeurs bénignes et surtout malignes de l'uretère, du bassin et de la vessie est signalée dans un tiers des cas, avec une prévalence de 100 à 200 fois plus élevée dans les villages affectés que dans les non affectés (Godin *et al.*, 1997 ; Tatu *et al.*, 1998). Les patients, ainsi que des sujets vivant dans les régions endémiques, présentent une diminution du nombre des lymphocytes B, une éosinophilie et une augmentation de la proportion des lymphocytes CD3+, CD8+, CD16+ et CD56+ cytotoxiques (Tatu *et al.*, 1998).

L'étiologie de cette néphropathie très particulière diverge en plusieurs pistes. L'analogie avec la néphropathie par abus d'analgésique (Bach, 1991), et plus récemment avec la néphropathie due aux herbes chinoises (Fillastre *et al.*, 1997 ; Tatu *et al.*, 1998 ; Arlt *et al.*, 2001) dans lesquelles l'atteinte rénale est associée à un fort pourcentage de cancers de l'épithélium urothélial, a renforcé l'idée d'une toxine. Des autres investigations ont montré une forte contamination des denrées alimentaires par l'OTA dans les régions endémiques de la Bulgarie et de la Yougoslavie, des concentrations sériques d'OTA très élevées (de l'ordre de 2 à 50 ng/ml) (Petkova-Bocharova et Castegnaro, 1991 ; Radic *et al.*, 1997) ainsi que des adduits à l'ADN dans des tumeurs du tractus urinaire chez les sujets habitant les régions endémiques (Nikolov *et al.*, 1996; Radic *et al.*, 1997). D'autres facteurs ont aussi été impliqués comme la proximité des villages endémiques avec des gisements de charbon qui auraient contaminé l'eau des puits par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (pyrène, anthracène) et des amines aromatiques (aniline, naphtylamine) (Tatu *et al.*, 1998). Enfin une étude de Grollman *et al.* (2007) avance l'hypothèse de l'intoxication chronique à l'acide aristolochique contenu dans des herbes (*Aristolochia* sp.) soit contaminant des céréales soit utilisées pour leur vertu médicinale, comme facteur étiologique pour la NEB.

5.2 Exposition de la population française

Une étude de la ration alimentaire totale (EAT) a été entreprise en 2000, afin de connaître le niveau d'exposition à l'OTA de la population française générale et végétarienne à partir d'aliments "prêts à consommer". Les apports ont été estimés à partir de 343 données de contamination dont 321 étaient inférieures à la limite de détection. Le tableau 2 récapitule les apports moyens et au 95^{ème} percentile de consommation pour différents types de population (Leblanc *et al.*, 2005).

Les aliments les plus contributeurs à l'exposition de la population française à l'ochratoxine A sont les céréales, le café, le vin, les fruits secs, la bière, le chocolat et les épices. Les données de contamination reliées à la consommation montrent que les forts consommateurs français sont exposés à 3,5 ng/kg p.c./j (20% de la DJT) pour les adultes et à 7,8 ng/kg p.c./j (45% de la DJT) pour les enfants.

Tableau 2 : Estimation des apports alimentaires moyens et des forts consommateurs (P95) pour différents types de population en OTA (EAT, 2004⁴)

Type de population		Apport moyen (ng/kg p.c./j)	Apport au P95 (ng/kg p.c./j)	% de la DJT* pour P95	% d'individus pouvant dépasser la DJT*
Population générale	Adultes (15 ans et +)	2,2	3,5	20	0
	Enfants (3-14 ans)	2,1	7,8	45	0
Population végétarienne (15 ans et +)	Ovolactovégétariens	2,2	3,7	22	0
	Lactovégétariens	2,4	3,7	22	0
	Végétaliens	2,7	8,5	50	0

* L'AESA a fixé une DHT de 120 ng/kg p.c./semaine, soit 18 ng/kg p.c./j

A titre de comparaison, la Tâche SCOOP européenne⁵ réalisée en 2002 (tableau 3) avec des données de contamination recueillies entre 1997 et 1999 confirme les niveaux d'exposition observés dans le cadre de l'étude de l'alimentation totale.

Tableau 3 : Exposition alimentaire de la population française à l'ochratoxine A (Tâche SCOOP, 2002)

Type de population	Exposition moyenne (ng/kg p.c./j)	% de la DJT fixée par le JECFA*	% de la DJT fixée par l'AESA**
Tous consommateurs	2,5	18	15
Adultes (15 à 65 ans)	2,3	16	14
Enfants (2 à 14 ans)	3,4	24	20

* Le JECFA a fixé une DHTP de 100 ng/kg p.c./sem, soit 14 ng/kg p.c./j

** L'AESA a fixé une DHT de 120 ng/kg p.c./semaine, soit 18 ng/kg p.c./j

Ces études sur l'exposition alimentaire des consommateurs français à l'OTA ont révélé que l'exposition hebdomadaire actuelle est, en fait, comprise entre 15 et 60 ng d'OTA par kg de poids corporel par semaine, ce résultat englobant les forts consommateurs d'aliments contenant de l'OTA. Ce taux d'exposition est inférieur à la DHT de 120 ng/kg de poids corporel obtenue par l'EFSA. Cependant, il est à souligner que les calculs d'exposition ne prennent pas en compte les nourrissons, et de ce fait que des données supplémentaires seraient nécessaires afin d'évaluer les taux d'exposition de cette population de consommateurs avec prise en compte de leurs préférences alimentaires.

5.3 Biomarqueurs d'exposition chez l'Homme

Deux indicateurs simples, facilement utilisables dans le cadre d'une enquête épidémiologique, peuvent permettre d'évaluer l'exposition individuelle à l'OTA en population humaine, il s'agit des concentrations sérique et urinaire en OTA. Leur limitation majeure est que l'on ne connaît pas avec certitude la fenêtre temporelle d'exposition à laquelle ils se rapportent, ni l'importance de la variabilité intra-individuelle par rapport à la variabilité inter-individuelle, qui de plus est variable d'une population étudiée à une autre. En raison de ces incertitudes, il est préférable d'utiliser la terminologie d'"indicateur d'exposition" et non pas de "bio-marqueur" ou de "marqueur biologique d'exposition".

Jusqu'ici, l'OTA sérique a été utilisée comme l'indicateur unique dans la mesure de l'exposition à l'OTA chez l'homme, probablement pour des raisons historiques, à savoir la disponibilité d'une méthode analytique (Zimmerli et Dick, 1995), le début de caractérisation de ses propriétés toxico-

⁴ Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et éléments traces. (2004). Rapport INRA/DGAL. Coordinateur Jean-Charles Leblanc.

⁵ SCOOP report on Tasks 3.2.7. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU members states

cinétiques (Studer-Rohr *et al.*, 2001), ou encore le souci de comparer tous nouveaux résultats à ceux précédemment publiés.

La teneur urinaire en OTA, quoique moins étudiée, moins utilisée et moins importante que dans le sang (problème des limites de détection et de quantification), présente l'avantage que l'urine est une matrice plus facile à prélever, assurant en principe une bonne acceptabilité par les populations. En outre, une meilleure corrélation a été observée entre les teneurs en OTA dans les aliments et l'urine qu'avec l'OTA plasmatique (Gilbert *et al.*, 2001).

Les tableaux 4a et 4b présentent les résultats récents de dosages de l'OTA dans des échantillons de plasma, de sérum et d'urines obtenus dans différentes populations ne souffrant pas de néphropathie.

Tableau 4a : Teneurs en OTA plasmatique ou sérique (ng/ml) dans la population générale de quelques pays.

Pays	N	LOD (LOQ) (ng/ml)	> LOD (%)	min - max (ng/ml)	moyenne ± E.T. (ng/ml)	Référence
Canada	144	0,15	100	0,29 - 2,37	0,88 ± 0,35	Scott <i>et al.</i> , 1998
Croatie	249	0,20	59	n.d. - 15,9	0,39	Pereica <i>et al.</i> , 1999
Croatie	983	0,20	48	non indiqués	0,30	Pereica <i>et al.</i> , 2001
France	60	0,10	18	n.d. - 11,8	1,17 ± 1,55	Eko-Bongue <i>et al.</i> , 1994
Grande-Bretagne	50	0,01	100	0,40 - 3,11	1,09 ± 0,34	Gilbert <i>et al.</i> , 2001 MAFF, 1999
Italie	137	0,10	97	0,12 - 2,84	0,50 ± 0,30 (F) 0,64 ± 0,45 (H)	Palli <i>et al.</i> , 1999
Liban	250	(0,12)	27	n.d. - 0,87	0,17 ± 0,01	Assaf <i>et al.</i> , 2004b
Maroc	309	0,10	60	n.d. - 6,59	0,29	Filali <i>et al.</i> , 2002
Norvège	206	0,01	100	-	0,18 ± 0,11	Thuvandeter <i>et al.</i> , 2001
Suède	200	0,01	100	-	0,21 ± 0,17	Thuvandeter <i>et al.</i> , 2001
Suisse	368	0,01	100	0,06 - 6,02	0,24 ⁱ (F) 0,30 ⁱ (H)	Zimmerli et Dick, 1995
Tunisie	62	(0,10)	100	0,12 - 8,06	0,53 ± 1,00	Grosso <i>et al.</i> , 2003

LOD : limite de détection ; LOQ : limite de quantification ; E.T. : écart-type ; F : femmes ; H : hommes, nd : non détecté.

Tableau 4b : Teneurs en OTA urinaire (ng/ml) dans quelques populations

Pays	N	LOD (LOQ) (ng/ml)	> LOD (%)	min - max (ng/ml)	moyenne ± E.T (ng/ml)	Référence
Bulgarie	31	0,005	13	0,017 - 0,041	-	Castegnaro <i>et al.</i> 1991
Grande-Bretagne	50	0,010	93	0,007 - 0,058	0,021±0,003	Gilbert <i>et al.</i> , 2001 MAFF, 1999
Hongrie	88	0,005	61	0,006 - 0,065	0,013	Fazekas <i>et al.</i> , 2005
Italie	38	0,005	58	0,012 - 0,046	-	Pascale et Visconti, 2001

LOD : limite de détection ; LOQ : limite de quantification ; E.T. : écart-type .

L'OTA est également retrouvée dans le lait de femme (Pfohl-Leszkowicz et Manderville, 2007). Les niveaux sont variables, compris entre 0,01 et 10 ng/mL pour les enquêtes menées en Europe. Certaines contaminations plus élevées ont été relevées : jusqu'à 337 ng/mL en Sierra Leone. Ces données montrent que le nourrisson peut être exposé à l'OTA par le lait maternel. Ces éléments doivent être pris en compte dans l'évaluation de l'exposition du nourrisson à l'OTA et la caractérisation du risque pour le nourrisson.

6 Exposition animale

6.1 Effets sur la santé animale et transfert dans les tissus animaux

6.1.1 les porcins

La première description chez le porc de lésions rénales attribuées à la consommation d'un aliment moisi est due à Larsen en 1928. Cette pathologie, dénommée par la suite MPN (mycotoxique porcine nephropathy), a été mise en évidence dans de nombreux pays et associée notamment à la présence d'OTA dans les aliments pour porc et notamment les produits céréaliers. Des enquêtes ont révélé la présence de résidus d'OTA dans les reins de porcs au Danemark (Krogh, 1976; Buchmann et Hald, 1985), en Suède (Hult, 1991; Hult *et al.*, 1992) en Norvège (Langseth and Bergsjø, 1992), en Pologne (Goliński *et al.*, 1984, 1985, Kotowski *et al.*, 1993), en Bulgarie (Stoev, 1999), en Allemagne (Dieber et Köfer, 1999), en Espagne (Canela *et al.*, 1994), en France (Dragacci *et al.*, 1999) et au Canada (Marquardt *et al.*, 1988; Ominski *et al.*, 1996). A titre expérimental, la DL₅₀ a été établie entre 1 et 6 mg/kg de poids vif chez le porc (Krogh, 1991; Marquardt et Frohlich, 1992).

Effets sur les performances des porcs

La consommation d'aliment par le porc n'est généralement pas affectée pour une teneur inférieure à 1 mg/kg mais elle est diminuée lorsque la teneur dépasse 1,4 mg d'OTA/kg (Madsen *et al.*, 1982b), et (Tableau 5). Au delà de ces valeurs, la baisse de consommation est d'autant plus importante que le niveau de contamination en OTA de l'aliment est élevé (Tapia et Seawright, 1984; Szczech *et al.*, 1973).

Tableau 5 : Effets de l'OTA sur les performances zootechniques des porcs

Auteurs	Poids initial	Durée ¹	mg OTA/kg aliment	Consommation	Vitesse de croissance	Efficacité alimentaire
Malagutti <i>et al.</i> , 2005	41 kg	→ 170 kg	0,025	=	= → 100 kg puis ↓ de 13%	= → 100 kg puis ↓ de 15%
Lusky <i>et al.</i> , 1995	70 kg	2 S	0,09	=	=	=
Lusky <i>et al.</i> , 1998	60 kg	3 M	0,1	=	=	=
Tesch et Lusky, 1993	25 kg	4 S	0,15-0,58	=	=	=
Stoev <i>et al.</i> , 2001	10-12 kg	3 M	0,13-0,31-0,79	↓	↓	↓
Stoev <i>et al.</i> , 2002	12-14 kg	6 et 12 M	0,8		↓ faible	
Krogh <i>et al.</i> , 1976a	20 kg	→ 90 kg	1	rationnée	↓ 6%	↓ 6%
Krogh <i>et al.</i> , 1979	20 kg	24 M	1	rationnée	↓ 6% → 90 kg puis ↓ 1%	↓ 5% → 90 kg puis ↓ 1%
Madsen <i>et al.</i> , 1982a	20 kg	6 S	1,4	rationnée	↓ 7%	↓ 5%
Madsen <i>et al.</i> , 1982b	20 kg	2 S à → 90 kg	0,02 à 1,9	↓ si >1,4	↓ si >1,4	↓ si >1,4
Madsen <i>et al.</i> , 1983	50 kg	→ 90 kg	0,27-1,67-1,72-1,99	rationnée	↓ 15-34-43-25%	↓ 13-36-42-24%
Harvey <i>et al.</i> , 1989	16 kg	4 S	2		↓ 11%	↓ 27%
Harvey <i>et al.</i> , 1994	18 kg	1 M	2,5	↓ 20%	↓ 25%	↓ 7%
Harvey <i>et al.</i> , 1992	20 kg	35 J	2,5	↓ 34%	↓ 39%	↓ 7%
Krogh <i>et al.</i> , 1974	20 kg	→ 90 kg	0,2-1-4	rationnée	↓ 6-4-17%	↓ 5-5-16%
Tapia et Seawright, 1984	14 kg	13 J	2, 4, 8, 16	↓ 0, 10, 25, 50%	↓ 7-47-87-120%	↓ 12-43-85-141%

¹ J, jour; S, semaine; M, mois.

Tout comme la consommation, la vitesse de croissance des porcs est diminuée par la présence d'OTA dans l'aliment. Cet effet se manifeste dès le taux de 1 mg d'OTA/kg d'aliment (Krogh *et al.*, 1976a, 1979), voire à des niveaux de contamination plus faibles (Madsen *et al.*, 1983; Stoev *et al.*, 2001, 2002). A partir de la même teneur de 1 mg/kg dans l'aliment, l'OTA réduit aussi l'efficacité alimentaire, et cette réduction s'accroît lorsque la teneur en toxine augmente (Tapia et Seawright, 1984).

Symptômes cliniques, paramètres urinaires et sanguins

Symptômes cliniques

L'OTA peut provoquer une polydipsie et une polyurie chez le porc (Cook *et al.*, 1986). Ces symptômes restent limités aux faibles niveaux de contamination (Stoev *et al.*, 2001) et sont durables puisqu'ils persistent au cours des 2 ans durant lesquels des porcs ingèrent 25 à 50 µg d'OTA/kg de poids vif (Krogh *et al.*, 1979). D'autres symptômes se manifestent aux doses plus élevées: vomissements, anorexie, diarrhée grave, puis mort en quelques jours de porcs ingérant quotidiennement 0,6 à 2 mg d'OTA/kg p.c. (Szczech *et al.*, 1973).

Paramètres urinaires

La capacité de résorption tubulaire du glucose est diminuée chez des porcs exposés à un aliment contaminé par 0,8 mg d'OTA/kg (Krogh *et al.*, 1974, 1976a). Une glycosurie (Krogh *et al.*, 1974,

1976a, 1979; Stoev *et al.*, 2000, 2001; Tapia et Seawright, 1984), une protéinurie et une faible augmentation de l'albumine urinaire sont également constatées (Krogh *et al.*, 1976a, 1979; Stoev *et al.*, 1998, 2000; Tapia et Seawright, 1984). La quantité de protéines excrétées augmente avec la durée d'exposition et le taux d'OTA dans l'aliment (Krogh *et al.*, 1974). La capacité des porcs à concentrer l'urine après 24 h de jeûne hydrique est diminuée dès 1 mg d'OTA/kg d'aliment (Krogh *et al.*, 1974, 1976a, 1979; Stoev *et al.*, 1998, 2000, 2001). L'excrétion d'électrolytes, notamment du potassium (Krogh *et al.*, 1974, Stoev *et al.*, 1997) et du sodium (Stoev *et al.*, 1997), de nitrites et de bilirubine (Stoev *et al.*, 2000) augmentent, ainsi que le pH de l'urine (Stoev *et al.*, 1998, 2001), tandis que son osmolarité diminue (Krogh *et al.*, 1974). La densité de l'urine est abaissée (Krogh *et al.*, 1974; Stoev *et al.*, 2000), même après le retrait de l'aliment contaminé pendant un mois (Stoev *et al.*, 2001). L'excrétion tubulaire maximale de l'acide para-amino-hippurique et le rapport entre ce paramètre et la clairance de l'inuline diminuent, révélant une dégradation du fonctionnement des tubules proximaux (Krogh *et al.*, 1974, 1976a, 1979, 1988). Les concentrations en lactate déshydrogénase, en isocitrate déshydrogénase lactique et citrique et en glutamyl-oxaloacétique déshydrogénase sont augmentées de façon transitoire (Szczzech *et al.*, 1973). L'excrétion urinaire en enzymes localisées dans la bordure en brosse des tubules proximaux comme la leucine aminopeptidase (LAP) ou la gamma-glutamyl transpeptidase, est augmentée (Krogh *et al.*, 1974; Stoev *et al.*, 1998, 2000, 2001).

Paramètres sanguins

Lusky *et al.* (1994, 1995), Krogh *et al.* (1974) et Sandor *et al.* (1991) ne constatent pas d'altération des teneurs en métabolites sanguins chez des porcs exposés, même pendant une longue durée, à des aliments renfermant au maximum 0,4 mg d'OTA/kg. Mais dès le taux de 1 mg d'OTA/kg, la créatininémie (Harvey *et al.*, 1989, 1992, 1994; Krogh *et al.*, 1974, 1976a, 1979; Stoev *et al.*, 1997, 2000; Tapia et Seawright, 1984), l'urémie (Krogh *et al.*, 1974; Stoev *et al.*, 2000, 2001) et la concentration en protéines sériques (Harvey *et al.*, 1992, 1994; Stoev *et al.*, 1998) sont augmentées. Stoev *et al.* (2001) trouvent cependant une baisse de la protéinémie chez des porcs recevant un aliment contaminé simultanément par de l'OTA (0,18 puis 0,79 mg/kg) et de l'acide pénicillique (3 puis 9 mg /kg). La glycémie (Stoev *et al.*, 1997, 2000, 2001) et la cholestérolémie (Harvey *et al.*, 1994, 1989; Stoev *et al.*, 1998, 2000) sont diminuées. Dans l'étude de Stoev *et al.* (2000), la créatininémie est seule augmentée lorsque l'aliment apporte 1 mg d'OTA/kg, alors que les autres paramètres sanguins sont également affectés au taux de 3 mg d'OTA/kg. Stoev *et al.* (2001) en concluent que la créatinine, et dans une moindre mesure l'urémie, sont les critères sanguins indicateurs précoces (dès un mois) les plus sensibles des lésions rénales provoquées par l'intoxication des porcs par l'OTA; leur niveau demeure élevé un mois après que l'aliment contaminé ait été retiré, contrairement à la glycémie et à la protéinémie qui retrouvent le niveau des témoins.

Immunité

Certaines études montrent que l'OTA peut affecter la fonction immunitaire et la sensibilité aux infections des porcs. Un aliment renfermant 2,5 mg d'OTA/kg réduit à la fois l'hypersensibilité cutanée des basophiles après injection de tuberculine, l'activité des macrophages, la phagocytose des érythrocytes de porc, la prolifération lymphocytaire induite par la phytohémmagglutinine, ainsi que la production d'IL-2 après stimulation par la concanavaleine A (Harvey *et al.*, 1992, 1994). Des porcs immunisés avec *Pasteurella* subissant un challenge à *Pasteurella* sont davantage malades s'ils ingèrent l'OTA. Après immunisation contre la salmonellose, la réponse humorale est diminuée lorsque les porcs consomment un aliment ayant 1 mg d'OTA/kg (Stoev *et al.*, 2000).

Lésions rénales

A l'autopsie, l'aspect morphologique des reins de porcs consommant 0,02 mg d'OTA/kg de poids vif ne paraît pas modifié (Sándor *et al.*, 1991). Par contre, aux doses plus élevées, les reins deviennent pâles et hypertrophiés (Krogh *et al.*, 1976a; Rutqvist *et al.*, 1978; Cook *et al.*, 1986). Des marbrures (Stoev *et al.*, 2000, 2001) et des pétéchies (Harvey *et al.*, 1989) se développent à la surface des reins et leur poids relatif augmente (Harvey *et al.*, 1989, 1994; Krogh *et al.*, 1979). Ces anomalies sont d'autant plus marquées que la durée d'exposition à l'OTA augmente (Elling, 1983) ou que le taux de la mycotoxine dans l'aliment est élevé (Krogh *et al.*, 1974; Tapia et Seawright, 1984), et elles persistent un mois après le retrait de l'aliment contaminé (Stoev *et al.*, 2001).

Dans quelques études, l'examen histologique des reins ne révèle aucune ou peu de lésions chez des porcs exposés à un régime renfermant 1 mg d'OTA/kg pendant 4 semaines, ou de plus faibles doses pendant une durée plus longue (Krogh *et al.*, 1976b; Sandor *et al.*, 1991; Lusky *et al.*, 1994). Mais la plupart des travaux révèlent des altérations histologiques et ultrastructurales rénales

s'aggravant lorsque le niveau de contamination et la durée d'exposition augmentent avec dégénérescence des tubules contournés proximaux, hyalinisation et sclérose des glomérules, et développement d'une fibrose interstitielle (Hald, 1991; Krogh, 1991, 1992).

Les cellules épithéliales des tubules contournés proximaux se nécrosent, dégèrent et se desquament (Szczzech *et al.*, 1973; Elling, 1977, 1979, 1983; Krogh *et al.*, 1979; Tapia et Seawright, 1984; Stoev *et al.*, 2001). Elles peuvent apparaître gonflées, pâles et vacuolisées (Krogh *et al.*, 1974; Cook *et al.*, 1986; Harvey *et al.*, 1992, 1994; Stoev *et al.*, 2001). Des débris cellulaires sont retrouvés dans la lumière des tubules contournés et des canaux collecteurs (Krogh *et al.*, 1974, 1979; Tapia et Seawright, 1984; Stoev *et al.*, 2001). Ces constatations sont généralement faites chez des porcs consommant des aliments contaminés par au moins 1 mg d'OTA/kg, mais aussi avec un faible degré de gravité lors d'une contamination par seulement 0,2 mg d'OTA/kg (Krogh *et al.*, 1974; Stoev *et al.*, 2001).

Les tubules proximaux s'atrophient et dégèrent (Szczzech *et al.*, 1973; Krogh *et al.*, 1976a; Elling, 1979, 1983; Harvey *et al.*, 1992). Les membranes basales des tubules des zones les plus atteintes s'épaississent (Krogh *et al.*, 1974, 1976a, 1979; Elling, 1983). Inversement, la hauteur de la membrane en brosse diminue (Krogh *et al.*, 1974, 1976a; Rutqvist *et al.*, 1978), pouvant même disparaître totalement (Tapia et Seawright, 1984). La récupération semble dans une certaine mesure possible puisque, après un mois de distribution d'un aliment non contaminé, on ne trouve plus, ou seulement peu, de tubules proximaux dégénérés chez des porcs ayant précédemment consommé un aliment renfermant 0,79 mg d'OTA/kg (Stoev *et al.*, 2001).

La fibrose interstitielle se limite à la zone où les tubules sont lésés (Krogh *et al.*, 1976a, 1979; Elling, 1979; Tapia et Seawright, 1984; Cook *et al.*, 1986; Stoev *et al.*, 2001). Dans les cas les plus graves ou lorsqu'un aliment fortement contaminé est distribué pendant une longue durée, le parenchyme cortical est atrophié et la fibrose se développe dans tout le cortex rénal. Des petits kystes contenant un liquide séreux (Krogh *et al.*, 1979; Stoev *et al.*, 2001, 2002), un matériel éosinophile homogène et fréquemment des lymphocytes (Krogh *et al.*, 1974; Elling, 1983) peuvent aussi se développer dans le cortex rénal.

L'activité d'enzymes du cortex rénal est diminuée, c'est le cas de la LAP, considérée comme spécifique du rein et de la glutamate déshydrogénase (Krogh *et al.*, 1974). Il en va de même pour la NADPH-tétrazolium réductase, la succinate déshydrogénase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, l' α -glycérophosphate déshydrogénase (Elling, 1979), la PEPCK et la γ -glutamyl transpeptidase, enzyme localisée dans la bordure en brosse des tubules proximaux (Krogh *et al.*, 1988).

Autres lésions

Le tube proximal du rein constitue la cible principale de l'OTA chez le porc, et les autres organes ne sont pas affectés par la consommation d'un aliment contenant jusqu'à 4 mg d'OTA/kg (Krogh *et al.*, 1974, 1976a, 1979; Harvey *et al.*, 1989, 1992; Tesch et Lusky, 1993). Selon Krogh (1980, 1991), ce n'est qu'au-delà d'une teneur de 5 à 10 mg d'OTA/kg, très rarement trouvée de façon naturelle, que les aliments deviennent toxiques pour d'autres organes que les reins: la paroi des intestins devient fine et atonique, et leur muqueuse porte des taches de nécrose. Le foie est brun-pâle à jaune, les altérations correspondant à une surcharge graisseuse. Les nodules lymphatiques mésentériques et périphériques sont proéminents, œdémateux et faiblement congestionnés et se nécrosent. Une atteinte limitée des lymphocytes, caractérisée par de la pycnose, de la caryorexie, et de la cytolyse se produit dans les centres germinatifs.

Effets sur la reproduction

L'OTA est trouvée dans le plasma séminal de verrats consommant 20 ou 40 μ g d'OTA par jour (Solti *et al.*, 1999; Biró *et al.*, 2003), la viabilité des spermatozoïdes, leur motilité et leur longévité étant significativement réduites après un délai lié à la durée du cycle de la spermatogénèse, de 39 jours chez le porc. Une baisse de la qualité du sperme a été également constatée par Ewald et Heer (1989) chez des verrats consommant un aliment contaminé par de l'OTA.

Les très faibles effectifs de truies dans les expériences (1 à 2 /Lot) sont insuffisants pour permettre de conclure à l'absence d'effet de l'OTA sur les performances de reproduction (Shreeve *et al.*, 1977; Mortensen *et al.*, 1983a). L'OTA est trouvée dans les tissus maternels et le placenta mais pas chez

les foetus de truies ayant ingéré de l'OTA et de l'OTB pendant les 8 jours précédents (Patterson *et al.* (1976). De même, Mortensen *et al.* (1983a) ne détectent pas d'OTA dans les tissus des porcelets à la naissance, leurs reins ont un poids normal et ne présentent aucune anomalie morphologique. En revanche, un cas de transfert d'OTA aux foetus porcins a été rapporté par Barnikol et Thalmann (1988). De même, Rajić *et al.* (1986) en retrouvent 5 à 10 µg/kg dans les muscles, les poumons et le foie des porcelets nouveau-nés n'ayant pas encore tété leurs mères, celles-ci ayant consommé un aliment avec 2,3 mg d'OTA/kg pendant les 4 jours précédents.

Devenir de l'ochratoxine

L'absorption de l'OTA est beaucoup plus lente et plus complète (65,7% de l'OTA administrée) chez le porc que chez le lapin ou le poulet. Le volume de distribution de la toxine (42,9 mL/kg) correspond approximativement au volume du plasma. Le pic d'OTA est atteint dans le plasma 10 h après son administration orale (Galtier *et al.*, 1981). La demi-vie plasmatique de 88,8 h de l'OTA (contre respectivement 8,3 et 4,2 h chez le lapin et le poulet) trouvée par Galtier *et al.* (1981) est du même ordre dans les reins, le foie et les muscles de porcs (respectivement 4,5, 4,3 et 3,3 jours d'après Krogh *et al.*, 1976b). La toxine s'accumule donc dans les tissus, et elle est encore trouvée dans les reins 1 mois après l'arrêt de sa consommation (Krogh *et al.*, 1976b). La plus grande affinité de la sérum albumine de porc pour l'OTA contribuerait à expliquer l'élimination particulièrement lente des résidus de la toxine chez cette espèce (Galtier, 1991).

Après 5 mois de consommation par des porcs d'un aliment contenant de l'OTA, la concentration de la toxine dans l'urine est plus élevée que dans le sérum sanguin, et après une semaine de retrait de l'aliment contaminé, l'OTA est encore trouvée dans l'urine alors qu'elle n'est plus détectée dans le sang. La voie urinaire serait donc primordiale pour l'élimination de la toxine (Stoev *et al.*, 2001).

Lorsque l'aliment contient à la fois de l'OTA et de l'OTB, toutes deux sont trouvées dans le plasma, mais l'OTA est davantage absorbée que l'OTB (Patterson *et al.*, 1976). Ni l'OTB, ni l'OT α , métabolite de l'OTA, ne sont présentes dans les tissus (Krogh, 1977; Krogh *et al.*, 1976a,b, 1979).

Résidus dans les tissus et organes: conséquences pour les aliments de l'homme

Chez le porc exposé à une contamination alimentaire en OTA, la toxine est localisée principalement dans le plasma (Galtier, 1991; Hult *et al.*, 1992). Sa concentration plasmatique est liée à la teneur dans l'aliment (Sandor *et al.*, 1991; Lusky *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1999), mais elle demeure 1,5 fois plus élevée dans le sang que dans l'aliment (Tesch et Lusky, 1993; Lusky *et al.*, 1995; Solti *et al.*, 1999). Lorsque l'aliment contaminé cesse d'être distribué, le taux sanguin d'OTA diminue de façon exponentielle (Biró *et al.*, 2003). Stoev *et al.* (2001) n'en trouvent plus dans le sérum une semaine après que des porcs aient cessé de consommer un aliment avec 0,79 mg d'OTA/kg. Mais le plus souvent, on en retrouve encore 5 à 7 semaines plus tard (Mortensen *et al.*, 1983a; Biró *et al.*, 2003). Solti *et al.* (1999) constatent même l'apparition de pics d'OTA à 14 et 35 jours après que l'aliment contaminé ne soit plus alloué à des verrats.

Compte tenu de sa longue demi-vie, le taux d'OTA dans le sang est considéré comme représentatif du niveau de contamination de l'aliment lorsqu'il est distribué pendant une longue durée (Hult, 1991). Cette relation a été mise à profit au cours d'enquêtes en abattoirs conduites dans des régions ou sur des troupeaux de porcs à forte prévalence de MPN, et l'OTA était alors retrouvée dans le sang d'une proportion importante d'animaux (65%, Marquart *et al.*, 1988; 36%, Ominski *et al.*, 1996). Cependant, pour un même niveau de contamination de l'aliment, les variations individuelles de teneur en OTA du sang sont importantes (Mortensen *et al.*, 1983a; Stoev *et al.*, 2001).

La teneur en OTA de la bile est proche de celle du sang (Lusky *et al.*, 1994) mais elle est beaucoup plus faible dans les tissus et organes (Rutqvist *et al.*, 1978; Cook *et al.*, 1986; Krogh, 1991; Mortensen *et al.*, 1983b; Müller *et al.*, 1999). Les reins sont les organes dans lesquels le taux de toxine (localisée dans les tubules contournés proximaux) est le plus élevé, variant entre 4 et 71 µg/kg à la suite de la consommation d'aliments contaminés par 0,1 et 1,4 mg d'OTA/kg (Madsen *et al.*, 1982b; Lusky *et al.*, 1995, 1998). Dans le myocarde, des taux d'OTA proches de ceux des reins ont été notés (Lusky *et al.*, 1994, 1995). Par ordre de teneur décroissante, on trouve ensuite en général le foie, les muscles, puis les graisses (Krogh *et al.*, 1976a,b; Rutqvist *et al.*, 1978; Tesch et Lusky, 1993; Gareis et Scheuer, 2000; Malagutti *et al.*, 2005).

En raison de la longue demi-vie plasmatique de l'OTA chez le porc, cette toxine peut se retrouver dans les produits carnés consommables par l'homme. Un tiers des reins de porcs présentant des signes de MPN contiennent plus de 10 µg d'OTA/kg (Krogh, 1977). Cette teneur est également dépassée dans 33% des foies, 20% des muscles et 8% des graisses des mêmes animaux. Mais la situation est meilleure lorsque l'on considère les porcs dont les reins sont apparemment normaux. Au Danemark, des enquêtes ont montré que si l'OTA est détectée dans une proportion relativement importante d'échantillons de viande de porc, sa teneur ne dépasse 1 µg/kg que dans 2 cas sur 83 (Jørgensen, 1998) ou 9 cas sur 300 d'entre eux (Jørgensen et Petersen, 2002). Une étude analogue conduite en Allemagne sur 620 échantillons de viande et d'abats issus de porcs, bœufs et volailles démontre que le risque de contamination par l'OTA est beaucoup plus important avec le porc (Gareis et Scheuer, 2000).

L'OTA est également retrouvée dans la charcuterie, et l'addition de sang, de sérum ou de foie à la viande en augmente la teneur. Gareis et Scheuer (2000) détectent de l'OTA dans 70% des boudins, 68% des saucisses à base de foie, et 50% des saucisses ordinaires, avec des 90^{èmes} percentiles qui sont respectivement de 0,24, 0,16 et 0,11 µg/kg. La charcuterie produite à partir de porcs ayant consommé un aliment avec 0,09 mg d'OTA/kg pendant leurs 4 dernières semaines de vie en contient, en moyenne 12,4 µg/kg pour la saucisse avec plasma ajouté, 11,4 µg/kg pour le boudin et 10,0 µg/kg pour la saucisse de foie (Lusky *et al.*, 1995). La saucisse obtenue à partir de porcs lourds qui ont reçu une ration renfermant 2,5 µg d'OTA/kg contient environ 5 µg d'OTA/kg (Malagutti *et al.*, 2005). La charcuterie contient d'autant plus d'OTA que le régime était davantage contaminé (Lusky *et al.*, 1994). L'OTA contenue par ces produits n'est pas détruite par la fermentation, le stockage, la maturation, la cuisson (Krogh, 1977; Lusky *et al.*, 1994) ou la congélation à -70°C (Rutqvist *et al.*, 1978). Ainsi, la teneur en OTA de la saucisse fraîche n'évolue pas après 40 ou 100 jours de maturation (Malagutti *et al.*, 2005).

Au Danemark, où les risques de contamination de la viande et des abats par l'OTA étaient élevés, un contrôle en abattoir des reins de porcs a été mis en place: lorsqu'un rein présente des signes de néphropathie, sa teneur en OTA est déterminée. Si elle est supérieure à 25 µg/kg, l'animal entier est saisi, et quand elle est comprise entre 10 et 25 µg/kg, seuls les reins et le foie sont éliminés. La dose limite de 25 µg d'OTA/kg dans les reins correspond à une teneur théorique de 10 µg d'OTA/kg dans la viande, fondée sur des équations de régression reliant les teneurs en résidus dans les reins à celle des tissus (Krogh, 1977). L'application de ces mesures jointe à une plus grande surveillance de la qualité des aliments destinés aux animaux et à leurs conditions de séchage et de conservation a amélioré la situation sans éliminer tous les risques (Jørgensen et Petersen, 2002).

La citrinine, parfois retrouvée simultanément à l'OTA dans l'alimentation, a les mêmes effets néphrotoxiques chez le porc mais à des doses beaucoup plus élevées que celles de l'OTA (Krogh, 1980) (voir chapitre « Autres mycotoxines »). Il n'y a actuellement pas de données épidémiologiques disponibles montrant leur éventuelle potentialisation toxique lorsqu'elles sont présentes de façon concomitante à l'état naturel.

6.1.2 Les volailles

Effets sur la santé

Comme chez la plupart des espèces d'élevage, l'intoxication par l'OTA peut se manifester chez les volailles par une forme aiguë ou une forme chronique. Ces deux formes sont observées après ingestion de doses relativement élevées d'OTA (de l'ordre du mg/kg ou plus, dans les aliments composés ou les céréales). Peu de données sur les effets de faibles doses (quelques µg/kg d'aliment) sont disponibles. Différentes études renseignent la toxicité comparée de l'OTA et de l'AFB1, de la toxine T2, de la citrinine ou du DON (Ruff *et al.*, 1992 et 1990 ; Huff *et al.*, 1992a et b ; Glahn *et al.*, 1989; Osborne *et al.*, 1982). Ces études sont généralement conduites avec de fortes doses et n'ont pas pour objectif de documenter les risques d'une exposition conjointe à ces toxines. Les données disponibles concernant les expositions simultanées semblent conclure à des effets synergiques entre OTA et AFB1 (Verma *et al.*, 2004 ; Huff *et al.*, 1984 ; Campbell *et al.*, 1983 ; Huff *et al.*, 1983 ; Huff et Doerr, 1981 ; Warren et Hamilton, 1980), y compris en ce qui concerne leur persistance à l'état résiduel (Micco *et al.*, 1988) ou additifs entre OTA et trichothécènes (déoxynivalénol, toxine T2, diacetoxyscirpenol) ou acide cyclopiazonique ou fumonisine B1 (Kubena *et al.*, 1989 et 1988 et 1994 et 1997 ; Gentles *et al.*, 1999) mais pas entre OTA et citrinine, un antagonisme pouvant même être constaté dans ce cas (Glahn *et al.*, 1988 ; Brown *et al.*, 1986 ; Manning *et al.*, 1985).

Forme aiguë

Les DL50 établies pour l'OTA chez les volailles varient de 3,4 mg/kg p.v. chez les poulets à 16,5 mg/kg p.v. chez les cailles (Prior *et al.*, 1976). Chez les dindes, la DL50 orale est de 5,9 mg/kg p.v. L'OTB et l'OTC seraient environ 15 et 1,5 fois moins toxique que l'OTA (Peckham, 1978). Le poussin de 1 jour serait environ 2 fois plus sensible que le jeune de 3 semaines, aussi bien chez les poulets que les dindes (Peckham, 1978 ; Chang *et al.*, 1981). Les DL 50 seraient environ 20 fois plus basses lors d'administration intrapéritonéale (Chang *et al.*, 1981).

Les formes aiguës de l'intoxication sont rapportées lors d'exposition à des concentrations en OTA variant de 2 à plusieurs dizaines de mg/kg d'aliment. Une diminution de la consommation alimentaire a été constatée chez la dinde mais pas le poulet (Hamilton *et al.*, 1982 ; Burditt *et al.*, 1984). Les animaux sont prostrés, ataxiques avec des tremblements et une diminution des réflexes. La mortalité peut atteindre 55%. A l'autopsie, les reins sont pâles, gonflés et hémorragiques (Hamilton *et al.*, 1982). Le foie est pâle, on peut remarquer une hypertrophie des nœuds lymphatiques et une congestion intestinale. Des hémorragies dans différents tissus, une gastrite et une entérite catarrhales ont également été décrites chez le poulet et le canard (Hamilton *et al.*, 1982 ; Bryden, 1998). A ces doses, l'OTA ne semble pas modifier la spermatogenèse mais augmenterait la mortalité embryonnaire précoce (Prior *et al.*, 1979).

Forme chronique

Les formes chroniques de l'intoxication sont observées lors d'exposition pendant plusieurs semaines à des concentrations en OTA dans l'aliment de 0,3 à 4 mg/kg. Ces concentrations sont relativement élevées, les niveaux toxiques minimum pour les volailles sont voisins de 0,5 mg/kg d'aliment chez les poules pondeuses et les poulets de chair (Huff *et al.*, 1978). Administrée à hauteur de 0,2 mg/kg d'aliment pendant 20 jours, l'OTA n'entraîne pas de lésions macroscopiques et/ou microscopiques des tissus cibles, ni l'apparition de résidus (LD = 0,0005 mg/kg) chez le poulet (Kozaczynski, 1994).

Les principaux symptômes observés sont un retard de croissance et un mauvais indice de conversion alimentaire. Une néphropathie est rapportée dans toutes les espèces exposées à des concentrations supérieures ou égales à 2 mg d'OTA/kg d'aliment (Chang *et al.*, 1981 ; Dwivedi *et al.*, 1984a et c, Kubena *et al.*, 1985, Hamilton *et al.*, 1982). Elle s'accompagne d'une polyuro polydypsie cliniquement révélée par un large volume de fèces humides (Elling *et al.*, 1975). Des signes digestifs tels que l'augmentation du poids du gésier et des problèmes de conformation avec retards de maturité sexuelle sont parfois rapportés (Huff *et al.*, 1988). Chez le poulet, une dépigmentation, peut-être liée à une diminution des teneurs plasmatiques en caroténoïdes (cf. infra) et une diminution de la solidité des os ont été observées, de même qu'une ostéoporose (Hamilton *et al.*, 1982, Dwivedi *et al.*, 1984a ; Huff *et al.*, 1987). Chez les poules pondeuses, on note une diminution de la production d'œufs avec un nombre excessif de taches sur les coquilles d'œufs produits et une diminution de la gravité spécifique des œufs : les coquilles sont minces et molles et les bris de coquilles plus élevés (Page *et al.*, 1980 ; Hollinger et Ekperigin, 1999). Un refus alimentaire ne semble pas être la cause de la chute de ponte (Prior et Sisodia, 1978 ; Bryden, 1998). Un apport supérieur en protéines ou une supplémentation de la ration en phénylalanine diminuent les signes cliniques (Gibson *et al.*, 1989 et 1990).

Ces troubles sont accompagnés de différentes altérations biochimiques et hématologiques. On note une diminution des concentrations sériques en protéines, cholestérol, triglycérides, ammoniacque, calcium, phosphates inorganiques, potassium et caroténoïdes et une augmentation des concentrations en acide urique et en créatinine, accompagnées d'une augmentation de la filtration glomérulaire avec augmentation de la diurèse et diminution de l'osmolarité des urines (Huff et Hamilton, 1975 ; Huff *et al.*, 1975 ; Page *et al.*, 1980 ; Schaeffer *et al.*, 1987 ; Huff *et al.*, 1988 ; Glahn *et al.*, 1988 et 1989 ; Ayed *et al.*, 1991 ; Elissalde *et al.*, 1994 ; Hollinger et Ekperigin, 1999). Une anémie microcytaire et hypochrome est parfois rapportée (Huff *et al.*, 1979a et 1988), de même qu'une altération de la coagulation sanguine (Doerr *et al.*, 1981). Un apport supérieur en protéines ou une supplémentation de la ration en phénylalanine diminuent les signes biochimiques et hématologiques (Bailey *et al.*, 1989 et 1990).

Enfin, une altération des défenses immunitaires est observée. Elle s'accompagne d'une lymphopénie variable, d'une hypoplasie médullaire, d'une lymphopénie sanguine et tissulaire (bourse de Fabricius, thymus, rate, plaques de Peyer), d'une diminution des teneurs en immunoglobulines et des capacités phagocytaires des monocytes et des polynucléaires neutrophiles avec, dans certains cas, une

augmentation de la sensibilité aux infections et infestations (Chang *et al.*, 1979 ; Huff et Russ, 1982 ; Hamilton *et al.*, 1982 ; Singh *et al.*, 1990 ; Elissalde *et al.*, 1994 ; Fukata *et al.*, 1996 ; Hollinger et Ekperigin, 1999 ; Stoev *et al.*, 2000 et 2002 ; Kumar *et al.*, 2003 et 2004).

A l'autopsie, dans les cas les plus sévères, on constate une néphrose sévère, avec accumulation d'urates dans les tubules, les uretères et sur le mésentère. Une atrophie des reins uni ou bilatérale est constatée chez certaines espèces alors qu'une hypertrophie avec œdème ou une absence d'effet est constatée dans d'autres (Huff *et al.*, 1975 ; Page *et al.*, 1980 ; Change *et al.*, 1981 ; Dwidedi *et al.*, 1984c, Ruff *et al.*, 1990 et 1992 ; Huff *et al.*, 1990 et 1992b ; Hollinger et Ekperigin, 1999 ; Kumar *et al.*, 2003 et 2004). Chez certains oiseaux, une légère entérite catarrhale peut être mise en évidence. L'examen microscopique des reins révèle une atrophie et une dégénérescence des tubules proximaux et distaux (Huff *et al.*, 1975 ; Hollinger et Ekperigin, 1999). Le tube contourné proximal est le plus atteint, il présente une distension sévère, un élargissement et une hypertrophie, un épaississement des membranes basales des glomérules avec, dans certains cas, de faibles accumulations de glycogène dans le cytoplasme (Burns et Maxwell, 1987). Le cytoplasme de l'épithélium tubulaire est granuleux avec hyperplasie cellulaires. Au niveau hépatique, on constate une vacuolisation périlobulaire avec une possibilité de dégénérescence et de nécrose focale (Burns et Maxwell, 1987). Le contenu hépatique en glycogène est augmenté, l'OTA inhibant la mobilisation du glucose à partir du glycogène ; en revanche le contenu lipidique demeure inaltéré (Huff *et al.*, 1979b ; Bryden, 1998). L'hépatotoxicité de l'OTA serait plus importante chez la caille que chez les autres espèces (Maxell *et al.*, 1987). Enfin, un élargissement du volume intestinal accompagné d'une plus grande fragilité de la paroi a été décrit (Warren et Hamilton, 1980).

Toxicocinétique et transfert tissulaire

L'absorption orale de l'OTA chez les volailles semble se dérouler comme chez les autres espèces monogastriques, par diffusion passive de la forme non ionisée liposoluble. La biodisponibilité relative semble toutefois inférieure. Elle serait de l'ordre de 40% chez le poulet, et seulement de 6,2 % chez la caille. Le pic de concentration plasmatique est plus précoce et obtenu après 0,33 heures chez le poulet. La demi-vie plasmatique de l'OTA, après administration orale, varie de 4,1 heures pour le poulet à 6,7 heures pour la caille. Cette demi vie est donc très inférieure à celle rapportées dans la plupart des espèces de mammifères (Galtier *et al.*, 1991).

Une fois dans la circulation, l'OTA se fixe aux protéines plasmatiques, sa constante d'affinité (K_a) pour les albumines sériques est de l'ordre de $5,1 \times 10^4$, très proche de la valeur chez l'homme (Galtier *et al.*, 1980). La distribution tissulaire de l'OTA chez le poulet semble plus importante que dans les autres espèces. Les concentrations tissulaires les plus élevées sont observées dans les tissus suivants : reins > foie > muscles, aucun résidu n'étant retrouvé dans les graisses ou dans la peau. Le passage dans les œufs est minime ou nul (Galtier *et al.*, 1991).

Aucune donnée sur le métabolisme de l'OTA chez la volaille n'est disponible.

6.1.3 Les ruminants

Effets sur la santé

Grâce à la présence du rumen situé en amont de l'estomac, les ruminants sont relativement résistants aux intoxications aiguës par l'OTA (voir ci-dessous). Cependant, Llyod (1980) et Llyod et Stahr (1980) ont décrit un cas plutôt exceptionnel dans lequel 63 bovins sont morts à la suite d'une consommation d'aliments fortement contaminés en OTA et en citrinine, ayant entraîné des affections rénales graves des animaux.

Métabolisme de l'OTA dans le rumen

La molécule d'OTA peut être aisément hydrolysée dans le rumen (Hult *et al.*, 1976 ; Müller *et al.*, 2001). Les protozoaires sont majoritairement impliqués dans le processus de dégradation de l'OTA (Kiessling *et al.*, 1984). L'OT α formée au cours des fermentations ruminales est beaucoup moins toxique que l'OTA. On trouve là une explication à la moindre sensibilité des ruminants à l'OTA décrite par Ribelin *et al.* (1978). L'OTA peut également être estérifiée dans le rumen en ochratoxine C sans modification de la toxicité (Galtier et Alvinerie, 1976).

Müller (1995) a estimé que 33 à 72 mg d'OTA peuvent être dégradés chaque jour dans le rumen de vache, ce qui correspond à 3 à 7 mg/j pour un mouton adulte. Selon Höhler *et al.* (1999), des différences notables existent dans la capacité des microorganismes du rumen à dégrader l'OTA, selon

que la toxine est ajoutée pure au milieu ou qu'elle est naturellement présente dans la matrice alimentaire. L'accès des microbes à la toxine est plus difficile dans l'aliment contaminé, et sa dégradation est alors plus faible que s'il est administré sous forme pure.

La nature du régime alimentaire des animaux agit sur la composition qualitative et quantitative de la population microbienne et sur son activité hydrolytique à l'égard de l'OTA. Xiao *et al.* (1991a,b) ont montré que le métabolisme de l'OTA dans le rumen est augmenté lorsque l'on passe d'un régime riche en céréales à un régime à base de fourrages. En effet, les demi-vies respectives de l'OTA et de l'OT α dans le rumen sont 0,63 et 0,9 heures dans le cas d'un régime à base de fourrages, et 2,7 et 1,9 heures dans le cas d'un régime contenant une proportion élevée de concentré énergétique. Les auteurs ont calculé que la biodisponibilité de l'OTA était 4,3 fois plus élevée chez le mouton nourri avec des céréales que chez le mouton recevant des fourrages. A l'opposé, Özpınar *et al.* (2002) ont montré que l'addition d'une quantité d'amidon inférieure à 30% de la ration totale, diminue la demi-vie dans le rumen de l'OTA de 3,7 h à 1,9 heures, alors qu'elle passe à 4,5 h après l'addition de cellulose. Ces différences peuvent être dues au fait que le régime à base de céréales utilisé par Xiao *et al.* (1991a) a conduit à une chute sévère du pH dans le rumen (pH=5,6) entraînant une diminution importante de la population de protozoaires et une dégradation de l'OTA plus faible. En revanche, le régime utilisé par Özpınar *et al.* (2002) a vraisemblablement conduit à un développement de la population de protozoaires favorisant l'hydrolyse de l'OTA (Jouany, 1989). On peut noter que la cinétique de dégradation de l'OTA après le repas évolue comme la concentration des protozoaires dans le rumen, ce qui confirme le rôle primordial de ces composants de l'écosystème microbien ruminal sur la détoxification de l'OTA (Müller *et al.*, 1998 et 2001 ; Kiessling *et al.*, 1984).

Le rumen et sa population microbienne, impliquant principalement les protozoaires, peuvent donc être considérés comme efficaces pour protéger les ruminants contre la toxine OTA. Le rôle des microorganismes du rumen devient évident lorsque l'on considère la différence de LOAEL selon l'OTA distribuée par voie orale (13 mg/kg) ou par voie intraveineuse (1 mg/kg) (Cheeke, 1998).

La toxicité de l'OTA à l'égard des microorganismes du rumen a été étudiée sur la souche *Butyrivibrio fibrisolvens* CE51 (Westlake *et al.*, 1987), cette bactérie étant choisie pour sa contribution considérée comme importante dans le processus de détoxification ruminale des mycotoxines (Mackie et White, 1990). Les résultats montrent que la croissance spécifique de *B. fibrisolvens* n'est pas affectée par l'OTA. L'absence d'effet sur la digestibilité de la ration chez le mouton à la dose de 5 mg/kg prouve que l'OTA n'a pas d'effet délétère sur la population microbienne digestive prise dans sa globalité.

Absorption et excrétion de l'OTA et de l'OT α par les ruminants

Selon Marquadt et Frolisch (1992), l'OTA serait absorbée par les ruminants sous une forme passive de la molécule non-ionisée, l'absorption étant surtout effective à des valeurs faibles de pH, cette observation suggère que l'estomac serait le lieu privilégié de l'absorption d'OTA.

Höhler *et al.*, (1999) ont adapté trois groupes de moutons à recevoir une ration mixte composée de 70% de concentré et de 30% de fourrages contenant 3 niveaux de contamination d'OTA (0, 2 et 5 mg/kg d'aliment). Des concentrations significatives d'OTA et d'OT α ont été détectées dans le sérum sanguin pendant toute la durée de l'expérimentation (10 et 3 ng/ml avec la dose 2 mg/kg ; 80 et 15 ng/ml avec la dose 5 mg/kg). Selon les auteurs, la capacité de l'écosystème microbien à dégrader l'OTA serait limitée pour ces fortes concentrations. Environ 75 % de l'OTA ingéré a été retrouvé sous forme d'OT α dans les excréta (10 % dans les fèces et 65 % dans l'urine), alors que seulement 1 % et 3,8 % de la toxine mère étaient récupérés dans les fèces et l'urine respectivement.

Blank *et al.* (2003) ont exposé des moutons à une gamme de doses d'OTA plus large : 0 ; 9,5 ; 19 ; 28,5 μ g/kg p.v./jour. Les auteurs ont détecté la présence d'OTA dans le sérum des animaux pour toutes les doses testées. La concentration d'OTA dans le sérum (de 1,5 à 18 ng/ml) a augmenté avec la durée d'administration de la toxine, et a été quantitativement corrélée d'une manière linéaire à la dose initiale. La proportion excrétée dans l'urine a été constante, et a représenté 6 à 8 % de la dose. Les faibles quantités d'OT α détectées dans le sérum (0,5 à 1,6 ng/mL) ont augmenté linéairement avec la dose administrée. Ces résultats montrent qu'une exposition à faible dose peut aboutir à une accumulation d'OTA dans le sérum des ruminants.

L'OTA possède la propriété de se lier aux protéines et d'être réabsorbée au niveau des néphrons, ce qui lui permet de se maintenir longtemps dans le sang ou dans les tissus des animaux (Dahlmann *et al.*, 1998). Cependant, l'accumulation d'OTA dans le sang est plus faible chez les ruminants que chez

les autres animaux. Cette observation s'explique à la fois par la dégradation de la toxine dans le rumen et par la faible réabsorption par les néphrons due au pH urinaire plus élevé chez les ruminants puisque ce phénomène est régulé par le pH luminal (Blank *et al.* 2003). Ainsi, la demi-vie plasmatique dans l'organisme animal de l'OTA est beaucoup plus courte chez le ruminant (17,3 h) que chez le singe rhésus (510 h), le porc et le rat (100 h) (Xiao, 1991b ; Kuiper-Goodman et Scott, 1986).

Transfert de l'OTA dans le lait des ruminants

L'expérimentation menée par Shreeve *et al.* (1979) sur un nombre limité d'animaux recevant des doses contrôlées d'OTA avait montré que les laits ne contenaient pas d'OTA détectable (> 100 ng/L). . . En fait le risque existe de retrouver l'OTA et son principal métabolite l'ochratoxine α (OT α) dans le lait des animaux ayant ingéré des aliments contaminés par cette toxine (Breitholtz-Emanuelson *et al.*, 1993 ; Valenta et Goll, 1996).

Mais ce risque est faible : En Norvège, Skaug (1999) a détecté la présence d'OTA (>10 ng/L) dans 11/87 échantillons de lait, avec une concentration maximale de 58 ng/L. Une enquête réalisée en Grande-Bretagne sur 100 échantillons de lait, a montré qu'ils ne contenaient pas de teneur en OTA supérieure à 100 ng/L. Une enquête conduite en France sur 264 échantillons a révélé la présence d'OTA dans 3 échantillons mais à des teneurs inférieures à 10 ng/L (Boudra *et al.*, 2007). Ces enquêtes corroborent les travaux expérimentaux de 1979.

Il semble donc que le transfert très limité de l'OTA dans le lait des ruminants ne conduise pas à un risque de contamination significative de cette production animale.

6.1.4 Animaux de compagnie et de loisirs

Si les animaux de compagnie et de loisirs ne diffèrent pas fondamentalement des autres animaux domestiques quant aux circonstances et aux conséquences du risque lié aux mycotoxines, ils présentent cependant une différence notable : celle de la durabilité de l'action toxique inhérente à leur très longue espérance de vie. Pour ces espèces, c'est tout autant l'impact de consommation de faibles doses sur de très longues périodes avec ses répercussions sur la fonction rénale, la baisse d'immunité ou la sensibilité accrue aux agents infectieux, que le risque ponctuel lié à des contaminations plus massives associées à un tableau clinique plus explicite, qu'il s'avère particulièrement pertinent de connaître.

Les équidés

Aucune donnée n'est disponible quant à la sensibilité éventuelle des équidés face à la consommation d'aliments contaminés par l'OTA.

Les carnivores

Différentes enquêtes épidémiologiques laissent à penser que les carnivores domestiques (chiens et chats) seraient exposés au risque toxicologique lié à la présence d'OTA dans les aliments. Scudamore *et al.* (1997) ont analysé 35 aliments secs pour chiens et 35 aliments secs pour chats disponibles sur le marché britannique afin de rechercher la présence d'OTA (seuil de détection 0,5 μ g/kg). L'OTA n'a été identifiée que dans deux aliments pour chiens (1,1 et 1,3 μ g/kg) et dans deux aliments pour chats (1,2 et 2,3 μ g/kg).

Razzazi-Fazeli *et al.* (2001) ont analysé 26 aliments humides et 17 aliments secs pour chiens et chats : l'OTA a pu être identifiée dans 47% des prélèvements, majoritairement à faibles doses (de 0,1 à 0,8 μ g/kg), deux échantillons seulement présentant des valeurs élevées (3,2 et 13,1 μ g/kg). Par ailleurs, 26 prélèvements de tissu rénal de chats ont été analysés. Seize d'entre eux présentaient des teneurs en OTA comprises entre 0,35 et 1,5 μ g/kg, mais sans que ces valeurs puissent être reliées à quelque signe pathologique que ce soit. Dans le prolongement de cette première étude, Pühringer (cité par Böhm et Razzazi-Fazeli, 2005) a analysé 101 prélèvements de tissu rénal de chats présentant ou non des signes cliniques rénaux. Trente-neuf échantillons présentaient des teneurs en OTA comprises entre 0,11 et 0,30 μ g/kg, et 16 entre 0,31 et 5,18 μ g/kg, mais sans que ces valeurs puissent être reliées à une quelconque pathologie rénale. Parallèlement, cet auteur a analysé 55 aliments pour chats (45 humides et 10 secs). Quatorze (7 aliments humides et 7 aliments secs) présentaient des teneurs comprises entre 0,11 et 2,17 μ g/kg (seuil de détection 0,10 μ g/kg). Il serait intéressant de connaître l'effet à long terme sur les carnivores domestiques des niveaux de contamination les plus élevés.

Deux études expérimentales majeures ont été conduites afin de mesurer l'impact d'un apport continu *per os* d'OTA sur l'organisme de jeunes chiots (Szczech *et al.*, 1973a, 1973b et 1974 ; Kitchen *et al.*,

1977a, 1977b, 1977c). Dans la première étude portant sur 23 chiots âgés de 8 à 9 semaines et répartis en lots de 3 animaux, la dose quotidienne de 0,2 à 0,4 mg/kg p.v. conduit à un tableau clinique dominé par de l'anorexie, des vomissements, du ténésme, une élévation de la température corporelle, un syndrome polyurie-polydipsie, puis une déshydratation, de la prostration avec une évolution mortelle en moins de 2 semaines (Szczzech *et al.*, 1973a). Des apports supérieurs (3 mg/kg p.v.) se sont révélés systématiquement et rapidement mortels avec un tableau clinique similaire évoluant en moins de 4 jours. A l'évidence, les jeunes chiots s'avèrent être une catégorie animale particulièrement sensible à l'OTA. En revanche, la dose de 0,1 mg/kg p.v. a été bien supportée par l'ensemble des animaux. A l'instar des autres espèces, chez le chiot, l'action toxique de l'OTA s'exerce sur l'épithélium tubulaire rénal comme le montrait dans cet essai, la détérioration des paramètres urinaires (faible densité urinaire, protéinurie et glucosurie) sans altération des paramètres plasmatiques. L'examen anatomo-pathologique a montré la présence d'une entérite hémorragique (colon, cæcum et rectum), d'une hypertrophie des nœuds lymphatiques qui étaient œdémateux, hyperémiques et localement nécrotiques ainsi que d'une nécrose et d'une desquamation de l'épithélium du tube contourné proximal (Szczzech *et al.*, 1973b) associée à une altération profonde des membranes basales et du reticulum endoplasmique des cellules de l'épithélium tubulaire (Szczzech *et al.*, 1974).

Dans la seconde étude, réalisée ultérieurement par la même équipe de l'université Purdue (West Lafayette, Indiana), l'action toxique de l'OTA *per os* a été testée séparément ou conjointement à l'administration parentérale de citrinine aux doses respectives de 0,1 ou 0,2 mg/kg pc d'OTA et 5 ou 10 mg/kg pc de citrinine sur des chiots âgés de 10 semaines. Le même tableau clinique que précédemment n'a été retrouvé que pour les chiots recevant l'association d'OTA *per os* et de citrinine en injection intrapéritonéale. Les associations OTA (0,1 mg/kg p.v.) – citrinine (5 mg/kg p.v.) et OTA (0,2 mg/kg p.v.) – citrinine (10 mg/kg p.v.) ont entraîné la mort de 4 à 6 chiots en moins de 2 semaines, alors qu'en l'absence de citrinine, aucun signe notable d'intoxication n'avait été observé. Avec l'association les 6 chiots moururent en 4 ou 15 jours, alors qu'en l'absence de citrinine, aucun signe d'intoxication notable n'avait été observé. La présence de citrinine potentialise l'effet toxique de l'OTA et conduit à une plus grande sévérité des troubles ainsi qu'à une mortalité plus rapide des chiots, ce qui reflète une véritable synergie toxicologique des deux mycotoxines (Kitchen *et al.*, 1977a). L'examen anatomo-pathologique a confirmé les effets délétères de l'OTA : présence d'ulcérations digestives, nécrose des tissus lymphoïdes ainsi que nécrose et desquamation de l'épithélium du tube contourné proximal (Kitchen *et al.*, 1977b) associées à une altération profonde des cellules de l'épithélium tubulaire (Kitchen *et al.*, 1977c). Le tableau nécropsique a également été amplifié par la présence de citrinine.

A la vue de la grande sensibilité de l'espèce canine à l'OTA, il n'est donc plus possible d'écarter l'éventuelle responsabilité d'une contamination même faible des aliments utilisés par les chiots en croissance dans la survenue de troubles de la fonction rénale, surtout lors de contamination fongique multiple. Dans la mesure où la dose de 0,1 mg/kg pc semble bien supportée (ce qui équivaut à environ 1 mg/kg d'aliment) et en prenant une marge de sécurité de 10, il est possible de fixer à 0,1 mg/kg d'aliment la limite maximale tolérable pour les carnivores domestiques.

6.1.5. Les poissons

Aucun cas d'ochratoxicose spontanée chez le poisson n'a été rapporté dans la littérature scientifique. On peut trouver de l'OTA dans les céréales telles que le blé et le maïs qui peuvent être incorporées dans l'aliment des poissons, à des taux variables selon les espèces (type carnivore ou omnivores). Les poissons sont donc potentiellement exposés à une ingestion d'aliments contaminés à l'OTA.

6.2. Calcul de l'exposition animale en France

La méthodologie générale est exposée en annexe 2

6.2.1 Données de contamination

A partir de données de différentes origines (voir détails annexe 1), 1088 valeurs de contamination par l'OTA ont été recueillies, réparties sur 38 types d'aliments. Cependant, de nombreuses valeurs sont inutilisables car effectuées sur des aliments non définis clairement (composition inconnue) tels que aliments complets, compléments, ou des aliments dont l'intitulé n'est pas suffisamment précis :

« fourrages bovins » ou « déshydratés », « autres céréales » ou encore des analyses sur un mélange de produits : « seigle, avoine »

Pour de nombreux aliments, on dispose de moins de 5 valeurs, voire souvent d'une seule analyse, ceux-ci n'ont pas été intégrés dans le calcul de l'exposition.

Au total, une fois ces données retirées, il reste 1042 valeurs de contamination regroupées en 13 types d'aliments.

Tableau 6a : Répartition des valeurs de contamination en OTA par types de matières premières (n>= 5) :

	nombre de données	% < LOD	% > LOQ
blé	302	50.3	8.9
corn feed	31	0.0	3.2
farine basse	12	0.0	16.7
gluten feed de blé	120	0.0	63.3
issues de céréales	22	0.0	72.7
maïs	128	80.5	3.9
orge	239	55.6	6.3
paille de blé	7	0.0	14.3
remoulage	62	0.0	53.2
son	102	0.0	38.2
sorgho	6	0.0	0.0
tourteaux colza	5	0.0	0.0
tourteaux soja	6	0.0	0.0
total	1042	37.0	20.5

Le pourcentage de valeurs non détectées est de 37% tandis que 20.5% des valeurs sont supérieures à la LOQ. Ces données quantifiées serviront pour l'estimation selon le 2^{ème} scénario.

Les estimations moyennes de l'ensemble des données et aux p75 et p95 des valeurs positives sont comparées aux valeurs réglementaires pour les aliments complets (Recommandation 2006/576/CE).

Les statistiques descriptives des niveaux de contamination selon les scénarii indiqués sont fournis en annexes. Ces résultats sont présentés pour les niveaux de contamination en poids frais (12% d'humidité), tel que dans la recommandation.

On constate que les issues de céréales sont les aliments les plus contaminés. Ces issues ne sont pas employées dans les régimes utilisés dans ces estimations mais pourraient l'être dans d'autres régimes alimentaires.

Comme il existe différentes sortes d'issues de céréales, il ne s'agit pas forcément d'issues de meunerie. La contamination du remoulage est supérieure à celle du son, cette mycotoxine paraît plus présente dans les grains.

6.2.2. Calcul de l'exposition

Les calculs de contamination des rations sont les suivants (les tableaux détaillés des résultats sont en annexe II) :

Pour les herbivores, ruminants (notamment bovins)

L'exposition n'a pas été calculée ; en effet, les régimes comportent pour une très large part des matières premières pour lesquelles les données de contamination ne sont pas disponibles ou pas suffisantes : fourrages, pâturages ou encore ensilages de maïs pour ce qui concerne le régime retenu (cf annexe II « Exposition animale : Méthodologie générale »).

Tableau 6b : Calculs de contamination en OTA des rations destinées aux volailles

		Contamination minimale calculée		contamination des positifs			Rec 2006/576/CE Teneurs max (en µg/kg)
		en µg/kg d'aliment	% de la ration	en µg/kg d'aliment au p75	au p95	% de la ration	
Poulet standard	démarrage	0.646	93.3	0.840	2.126	93.3	100
	croissance	0.634	90.2	0.841	2.360	90.2	100
	finition	0.573	81.6	0.778	2.403	81.6	100
	retrait	0.578	84.0	0.798	2.572	84.0	100
Poulet label	démarrage	0.596	96.4	0.791	1.938	96.4	100
	croissance	0.543	96.7	0.759	2.103	96.7	100
	finition-retrait	0.512	92.4	0.723	2.041	92.4	100
Poule pondeuse	démarrage	0.553	89.1	0.757	1.866	89.1	100
	croissance	0.548	89.3	0.784	2.061	89.3	100
	repro-entretien	0.533	87.5	0.774	2.031	87.5	100
	pondeuse	0.528	85.9	0.741	1.852	85.9	100
Dinde	démarrage	0.672	88.0	0.830	1.789	88.0	100
	croissance 1	0.629	81.8	0.796	1.970	81.8	100
	croissance 2	0.640	85.4	0.824	2.152	85.4	100
	finition 1	0.605	86.6	0.799	2.188	86.6	100
	finition 2	0.588	81.5	0.790	2.394	81.5	100
	finition 3	0.571	81.2	0.782	2.489	81.2	100
Pintade	démarrage	0.525	91.1	0.683	1.332	91.1	100
	croissance	0.437	86.3	0.601	1.306	86.3	100
	finition-retrait	0.409	87.4	0.572	1.197	87.4	100
Canard Barbarie	canard démarrage	0.599	92.1	0.819	2.404	92.1	100
	canard croissance	0.582	93.2	0.821	2.620	93.2	100
	canard finition	0.549	89.3	0.793	2.715	89.3	100
Canard prêt à gaver	élevage	0.557	95.0	0.775	2.193	95.0	100
	gavage	0.281	98.0	0.490	1.274	98.0	100

La part de la ration (exprimée en pourcentage) susceptible d'être contaminée par l'OTA utilisée dans le calcul d'exposition varie selon les scénarii :

- dans le cas de la contamination minimale calculée, elle correspond aux matières premières pour lesquelles on a des données (même si elles sont ND)
- dans le cas des scénarii contamination aux p75 et p95 des teneurs positives, elle correspond aux matières premières pour lesquelles les teneurs sont supérieures à la LOD.

L'estimation au 95ème percentile est 3 à 5 fois plus importante que l'estimation moyenne. D'une manière générale, les niveaux de contamination calculés sont très inférieurs aux teneurs maximales de la réglementation ; la part de la ration susceptible d'être contaminée par l'OTA utilisée dans cette estimation étant relativement importante (minimum 81%).

Ces estimations permettent d'indiquer un ordre de grandeur, et les niveaux de contamination sont largement inférieurs à la réglementation européenne. On observe au minimum un facteur 40 et au maximum un facteur 200 entre la teneur issue de la recommandation et la plus haute teneur calculée.

Pour les porcs (Tableau 6c)

Tableau 6c : Calculs de contamination en OTA des rations destinées aux porcs

Porcins	contamination minimale calculée		contamination des positifs			Rec 2006/576/CE Teneurs max (en µg/kg)
	en µg/kg d'aliment	% de la ration	au p75 en µg/kg d'aliment	au p95 en µg/kg d'aliment	% de la ration	
1 ^{er} âge	0.316	64.0	0.465	1.357	64.0	50
2ème âge	0.554	87.5	0.688	2.165	87.5	50
croissance CORPEN	0.474	75.8	0.569	1.711	75.8	50
finition CORPEN	0.509	77.5	0.614	1.785	77.5	50
truies gestantes	0.391	70.9	0.481	1.554	70.9	50
truies allaitantes	0.549	76.0	0.596	1.733	76.0	50

Compte-tenu de la nature de l'alimentation destinée aux porcs, un plus faible pourcentage de la ration est pris en compte ici (minimum 64%).

La contamination au p95 est 3 à 4 fois plus importante que la contamination minimale calculée.

Comme pour les volailles, les niveaux de contamination sont largement inférieurs à la réglementation européenne. L'ordre de grandeur fourni par ces estimations montre que l'écart avec la teneur limite de 50 µg/kg pour un aliment complet est important (au minimum 100 fois moindre).

7. Réglementation

Pour l'alimentation humaine, dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, les teneurs maximales ont été fixées pour l'OTA (tableau 7a).

Pour l'alimentation animale, aucune teneur maximale en OTA n'est encore fixée dans les aliments pour animaux. Cependant, la Commission recommande⁶ d'appliquer des teneurs maximales en OTA dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation animale (tableau 7b).

Tableau 7a : Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires destinées à l'Homme, exprimées en µg/kg

Matrice	Teneur maximale en µg/kg
Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin)	5
Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation directe)	3
Préparation à base de céréales pour enfants en bas âge et aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	0,5
Raisins secs (Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10
Grains de café torréfié et café torréfié moulu	5
Café soluble (instantané)	10
Vin (rouge, blanc et rosé et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins)	2
Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué	2

⁶ Recommandation 2006/576/CE de la Commission du 17 août 2006 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.

Tableau 7b : Teneurs maximales recommandées en ochratoxine A pour les produits destinés à l'alimentation animale, selon la recommandation 2006/576/CE

Matrice	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la compositions des aliments pour animaux : céréales, produits et sous produits de céréales et fourrages	250
Aliments complémentaires et complets pour :	
- les porcs	50
- les volailles	100

Il convient de différencier dans cette recommandation, les teneurs maximales dans les matières premières des teneurs maximales dans l'aliment complet : des teneurs de 250 µg/kg dans les matières premières pour une contamination globale de la ration 2,5 à 5 fois plus faible.

8. Surveillance et contrôle

Dans le cadre 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-), l'OTA a été recherchée dans de nombreux aliments prêts à consommer et matières premières importées ou non. Dans les cas de non-conformité, les actions correctives sont entreprises telles qu'interdiction de mise le marché, retrait du marché, saisie. Bien que les denrées prélevées au sein des catégories d'aliments réglementées ou non soient de nature et d'origine variables selon les années, il peut néanmoins être dégagé les grandes tendances suivantes :

Concernant les produits céréaliers (semoules et farines de blé, de maïs, pains, biscottes, biscuits, riz, céréales pour petit déjeuner, aliments pour bébés) parmi les 80-100 d'échantillons analysés annuellement, aucune non conformité n'a été relevée avec des teneurs inférieures à la réglementation (voir limites maximales indiquées au § précédent).

En ce qui concerne les autres catégories d'aliments réglementées, font l'objet de plans de contrôle : les vins et jus de raisin, les raisins secs, et le café : parmi les 80-100 prélèvements effectués annuellement, aucune non conformité n'est relevée à l'exception d'un échantillon de raisin sec en 2005. Enfin, lors d'une enquête menée, la contamination moyenne du vin est de 0,15 µg/L. Seulement 1% des 1090 échantillons analysés dépassent la limite réglementaire de 2 µg/L, avec une teneur maximale de 6,2 µg/L.

Certaines catégories de denrées bien que non réglementées, font l'objet d'une surveillance et d'un suivi sur plusieurs années. Sont concernées : les bières, les épices (piments doux et forts, poivre, muscade...), et les figues. Aucune teneur supérieure à 0,1 µg/kg n'a été identifiée dans les bières (trentaine d'échantillons). Par contre, des teneurs supérieures à 10 µg/kg ont été relevées dans certaines épices en 2006 et 2007 (piments doux) et dans les figues en 2005, 2006 et 2007 dans une proportion de 5-10%.

Pour les produits d'origine animale, la teneur moyenne en OTA dans les rognons de porcs est de 0,18 µg/kg, avec 90 % des échantillons non quantifiables (LOQ = 0,1 à 0,5 µg/kg).

La contamination des céréales brutes (maïs, blé et orge) est faible : sur 646 échantillons des plans de surveillance réalisés entre 2003 et 2006, 95% des échantillons ont une teneur inférieure à la limite de quantification (LOQ = 0,5 µg/kg), et 0,5% des échantillons dépassent la limite réglementaire (5 µg/kg).

9. Conclusion - Recommandations

L'OTA est une mycotoxine qui présente des effets néphrotoxiques démontrés chez l'animal et suspectés chez l'homme. En 2006, la DHT a été revue à la hausse à 120 ng/kg p.c./sem par l'EFSA. Cette réévaluation se fonde notamment sur la démonstration de l'absence de génotoxicité directe de l'OTA.

Des techniques analytiques plus sensibles sont à développer de façon à affiner les estimations d'exposition du consommateur, pour deux raisons majeures. D'une part, le nombre de données de contamination par l'OTA des denrées alimentaires inférieures à la limite de détection est important et la méthode de calcul conduit vraisemblablement à une surestimation de l'exposition du fait de la multiplicité des denrées susceptibles d'être contaminées.

Les farines de seigle et de sarrasin apparaissent les plus contaminées ; aussi conviendrait-il de renforcer les plans de surveillance et de contrôle de l'OTA dans ces produits.

Les données de contamination reliées à la consommation montrent que les forts consommateurs français sont exposés à 3,5 ng/kg p.c./j (20% de la DJT) pour les adultes et à 7,8 ng/kg p.c./j (45% de la DJT) pour les enfants. Cependant, il est à souligner que les calculs d'exposition ne prennent pas en compte les nourrissons, et de ce fait que des données supplémentaires seraient nécessaires afin d'évaluer les taux d'exposition de cette population de consommateurs avec prise en compte de leurs préférences alimentaires.

Des interrogations subsistent quant à l'origine et la signification toxicologique de la présence d'OTA à faible concentration dans le sang humain et dans le lait maternel. Des études complémentaires associant les données d'exposition et la présence de cette toxine dans les liquides biologiques humains, sont nécessaires pour éclairer cet aspect afin de mieux estimer le risque pour l'homme.

Références bibliographiques : voir document spécifique

chapitre 3 Les trichothécènes

Coordination : Dominique Parent Massin et Bernard Marie Paragon

Introduction

Les moisissures productrices de trichothécènes sont du genre *Fusarium* et contaminent principalement les céréales (blé, maïs, orge, sarrasin, seigle, millet, avoine, riz), mais également les fruits (bananes).

Certaines conditions de température et d'humidité ainsi que le rapport oxygène/dioxyde de carbone de l'atmosphère leur sont favorables (Betina, 1989) ; elles sont capables de résister à des climats rigoureux ; leur développement et la production de toxines sont même fortement stimulés par les épisodes de refroidissement (Cisti *et al.*, 1983), et neutralisés par l'acidité (par exemple dans le cas des ensilages). Les contaminations peuvent survenir en cours de culture ou lors des récoltes, mais aussi lors d'un stockage des céréales en conditions humides, avant séchage des grains.

Des contaminations par des *Fusarium* ont été rapportées dans toutes les régions du monde, principalement dans les régions à climat tempéré d'Amérique du Nord, d'Europe et d'Asie où tous les pays semblent affectés, aucune région ni aucun type de culture céréalière ne semblant épargnés.

Les teneurs les plus élevées retrouvées dans les céréales sont de l'ordre de quelques mg/kg, les valeurs maximales ayant été détectés en Chine (14 mg/kg de blé). Dans les denrées alimentaires à base de céréales, les teneurs sont généralement inférieures au mg/kg.

Pour mémoire, des trichothécènes (T-2, DAS, roridine A et T-2 tétraol) ont été détectés dans des poussières de systèmes de ventilation au Canada (Smoragiewicz *et al.*, 1993). Par ailleurs, leur usage dans les armes chimiques en Iran, Afghanistan et dans le Sud-Est asiatique a été suspecté (pluies jaunes ou "Yellow rain"), comme l'atteste la présence de trichothécènes dans les urines et de sang de soldats iraniens exposés à ces pluies. Aucune confirmation n'a cependant été apportée (Rosen et Rosen, 1982 ; Heyndrickx et Heyndrickx, 1984 ; Heyndrickx *et al.*, 1984 ; Schiefer et Sutherland, 1984).

1. Propriétés physiques et chimiques des trichothécènes

1.1 Structure générale

Les trichothécènes (TCT) appartiennent au groupe des sesquiterpénoïdes qui possèdent un squelette tricyclique (appelé trichothécane) formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons oxygénés et quatre groupements méthyles (figure 1). Tous les trichothécènes naturels possèdent une double liaison (ou pont olefinique) en C9,10 ainsi qu'un groupement époxy en C12,13 caractéristique des 12,13 époxy-trichothécènes (Ueno *et al.*, 1985 ; Vidal *et al.*, 1985).

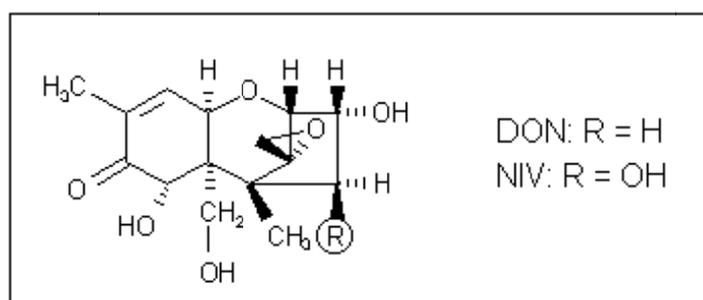


Figure 1 : Structure moléculaire de deux TCT : NivalénoI (NIV) et DéOxyNivalénoI (DON)

Ueno (1977) a proposé une classification des trichothécènes en 4 groupes :

- Groupe A : constitué par les trichothécènes dépourvus de fonction cétone en C8 ; la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS) en font partie
- Groupe B : constitué par les trichothécènes possédant une fonction cétone en C8 ; le nivalénol, le déoxynivalénol (DON) et la fusarénone-X en font partie.
- Groupe C : constitué par les trichothécènes possédant un époxyde supplémentaire entre C7 et C8 comme la crotocine.
- Groupe D : constitué par les trichothécènes possédant un macrocycle entre C4 et C15 ; les verrucarines, les roridines et les satratoxines en font partie.

Les trichothécènes des groupes A et B sont les plus fréquemment retrouvés dans les denrées alimentaires. L'exposition aux TCT des groupes C et D est plus fréquente par voies cutanée et respiratoire et ne seront donc pas traités dans ce chapitre (le cas des satratoxines sera toutefois abordé dans le chapitre 7 « autres mycotoxines »)

1.2 Propriétés communes

Les trichothécènes se présentent en général sous la forme de poudres incolores, cristallisables (Ueno, 1980 ; IPCS, 1990). Leur poids moléculaire varie de 154 à 697 daltons, pour la plupart entre 300 et 600 daltons. Ils sont optiquement actifs (lévogyres ou dextrogyres) et n'absorbent pas les radiations ultraviolettes ou visibles, excepté les trichothécènes macrocycliques qui présentent des doubles liaisons conjuguées et absorbent à 260 nm (groupe D) (IPCS, 1990).

Le spectre infrarouge est caractérisé par la présence de bandes d'absorption : à $1\,720\text{ cm}^{-1}$ et $1\,259\text{ cm}^{-1}$, correspondant à la vibration de valence des C = O et C – O des groupes acétyles ; à $1\,580\text{ cm}^{-1}$ et 825 cm^{-1} , dues à la présence d'une double liaison bi substituée en 9-10 ; à $3\,400\text{ cm}^{-1}$ et à $3\,480\text{ cm}^{-1}$, dues à la présence des groupements hydroxyles.

Les trichothécènes sont des composés neutres d'un point de vue acido-basique. Ils sont généralement solubles dans les solvants modérément polaires tels que les alcools, les solvants chlorés, l'acétate d'éthyle ou l'éther éthylique et parfois quelques uns étant légèrement solubles dans l'eau (Ueno, 1980). Les dérivés alcooliques ont une solubilité dans l'eau supérieure à celle des dérivés estérifiés (nivalénol et diacétylnivalénol) et sont difficilement cristallifiables (Ueno, 1980).

Le noyau trichothécane résiste à un traitement par les alcalis concentrés. L'ouverture du cycle 12-13 époxyde conduit à la formation de dérivés totalement inactifs.

1.3 Trichothécènes du groupe A

La toxine T-2 (12,13-époxytrichothéc-9-ène-3,4,8,15-tétraol, 4,15-diacétate 8-isovalérate ; formule brute $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_9$) est également connue sous le nom de fusariotoxine T2, 8-isovalérate, isariotoxine ou mycotoxine T-2 (Figure 1). Le poids moléculaire est de 466,50 g/mol. Le point de fusion est de 151-152°C. Elle est soluble dans les solvants organiques polaires comme l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle ou le dichlorométhane.

Elle est stable, au moins 24 mois, dans l'acétate d'éthyle quelles que soient les conditions de stockage, de -18°C à $+40^\circ\text{C}$ (Widestrand, 2001).

La toxine HT-2 (12,13-époxytrichothéc-9-ène-3,4,8,15-tétraol, 15-acétate 8-isovalérate ; formule brute $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_8$) a un poids moléculaire de 424,5 g/mol. Le pic d'absorption en UV est le même que celui de la toxine T-2 (218 nm). Le cristal est soluble dans les solvants organiques polaires.

Elle est également stable au moins 24 mois dans l'éthyle acétate, quelles que soient les conditions de stockage, de -18°C à $+40^\circ\text{C}$ (Widestrand, 2001).

Le diacétoxyscirpénol (DAS) (12,13-époxytrichothéc-9-ène-4, 15-diacétoxy-3hydroxyle ; formule brute est $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_7$) est également connue sous le nom de l'anguidine, trichothéc-9-ène (Figure 1).. Le poids moléculaire est de 366,41 g/mol. Le diacétoxyscirpénol est incolore, cristallisable et soluble dans les solvants polaires. Il est très peu soluble dans l'eau. Il est chimiquement stable et résiste bien à la cuisson des aliments (Vidal, 1990).

1.4.2 *Trichothécènes du groupe B*

Le déoxynivalénol (DON) (trichothec-9-en-8-one,12,13-epoxy-3,7,15-trihydroxy- ; formule brute $C_{15}H_{20}O_6$) est également connu sous le nom de dehydronivalénol , 4-deoxynivalénol , 12,13-epoxy-3,7,15-trihydroxy-9-trichothecen-8-one, Rd toxin, spiro[2,5-methano-1-benzoxepin-10,2'-oxirane]trichothec-9-en-8-one dérivé ou encore vomitoxine (Figure 1). Le poids moléculaire est de 296,36 g/mol. Il est cristallisable, le point de fusion est de 151 - 153° C, et le pic d'absorption aux UV est de 218 nm.

Le DON est soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'eau et le chloroforme. Il est stable dans l'acétate d'éthyle pendant 24 mois à -18° C mais se décompose significativement après 24 mois à 4° C et après 12 mois à 25° C.

Le nivalénol (trichothec--9-en-8-one, 12, 13-epoxy-3, 4, 7, 15-tetrahydroxy ; formule brute $C_{15}H_{20}O_7$; Figure 1). Le poids moléculaire est de 312,32 g/mol. Il est cristallisable, le point de fusion est de 222 - 223° C, le pic d'absorption au UV est de 218 nm.

Le nivalénol est soluble dans les solvants organiques polaires comme le méthanol, l'éthanol, l'éthyle d'acétate et le chloroforme. Il est en revanche faiblement soluble dans l'eau. Comme le DON, le nivalénol est stable dans l'acétate d'éthyle pendant 24 mois à - 18° C, mais se décompose significativement après 24 mois à 4° C et après 12 mois à 25° C (Widestrand, 2001).

La fusarénone X (12,13-epoxy-3,4,7,15-tetrahydroxytrichothec-9-en-8-one-4-acetate ; La formule brute est $C_{17}H_{22}O_8$; Figure 1) est aussi connue sous le nom de fusarenon, fusarenon X, nivalénol monoacétate, nivalenol 4-O-acétate, 3,7,15-trihydroxy-4-acetoxy-8-oxo-12-13-epoxy-9-trichothecene. . Le poids moléculaire est de 338 g/mol. La fusarénone X est cristallisable, le point de fusion est de 91-92° C.

La fusarénone X est soluble dans le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'eau et le chloroforme mais insoluble dans le n-hexane et le n-pentane. La fusarénone X est généralement stable mais peut être hydrolysée en nivalénol par des bases.

2 Méthodes d'analyse (voir principes généraux en Annexe 1)

Bien qu'il existe des méthodes validées en intra-laboratoire, rares sont les méthodes officielles et/ou normalisées et/ou validées en inter laboratoires de détermination des toxines T-2 et HT-2. Les quelques études inter-laboratoires disponibles montrent le besoin d'améliorations techniques tant en ce qui concerne les taux de récupération lors de l'extraction que la précision et l'exactitude des mesures. La disponibilité de matériaux de référence (matrices avec contamination certifiée) et la mise en œuvre d'études collaboratives sont aujourd'hui prioritaires.

Des méthodes validées et reconnues sont disponibles pour le déoxynivalénol (DON), en particulier pour les céréales et l'alimentation du bétail. Comme la stratégie analytique applicable aux trichothécènes A diffère sensiblement de celle suivie pour les toxines du groupe B, les deux familles ont été traitées séparément dans la suite du document.

2.1 *Trichothécènes de type A*

L'extraction de matrices solides telles que les grains ou les aliments est généralement réalisée par des mélanges binaires associant eau et acétonitrile (ou méthanol) ou encore le chloroforme et l'éthanol ou plus simplement le méthanol seul.

La purification est conduite sur des cartouches SPE reposant sur le principe de la phase normale en particulier du type silice, florisil, cyano, ou encore en phase inverse (C18). Les colonnes multifonctionnelles, associant plusieurs types de phase sont de plus en plus fréquemment utilisées.

Les immuno-essais sont utilisées en routine pour le dépistage de T-2 et HT-2 dans les céréales, avec des , comprises entre 0,2 et 50 ng/g pour T-2.

Divers types de méthodes d'analyse peuvent être appliquées pour analyser les trichothécènes, mais comme les molécules du groupe A ne peuvent être suivies par HPLC-UV du fait de l'absence de groupe cétonique en position C-8, la CPG est généralement utilisée pour cette famille. La dérivation de ces molécules par silylation ou fluoroacylation apparaît nécessaire pour améliorer la sensibilité. La détection peut être assurée par détecteur à capture d'électrons (ECD) lorsque des halogènes ont été préalablement introduits par perfluoroacylation sur la molécule, ou par

spectrométrie de masse. Dans les céréales, les limites de quantification l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour T-2 et HT-2 pour la CPG-ECD, et de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$ pour la CLHP-SDM ..

2.2 Trichothécènes de type B

L'étape d'extraction des trichothécènes de type B est réalisée par technique solide-liquide au moyen de mélanges associant acétonitrile et eau, ou chloroforme/méthanol. L'extraction par fluide supercritique (SFE) qui peut être aussi utilisée pour extraire le DON (Krska *et al.*, 2001), est très efficace sur matrice solide, ; elle permet en outre de combiner en une seule étape, extraction et purification, en couplant en ligne une cartouche de silice greffée ou non, qui retient spécifiquement les analytes cibles.

L'étape de purification des trichothécènes de type B s'effectue au moyen de colonnes à remplissage mixte de type charbon/alumine/célite ou encore de colonnes multifonctionnelles spécifiquement dédiées à la purification du DON.

Les méthodes de séparation basées sur la chromatographie couche mince (CCM) restent encore communément utilisées pour le dépistage en particulier dans les pays ne disposant pas de chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou de chromatographie liquide haute performance (CLHP) indiscutablement plus performantes. La visualisation du DON en CCM requiert l'utilisation de révélateurs tels que l'acide sulfurique, le para-anisaldéhyde ou encore le chlorure d'aluminium. Les limites de détection sont comprises entre 20 et 300 $\mu\text{g/kg}$.

Les tests ELISA permettent l'obtention rapide d'un résultat semi-quantitatif mais pas spécifique puisque donnant une réponse globale caractéristique de l'ensemble des trichothécènes de type B. Ces tests permettent néanmoins la mise en évidence de concentrations inférieures au $\mu\text{g/kg}$ sur des extraits d'échantillon ayant subi une réaction d'acylation . Des approches sans dérivation préalable ont une moindre sensibilité (20 à 300 $\mu\text{g/kg}$).

La CPG couplée à un détecteur à capture d'électrons, à un spectromètre de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS), est régulièrement utilisée sur des analytes préalablement dérivatisés, généralement par triméthylsilylation ou perfluoroacylation. La première technique implique, outre l'usage d'un agent de silylation classique, l'adjonction d'un catalyseur (type triméthylchlorosilane ou triméthylsilylimidazole), qui améliore le rendement de la réaction en permettant le greffage de TMS y compris des positions encombrées de la structure chimique. Le produit de la réaction est alors unique, ce qui constitue un avantage pour la quantification. La fluoroacylation par des anhydrides d'acides perfluorés (TFAA, PFPA ou HFBA) permet d'abaisser considérablement les limites de détection de la mesure par ECD ou SDM (ionisation chimique négative).

L'approche par CPG, qui s'avère suffisamment sensible eu égard aux concentrations généralement rencontrées dans les céréales, donne cependant des réponses quantitatives variables pour le DON, le NIV, mais aussi l'HT-2 et la T-2. En effet, les résultats d'études collaboratives entre 21 laboratoires européens ciblant les quatre principaux trichothécènes selon une méthode officielle AOAC (référence 986.18) ont révélé des coefficients de variation inter-laboratoires de l'ordre de 50 % pour des niveaux de contamination compris entre 350 $\mu\text{g/kg}$ et 750 $\mu\text{g/kg}$. Les problèmes analytiques concernent entre autres les sources de molécules de référence (différentes selon les laboratoires), la non linéarité des courbes de calibration (liée à la non adéquation des étalons internes), la présence d'interférences matricielles (causées par une spécificité insuffisante de la méthode de purification). Ces observations plutôt décevantes conduisent les analystes recourir davantage à l'approche par CLHP-SDM.

Le couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse, avec en particulier l'introduction des techniques d'ionisation à pression atmosphérique, s'impose progressivement. La séparation des analytes en phase inverse sur phase stationnaire type C18 et phase mobile méthanol-eau ou acétonitrile-eau apparaît parfaitement compatible avec cette approche. Si la SDM n'est pas utilisée en détection, une méthode de purification multi-étapes doit être développée pour compenser la non spécificité de la mesure ; c'est le cas notamment des approches UV/DAD ou fluorimétriques. Parmi les techniques évoquées ci-dessus, le couplage GC-MS est le plus sensible pour détecter le DON dans les céréales, si l'analyte est fluoro-acylé (ordre du $\mu\text{g/kg}$).

3 Facteurs influençant la teneur en trichothécènes dans les denrées

Les conditions de développement des *Fusarium* sur des céréales et des aliments et de production de mycotoxines sont complexes, et sont encore incomplètement comprises d'autant que ce ne sont pas toujours les mêmes qui agissent sur la croissance des champignons et sur la production de mycotoxines.

Selon les souches de *Fusarium*, le développement fongique est indépendant de la production de fusariotoxines : les unes sont génétiquement incapables de produire des trichothécènes, les autres le sont mais les produisent en fonction des conditions du milieu telles que la température ou l'humidité.

Parmi les trichothécènes du groupe A :

La toxine T-2 a été isolée pour la première fois en 1968 à partir de *Fusarium tricinctum*, puis a été détectée sur de nombreuses céréales (blé, maïs, avoine, orge, riz, fèves, soja...). Elle est produite par de nombreuses espèces de *Fusarium*, en particulier *Fusarium sporotrichioides* et *Fusarium langsethiae* (Thrane *et al.*, 2004).

La toxine HT-2 est produite par de nombreuses espèces de *Fusarium*, en particulier *Fusarium langsethiae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. solani*, *F. equiseti* (Thrane *et al.*, 2004), la plus fréquente étant *F. sporotrichioides*. Cette moisissure se développe entre -2 °C et +35 °C, dans des milieux à haute activité en eau. (très humides).

Le diacétoxyscirpénol (DAS) est produit par différentes souches appartenant aux espèces de *Fusarium* dont les principales sont *F. graminearum* et *F. roseum* (Jimenez, 2000) mais aussi *Fusarium langsethiae* (Thrane *et al.*, 2004).

Parmi les trichothécènes du groupe B :

Le DON est l'un des trichothécènes les plus répandus dans le monde. Il est principalement produit par *Fusarium graminearum* et par *Fusarium culmorum* qui se développent principalement dans les pays tempérés. La température optimale de développement de *F. graminearum* est légèrement supérieure à celle de *F. culmorum* : 25-27°C versus 22-25°C (Doohan *et al.*, 2003). Ces moisissures nécessitent des humidités relatives (A_w) élevées caractéristiques de la phase de production au champ plus que de celle du stockage.

La fusarénone X est principalement produite par *Fusarium crookwellense* et certaines souches de *Fusarium graminearum*, mais elle peut aussi être produite par d'autres *Fusarium* (*F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*) (Ueno *et al.*, 1975). On retrouve peu de fusarénone X en Europe, notamment en France.

3.1 Facteurs liés au développement fongique au champ

Le premier facteur de risque de production de fusariotoxines, notamment de DON dans le blé tendre (*Triticum aestivum*) et les céréales, est la pluie au moment de la floraison, voire dans les semaines qui suivent la floraison. La toxine T2 se retrouve principalement sur des céréales ayant reçues de la pluie et moissonnées en période froide.

D'autres facteurs dits secondaires peuvent influencer sur cette production de mycotoxines, modulant l'effet du facteur climatique : parmi les facteurs secondaires modulant l'effet de la pluie au moment de la floraison figurent la sensibilité à la fusariose de la variété de blé ainsi que la relation entre variétés et teneurs en trichothécènes (encore mal connues).

La présence dans le sol de reliquats de la récolte précédente contaminés (tiges, feuilles, ...) et le potentiel de survie des *Fusarium* peuvent être à l'origine de la contamination des cultures de rotation (Obst *et al.* 1997). Le risque de fusariose est plus grand pour un blé cultivé après un maïs que pour un blé succédant à blé (Yi *et al.*, 2002).

La qualité du "travail du sol" et la profondeur d'enfouissement des reliquats de la culture précédente influe également sur la survie des *Fusarium* d'une saison à l'autre. La survie est maximale en l'absence de travail du sol et réduite en cas de labour et ce d'autant plus que l'enfouissement est profond (Yi *et al.* 2002).

De plus, la rotation des cultures et travail du sol peuvent interagir comme démontré par Obst *et al.* (2000) : la teneur en DON du blé était plus élevée si la culture précédente était un maïs grain et si aucun labour n'avait été effectué. Par contre, le risque lié à la présence de reliquats contaminés de la

récolte précédente ne se retrouve pas avec une rotation de blé sur blé, du fait de la taille des particules de pailles, d'épillets et de glumes qui ne favorisent pas la survie fongique.

Le traitement phytosanitaire peuvent également moduler la teneur en DON du blé, notamment ceux à base de triazoles et de strobilurines dont les effets protecteurs sont variables voire même contraires : les triazoles réduisent le développement des *Fusarium* et font chuter la teneur en DON, alors que les strobilurines réduisent le développement de *Microdochium nivale* (donnant des symptômes de fusariose, mais sans production de toxines au champ). Au contraire, la strobilurine favoriserait le développement des *Fusarium* (et donc la production de DON) d'une part, en supprimant leurs compétiteurs (Simpson *et al.*, 2001) et d'autre part, par un effet de stress sur les *Fusarium* (Magan *et al.*, 2004). Comme la fusariose du champ provoquée par *Microdochium* se distingue visuellement mal d'une fusariose provoquée par *Fusarium*, il importe donc de traiter avec un mélange triazole-strobilurine. Ce traitement doit être appliqué le plus rapidement possible après apparition des risques ou des symptômes. Malgré ces précautions, l'efficacité du traitement n'est jamais totale (diminuant au mieux de moitié la progression de la fusariose et la teneur en DON) et d'autant plus réduite que les autres facteurs de risque subsistent (Nicholson *et al.*, 2004).

Enfin, d'autres facteurs sont parfois évoqués tels que la fertilisation azotée (Yi *et al.*, 2002), mais les données sont contradictoires..

Les facteurs de variation des autres fusariotoxines du blé tendre au champ sont mal connus du fait des teneurs faibles en ces mycotoxines.

Les facteurs de variation de la teneur en trichothécènes du maïs sont moins bien connus que ceux du blé et semblent plus complexes, probablement parce que le grain de maïs sur pied conserve longtemps un taux d'humidité élevée (supérieur à 20%), favorable au développement des *Fusarium* et à la production de mycotoxines. La date de récolte est un facteur de risque spécifique au maïs par rapport aux céréales à paille : plus la récolte est effectuée tardivement et plus la teneur en fusariotoxines peut être élevée (Reyneri et Blandino, 2003).

Cependant, ces facteurs de variation de la teneur en trichothécènes au champ semblent identiques à ceux cités précédemment pour le blé tendre (pluie à la floraison, reliquats de culture précédente, résistance variétale). La protection phytosanitaire contre les vrais *Fusarium* est inefficace et par ailleurs difficile à mettre en œuvre en raison de la hauteur des tiges. Le maïs n'est pas concerné par le *Microdochium nivale*.

Pour les autres céréales à paille cultivées en France, les facteurs de risque de production des trichothécènes au champ sembleraient identiques à ceux considérés pour le blé. Pour le sorgho, ces facteurs de risque seraient comparables à ceux décrits pour le maïs. Mais cela reste au stade de suppositions, faute de données suffisantes pour ces deux cas.

En conclusion, la connaissance des facteurs influençant le développement des *Fusarium* et la production de leurs toxines au champ est déterminante dans la lutte préventive contre la contamination des céréales. Les différents facteurs influençant la teneur en trichothécènes des céréales et notamment de céréales à paille agissent variablement selon qu'ils sont associés ou non avec d'autres facteurs dits « secondaires » et ils doivent donc être considérés surtout comme des facteurs de risque et non comme des facteurs étiologiques. L'étude de ces facteurs de risque, pris individuellement et en association, a donné lieu à la construction de modèles probabilistes permettant de prédire l'importance de la contamination des céréales à paille (Barrier-Guillot *et al.*, 2004) et de renseigner sur la hiérarchie des facteurs à prendre en considération pour maîtriser la contamination en fusariotoxines.

3.2 Facteurs liés au développement fongique au cours du stockage

Lors du stockage, l'humidité des lots de céréales est en général trop faible pour conduire au développement des *Fusarium* et à la production de trichothécènes, à l'exception du maïs en cribs, installation propice à la persistance d'une forte humidité.

En ce qui concerne le maïs et le sorgho qui doivent être séchés, la contamination en fusariotoxines dépend aussi des conditions de pré-stockage, comme par exemple la durée d'attente entre la récolte et le séchage.

3.3 Impact des procédés technologiques sur la teneur en trichothécènes

Le nettoyage des grains par tri-séparation ou sur table densimétrique représente le premier procédé susceptible de réduire la teneur en trichothécènes, qui devrait être appliqué par les industries céréalières, avant ou après le stockage. Cette opération consiste à séparer les grains nettoyés des "issues de nettoyage" qui contiennent des graines étrangères à l'espèce céréalière du lot, des petits grains et des grains cassés de cette espèce, ainsi que des fragments de tige, glumes et glumelles. Sachant qu'un lot de grains contaminés par des *Fusarium* comporte davantage de grains petits, légers et cassés qu'un lot de grains sains, les issues peuvent présenter des niveaux de contamination élevés en fusariotoxines.

Pour une teneur en DON de 100 mg/kg dans des grains de blé nettoyés, la teneur des grains avant nettoyage varie de 110 à 120 mg/kg et celle des issues de nettoyage de 361 à 560 mg/kg (Scott *et al.* 1983, 1984 ; Young *et al.*, 1984 ; Seitz *et al.*, 1985) . Une observation similaire a été faite sur le maïs (Bennett *et al.*, 1976).

Les poussières générées lors des opérations de travail des grains sont fréquemment mélangées aux issues de nettoyage des grains. Ces poussières sont généralement fortement contaminées par les spores des champignons et par les mycotoxines.

Pour ce qui concerne les procédés de meunerie, des travaux ont été menés sur les différentes fractions de blé contaminé par le DON. Par rapport à une teneur en DON des blés nettoyés de 100 mg/kg, les teneurs relatives en DON des sons, des issues (comprenant les remoulages) et des farines sont respectivement de 103 à 270 mg/kg, de 142 à 225 mg/kg et de 15 à 99 mg/kg. Ces plages de variation peuvent s'expliquer par l'importance, variable selon les essais, de la contamination par les *Fusarium* (pénétration plus ou moins profonde des champignons qui dégradent les tissus du grain) et le caractère «hard» ou «soft» de l'endosperme (Scott *et al.*, 1984 ; Young *et al.*, 1984, Seitz *et al.*, 1985).

Les procédés de semoulerie sont similaires à ceux de la meunerie, mais peu de travaux ont étudié la répartition des fusariotoxines dans les procédés de semoulerie utilisant le blé dur. Nowicki *et al.* (1988) ont observé que la teneur en DON des sons, des issues, de la farine et de la semoule sont respectivement de 151, 137, 111 et 86 % par rapport à celle du blé dur propre. Dexter *et al.* (1997) ont indiqué que la teneur en DON de la semoule est moitié moindre que celle des grains avant traitement.

Les trichothécènes sont remarquablement stables à température ambiante. Ils ne sont pas détruits lors de la cuisson des aliments, ni dans les conditions de stérilisation (environ 15 minutes à 118°C) (Vidal, 1985). Néanmoins, la cuisson des aliments peut réduire leur teneur en TCT, non pas en raison de la température, mais de la solubilité : la cuisson des pâtes alimentaires diminue de 50 % la teneur en DON; la quantité résiduelle du DON retrouvé dans l'eau de cuisson doit être pris en compte dans le cas de soupe avec du vermicelle (Visconti *et al.*, 2004).

L'amidonnerie de maïs comporte des opérations par voie humide avec une phase de trempage destinée à solubiliser certains composants, suivie du dégermage du grain par broyage grossier, le reste du grain étant séparé en amidon, gluten et drêches. Le gluten, les drêches et les composés solubles du trempage peuvent être mélangés pour être commercialisés en alimentation animale (corn gluten feed). Le travail par voie humide joue de façon significative sur la migration des mycotoxines hydrosolubles, comme l'ont montré Lauren et Ringrose (1997) et Collins et Rosen (1981) qui relèvent des teneurs en DON et en nivalénol dans les concentrés d'eaux de trempage comprises respectivement entre 270 et 5000 % et entre 200 et 4900 % des teneurs observées initialement dans les grains propres. Dans ces conditions, les teneurs en mycotoxines des fractions non solubles du grain sont plus faibles après le trempage, les glutens sont moins contaminés et l'amidon encore moins.

En malterie, les mycotoxines hydrosolubles passent en grande partie dans les eaux de trempage comme l'ont montré Schwarz *et al.* (1995) pour le DON, Flanningan *et al.* (1985, cité par Scott, 1996) pour la toxine T2. Lors de la germination, des mycotoxines peuvent être produites. Ainsi, Schwarz *et al.* (1995) ainsi que Boivin *et al.* (2001) ont noté une augmentation de la teneur en DON dans le grain germé. Dans les opérations de brasserie, ils observent que le DON du malt passe dans une très grande proportion dans la bière et accessoirement dans les drêches.

4 Devenir et Propriétés toxicologiques

4.1 Trichothécènes du groupe A

4.1.1 Absorption, distribution et excrétion (groupe A)

Aucune donnée n'est disponible sur le métabolisme de la toxine T-2 et la toxine HT-2 chez l'homme.

Chez l'animal, la toxine T-2 est rapidement absorbée après ingestion dans la plupart des espèces et distribuée dans l'organisme sans accumulation dans un organe spécifique. Les concentrations plasmatiques maximales sont observées après 30 minutes chez les rongeurs.

La toxine T-2 est rapidement métabolisée par déacétylation, hydroxylation, glucuroconjugaison et dé-époxydation : la principale voie de biotransformation est une déacétylation au niveau du carbone 4, qui aboutit à la formation de toxine HT-2 (seul métabolite isolé après incubation en présence de microsomes de foie, de rein et de rate de différentes espèces animales). La réaction est catalysée par une carboxyestérase non spécifique, présente dans le sérum et plusieurs tissus, principalement dans le foie. La toxine HT-2 peut être ensuite deacétylée, hydroxylée et conjuguée selon différentes voies métaboliques en 3'hydroxy HT62, T-2 triol, 3'hydroxy T-2 triol, 4-deacetylneosolaniol qui est converti en T-2 tetraol et ses conjugués glucuronides. La toxine T-2 peut également être directement hydroxylée en 3'hydroxy T-2. Ces métabolites ont été retrouvés chez plusieurs espèces de rongeurs, le porc (Johnsen *et al.*, 1988, Conrady-Lork *et al.*, 1989).

Chez les rongeurs, le foie est le principal site de métabolisation avec une excrétion principalement biliaire (Matsumoto *et al.*, 1978).

La toxine T-2 traverse la barrière placentaire chez le rat femelle et se retrouve préférentiellement dans le thymus et la rate du fœtus (Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1990).

Chez le porc, 4 heures après une injection intraveineuse de la toxine T-2 radioactive, 15-24 % de la radioactivité est retrouvée dans le tractus gastro-intestinal et 4,7-5,2 % dans les autres tissus, principalement dans les muscles et le foie (Corley *et al.*, 1986). Dans cette espèce, 63 % des métabolites de la T-2 sont retrouvés dans les urines et 77% de ceux retrouvés dans la bile sont sous forme de conjugués d'acide glucuronide (Corley *et al.*, 1985).

Chez le singe recevant une administration intraveineuse unique de la toxine T-2 radiomarquée, la radioactivité plasmatique s'élève de 22% après 5 minutes, . 25 % après 2 heures et 8% après 24 heures. Les principaux métabolites retrouvés jusqu'à 5 jours après l'injection sont le T-2 tetraol et le 3'hydroxy T-2 pour le plasma et le T-2 tetraol, le 3'hydroxy T-2 et le 3'hydroxy HT-2 ceux pour l'urine . Les conjugués n'ont pas été déterminés (Naseem *et al.*, 1995).

La toxine T-2 et des métabolites hydroxylés ont été retrouvés dans le lait de vaches exposées par voie orale à 180 mg de T-2 (Yoshizawa *et al.*, 1981).

4.1.2 Toxicité cellulaire (groupe A)

- **Synthèse protéique**

Chez la souris Swiss, une inhibition de la synthèse protéique a été mise en évidence, sur des cellules de la moelle osseuse, de la rate et du thymus après injection intrapéritonéale de 0,75 mg/kg pc/j de la toxine T-2 pendant 3 à 7 jours. (Rosenstein et Lafarge-Frayssinet, 1983, Trusal, 1985, Trusal et O'Brien, 1986). Ces résultats ont été confirmées chez le rat au niveau du muscle, du cœur, du foie et de la rate, après injection intrapéritonéale de 0,3 ; 0,75, ou 2 mg/kg

pc de toxine T-2 (Thompson et Wannemacher, 1990). Des observations analogues ont été effectuées sur culture de cellules d'hépatomes, de lymphocytes stimulés, de cellules Vero, des hépatocytes de rat

- **Synthèse d'ADN**

La toxine T-2 inhibe l'incorporation de [³H]thymidine fortement dans des lignées cellulaires de thymus (concentration de 10 ng/ml dans le milieu de culture) et dans des lymphocytes stimulés par la PHA (inhibition totale à 8 ng/ml et de 80% à 1,5 ng/ml) (Cooray, 1984, Munsch and Muller, 1980).

- **Membranes cellulaires**

L'effet des trichothécènes sur les membranes cellulaires reste à éclaircir. En 1985, Gyongyossy-Issa *et al.* suggèrent que les trichothécènes s'intercaleraient dans la membrane jusqu'à atteindre un seuil critique au delà duquel une lyse se produit rapidement. Cependant, en 1987, DeLoach *et al.*, concluent que les interactions entre les trichothécènes et la membrane plasmique sont minimales voire inexistantes. Par contre Bunner et Morris (1988) suggèrent que les trichothécènes ont de multiples effets indépendants de l'inhibition de synthèse protéique, sur les fonctions de la membrane plasmique à faible concentration.

- **Apoptose**

Chez la souris BALB/c femelle, l'injection intrapéritonéale de 1,75 et 5 mg/kg pc de toxine T-2 induit rapidement l'apoptose (15 minutes après injection à la plus forte dose) dans le thymus, dans le rein et principalement dans le foie (Islam *et al.*, 1998a ; Sugamata *et al.*, 1998).

Dans des cellules HL60 exposées à 10 ng toxine T-2/ml, l'apoptose apparaît entre 2 et 6 heures (Ueno *et al.*, 1995).

L'induction de l'apoptose est inhibée par la cycloheximidine (inhibiteur de la synthèse protéique) injectée 5 minutes après celle de toxine T-2, indiquant que la synthèse protéique *de novo* est nécessaire à l'apoptose induite par les trichothécènes (Islam *et al.*, 1998b).

L'exposition de cellules HL-60 à la toxine T-2 inhibe l'expression du gène Bcl-2 (inhibiteur de l'apoptose). L'induction de l'apoptose par la toxine T-2 est toujours précédée par une augmentation précoce (quelque minutes) de concentration du calcium intracellulaire après l'injection de la toxine (Ueno *et al.*, 1995 ; Yoshino *et al.*, 1996 ; Sugamata *et al.*, 1998 ; Okumura *et al.*, 1998).

In vitro, la toxine T-2 induit l'apoptose des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de sang de cordon ombilical humain après 6 heures d'incubation en présence de 10⁻⁷ M (Ledréan *et al.*, 2005),

4.1.3 Toxicité aiguë (groupe A)

Chez les rongeurs, la DL50 de la toxine T-2 est comprise entre 5 et 10 mg/kg pc. Les nouveaux nés semblent plus sensibles que les animaux plus âgés (JECFA, 2002)

Les principaux effets relevés dans les études expérimentales de toxicité aiguë apparaissent pour des doses de toxine T-2 comprises entre 0,06 et 10 mg/kg pc suivant les espèces animales et comportent des symptômes non-spécifiques comme la perte de poids, l'inappétence, des dermatites, des vomissements, des diarrhées, des hémorragies ainsi que des lésions nécrotiques de l'épithélium stomacal et intestinal, de la moelle osseuse, de la rate, des testicules et des ovaires.

D'après De Nicola *et al.* (1978), l'organe cible de la toxicité de la toxine T-2 après exposition unique ou répétée est le tissu hématopoïétique. (cf section hématotoxicité/myélotoxicité)

4.1.4 Toxicité subchronique (groupe A)

Chez le rat, l'administration par voie orale de 5, 10 et 15 mg/kg pc/j de toxine T-2 pendant 4 semaines entraîne des lésions de l'épithélium de l'œsophage aux deux plus fortes doses (Ohtsubo et Saito, 1977)

De jeunes porcs exposés par voie orale à des doses comprises entre 0,04 et 0,64 mg/kg pc (1 à 16 mg T-2/kg d'aliment) pendant 8 semaines n'ont pas révélé de modifications hématologiques. Par contre, une diminution du gain de poids a été observée dès la plus faible dose, 0,04 mg/kg pc/j. Les

animaux refusaient la nourriture contaminée avec 16 mg/kg d'aliment de T-2, mais acceptaient celle contaminée avec 10-12 mg/kg de T-2 (Weaver *et al.*, 1978).

Le porc exposé pendant 5 semaines à doses comprises entre 0,016 et 0,132 mg/kg pc /j ne présente pas de modifications des paramètres hématologiques classiques et aucune diminution de la consommation alimentaire n'est observée (Friend *et al.*, 1992).

Dans une étude menée pendant 3 semaines sur des porcs âgés de 7 semaines, des modifications hématologiques et immunologiques ont été rapportées pour des doses de 0,03 et 0,06 mg/kg pc/j (Raifai *et al.*, 1995) (Voir sections Immunotoxicité et Hématotoxicité/Myélotoxicité).

Une étude de toxicité subchronique menée chez le singe (mâle, rhesus) exposés pendant 4 à 5 semaines à 0,1 mg/kg pc a permis d'observer une diminution importante du nombre de leucocytes (40 %), de lymphocytes B et T (Jagadeesan *et al.*, 1982).

4.1.5 Génotoxicité (groupe A)

Les données des études de génotoxicité sur les trichothécènes apparaissent contradictoires et ne permettent pas de tirer de conclusion définitive.

Les tests de mutations réverses sur *Salmonella typhimurium* et *Saccharomyces cerevisiae* sont négatifs en absence et en présence d'activation métabolique. Les tests de réparation de l'ADN (SOS Chromotest) sur bactérie sur également négatifs (Haschek, 1989 ; JECFA, 2001).

In vitro, la T-2 (0,05 µg T-2/ml) induit de cassures simple-brin d'ADN sur des lymphocytes spléniques et thymiques de souris et des hépatocytes de souris (Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1981). T-2 induit *in vitro* à de très faibles concentrations (0,001 µg/ml à 0.5 µg/ml) des aberrations chromosomiques sur les cellules V79 (hamster chinois) et sur des lymphocytes humains exposés à 0,1 ng T-2/ml (Thust *et al.*, 1983 ; Hsia *et al.*, 1986 ; Zhu *et al.*, 1987 ; Hsia *et al.*, 1986, 1988). Deux tests sur trois d'échange de chromatides sœurs sont positifs (Thust *et al.* 1983, Zhu *et al.* 1987, Cooray 1984). Le test du micronucleus *in vitro* est positif, et un test de synthèse non programmée d'ADN sur fibroblastes humains est positif (Zhu *et al.*, 1987, Oldham *et al.*, 1980).

In vivo, les résultats sont également contradictoires. Chez *Drosophila melanogaster*, le test du micronoyau est positif, alors que les essais de mutation récessive liée au sexe sont l'un positif, l'autre négatif (Sorsa *et al.* 1980). Chez la souris BALB/c, l'injection intrapéritonéale de 3 mg de toxine T-2/kg pc induit des cassures simple-brin d'ADN au niveau de la rate et du thymus (Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1981). Des aberrations chromosomiques ont décrites sur cellules de moelle osseuse de hamster chinois et de souris exposées respectivement à 1,7 et 3 mg toxine T-2 /kg pc (Norppa *et al.*, 1980 ; Bilgrami *et al.*, 1995). Cependant, après injection intrapéritonéale de 3 mg de toxine T2/kg pc, aucune induction de cassures simple-brin n'est relevée dans les cellules de foie de souris, et le test du micronucleus sur moelle osseuse de hamster chinois est négatif (Norppa *et al.*, 1980 ; Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1981).

4.1.6 Toxicité chronique et Cancérogénicité (groupe A)

Des souris exposées par voie orale pendant 12 mois à 1,5 et 2,25 mg de toxine T-2/kg pc/j ont présenté des lésions réversibles de l'œsophage (hypoplasie, hyperkératose) apparaissant dès la 13^{ème} semaine. Chez le rat, les mêmes lésions sont observées au delà de 0,5 mg/kg pc (Ohtsubo *et al.*, 1977; Ohtsubo et Saito, 1977).

Des rats albinos exposés pendant 8 mois à 10 mg/kg d'aliment n'ont présenté aucune lésion dans les organes observés (Marasas *et al.*, 1969).

Chez la souris, l'administration de 0,23 à 0,45 mg/kg pc/j de toxine T-2 pendant 16 mois induit une augmentation de l'incidence d'adénomes pulmonaires de l'ordre de 10 % à la plus faible dose et de 15 % à la plus forte dose, ainsi que des adénomes hépatocellulaire chez les mâles à la plus forte dose et une augmentation dose dépendante des d'hyperplasie de l'épithélium de l'estomac antérieur dans les 2 sexes aux deux doses testées. Aucune modification des paramètres hématologiques et immunologiques n'a été rapportée dans cette étude (Schiefer *et al.*, 1987).

Cependant ces données sont insuffisantes pour conclure.

4.1.7 Autres effets (groupe A)

- **Neurotoxicité**

Chez le rat exposé à la toxine T-2 (2-21 mg /kg pc/j) des modifications des taux de neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine, tryptophane, acide 5-hydroxy-3 indolacétique, acide 3,4 dihydroxyphenylacétique) à toutes les doses testées ont été rapportées par Mac Donald *et al.*, 1988, & Wang *et al.*, 1993). Dans un autre étude, Wang *et al.*, 1993 observent une augmentation du taux de l'acide 5-hydroxy-3 indolacétique après administration de 0,1 et 0,4 mg/kg pc/j de T-2.

Chez le rat et le poulet, l'administration de 2,5 et 2 mg/kg pc de toxine T-2 respectivement induit une augmentation de la dopamine et une réduction de la noradrénaline chez le poulet uniquement (Chi *et al.*, 1981 ; MacDonald *et al.*, 1988 ; Wang *et al.*, 1993).

Aucune modification comportementale n'a été observée chez des rats Wistar après administration de 0,4 mg/kg pc de toxine T-2. Par contre, une diminution du poids corporel après 7 jours, des troubles comportementaux et une diminution de l'activité motrice après administration de 2 mg/kg pc (Sirkka *et al.*, 1992).

Chez le rat Sprague-Dawley, recevant 1 mg/kg pc par voie intrapéritonéale ou 10 mg/kg de toxine T-2 dans la nourriture, une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au mannitol a été décrite (Wang *et al.*, 1998).

- **Reprotoxicité**

La toxine T-2 inhibe la libération de la progestérone chez le lapin traité à la GnRH ainsi que chez la brebis (Fekete et Huszenicza, 1993) chez laquelle elle retarde la maturation folliculaire et l'ovulation après administration de 0,025 mg /kg pc/j pendant 20 jours (Huszenicza *et al.*, 2000).

In vitro, la toxine T-2 inhibe la sécrétion de testostérone par les cellules interstitielles de gerbille (Fenske et Fink-Gremmels, 1990).

Les trichothécènes provoquent la mort fœtale à partir de 3 mg T-2/kg p.c. administrés *po* ainsi que des malformations fœtales lorsque les souris sont soumises à 1 mg T-2/kg pc (Stanford *et al.*, 1975 ; Rousseaux *et al.*, 1986 ; Rousseaux et Schiefer, 1987 ; Tutel'ian *et al.*, 1991). Le taux de résorption fœtale est respectivement de 100 % et 73 % pour des concentrations égales à 4 et 3,5 mg T-2/kg pc chez des souris exposés au neuvième jour de gestation à 0.5, 1, 2, 3, 3.5 et 4 mg T-2/kg pc (Rousseaux *et al.* 1986).

L'injection *ip* de 0,5 mg T-2/kg pc induit des malformations de la queue et des pattes chez la souris (Hood *et al.*, 1978 et 1986).

L'administration de 5, 10 et 15 mg de toxine T-2/kg pc pendant 4 jours diminue le poids corporel et le nombre de fœtus vivants et provoque des malformations céphaliques (Khera *et al.*, 1982). L'administration *ip* de 0,2 et 0,4 mg de toxine T-2/kg pc induit une diminution du poids du thymus de 39 % et une augmentation du poids du foie. L'effet sur le thymus est transitoire (Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1990).

- **Immunotoxicité**

Chez la souris, l'exposition par voie orale ou systémique à T-2 induit une diminution du nombre de splénocytes, de thymocytes, et lymphocytes circulants ainsi qu'une déplétion des lymphocytes B dans le foie fœtal (Friend *et al.*, 1983ab ; Islam *et al.*, 1998ab ; Holladay *et al.*, 1993). La stimulation *in vivo* des lymphocytes B et T de souris est inhibée de façon réversible (Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1979).

Des souris exposées par voie orale à simultanément à *Salmonella typhimurium* et à la T-2 (1 mg/kg p.c.) présentent une diminution du poids et une mortalité plus élevée que les souris exposées seulement à *S. typhimurium* (Tai et Petska, 1988). De même, l'exposition orale à T-2 diminue la résistance à l'infection mycobactérienne (Kanai et Kondo, 1984). Les effets de T-2 sur la résistance à *Listeria monocytogenes* ont été étudiés sur des souris exposées à $4 \cdot 10^5$ ou $4 \cdot 10^4$ CFU de *L. monocytogenes* et traitées par une dose unique orale de 4 mg T-2/kg pc : chez les animaux traités par la T-2 et exposé aux bactéries, une rapide multiplication bactérienne dans la rate, un excès de mortalité et une nécrose des tissus lymphoïdes du thymus et de la rate ont été relevés. Corrier et Ziprin (1986) ont rapporté une augmentation de la résistance à *L. monocytogenes* lorsque T-2 (2 mg/kg pc) est administrée avant l'infection bactérienne. Une telle résistance est fréquemment observée lorsque les trichothécènes sont administrés peu avant le début de l'infection (Bondy et

Petska, 2000). La capacité proliférative des lymphocytes de souris exposés aux trichothécènes dépend de la concentration en mycotoxines et en molécules mitogènes (Paucod *et al.*, 1990) et elle est inhibée dans le cas de lymphocytes exposés à des concentrations en T-2 supérieures à 0,75 nM et stimulés par ConA, PWM et PHA.

In vitro, la fonctionnalité des macrophages alvéolaires de rat est perturbée par la T-2 (10^{-7} M), se traduisant par une diminution de la phagocytose (Gerberick *et al.*, 1984 ; Sorenson *et al.*, 1986).

Sur les modèles cellulaires humains, la T-2 inhibe la production d'immunoglobulines IgA, IgG, IgM (Thuvander *et al.*, 1999). L'exposition de monocytes humains à 10^{-8} M de T-2 inhibe leur différenciation en macrophages, se traduisant par une inhibition de la phagocytose, de l'endocytose, de la production de radicaux oxygénés, de l'expression phénotypique du CD71 et de la sécrétion du TNF- α (Hymery *et al.*, 2007). L'incorporation de 1 à 2 nM de T-2 dans le milieu de culture de lymphocytes induit une modification des proportions cellulaires et notamment, l'expression des marqueurs CD69, CD25 et CD71 sur les cellules CD4+ et CD8+ (Johannisson *et al.*, 1999). D'autres études ont montré l'inhibition de la prolifération des lymphocytes humains par la T-2 (Tomar *et al.*, 1988 ; Charoenpornsook *et al.*, 1998 ; Thuvander *et al.*, 1999 ; Johannisson *et al.*, 1999) et l'effet immunosuppresseur de différents trichothécènes notamment la T-2 et le NIV sur les lymphocytes périphériques humains, ainsi qu'une diminution de l'activité des cellules NK (natural killer) (Berek *et al.*, 2001 ; Meko *et al.*, 2001 ; Froquet *et al.*, 2003). L'ajout de 1,6 ng T-2/ml au milieu de culture inhibe la prolifération stimulée par ConA et celle de 2,4 ng T-2/ml inhibe la prolifération stimulée par la phytohemaglutinine (Tomar *et al.*, 1988).

In vitro, la présence de 10^{-8} M de T-2 inhibe la maturation des cellules dendritiques humaines alors incapables de présenter l'antigène, de costimuler les lymphocytes, d'induire la prolifération lymphocytaire et de sécréter les interleukines 12 et 10. Cependant, les cellules dendritiques gardent leur capacité de migration et leur pouvoir d'endocytose (Hymery *et al.*, 2006ab).

- **Hématotoxicité**

Lignée des globules blancs

Des diminutions du nombre de globules blancs (leucopénie) apparaissent après exposition aux trichothécènes chez le chat, la souris, le cochon d'inde, le rat, le lapin, le mouton et le porc (Sato *et al.*, 1975 ; Sato *et al.*, 1978 ; DeNicola *et al.*, 1978 ; Fromentin *et al.*, 1980 ; Friend *et al.*, 1983c ; Yarom *et al.*, 1984a ; Lorenzana *et al.*, 1985, Bergers *et al.*, 1987 ; Niyo *et al.*, 1988 ; Suphiphat *et al.*, 1989 ; Rotter *et al.*, 1994,). Les intoxications aux trichothécènes se traduisent de différentes manières si on considère la lignée des globules blancs. Dans les premières 24 heures après administration d'une dose unique, une leucocytose (augmentation du nombre de globules blancs) est observée suivie d'un retour à la normale pour une dose moyenne ou d'une leucopénie pour une dose plus forte (Ueno *et al.*, 1985). Lors d'administrations répétées, une leucopénie est observée (Otokawa *et al.*, 1983 ; Ueno *et al.*, 1983 ; Ryu *et al.*, 1988 ; Suphiphat *et al.*, 1989).

Chez la souris, l'injection unique de toxine T-2, induit une leucocytose alors que les injections quotidiennes de 3 mg de toxine T-2/kg pc pendant 3 jours provoquent une leucopénie (Sato *et al.*, 1978). Chez la souris CD-1 mâle, l'injection intra-péritonéale de 15 mg/kg pc de DAS induit une leucocytose après 6 heures, due essentiellement à une lymphocytose et à une augmentation transitoire du nombre de neutrophiles, elle même suivie d'une leucopénie (Conner *et al.*, 1986). Chez la souris, l'injection intrapéritonéale répétée (1 à 8) de 1,56 mg/kg pc entraîne une rapide lymphopénie dose dépendante et une granulocytose pour les 2 concentrations les plus élevées, suivie d'une granulocytopénie retardée à 48 heures. Un retour à la normale est observé 4 à 7 jours après injection (Bergers *et al.*, 1987).

Chez le rat, une dose initiale de 0,31 mg de toxine T-2/kg pc entraîne une faible leucopénie et une forte granulocytose à 24 heures.

In vitro, l'incubation de globules blancs humains en présence de 100 et 300 μ g de toxine T-2/ 10^6 cellules, provoque des modifications morphologiques des granulocytes alors que les lymphocytes et les monocytes ne sont pas affectés (Yarom *et al.*, 1984a).

Lignée des globules rouges

La lignée des globules rouges (érythrocytes) est également atteinte lors d'intoxications par les trichothécènes.

In vivo, des anémies, une diminution de la concentration en hémoglobine et une chute de l'hématocrite ont été décrites chez le rat, le chat, la souris, le poulet et le cochons d'inde (Sato *et al.*, 1975 ; DeNicola *et al.*, 1978 ; Lutsky *et al.*, 1978, 1981ab ; Hayes *et al.*, 1980, 1990 ; Rukmini *et al.*, 1980 ; Gentry *et al.*, 1981 ; Cosgriff *et al.*, 1984 ; Conner *et al.*, 1986 ; Ryu *et al.*, 1987 ; Suphiphat *et al.*, 1989 ; Harvey *et al.*, 1991).

Chez des rats Wistar recevant 1 mg de DAS/kg pc par gavage, les érythrocytes, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine sont les paramètres les plus affectés. En l'absence de modifications du volume globulaire moyen et la concentration corpusculaire en hémoglobine cellulaire, ces effets ont été attribués par les auteurs à une atteinte de la moelle osseuse et à une hémolyse conjointe (Janse van Rensburg *et al.*, 1987).

Chez le chat, l'administration orale chronique de 0.08 mg/kg pc de toxine T-2 induit une anémie avec une chute de l'hématocrite de 30 %, du taux d'hémoglobine (Lutsky *et al.*, 1981) et la présence d'érythrocytes nucléés dans le sang signant la régénération médullaire avec libération d'éléments immatures (Conner *et al.*, 1986). Ce dernier phénomène est également observé chez le porc après administration de toxine T-2 et la souris après administration de DAS (Lutsky *et al.*, 1978 et 1981 ; Lorenzana *et al.*, 1985 ; Conner *et al.*, 1986).

Chez le rat, l'administration de toxine T-2 entraîne une augmentation progressive de l'excrétion de porphyrines (coproporphyrine) au décours du traitement (Schoental *et al.*, 1979).

In vitro l'effet hémolytique la toxine T-2 observé sur les érythrocytes de rat pour des concentrations élevées (0,43 M et 0,536 M), et non aux faibles concentrations (0,28 M), serait tributaire soit de la pénétration du toxique dans la bicouche phospholipidique, soit d'une interaction du toxique avec une cible membranaire, ou d'une peroxydation lipidique induite par la libération de radicaux libres (Rizzo *et al.*, 1992).

In vitro, la toxine T-2 entraîne la lyse des globules rouges pour des concentrations de 200 µg/5.10⁷ érythrocytes (Gyongyossy-Issa *et al.*, 1985). La proximité des doses lytiques et non lytiques conduit l'auteur à suggérer que la toxine T-2 agirait suivant le même mécanisme d'action que les antibiotiques polyènes qui s'intercalent dans la membrane cellulaire jusqu'à un seuil critique, au-delà duquel la lyse cellulaire se produirait rapidement. Cette notion de seuil critique sera reprise par Rizzo *et al.* en 1992. Dans cette même étude, l'auteur évalue la taille des lésions induites par la toxine T-2 sur les érythrocytes de cochon d'inde à 5,5 Å. Pendant la phase d'attente précédant l'hémolyse, les érythrocytes subissent des déformations morphologiques aboutissant à la formation d'échinocytes, modification indépendante de la concentration en Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ et ATP, l'auteur conclut que la toxine T-2 agit préférentiellement sur la bicouche phospholipidique (Gyongyossy-Issa *et al.*, 1985b, 1986 ; DeLoach *et al.*, 1987). La forte inhibition de l'incorporation de ⁵⁹Fe dans les érythrocytes de souris par la toxine T-2 apparaît liée à l'inhibition de la synthèse d'hémoglobine au stade réticulocytaire et à l'activité cytotoxique sur les progéniteurs érythroïdes (Faifer *et al.*, 1991). Il est important de noter que les études menées chez 12 espèces animales ainsi que chez l'homme montrent que l'effet hémolytique est tributaire de la présence de phosphatidylcholine dans la membrane cellulaire : seuls les animaux monogastriques (porc, cochon d'inde, lapin, rat, souris, chien, cheval et Homme) possédant de la phosphatidylcholine membranaire présentent une hémolyse (3 10⁻⁴ et 1,5 10⁻⁴ M T-2) ; par contre, les érythrocytes de 5 espèces de ruminants (vache, mouton, buffle, chèvre et chevreuil) ne possédant pas de phosphatidylcholine membranaire ne sont pas lysés par la toxine T-2 (DeLoach *et al.*, 1987 et 1989).

Lignée plaquettaire :

L'apparition d'hémorragies constitue un des symptômes caractéristiques des intoxications aux trichothécènes. Chez la souris gravide, l'administration orale de 3 mg de la toxine T-2/kg pc. provoque la mort de 17 % des animaux par hémorragie massive vaginale prenant son origine au niveau des points d'attache des enveloppes fœtales (Rousseaux *et al.*, 1984). Chez le singe, l'administration de 1 mg/kg pc/jour de la toxine T-2 est suivie de l'apparition de pétéchies au niveau de la face (Rukmini *et al.*, 1980). Des thrombocytopénies ont été rapportées chez plusieurs espèces animales (Sato *et al.*, 1975 et 1978 ; Lutsky *et al.*, 1978 et 1981 ; Rukmini *et al.*, 1980 ; Cosgriff *et al.*, 1984 ; Suphiphat *et*

al., 1989). Chez le porc, l'administration intraveineuse de 17,59 et 14,05 mg de DAS provoque des hémorragies au niveau des muqueuses du tractus digestif (jéjunum, iléon, colon et caecum).

Outre les déficits en plaquettes, les trichothécènes inhibent l'agrégation plaquettaire chez les bovins, chez les ovins et chez l'Homme (Chan *et al.*, 1984 ; Gentry *et al.*, 1987ab ; Yarom *et al.*, 1984b). Ce phénomène, qui apparaît dépendant de la dose, s'accompagne d'une diminution du relargage de thromboxane B2 par les plaquettes chez les bovins (Chan *et al.*, 1984 ; Bondy *et al.*, 1988 et 1989). Les agrégats plaquettaires stimulés par l'ADP sont moins stables en présence de la toxine T-2 (Chan *et al.*, 1984 ; Bondy *et al.*, 1988). Cependant, *in vitro*, les plaquettes humaines et bovines ne subissent pas de modifications morphologiques lorsqu'elles sont exposées à la toxine T-2 (Yarom *et al.*, 1984b ; Bondy *et al.*, 1989), mais une modification de la perméabilité des membranes plaquettaires humaines est observée en présence de 500 µg T-2/10⁹ plaquettes (Yarom *et al.*, 1984b). Chez le cochon d'Inde, l'administration parentérale de la toxine T-2 (1mg/kg pc) des inhibe partiellement l'agrégation plaquettaire stimulée par l'ADP et dans une moindre mesure celle stimulée par le collagène.

L'agrégation plaquettaire effectuée sur PRP (Plasma Riche en Plaquettes) n'est pas affectée par la toxine T-2 (Cosgriff *et al.*, 1984). Dans cette étude, 1µg de toxine T-2/ml n'inhibe pas *in vitro* l'agrégation plaquettaire que ce soit en présence de sang total ou de PRP. Ces mêmes auteurs suggèrent que le mécanisme d'inhibition de l'agrégation plaquettaire serait lié à l'inhibition de la synthèse du thromboxane B2, alors que d'autres auteurs considèrent qu'il s'agit d'un mécanisme secondaire (Yarom *et al.*, 1984b ; Gentry *et al.*, 1987).

La toxine T-2 provoque des modifications dans la composition phospholipidique de la bicouche membranaire des plaquettes bovines exposées à 2 mM ou à 0,68 µg/10⁶ (Bondy *et al.*, 1988, 1989 ; Grandoni *et al.*, 1992). La toxine T-2 inhiberait la fonction plaquettaire bovine selon un mécanisme biochimique différent de ceux impliquant l'inhibition des cyclooxygénases, l'inhibition des canaux calcium et/ou un modulateur AMPc (Bondy *et al.*, 1988).

L'administration de toxine T-2 (1 mg/kg p.c.) au cochon d'Inde et au porc allonge les temps de prothrombine (PT) et de thromboplastine (APTT) ce qui reflète une diminution de la concentration en facteurs de coagulation. Parallèlement, le temps de thrombine (TT) augmente pour atteindre son maximum à 24 heures, ce qui indique une concentration maximale en fibrinogène 24 heures après administration (Cosgriff *et al.*, 1984 et 1986 ; Gentry, 1982). La toxine T-2 modifie la concentration plasmatique des facteurs de coagulation (Doerr *et al.*, 1981; Gentry 1982 et Gentry et Cooper 1983; Cosgriff *et al.*, 1984 et 1986) qui subissent une diminution maximale 24 heures après injection *im* de 0.65 mg/kg pc chez le singe et de 1 mg/kg pc chez le cochon d'Inde (Cosgriff *et al.*, 1984 et 1986). La concentration en fibrinogène décline parallèlement aux autres facteurs chez le singe mais n'est pas affectée chez le cochon d'Inde (Cosgriff *et al.*, 1984, 1986). Gentry *et al.*, en 1982 et 1983, mettent en évidence une diminution de la concentration plasmatique des facteurs de coagulation VII, IX, X, XI chez le lapin et le veau exposés respectivement à 0,5 mg de toxine T-2/kg pc et 0,25 mg de toxine T-2/kg pc. On peut noter également que le facteur VIII est diminué de 40 % chez le lapin exposé à 0,5 mg/kg pc alors qu'il reste normal chez le veau intoxiqué par 0,25 mg de T2/kg pc (Gentry, 1982 ; Gentry et Cooper, 1983). La dépression des facteurs de coagulation est corrélée négativement à la concentration en toxine. Cosgriff *et al.* (1986) expliquent les déplétions en facteurs de coagulation par l'inhibition de la synthèse protéique due à la toxine T-2. Compte tenu des durées de vie des facteurs de coagulation variant de quelques heures à 2 ou 3 jours, Gentry *et al.* (1987ab) semblent réfuter cette idée du fait de l'apparition du "nadir" pour chaque facteur 24 heures après administration. Alors que le facteur VII significativement diminué dès 4 µg/mg, il faut atteindre 16 µg/kg pour observer une déplétion significative du facteur X chez le jeune poulet; le facteur V ne présente quant à lui aucune modification (Doerr *et al.*, 1981). La toxine T-2 provoque une coagulopathie chez le poulet exposé à 16 µg/kg, caractérisée par une diminution de l'activité du facteur VII puis par une déficience de la prothrombine et du fibrinogène (Doerr *et al.*, 1981). Dans toutes les études ci dessus, la vitamine K n'a aucun effet protecteur contre les coagulopathies provoquées.

L'administration d'une dose sublétales (3 mg/kg pc) de la toxine T-2 à des souris QRF femelles provoque une diminution de la concentration en prekallikreine et de prothrombine 1 à 4 heures après administration. Le nadir est atteint après 24 heures. La sécrétion du fibrinogène et du facteur XIII par les mégacaryocytes pourrait participer à l'explication des désordres observés par lyse des mégacaryocytes après injection (Johnsen *et al.*, 1988). Lors des chocs hémorragiques provoqué par 17,59 mg DAS chez le porc, de multiples thrombus de fibrine apparaissent au niveau des ganglions lymphatiques (Weaver *et al.*, 1978).

- **Myélotoxicité**

Le terme myélotoxicité désigne les troubles induits sur la formation des cellules sanguines lors de l'hématopoïèse qui se déroule dans la moelle osseuse. Les atteintes de la moelle osseuse par les trichothécènes ont été rapportées chez le mouton, la souris, le poulet et le cochon d'Inde (De Nicola *et al.*, 1978 ; Hoerr *et al.*, 1982 ; Friend *et al.*, 1983c ; Smith *et al.*, 1994b). Elles sont caractérisées par des hypoplasies résultant de la nécrose des cellules médullaires. L'administration intra-péritonéale de 10 mg DAS/kg p.c./j à des souris provoque une chute de la concentration de tous les types cellulaires de la moelle osseuse après 1 à 7 jours d'exposition ainsi qu'une leucopénie et une thrombopénie (Suphiphat *et al.*, 1989).

L'hypoplasie induite par les trichothécènes est transitoire et le temps de régénération est variable. La capacité régénératrice de la moelle osseuse et de la rate a été étudiée chez la souris en mesurant l'incorporation de ⁵⁹Fe après induction d'une hypoplasie sévère par administration *sous cutanée* de 2 mg de toxine T-2/kg pc. La régénération de l'activité érythroïdique est plus rapide dans la rate (48-72 heures) que dans la moelle osseuse (21 jours) ; de plus, chez les souris splénectomisées, la régénération intervient en 48 heures ce qui témoigne de la réversibilité des dommages de la moelle osseuse, tant au niveau des cellules hématopoïétiques que des cellules stromales (Velazco *et al.*, 1996). La durée de régénération de l'activité érythroïdique de la souris est allongée par un régime alimentaire pauvre en protéines (Hayes et Schiefer, 1980, 1990), mais raccourcie par l'administration de rhG-CSF qui accélère la régénération de la moelle osseuse murine et peut prévenir les hypoplasies induites par les trichothécènes et (Othani *et al.*, 1993). Le retour à la normale peut s'accompagner d'une hyperplasie médullaire (Hayes *et al.*, 1980, 1990).

Des souris exposées à 20 mg de toxine T-2 /kg p.c./j pendant 28 jours présentent une hypoplasie médullaire pendant les 3 premières semaines. Au bout du quatorzième jour, la population érythroïde est presque inexistante alors que les populations myéloïdes et thrombocytiques ne sont que modérément réduites. La granulopoïèse et la thrombocytopoïèse reprennent avant l'érythroïèse. Au 21^{ème} jour, la myélopoïèse neutrophile induit une hyperplasie médullaire (Hayes *et al.*, 1980).

Les trichothécènes peuvent également provoquer des perturbations dans la distribution des différents phénotypes cellulaires. Ainsi, malgré une concentration stable en CD44⁺ dans la moelle osseuse, Holladay *et al.*, (1995) observent une diminution du nombre de CD44^{lo} (prolymphoïdes) et une augmentation des CD44^{hi} (granulocytes/macrophages) après exposition des souris à 1,75 mg T-2/kg pc pendant 5 jours. La chute du nombre de CD45R⁺ permet à l'auteur de conclure que les progéniteurs lymphoïdes sont hautement sensibles aux trichothécènes. L'injection de 0,3 mg T-2/kg p.c./j à des souris mâles provoque la chute du nombre de CFU-GM dans la moelle osseuse, réversible en 72 heures. Cet effet s'accompagne dans certains cas d'hyperplasie tendant à indiquer l'existence d'un mécanisme de compensation dans le système hématopoïétique (Faifer *et al.*, 1992). Chez des souris mâles CD-1 recevant 0,1, 0,5 et 2,5 mg/kg p.c. de T-2 pendant 14 jours tous les deux jours, la croissance des colonies de granulocytes à 0,5 mg T-2/kg pc et des colonies de monocytes à 0,1 et 2,5 mg/kg pc est stimulée. En revanche, la formation de colonies granulo-monocytaires est inhibée à 0,5 et 2,5 mg T-2/kg pc (Dugyala *et al.*, 1994).

Chez le cochon d'Inde, après administration de 0,9 mg T-2/kg pc/jour pendant 27 jours, le retour à une cellularité médullaire normale s'accompagne d'une hyperplasie apparemment liée à une hyperplasie érythroïde (DeNicola *et al.*, 1978). Chez le mouton, l'administration de 0,6 mg de toxine T-2/kg pc/jour pendant 21 jours entraîne la suppression de l'érythroïèse dès le 12^{ème} jour, les cellules de la lignée myéloïde sont majoritaires et celles de la lignée mégacaryocytaire sont toujours présentes (Friend *et al.*, 1983c).

Les cellules de la moelle osseuse de souris sont plus résistantes à la toxine T-2 (400 µg/10⁷ cellules) que les splénocytes, les thymocytes et les cellules péritonéales (DiNinno *et al.*, 1985). Les auteurs concluent à la capacité des cellules lymphoïdes de la moelle à recoloniser les organes lymphoïdes et à la lente adaptation des cellules hématopoïétiques à la toxine T-2. La prolifération des progéniteurs granulo-monocytaires de souris exposées à des concentrations croissantes de toxine T-2 a été étudiée par Dugyala *et al.* (1994). L'inhibition de la prolifération des progéniteurs est dose-dépendante. Dès 1 nM, une inhibition de la prolifération est observée si on considère les colonies de

granulocytes et les colonies mixtes de granulocytes/monocytes. Aucune prolifération n'est notée pour les trois types de colonies (granulocytes, monocytes et granulocytes/monocytes) pour 6 et 10 nM de T-2. L'auteur conclut que la toxine T-2 serait plus toxique *in vitro* qu'*in vivo*. Elle affecterait la capacité des cellules souches pluripotentes à se différencier en CFU-GM *in vivo*. Elle affecterait également la capacité à former des colonies *in vitro*.

L'étude de l'effet des toxines T-2, HT-2, et DAS sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques humains et murins a montré que les progéniteurs hématopoïétiques sont extrêmement sensibles aux trichothécènes (Parent-Massin *et al.*, 1994, 1995 ; Lautraite *et al.*, 1995, 1996, 1997a,b ; Rio *et al.*, 1997, Froquet *et al.*, 2001). Les sensibilités des CFU-GM et des BFU-E sont les mêmes chez l'Homme. Les concentrations non cytotoxiques sont toutes inférieures à 5.10^{-8} M.

Dans tous les cas la toxine T-2 est la plus myélotoxique des trichothécènes.

4.2 Trichothécènes du groupe B

4.2.1 Absorption, distribution et excrétion (groupe B)

La dé-époxydation de DON en DOM-1 est observée chez le rat, le porc, le poulet et les bovins (Worrel *et al.*, 1989 ; He *et al.*, 1992 ; Kollarczik *et al.*, 1994). Chez le mouton, DON se retrouve sous forme DOM-1 et de glucurono-conjugué, la biodisponibilité de DON est faible, de l'ordre de 7,5%. (Prelusky *et al.*, 1984, 1985). Chez le porc, une biodisponibilité systémique de 54,9 % a été mesurée (Prelusky *et al.*, 1988).

Chez le porc, après l'injection de 1 mg DON/kg pc, les concentrations les plus élevées sont relevées dans le plasma, les reins et le foie, s'élevant respectivement à 551, 931, 439 ng DON/g de tissu, trois heures après injection (Prelusky et Trenholm, 1991).

La demi-vie de DON est estimée à 100-125 minutes chez le mouton et à 3,9 heures chez le porc (Prelusky *et al.*, 1985 ; Prelusky et Trenholm, 1991).

Les trichothécènes sont excrétés par les urines, les excréments (Lake *et al.*, 1987) et la bile (Chi *et al.*, 1978a), de façon relativement rapide (DON et DOM-1 sont éliminés en 30 heures chez le mouton).

Les trichothécènes se retrouvent dans les œufs en très faible quantité, de l'ordre de 0,1 % de la dose administrée (Chi *et al.*, 1978b, Prelusky *et al.*, 1987a). Une exposition prolongée n'induit pas d'accumulation de DON dans les œufs (Prelusky *et al.*, 1989).

Une contamination du lait maternel par des trichothécènes a été rapportée (Robison *et al.*, 1979 ; Yoshizawa *et al.*, 1981). Le métabolite DOM-1 est également détecté dans le lait (Prelusky *et al.*, 1987b).

4.2.2 Toxicité cellulaire (groupe B)

• Synthèse protéique

Les trichothécènes sont des inhibiteurs de la synthèse protéique. Le DON inhibe l'élongation de la chaîne protéique (Ehrlich et Daigle, 1987 ; Betina, 1989) et exerce une toxicité *in vivo* supérieure à celle attendue d'après les expérimentations *in vitro*, du fait de sa lipophilie (Sato et Ueno, 1977 ; Thompson et Wannemacher, 1986).

• Apoptose

La roridine A, le DON et le NIV sont capables d'induire l'apoptose Ueno *et al* (1995). Les métabolites de 3AcDON à $7,4.10^{-7}$ M et 15AcDON à 6.10^{-7} M induisent l'apoptose des cellules CD34⁺ après 15h d'incubation par la voie des caspases (Josse *et al.*, 2006).

4.2.3 Toxicité aiguë (groupe B)

La DL50 par voie orale de DON est égale à 78 mg/kg pc chez la souris B6C3F1 et à 46 mg/kg pc chez la souris DDY.

Les effets toxiques observés dans les études de toxicité aiguë et subaiguë chez l'animal sont des vomissements, refus de s'alimenter, perte de poids et diarrhées. Après intoxication aiguë une nécrose

tissulaire est observée au niveau du tractus intestinal, de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes. La dose émétique par voie orale la plus basse chez le porc qui semble être l'espèce la plus sensible à DON est comprise entre 0,05 et 0,2 mg/kg pc. La consommation alimentaire est réduite chez cette même espèce dès 1 à 2 mg/kg p.c..

4.2.4 Toxicité subchronique (groupe B)

Chez la souris sept études de toxicité subaiguë et subchronique (7 jours à 56 jours d'exposition) mettent en évidence une réduction de la consommation alimentaire, une diminution du gain de poids et des modifications de paramètres sanguins, notamment le taux d'immunoglobulines sériques, jusqu'à des doses inférieures à 0,7 mg/kg pc/j.

Chez le rat, trois études publiées (2 sur 90 jours et 1 sur 60 jours) montrent essentiellement une diminution du poids corporel pour des doses égales ou supérieures à 0,5 mg/kg pc /j. Les plus petites doses sans effet (NOAEL) ont été identifiées lors de deux études chez le jeune porc recevant une nourriture naturellement contaminée par le DON pendant environ 3 semaines ; elles sont comprises entre 0,04 et 0,06 mg/kg pc/j. Aux plus fortes doses (de 0,08 à 0,16 mg/kg pc/j) il a été observé une réduction du gain de poids, une augmentation du poids du foie, une diminution de la concentration des protéines sériques et de l'albumine ainsi qu'une diminution temporaire du taux de calcium et de phosphore sérique.

4.2.5 Génotoxicité (groupe B)

Différents tests menés sur le seul DON sont décrits dans la littérature. Des résultats assez contradictoires sont observés qui ne permettent pas de statuer sur ce caractère pour le DON (Voir tableau 1).

Tableau 1 : Tests de génotoxicité réalisés sur le DON :

Tests		Concentration	Resultats	Reference
<i>in vitro</i>				
Mutation Reverse	S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 ^a	0.4–400 mg/plaque	Négatif	Wehner et al. (1978); Kuczuk et al. (1978)
Mutation Reverse	S. typhimurium TA98, TA100 ^a	0.7–500 mg/plaque	Négatif	Knasmuller et al. (1997)
Aberration Chromosomique	E. coli PQ37 ^a	5–500 mg/essai	Négatif	Knasmuller et al. (1997)
Mutation Genique	Cellules V79 de hamster	1–3 mg/mL	Négatif	Rogers & Heroux-Metcalf (1983)
Synthèse non programmée d'ADN	Culture primaire d'hépatocyte de rat	0.1–1000 mg/mL	Négatif	Bradlaw et al. (1985)
DNA repair	E. coli K12 (2 espèces)	0.7–500 mg/mL	Négatif	Knasmuller et al. (1997)
Aberration Chromosomique	Cellules V79 de hamster	1 mg/mL	Positif	Hsia et al. (1988)
Aberration Chromosomique Micronucleus	Culture primaire d'hépatocyte de rat	0.001–100 mg/ml Max at 1 mg/ml	Positif	Knasmuller et al. (1997)
			Négatif	
<i>In vivo</i>				
Aberration Chromosomique	Cellules de moelle osseuse de souris	3 mg/kg pc 2 x/semaine par gavage pendant 8 semaines 0.06 mg/kg pc/ dans l'alimentation	Positif	Bilgrami et al. (1993)
			Négatif	

^a avec et sans S9 ; ^b avec et sans activation via des hépatocytes

4.2.6 Cancérogénicité (groupe B)

Dans une étude de toxicité chronique (2 ans) chez la souris B6C3F1, les doses administrées par voie orale sont égales à: 0, 0.1, 0.5 et 1.1 mg/kg pc/j chez le mâle et 0, 0.1, 0.7 or 1.5 mg/kg pc./j chez les femelles. Une diminution significative du gain de poids est observée à partir d'une dose journalière de 0,7 mg/kg pc. Aucune modification des paramètres hématologiques et biochimiques n'est relevée en dehors d'une augmentation des IgA et des IgG (< 10 %) sériques chez les femelles recevant les doses les plus élevées ; une augmentation du poids du foie et des testicules et une diminution du poids de la rate est observée chez les mâles. Aucun excès d'affections néoplasique ou

prénéoplasique n'est rapporté. La dose sans effet indésirable (NOAEL) est égale à 0,1 mg/kg pc/j (Verson *et al.*, 1995).

Aucune étude de cancérogenèse ou de toxicité à long terme chez d'autres espèces n'est disponible.

4.2.7 Autres effets (groupe B)

- **Neurotoxicité**

Chez les rats Sprague-Dawley, le DON administré une fois à raison de 2,5 mg/kg pc provoque une augmentation de la concentration de sérotonine (+ 102–180%) et du 5-hydroxyindole-3-acide acétique (+ 27–79%) dans toutes les régions du cerveau de rats (Fitzpatrick *et al.*, 1988a, b).

D'après Prelusky *et al.*, (1992), les effets neurochimiques induits lors d'intoxication aiguë à DON pourraient être liés à des événements périphériques tels que les vomissements. Bien qu'ayant une faible affinité pour le récepteur à la sérotonine (Prelusky *et al.*, 1996), le DON augmente l'activité sérotoninergique cérébrale (Prelusky *et al.*, 1993). Selon le même auteur, la réduction de la prise alimentaire des souris exposées à DON serait liée à un mécanisme sérotoninergique (Prelusky *et al.*, 1997).

- **Toxicité sur la reproduction**

Une étude multigénération chez la souris exposées à 0, 0,38, 0,75, or 1,5 mg/kg pc/j de DON n'a pas révélé d'effets toxiques sur la fertilité mâle et femelle, la gestation, ni de malformation majeure dans la descendance (Khera *et al.*, 1984).

Deux études de reproduction, menées chez le rat, sur une génération, soumis à 0, 0,25, 0,5, 1 ou 2 de DON ne mettent pas en évidence d'effets sur les paramètres de la reproduction et la gestation, ni d'anomalie chez les petits. Le seul effet observé est une diminution de poids corporel, consécutive à une diminution de la consommation alimentaire dans la première étude (Khera *et al.*, 1984) et une diminution de taux de fertilité et du poids des petits entre 14 et 21 jours après la mise bas (Morrissey et Vesonder, 1985).

DON n'a pas d'effet sur les organes reproducteurs du porc mâle et femelle exposés à 0,17 mg de DON/kg pc/j pendant 7 semaines (Friend *et al.*, 1986).

Des études de tératogénèse ont été conduites chez la souris, le rat et le lapin exposés au DON.

Chez la souris, un pourcentage élevé de résorptions (100%, 100 %, 80 %) est observée à 5, 10 et 15 mg/kg pc/j et des anomalies viscérales majeures (exencéphalies, cerveau hypoplasique, syndactyly) sont observées aux doses plus basses (1, 2,5 et 5 mg/kg pc/j). Ces malformations sont doses dépendantes et observés en l'absence de toxicité maternelle. Aucun effet tératogène ni embryotoxique n'est observé à 0,5 mg/kg pc/j (Khera *et al.*, 1982).

Chez la rate exposée à 0,025, 0,1, et 0,25 mg/kg pc/j pendant la gestation, aucun effet tératogène n'est relevé (Morrissey, 1984), mais des effets foetotoxiques (anomalies du squelette et retard dans l'ossification) sont décrits pour des doses de 1,5 et 10 mg/kg pc/j, dans une étude permettant de fixer la dose sans effet de cette étude à 0,2 mg/kg pc/j (Tutel' ian *et al.*, 1991).

Chez la lapine exposées à 0, 0,3, 0,6, 1, 1,6, 1,8, et 2 mg/kg pc/j de DON l'incidence des résorptions est égale à 100 % aux deux plus fortes doses. Aucun effet tératogène n'a été observé aux plus faibles doses (Khera *et al.*, 1986).

- **Immunotoxicité**

Chez la souris, l'exposition aux trichotécènes en général induit une diminution du nombre de splénocytes et de thymocytes (Friend *et al.*, 1983ab ; Islam *et al.*, 1998a, b ; Tryphonas *et al.*, 1984), ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes circulants et une déplétion des lymphocytes B dans le foie fœtal de souris (Holladay *et al.*, 1993). La stimulation *in vivo* des lymphocytes B et T de souris est inhibée de façon réversible (Lafarge-Frayssinet *et al.*, 1979). Par ailleurs, le DON augmente la sensibilité des souris à une infection orale par *S. enteridis* (Hara-Kudo *et al.*, 1996) par *Listeria monocytogenes* (Tryphonas *et al.*, 1984) ou par des réovirus (Li *et al.*, 2005).

Chez la souris, le DON induit une augmentation d'IgA jusqu'à 25 mg DON/kg de nourriture (Forsell *et al.*, 1986 ; Petska *et al.*, 1989), mais diminue la concentration d'IgG et d'IgM. Il est également susceptible de modifier l'expression des cytokines *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Azcona-Olivera *et al.*, 1995ab ; Ji *et al.*, 1998 ; Wong *et al.*, 1998).

- **Hématotoxicité**

Des souris B6C3F exposées par voie orale à 0, 0,1, 0,4, 1, 2, et 5 mg/kg pc/j de DON pendant 6 semaines ont présenté une diminution du nombre de leucocytes aux deux plus fortes doses, la dose sans effet étant de 1mg/kg pc/j (Forsell et al., 1986). Chez le rat, le chat, la souris, le poulet et le cochon d'Inde une anémie, une chute de la concentration corpusculaire en hémoglobine et de l'hématocrite ont été rapportées dans de nombreuses études (Sato et al., 1975 ; DeNicola et al., 1978 ; Lutsky et al., 1978, 1981ab ; Hayes et al., 1980b, 1990 ; Rukmini et al., 1980 ; Gentry et al., 1981 ; Cosgriff et al., 1984 ; Conner et al., 1986 ; Ryu et al., 1987 ; Suphiphat et al., 1989 ; Harvey et al., 1991). Chez la souris C57BL/6crSlc SPF, la consommation d'aliments contaminés par 30 mg/kg de NIV induit une diminution du nombre d'érythrocytes sans modification de l'hématocrite ni de la concentration corpusculaire en hémoglobine (Ryu et al., 1987).

In vitro, le DON exerce un effet hémolytique sur des érythrocytes de rat après exposition à des concentrations de 130, 200, et 250 µg/ml pendant 11 h ; l'hémolyse est totale aux deux plus fortes concentrations après 7 heures d'incubation. Cet effet pourrait être lié soit à la pénétration de DON dans la bicouche phospholipidique, soit à une interaction de DON avec une cible membranaire et/ou à une peroxydation lipidique induite par la libération de radicaux libres. (Rizzo et al., 1992).

In vitro, Le DON (10^{-8} M) inhibe la maturation des cellules dendritiques et la différenciation des monocytes en macrophages (Hymery et al., 2006 a et b, 2007).

- **Myélotoxicité**

L'ingestion par des souris de 30 mg/kg de nivalénol pendant 24 jours induit une diminution du nombre de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Ryu et al., 1987). L'hypoplasie induite par les trichothécènes est transitoire et le temps de régénération est variable.

Des progéniteurs hématopoïétiques humains et de rat ont été cultivés en présence de 4-400 ng/ml de DON pendant 14 jours. Le DON inhibe le développement de ces cellules de façon dose dépendante pour des doses égales de 100 à 400 ng/ml. La CI50 est égale à 16 ng/ml pour les cellules humaines et 64 ng/ml pour les cellules murines après 14 jours d'incubation; Les cellules humaines sont plus sensibles que les cellules murines. Ces résultats laissent à penser que les leucopénies décrites lors d'intoxications à DON sont dues à un effet myélotoxique (Parent-Massin et al., 1994, 1995, 1998; Lutraite et al., 1995, 1996, 1997ab ; Rio et al., 1997). Des études complémentaires ont montré que DON est le moins myélotoxique des trichothécènes, et que les progéniteurs de la lignée rouge sont moins sensibles à ces effets myélotoxiques que ceux de la lignée des globules blancs et/ou plaquettaire (Rio et al., 1997, Froquet et al., 2003). Bien que présentant une forte myélotoxicité sur les CFU-GM humains, les métabolites de DON (3AcDON et le 15AcDON) sont moins myélotoxiques que leur molécule mère (Hymery et al., 2007).

4.3 Valeurs toxicologiques de références

Le CIRC a classé les différents trichothécènes (T-2, DON, ...) en 1993 dans le groupe 3, du fait de données insuffisantes pour statuer.

4.3.1 Trichothécènes du groupe A

Toxine T-2 et toxine HT-2 : bien que peu d'études aient été réalisées sur la toxine HT-2, la dose journalière tolérable fixée par le JECFA et le SCF concernent ces deux toxines. Ces comités ont retenu l'étude réalisée chez le porc sur la T-2 comme étude pertinente (Raifai et al., 1995). Les effets toxiques observés aux faibles doses dans cette étude sont des effets immunotoxiques et hématotoxiques. Comme il n'a pas été identifié de dose sans effet dans cette étude, c'est la plus petite dose avec effet (LOAEL) qui a été retenue, soit 0,029 mg/kg pc/j. Un facteur de sécurité de 500 (10 x 10 x 5) a été appliqué et la dose journalière tolérable provisoire des toxines T-2 et HT-2 est de 0,06 µg/kg pc/j.

4.3.2 Trichothécènes du groupe B

DON : Le JECFA et le SCF ont retenu l'étude de toxicité chronique menée sur la souris (Iverson *et al*, 1995). La dose sans effet (NOAEL) est égale à 100 µg/kg pc/j . L'effet toxique pertinent identifié dans cette étude est une diminution du gain de poids entraînant un retard de croissance. Un facteur de sécurité de 100 (10 x10) a été appliqué à la dose sans effet pour obtenir la dose journalière tolérable de DON qui est en conséquence égale à 1 µg/kg pc/j (JECFA ,SCF 2001).

NIV : Le SCF a fixé une dose journalière tolérable pour le nivalénol à partir des études de toxicité chronique menées chez la souris (2 ans). Les effets toxiques pertinents identifiés pour déterminer la dose sans effet sont les effets immunotoxiques et hématotoxiques. Aucune étude n'ayant permis d'identifier une dose sans effet, c'est la plus petite dose avec effet qui a été retenue, soit 0,7 mg/kg pc/j à laquelle il a été appliqué un facteur de sécurité de 1000 (10x10x10) compte tenu du fait que peu de données sont disponibles sur cette toxine. La dose journalière tolérable provisoire du nivalénol est donc égale à 0,7 µg/kg pc/j.

5 Exposition humaine aux trichothécènes

5.1 Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

La consommation de produits contaminés par les trichothécènes serait à l'origine de graves mycotoxicoses chez l'homme.

La première manifestation pouvant être imputée aux trichothécènes survint en 1891 dans le comté d'Oussouri en Sibérie Orientale. Elle fut désignée sous le nom de maladie chancelante (Grevier-Rames, 1989).

Les affections les plus connues, dans lesquelles les trichothécènes sont suspectées d'être incriminées, sont l'Aleucie Toxique Alimentaire (ATA) décrite en Russie et aussi la "Moldy Corn Toxicosis" en Amérique du Nord, la "Red Mold Disease" ou "Akakabi byo disease" au Japon, toutes provoquant les mêmes symptômes.

L'ATA est rapportée depuis la fin du 19ème siècle en Russie. Mais, c'est dans les années 1940 que les cas d'intoxication les plus graves ont été signalés. Cette intoxication a provoqué le décès de 10 % de la population du comté d'Orenburg en Russie. L'ATA se caractérise par des diarrhées, des vomissements et des modifications hématologiques et par l'apparition de pétéchie au cours des deux premiers stades. Lors du troisième stade, l'atteinte du système hématopoïétique s'intensifie et le nombre de cellules circulantes diminue. Le nombre de thrombocytes tombe sous les 5 000/mm³ alors que le nombre de leucocytes chute sous les 100/ mm³ et le nombre d'érythrocytes devient inférieur à 1x10⁶/ mm³ La population touchée avait consommé du pain préparé à partir de grains de blé contaminés par des *Fusarium*. Le blé n'ayant pas été moissonné en raison de la guerre, la population utilisait des grains de blé récoltés sous la neige en hiver. A partir de souches de *Fusarium poae* et *sporotrichioïdes*) impliquées dans les épidémies d'ATA en Union Soviétique, de nombreux auteurs ont montré la capacité de ces moisissures à produire des trichothécènes, notamment T-2 (Sato *et al.*, 1975 ; Szathmary *et al.*, 1976). Le mécanisme impliqué dans la survenue des troubles hématologiques due à une forte cytotoxicité sur les progéniteurs hématopoïétiques a été mis en évidence 20 ans après.

5.2 Exposition de la population Française

L'étude de l'alimentation totale (EAT) entreprise en 2000 pour déterminer le niveau d'exposition de la population française aux trichothécènes à partir d'aliments "prêts à consommer" montre que sur les 238 échantillons analysés, des concentrations supérieures à la limite de détection n'ont été relevés que pour les seules toxines HT-2 et fusarénone X (2 échantillons sur 238), NIV (3 échantillons) et DON (31 échantillons) (Leblanc *et al.*, 2005).

Les niveaux d'exposition moyens et des forts consommateurs (95^{ème} percentile) adultes (15 ans et plus) et enfants (de 3 à 14 ans) de la population française générale (tableau 1) et de la population végétarienne (tableau 2) ont été estimés pour le DON et le NIV (Leblanc *et al.*, 2005).

Le principal vecteur d'exposition pour les deux groupes de population est représenté par les produits dérivés des céréales (> 90% pour le DON et environ 80% pour le NIV, en particulier le pain et les biscottes (entre 45 et 70% pour le DON et entre 19 et 32% pour le NIV). Les autres vecteurs contribuent à moins de 2% (DON) et moins de 4% (NIV) de l'exposition alimentaire totale.

Tableau 1 : Exposition de la population moyenne et des forts consommateurs (P95) (adultes et enfants) en DON et NIV lors de l'EAT

	DON				NIV			
	Moyenne en $\mu\text{g/kg p.c./j}$	P95	% de la DJT pour P95	% d'individus pouvant dépasser la "limite maximale *	Moyenne	P95	% de la DJT pour P95	% d'individus pouvant dépasser la "limite maximale *
adultes (15 ans et +)	0,281	0,571	57 %	0,4 %	0,088	0,157	23 %	0 %
Enfants (3-14 ans)	0,451	0,929	93 %	4 %	0,163	0,300	43 %	0 %

* Le JECFA a établi la dose journalière tolérable pour le DON à $1 \mu\text{g/kg pc/j}$ et le NIV à $0,7 \mu\text{g/kg pc/j}$.

Tableau 2 : Exposition de la population végétarienne française adultes (15 ans et +) aux DON et NIV lors de l'EAT

	DON				NIV			
	Moyenne en $\mu\text{g/kg p.c./j}$	P95	% de la DJT pour P95	% d'individus pouvant dépasser la "limite maximale *	Moyenne	P95	% de la DJT pour P95	% d'individus pouvant dépasser la "limite maximale *
Ovolacto végétariens	0,360	0,720	72 %	4 %	0,120	0,230	33%	0 %
Lactovégétariens	0,320	0,830	83 %	5,3 %	0,120	0,190	27 %	0 %
Végétaliens/macrobiotés	0,410	0,960	96 %	3,8 %	0,210	0,420	60 %	3,8 %

* Le JECFA a établi la dose journalière tolérable pour le DON à $1 \mu\text{g/kg pc/j}$ et le NIV à $0,7 \mu\text{g/kg pc/j}$.

Les niveaux d'exposition moyens des adultes (15 ans et plus) et enfants (de 3 à 14 ans) de la population française générale estimés pour les DON et NIV lors de l'EAT sont plus faibles d'environ 60% à ceux estimés par la Tâche SCOOP européenne⁷ réalisée en 2003 pour les DON, NIV et T-2 (tableau 3). Pour l'essentiel, la différence est due au fait que les données de contamination proviennent pour l'EAT des denrées telles que consommées et pour la tâche SCOOP des matières premières entrant dans la composition des aliments.

⁷ SCOOP report on Tasks 3.2.10. (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food et assessment of dietary intake by the population of EU members states.

Tableau 3 : Exposition alimentaire de la population française aux trichothécènes (Tâche Scoop, 2003)

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

6.1 Effets sur la santé animale et transfert dans les tissus animaux

6.1.1 Les porcins

Les trichothécènes de type A

Cas de la toxine T-2

* Effets sur les performances de croissance

Les conséquences de la T-2 sur les performances de croissance des porcs ont été beaucoup moins étudiées que celles des trichothécènes de type B (DON). Néanmoins toutes les études réalisées sur de jeunes animaux, à part celle de Weaver *et al.* (1978a) où aucun effet n'est constaté lors de la consommation d'un aliment renfermant jusqu'à 8 mg de T-2/kg, des réductions de la consommation d'aliment et de la vitesse de croissance sont mises en évidence pour des teneurs en T-2 inférieures à 1 mg/kg d'aliment (Friend *et al.*, 1992), significativement à partir de 3 mg de T-2/kg (Rafai *et al.*, 1995a) et d'autant plus marquées que les concentrations sont plus élevées par rapport aux témoins (Rafai et Tuboly, 1982; Rafai *et al.*, 1989, 1995a; Harvey *et al.*, 1990, 1994). Les porcs refusent de consommer un régime renfermant 16 mg de T-2/kg (Mirocha, 1977; Weaver *et al.*, 1978a). Leur vitesse de croissance est également réduite, les porcs perdant même du poids lorsque les aliments renferment 5 à 15 mg de T-2/kg (Rafai *et al.*, 1995a). Comme pour le DON (voir plus loin), ces effets s'atténuent avec le temps alors que les animaux continuent à consommer l'aliment contaminé (Rafai et Tuboly, 1982). L'efficacité alimentaire n'est significativement altérée dans aucun de ces essais.

* Signes cliniques

La DL₅₀ de la T-2 est de 4 mg/kg pc par voie orale (Smalley, 1973) et de 1,21 mg/kg pc par voie intraveineuse, la plus faible dose létale étant de 0,9 mg/kg pc (Mirocha, 1977; Weaver *et al.*, 1978a). La toxicité aiguë de la T-2 administrée par voie intraveineuse se manifeste par des réactions de mastication, de salivation, suivies de vomissements, de polyphagie, de polydipsie, d'oligurie, puis d'apathie, de difficultés respiratoires et d'une coloration violacée des muqueuses buccales et du groin (Weaver *et al.*, 1978a; Corley *et al.*, 1983; Lorenzana *et al.*, 1985b; Beasley *et al.*, 1986; Pang *et al.*, 1986). Le porc défèque fréquemment. Entre 1 et 6 h, après la contamination, l'apparition d'une parésie postérieure, d'une démarche titubante entraînant des chutes fréquentes est suivie d'une léthargie extrême et de la mort qui intervient 19 h après l'injection. Chez les porcs qui ne meurent pas, les symptômes régressent à partir de 5 à 12 h suivant l'injection, et les animaux retrouvent un état normal après 24 h.

Lors d'une intoxication chronique de porcs par la consommation d'un aliment contaminé renfermant entre 5 et 15 mg de T-2/kg, aucun vomissement n'est observé, mais une léthargie s'installe au bout de quelques jours ainsi qu'une frilosité apparente en dépit d'une température rectale et de conditions ambiantes normales (Túry *et al.*, 1989; Harvey *et al.*, 1990; Rafai *et al.*, 1995a). Chez les animaux consommant un aliment renfermant plus de 4 mg/kg de T-2, une nécrose et une ulcération des tissus épithéliaux se développent sur le groin, les commissures et la cavité buccales, la langue, les zones cutanées rétro-auriculaires et péri-prépucciales à partir de 9 à 14 jours après le début de l'intoxication et s'aggravent au cours du temps sans que les animaux manifestent de signes de douleur ou d'inconfort (Harvey *et al.*, 1990). Lorsque l'aliment renferme entre 0,5 et 3 mg/kg de T-2, seul l'examen histologique des tissus révèle la présence de lésions (Rafai *et al.*, 1995a).

* Effets sur la circulation sanguine

L'injection intraveineuse de 0,6 ou 4,8 mg de T-2/kg pc entraîne un état de choc circulatoire avec chute du débit sanguin cardiaque et de la pression artérielle, dont la durée apparaît dose dépendante en dépit d'un accroissement du rythme cardiaque (Lundeen *et al.*, 1986, 1991; Beasley *et al.*, 1987). La teneur en catécholamines du sang augmente, le pH et la pression partielle en oxygène diminuent.

* Lésions

L'injection intraveineuse de 0,6 à 4,8 mg de T-2/kg p.c provoque des lésions oedémateuses multifocales et des hémorragies du myocarde, des œdèmes et des hémorragies des ganglions lymphatiques, du pancréas, des surrénales et de la vésicule biliaire, une congestion et des hémorragies de l'estomac, du jéjunum, de l'iléon et du colon, associées à des nécroses superficielles (Weaver *et al.*, 1978a; Pang *et al.*, 1986, 1987a,b; Williams, 1989). Par contre, le duodénum paraît indemne, même aux doses létales (Corley *et al.*, 1983; Williams, 1989).

L'examen histologique révèle des infiltrats de cellules mononucléées, une pycnose des myofibrilles du cœur (Pang *et al.*, 1986, 1987b) ainsi qu'une dégénérescence et une nécrose des cellules de la corticosurrénale, des acini du pancréas et de l'épithélium tubulaire de la médulla rénale (Pang *et al.*, 1987b). Des lésions similaires ont été rapportées au niveau de la surface et des cryptes de l'épithélium iléal et jéjunal, des tissus lymphoïdes de l'intestin grêle et du caecum, des follicules lymphoïdes de la rate et des centres germinatifs des ganglions lymphatiques (Pang *et al.*, 1987a,b; Weaver *et al.*, 1978a). La T-2 est donc un puissant agent cytotoxique pour les systèmes digestif, lymphoïde et hématologique, lésant aussi bien les cellules à division rapide que celles à faible renouvellement (Pang *et al.*, 1987a,b).

Lors d'une intoxication sub-aiguë par consommation d'un aliment contaminé par T-2 (0,4 à 10 mg/kg), on n'observe pratiquement pas de lésions dans la plupart des organes: foie, reins, rate, cœur, surrénales, thymus (Patterson *et al.*, 1979; Harvey *et al.*, 1990, 1994; Friend *et al.*, 1992). Cependant, Rafai et Tuboly (1982) et Túry et al (1989) ont relevé une réduction du poids du thymus et de la rate, ainsi qu'une augmentation du poids des surrénales après consommation d'un aliment avec 5 mg T-2/kg. Pour des teneurs comprises entre 0,4 et 3,2 mg/kg d'aliment, Friend *et al.*, (1992) constatent une élévation dose dépendante de l'incidence des lésions de la muqueuse œsophagienne. Certains des effets relevés après administration intraveineuse de T-2 sont retrouvés chez des truies consommant un aliment contaminé par 12 mg de T-2/kg, tels que la congestion de l'iléon, du colon, de la vésicule biliaire et un œdème sévère des canaux biliaires (Weaver *et al.*, 1978c). Une dégénérescence du foie et des reins et un œdème du mésentère œdémateux ont observés chez les porcelets issus d'une truie qui avait consommé un aliment contaminé par 8 mg/kg de T-2 purifiée pendant le dernier quart de la gestation et la 1^{ère} semaine de lactation (Vanyi *et al.*, 1991).

* Paramètres sanguins, hématologie et immunité

Après administration intraveineuse de 0,6 ou 4,8 mg/kg pc de T-2 à des porcs de 40 à 60 kg, une augmentation du taux sérique de calcium, de potassium, de magnésium, d'urée, de créatinine, de phosphatase alcaline et d'AST, et une diminution du pH sanguin ont été observées (Lorenzana *et al.*, 1985a). Pour de plus faibles doses (1 et 2 mg de T-2/kg d'aliment), Rafai et al (1995a) observent une baisse de la glycémie et du taux d'acides gras libres et une augmentation de l'AST, mais aucun effet sur les taux sériques de protéines, d'albumine et d'urée. Chez des porcs nourris avec un aliment contaminé par 10 mg de T-2/kg, le taux de triglycérides est augmenté et l'urémie diminuée (Harvey *et al.*, 1990). Par contre, Friend *et al.*, (1992) ne constatent aucune altération des paramètres métaboliques entre 0 et 3,2 mg de T-2/kg d'aliment.

L'injection intraveineuse de 0,6 ou 4,8 mg de T-2/kg pc provoque une leucocytose suivie d'une leucopénie (Lorenzana *et al.*, 1985a), et à la plus forte dose, une augmentation de l'hématocrite, du nombre d'érythrocytes et du taux d'hémoglobine. Des érythrocytes nucléés sont trouvés aux deux doses, mais ne persistent au-delà de 24 h qu'à la dose élevée. Les temps de coagulation ne sont pas affectés. La T-2 inhibe donc la production de leucocytes. La présence de globules rouges nucléés sans augmentation du nombre de globules rouges matures suggère une lésion de l'endothélium de la moelle osseuse.

Le nombre de globules rouges, le taux d'hémoglobine et le pourcentage de lymphocytes T diminuent lorsque l'aliment renferme 2 ou 3 mg/kg de T-2 (Rafai et al., 1995b). Inversement, d'après Rafai et Tuboly (1982) et Harvey *et al.*, (1990), la consommation d'un aliment contaminé par 5 ou 10 mg de T-

2/kg ne modifie pas le nombre de leucocytes ni d'érythrocytes, mais provoque une anémie microcytaire hypochrome.

La consommation par de jeunes porcelets d'aliments contaminés par 0,5 à 5 mg/kg de T-2 purifiée affecte leurs réponses immunitaires (Rafai et Tuboly, 1982; Rafai *et al.*, 1989, 1995b). La prolifération lymphocytaire après stimulation et le titre d'anticorps après vaccination contre la gastro-entérite hémorragique sont diminués. Cependant, Harvey *et al.*, (1994) ne constatent pas d'altération des fonctions immunitaire à la dose de 8 mg de T-2/kg d'aliment.

* Effets sur la reproduction

Seules, quelques études de cas (1 à 3 truies/lot) sont disponibles.

L'injection intraveineuse de 0,41 ou 0,21 mg de T-2/kg p.c au 3^{ème} tiers de la gestation de truies provoque l'avortement (Weaver *et al.*, 1978d).

La consommation d'un aliment contaminé par 13,5 mg/kg de T-2 et 5,4 mg/kg de HT-2 par des porcelets entraîne une atrophie utérine et ovarienne avec atresie des follicules (Palyusik *et al.*, 1990), Des troubles de fertilité sont constatés après le sevrage de truies ayant consommé un aliment contaminé par 12 mg/kg de T-2 purifiée (Weaver *et al.*, 1978b). Les porcelets nouveau-nés issus d'une truie dont l'aliment renfermait 8 mg/kg de T-2 étaient chétifs et mouraient avant le sevrage (Vanyi *et al.*, 1991). Le passage de la T-2 dans le lait a été démontré chez une truie consommant un aliment contaminé par 12 mg de T-2/kg (Robison *et al.*, 1979a). Une fréquence élevée d'avortements et de retours en œstrus chez les truies, une augmentation du nombre de porcelets momifiés, des lésions cutanées et des difficultés de déplacement chez les porcelets ont été observées dans des élevages où des truies consommaient un aliment renfermant de la T-2, mais aussi de l'ergot (Barnikol *et al.*, 1982, 1985).

* Métabolisme et transfert de T-2 dans les tissus animaux

Après injection intra-aortique, la T-2 est très rapidement épurée du sang, selon un modèle à 2 compartiments. Sa demi-vie plasmatique est estimée à 90 min, 13,8 min ou 5,3 min suivant les auteurs (Corley *et al.*, 1983; Beasley *et al.*, 1986; Bauer, 1995), et son volume de diffusion à 0,37 L/kg. Elle n'est plus retrouvée dans le sang dès 2 h après son administration par injection intraveineuse ou par intubation intra-gastrique. Le dérivé HT-2, libre ou conjugué, est détecté dès les 5 premières minutes suivant l'injection. Les principaux métabolites qui sont présents sous forme non conjuguée (3'-OH T-2, HT-2 et 3'-OH HT-2), décroissent très rapidement (60% des métabolites totaux, 10 min après l'injection, à moins de 10% à 4 h). En fait, la majeure partie de la radioactivité (89%) est retrouvée dans les glucuronides dérivés de T-2, 3'-OH T-2, HT-2 et 3'-OH HT-2 (Corley *et al.*, 1983; Beasley *et al.*, 1986; Bauer, 1995),.

Plus de 20% de la T-2 est absorbée. La T-2 est éliminée principalement par l'urine (Robison et al, 1979b; Corley *et al.*, 1985) dans laquelle on retrouve moins de 0,1% de la toxine (Beasley *et al.*, 1986), les métabolites libres (principalement le 3'-OH T-2 et T-2 triol qui représentent 24 à 30% du total des formes éliminées), et les glucuronides conjugués (principalement de HT-2, 3'-OH T-2, 3'-OH HT-2 et T-2 représentant 59 à 68% du total des formes éliminées) (Corley *et al.*, 1985).

L'élimination biliaire de la T-2 n'a pas été quantifiée, mais est pour 77% sous la forme de glucuronides conjugués (Corley *et al.*, 1985).

Dix-huit heures après administration de T-2 marquée par intubation gastrique, 50% de la dose est retrouvée dans les tissus de l'animal, et le reste dans le tractus digestif (Robison et al, 1979b). La T-2 parente n'est pas retrouvée dans les fèces de porcs auxquels 2,4 mg de T-2/kg pc avaient été administrés par voie intra-gastrique (Beasley et al, 1986). Le principal métabolite dans les fèces serait HT-2, et le 3'-OH HT-2, le T-2 triol et le T-2 tétraol n'y seraient retrouvés qu'en faibles quantités (Bauer, 1995). La microflore intestinale hydrolyse les dérivés conjugués de T-2 et de ses métabolites ; une grande partie des formes parentes pourrait ainsi être réabsorbée et entrer dans un cycle entéro-hépatique (Corley *et al.*, 1985).

Après injection intra aortique, la T-2 parente disparaît rapidement des tissus des porcs. Sa clairance tissulaire (57 à 92 ml/kg/min) est d'autant plus faible que la dose de T-2 administrée (entre 0 et 1,2 mg/kg pc) est élevée (Beasley *et al.*, 1986). Les concentrations les plus élevées sont relevées dans les organes lymphoïdes, la rate et les nodules lymphatiques, les muscles, puis dans les reins , les niveaux dans le foie ni le tissu adipeux étant inférieurs à la limite de détection (Beasley et al., 1986). Les teneurs en T-2 et de ses métabolites présentes dans les tissus 18 h après administration par

intubation gastrique sont proportionnelles à la dose, mais les niveaux de contamination sont très faibles et les risques de toxicité pour le consommateur humain semblent donc très limités. Ainsi, il n'y aurait que 1,2 µg résidus dans 200 g de viande provenant d'un porc qui aurait consommé un aliment renfermant 2,5 mg/kg de T-2 (Robison *et al.*, 1979b).

Cas du diacétoxyscirpénol (DAS)

* Signes cliniques et performances

Les effets du diacétoxyscirpénol (DAS) administré par voie orale ou intraveineuse sont similaires à ceux de la T-2, mais apparaissent plus précocement ou pour des doses inférieures (Weaver *et al.*, 1978b; Bauer *et al.*, 1985; Coppock *et al.*, 1985a). La DL₅₀ du DAS est de 0,376 mg/kg pc administré par voie intraveineuse (Weaver *et al.*, 1978b) et n'est pas rapportée par voie orale.

La consommation d'aliment et la vitesse de croissance de porcelets de 7 à 9 kg diminuent lorsque la concentration du DAS dans l'aliment augmente entre 2 et 10 mg/kg, mais l'efficacité alimentaire reste inchangée (Weaver *et al.*, 1981). Au-delà d'une teneur de 10 mg de DAS/kg d'aliment, les animaux ne consomment plus la nourriture. D'après Weaver *et al.* (1981), le DAS provoque des ulcérations des muqueuses linguale, gingivale et buccale dont le nombre et la taille augmentent avec le temps, quelle que soit sa teneur dans le régime

* Effets sur les organes et les tissus

Le DAS est cytotoxique pour les tissus à forte prolifération ou forte activité métabolique.

L'administration intraveineuse de 0,5 ou 1 mg de DAS/kg pc provoque des érosions graves et des hémorragies des muqueuses, du tube digestif (intestin grêle, cæcum, colon), du cortex surrénalien, de la vésicule biliaire, ainsi que des lésions des tissus lymphoïdes. L'examen histologique révèle une nécrose, une pycnose et une caryorrhexie de la partie glandulaire de l'estomac, des entérocytes des cryptes intestinales, des acini du pancréas, des cellules épithéliales des tubules proximaux et des papilles rénales, et dans une moindre mesure de la moelle osseuse et des parotides, ainsi qu'une lympholyse sévère des centres germinatifs des nodules lymphatiques, des plaques de Peyer et des follicules de la rate. Les tissus lymphoïdes riches en lymphocytes B sont préférentiellement affectés. Des nécroses des capillaires et des hémorragies multifocales du cerveau, des hémorragies et une congestion diffuse du myocarde sont également rapportées (Weaver *et al.*, 1978b; Coppock *et al.*, 1985a).

L'injection intraveineuse de 0,5 ou 1mg de DAS /kg pc entraîne une hypoglycémie ou une hyperglycémie marquée (Coppock *et al.*, 1985a), une augmentation significative de l'urée et la créatinine sériques en relation avec l'installation d'une anurie, ainsi que de l'AST.

Le nombre de globules rouges, l'hématocrite et la teneur en hémoglobine du sang ne sont pas affectés pendant les 8 h suivant l'injection de 0,5 ou 1 mg de DAS/kg pc (Coppock *et al.*, 1989). Cependant, la présence de nombreuses cellules présentant des anomalies morphologiques dont le nombre augmente avec le temps et la dose suggère une destruction progressive des éléments hématopoïétiques de la moelle osseuse. La diminution du nombre de neutrophiles et la libération par la moelle osseuse de neutrophiles et de lymphocytes immatures témoignent d'un arrêt de la prolifération des progéniteurs médullaires. Cependant, aucune anomalie sanguine ou médullaire ne persiste chez les porcs survivants 8 jours après l'injection de 0,3 à 0,5 mg de DAS/kg pc (Weaver *et al.*, 1978b).

Dans le cas d'une intoxication chronique par un régime renfermant jusqu'à 10 mg de DAS /kg, seule une hyperplasie cellulaire de l'épithélium glandulaire et muqueux est observée (Weaver *et al.*, 1981). A la différence de l'intoxication aiguë, l'intoxication par un aliment contaminé par le DAS ne provoquerait pas d'hémorragies chez le porc.

* Métabolisme du DAS et résidus

Les données sur le métabolisme du DAS et les niveaux de résidus dans les tissus du porc sont fragmentaires. La concentration sérique maximale est atteinte entre 30 et 60 min après administration de 2 mg de DAS /kg pc par canule gastrique (Bauer *et al.*, 1985). Deux métabolites, le 15-monoacétoscirpénol, presque aussi toxique que le DAS, et le scirpenetriol (SCT) sont également présents dans le sérum (Bauer *et al.*, 1989). Le DAS et ces métabolites diminuent rapidement et ne sont plus mesurables à 24 h. Ces données indiquent que le DAS est très rapidement absorbé et

métabolisé , mais les dérivés glucuronides du DAS et de ses métabolites, n'ont pas été déterminés dans cette étude, ce qui limite l'interprétation des résultats.

Chez le porc, la demi-vie du DAS administré par voie intraveineuse est de 8,3 à 150,7 min et sa clairance de 27,3 à 191,7 ml/min/kg (thèse de Coppock, 1984, citée par Bauer *et al.*, 1989). Le DAS est partiellement éliminé dans l'urine, et principalement dans les fèces où sont retrouvés les métabolites SCT libre et dé-époxy SCT (Bauer *et al.*, 1989).

Huit heures après l'injection intraveineuse de 0,1, 0,5 ou 1 mg de DAS/kg pc, des résidus de DAS sont détectés à l'état de traces (au plus 10 ng/g) dans tous les tissus des porcs (Coppock *et al.*, 1988). Les concentrations les plus élevées sont mesurées dans la rate (jusqu'à 384 ng/g) et les nodules lymphatiques (jusqu'à 288 ng/g).

Les trichothécènes de type B : cas du DON

De nombreux cas d'intoxication du porc par des céréales infectées par *Fusarium* ont été rapportés, notamment aux Etats Unis (Mains *et al.*, 1930; Vesonder *et al.*, 1978; Côté *et al.*, 1984; Osweiler *et al.*, 1990) au Canada (Trenholm *et al.*, 1983; Abramson *et al.*, 1997) et en Australie (Moore *et al.*, 1985), avec des symptômes comparables à ceux qui avaient été observés chez l'homme dans des circonstances analogues (Vesonder et Hesseltine, 1980/81). C'est à la suite de vomissements constatés dans la "Corn Belt" des Etats Unis chez des porcs ayant consommé du maïs contaminé par *Fusarium graminearum* que le déoxynivalénol, a été isolé et dénommé alors vomitoxine (Vesonder *et al.*, 1973).

* Effets sur la consommation alimentaire

Le porc est plus sensible aux trichothécènes que le rat (Vesonder *et al.*, 1979), les volailles et surtout les ruminants (Trenholm *et al.*, 1984; Rotter *et al.*, 1996; Eriksen et Pettersson, 2004).

L'effet le plus manifeste est une baisse dose dépendante de la consommation alimentaire au delà de teneurs de l'aliment égales à au moins 1 mg de DON/kg, sachant toutefois que la variabilité de la consommation alimentaire est très élevée chez le porc (Friend *et al.*, 1982, 1986b,c; Bergsjø *et al.*, 1993). Les données indiquent une réduction moyenne de 4,3% de la consommation par mg/kg de DON supplémentaire dans l'aliment (figure 1). La baisse de consommation persiste généralement pendant toute la durée des expériences si la teneur des aliments dépasse 3 mg de DON/kg d'aliment, mais la consommation tend à redevenir normale au bout de 1 à 2 semaines si la teneur est plus faible (Forsyth *et al.*, 1977; Côté *et al.*, 1985; Lun *et al.*, 1985; Pollmann *et al.*, 1985; Chavez et Rheaume, 1986; Friend *et al.*, 1986b; Bergsjø *et al.*, 1992; Rotter *et al.*, 1995; Grosjean *et al.*, 2002). Une consommation alimentaire normale est également observée lorsqu'un régime non contaminé succède au régime contaminé (Grosjean *et al.*, 2003).

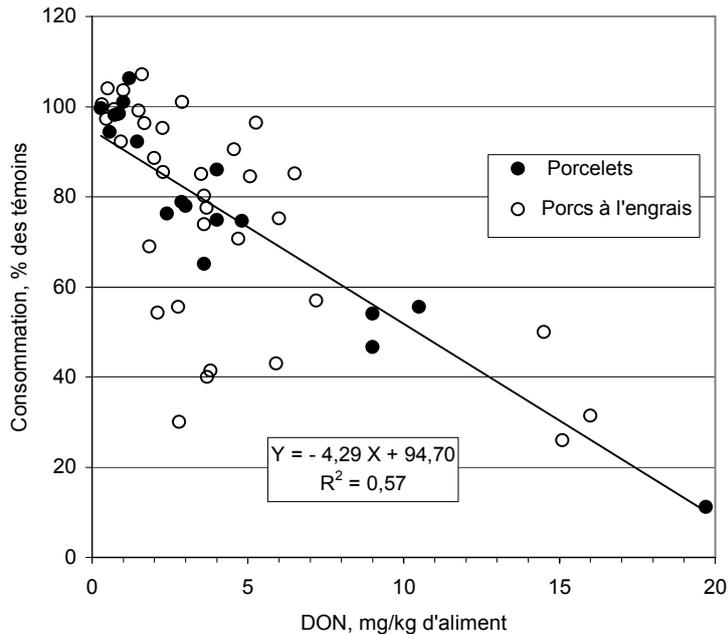


Figure 2 : Effets de la teneur en DON de l'aliment (X) sur la consommation des porcelets et des porcs à l'engrais (Y) (à partir des données de contamination n'excédant pas 20 mg de DON/kg d'aliment obtenues par Forsyth *et al.* (1977), Friend *et al.* (1982, 1984, 1986b,c), Young *et al.* (1983), Lun *et al.* (1985), Pollmann *et al.* (1985), Chavez et Rheume (1986), Foster *et al.* (1986), Bergsjø *et al.* (1992, 1993), He *et al.* (1993), Prelusky *et al.* (1994, 1997), Trenholm *et al.* (1994), Rotter *et al.* (1995), Grosjean *et al.* (2002, 2003), Pinton *et al.* (2004), Goyarts *et al.* (2005)).

Contrairement à ce que son appellation "vomitoxine" laisse supposer, seules des doses élevées de DON provoquent des vomissements, qui sont notamment observés après l'injection intraveineuse de 0,25 ou de 0,5 mg de DON/kg pc (Prelusky *et al.*, 1992; Coppock *et al.*, 1985b) ou à la suite de l'ingestion de 50 µg (Petska *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1999), de 0,1 à 0,2 mg (Forsyth *et al.*, 1977) ou de 0,3 mg de DON/kg pc (Prelusky et Trenholm, 1993), ou après consommation d'un aliment présentant une teneur de 20 mg de DON/kg (Young *et al.*, 1983).

Chez le porc, les effets du DON, et plus généralement des trichothécènes, sur la baisse de l'appétit et les vomissements semblent faire intervenir certains neuromédiateurs. Le DON administré par intubation gastrique (1 mg/kg pc) dans l'estomac apparaît très rapidement dans le liquide céphalorachidien (Prelusky *et al.*, 1990), mais comme les trichothécènes du groupe A, il possède une très faible affinité pour les récepteurs de la sérotonine (Prelusky, 1996). Cependant, certains antagonistes spécifiques des récepteurs de la sérotonine sont très efficaces pour prévenir les vomissements provoqués par le DON (Prelusky et Trenholm, 1993). L'administration de DON à des doses ne provoquant pas de signes cliniques (6 fois 10 µg de DON /kg pc en injection intraveineuse, ou 10 mg DON/j dans l'aliment par infusions intragastriques répétées) entraîne des variations importantes des concentrations de métabolites de la sérotonine et de la dopamine dans le liquide céphalorachidien (Prelusky, 1993). Swamy *et al.* (2004) observent également des modifications des concentrations de neuromédiateurs sérotoninergiques, noradrénergiques et dopaminergiques dans des zones du cerveau de porcs ayant consommé des régimes contaminés par du DON et de l'acide fusarique. L'implication dans ces altérations du tryptophane, précurseur de la sérotonine, a été suggérée (Smith, 1992; Prelusky, 1993). Cependant, Prelusky (1994) ne constate aucune modification des niveaux plasmatiques de sérotonine, d'acide 5-hydroxyindolacétique ou de tryptophane dans le sang périphérique après administration de doses faibles ou élevées de DON par voie intra gastrique ou intraveineuse.

* Effets sur la croissance

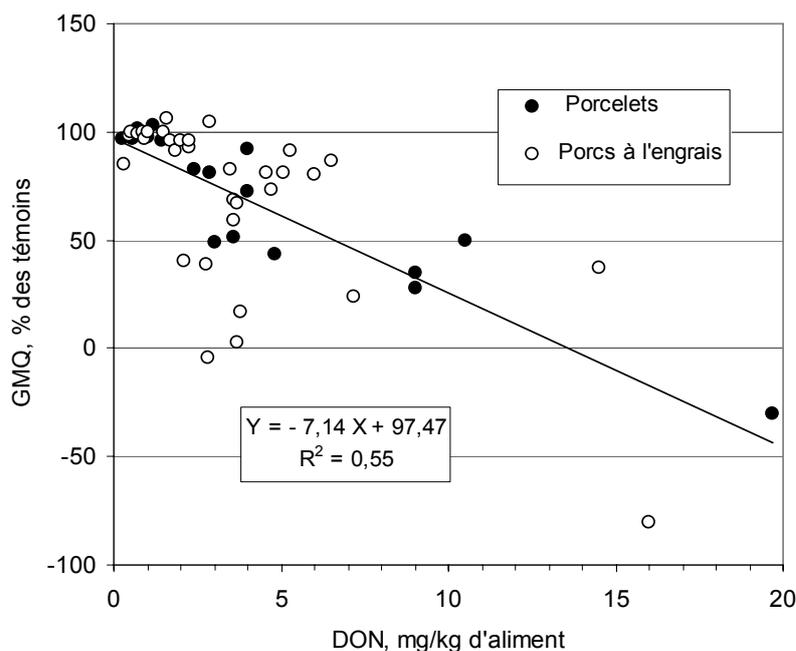


Figure 3 : Effets de la teneur en DON de l'aliment (X) sur la vitesse de croissance des porcelets et des porcs à l'engrais (gain moyen quotidien, Y) (à partir des données de contamination n'excédant pas 20 mg de DON/kg d'aliment obtenues par Friend et al. (1982, 1984, 1986b,c), Young et al. (1983), Lun et al. (1985), Pollmann et al. (1985), Chavez et Rheume (1986), Foster et al. (1986), Bergsjø et al. (1992, 1993), He et al. (1993), Prelusky et al. (1994, 1997), Trenholm et al. (1994), Rotter et al. (1995), Grosjean et al. (2002, 2003), Pinton et al. (2004), Goyarts et al. (2005)).

Parallèlement à la réduction de la consommation alimentaire, la présence de DON dans l'aliment diminue de façon dose dépendante la croissance pondérale du porc. Le regroupement des données de la littérature sur des taux de DON n'excédant pas 20 mg/kg d'aliment montre que la croissance pondérale est réduite d'environ 7% par mg/kg de DON ajouté dans l'aliment (figure 2). Comme pour la consommation alimentaire, l'effet s'atténue généralement à partir de la 2^{ème} semaine si l'aliment renferme moins de 4 mg de DON/kg (Friend et al., 1982; Pollmann et al., 1985; Foster et al., 1986; Bergsjø et al., 1992; Rotter et al., 1994), mais il persiste jusqu'à l'abattage si les teneurs sont plus élevées (Bergsjø et al., 1992, 1993). La réduction de la vitesse de croissance de porcs dont la consommation alimentaire est diminuée, soit parce qu'ils consomment un aliment contaminé par le DON, soit parce qu'ils sont rationnés (animaux pair-fed), est similaire (Lun et al., 1985; Chavez et Rheume, 1986; He et al., 1993; Rotter et al., 1995; Goyarts et al., 2005). L'effet du DON sur la croissance des porcs résulterait donc directement d'une moindre consommation d'aliment sans que leur métabolisme soit affecté, bien qu'un effet moindre d'une contamination de 3 mg de DON/kg d'aliment par rapport au rationnement ait été rapporté Rotter et al. (1994). Par ailleurs, Côté et al. (1985) suggèrent une différence de sensibilité suivant le sexe, la croissance des porcs mâles castrés étant plus affectée que celle des femelles, mais Friend et al. (1986b) n'observent pas de différence significative.

Certains travaux rapportent des effets d'une dose donnée de DON sur l'appétit ou la croissance des porcs plus importants si l'aliment est contaminé par la toxine naturelle plutôt que par la toxine purifiée (Forsyth et al., 1977; Foster et al., 1986; Friend et al., 1986b; Prelusky et al., 1994; Trenholm et al., 1994). L'explication généralement avancée est que bien qu'aucune mycotoxine autre que le DON n'ait été retrouvée dans les aliments contaminés, d'autres substances toxiques, telles l'acide fusarique (Smith, 1992), seraient présentes. L'écart pourrait aussi résulter d'une sous-estimation du taux de DON dans les aliments contaminés en raison de la complexité de la matrice, ou de différences de vitesses d'absorption entre les deux formes.

D'après Dersjant-Li et al. (2003), la baisse de l'efficacité alimentaire serait reliée au ralentissement de la croissance des porcs ingérant du DON. Bergsjø et al. (1992,1993) constatent que l'efficacité alimentaire diminue pendant toute la durée de l'engraissement pour des concentrations de 3,5 et 4 mg de DON/kg. Au contraire, Rotter et al. (1994) rapportent que l'indice de consommation tend à être

amélioré de façon linéaire lorsque la teneur en DON de l'aliment passe de 0 à 2,85 mg/kg ; le DON aurait alors le même effet qu'un rationnement alimentaire modéré. En fait, plusieurs études conduites avec des aliments renfermant jusqu'à 6,5 mg de DON/kg ne montrent pas d'altération de l'indice de consommation (Chavez, 1984; Øvernes et al., 1997; Grosjean et al., 2002, 2003; Goyarts et al., 2005).

Par ailleurs, aucune différence de rétention azotée n'a été rapportée entre des porcs consommant un aliment naturellement contaminé par 3,7 (Dänicke et al., 2004b) ou 5,3 mg de DON/kg (Friend et al., 1986c) et des porcs recevant un aliment sain. Goyarts et al. (2005) observent une amélioration du bilan azoté chez des porcs en croissance lorsque l'aliment renferme 6,5 mg de DON/kg. Cependant, l'effet inhibiteur du DON sur la synthèse protéique a été mis en évidence dans les reins, la rate et l'iléon du porc, mais pas dans le foie, le duodénum et le jéjunum, ni les muscles (Dänicke et al., 2006).

* Effets sur la reproduction

Il existe peu d'études sur les effets du DON sur la reproduction chez le porc. L'examen histologique des testicules et des ovaires n'indique pas d'effet de la consommation pendant 7 semaines d'un aliment contenant 3,7 ou 4,2 mg de DON/kg sur le développement sexuel (Friend et al., 1986b). Chez la truie gestante ou allaitante, la consommation de nourriture n'est pas affectée si les aliments renferment jusqu'à 6,2 mg de DON/kg lorsque les truies sont rationnées (Chavez, 1984; Friend et al., 1986a; Diaz-Llano et Smith, 2006; Etienne et al., 2006), mais elle est diminuée en cas d'accès *ad libitum* à l'aliment (Friend et al., 1983d; Etienne et al., 2006). D'importantes variations individuelles de consommation sont alors observées (Friend et al., 1986a; Etienne et al., 2006). Lorsque la présence de DON réduit l'appétit, le gain pondéral est diminué pendant la gestation (Friend et al., 1983d), et les pertes de poids augmentées pendant la lactation (Etienne et al., 2006). Par contre, si l'appétit n'est pas modifié, ces paramètres ne sont pas affectés. Quel que soit le niveau de contamination, des aliments (étudié jusqu'à 6,2 mg de DON/kg), les performances de reproduction (nombre et poids des porcelets vivants à la naissance, taux de survie et croissance post-natale), ne sont généralement pas affectées. Enfin, seules des traces de DON sont retrouvées dans le lait des mères (Friend et al., 1986a; Etienne et al., 2006).

* Effets sur les paramètres hématologiques et plasmatiques

Les effets du DON sur les paramètres hématologiques et biochimiques (constantes plasmatiques, hormones ou enzymes...) sont peu documentés et parfois contradictoires selon les études: absence d'effet sur la formule sanguine entre 0,28 à 4,5 mg de DON/kg d'aliment (Harvey et al., 1989, 1996; Rotter et al., 1994, 1995; Accensi et al., 2006), modifications épisodiques du nombre d'hématies et de plaquettes, de l'hématocrite (Prelusky et al., 1994) et augmentation du nombre de leucocytes (Rotter et al., 1994) à 3 mg de DON/kg d'aliment, réduction du taux d'hémoglobine pour une teneur de 10,5 mg DON/kg (Lun et al., 1985), diminution du volume globulaire moyen et de la concentration corpusculaire en hémoglobine pour 4,6 mg de DON et 23,4 mg d'acide fusarique/kg d'aliment (Swamy et al., 2002).

L'urémie et la créatinémie ne sont pas affectées pour des teneurs en DON de l'aliment allant de 0,28 à 19 mg/kg (Lun et al., 1985; Chavez et Rheume, 1986; Harvey et al., 1989, 1996; Prelusky et al., 1994; Trenholm et al., 1994; Dänicke et al., (2004b; Accensi et al., 2006). Une diminution des protéines et de l'albumine (Bergsjø et al., 1993) et des taux de protéines, d' α -globuline (Prelusky et al., 1994; Rotter et al., 1994) et de β -globuline sériques (Rotter et al., 1995) ont été rapportées chez des porcs qui consommaient un aliment renfermant de l'ordre de 3,5 mg de DON/kg. Ces modifications pourraient être liées à la diminution de la synthèse protéique provoquée par le DON (Rotter et al., 1995; Eriksen et Pettersson, 2004). Les teneurs en ions du plasma ne sont pas significativement modifiées par la présence de DON dans l'aliment (Prelusky et al., 1994; Accensi et al., 2006; Diaz-Llano et Smith, 2006). L'activité de diverses enzymes hépatiques n'est pas affectée jusqu'à 4 mg de DON /kg d'aliment (Lun et al., 1985; Harvey et al., 1996; Dänicke et al., 2004b; Accensi et al., 2006; Diaz-Llano et Smith, 2006). D'après Rotter et al. (1994), la présence de 3 mg de DON/kg d'aliment augmente la T₄ plasmatique, alors que la T₃ est inchangée.

* Effets sur la fonction immunitaire

Comme pour d'autres mycotoxines, la présence de DON dans l'aliment peut altérer la fonction immunitaire des porcs (Oswald et al., 2005; Oswald, 2007). Dans la plupart des cas, la teneur en IgA du sérum augmente après consommation d'aliments renfermant de 0,6 à 6,5 mg de DON/kg (Grosjean et al., 2002, 2003; Swamy et al., 2002; Drochner et al., 2004; Pinton et al., 2004, 2006; Accensi et al., 2006; Goyarts et al., 2005), à l'exception des études de Bergsjø et al. (1992), Dänicke

et *al.* (2004b) et Goyarts et *al.* (2006) qui n'observent pas ces effets jusqu'à des doses de 5,7 mg/kg d'aliment. Les variations des taux d'IgM et d'IgG sont plus limitées et paraissent moins répétables (Grosjean et *al.*, 2002, 2003; Swamy et *al.*, 2002; Pinton et *al.*, 2004, 2006; Accensi et *al.*, 2006; Goyarts et *al.*, 2006).

Chez des porcs vaccinés par l'ovalbumine, les teneurs en IgA et IgG anti-ovalbumine augmentent davantage lorsqu'ils consomment un aliment contaminé par 2,5 mg de DON/kg (Pinton et *al.*, 2006). Par contre, le titre en anticorps anti-globules rouges de mouton est diminué après ingestion d'un aliment contaminé par 3 mg de DON/kg (Rotter et *al.*, 1994). De même, les porcs consommant un aliment qui renferme 1,8 ou 4,7 mg de DON/kg présentent une réponse anticorps plus faible à la toxine tétanique, mais pas à la sérumbalbumine humaine, aux globules rouges de mouton, au vaccin de la paratuberculose et à la toxine de la diphtérie (Øvernes et *al.*, 1997).

La capacité de prolifération non spécifique des lymphocytes est accrue chez des porcs dont l'aliment renferme de 1,6 à 4,7 mg de DON /kg (Øvernes et *al.*, 1997; Grosjean et *al.*, 2002; Pinton et *al.*, 2004), mais elle n'est pas modifiée dans d'autres études pour des teneurs comprises entre 2,9 et 5 mg de DON/kg (Harvey et *al.*, 1996; Grosjean et *al.*, 2003, 2007). La production de cytokines sanguines ou tissulaires de porcelets qui consomment un aliment renfermant 0,84 ou 3,9 mg de DON/kg n'est pas affectée (Grosjean et *al.*, 2002, 2003).

En ce qui concerne la réponse immunitaire spécifique, la consommation d'un aliment contenant 2,5 mg de DON/kg par des porcelets immunisés par l'ovalbumine provoque une augmentation transitoire de la capacité de prolifération des lymphocytes, suivie d'une immunosuppression (Pinton et *al.*, 2006). Øvernes et *al.* (1997) rapportent une diminution limitée de réponse à la toxine du tétanos chez des porcelets qui consomment des aliments renfermant 1,8 et 4,7 mg de DON/kg. Rotter et *al.* (1994) ne constatent pas de différence après immunisation par des hématies de mouton pour des taux de 1,5 et 3 mg de DON/kg.

Les études *in vitro* révèlent également que le DON modifie certaines fonctions des cellules immunitaires de porcs. Par exemple, un traitement de 2 heures avec 10^{-5} ou 10^{-6} M de DON diminue de 35 et 26% la production de dérivés oxygénés (Takayama et *al.*, 2005). Cependant, une exposition de 18 heures de lymphocytes à 10^{-5} M de toxine n'a pas d'effet sur leur activité chimiotactique. La prolifération des lymphocytes sanguins après stimulation mitogénique par la concanavaline A est inhibée de 50% pour des concentrations de 200 ou 309 ng de DON/mL selon le test utilisé (Goyarts et *al.*, 2006)

* Effets sur divers organes et tissus

En dehors des cas d'intoxication aiguë (Coppock et *al.*, 1985b), l'autopsie ne révèle généralement aucune anomalie des organes analysés jusqu'à des doses de 6 mg de DON/kg d'aliment (Friend et *al.*, 1982, 1983d; Trenholm et *al.*, 1984, Pollmann et *al.*, 1985; Harvey et *al.*, 1996), y compris lorsque l'aliment a été consommé pendant près de 6 mois (Friend et *al.*, 1986a; Etienne et *al.*, 2006). Ont été cependant signalées, une augmentation du poids relatif du foie après ingestion d'aliments renfermant 2,9 à 8,7 mg de DON/kg pendant toute la période d'engraissement (Friend et *al.*, 1986c; Bergsjø et *al.*, 1993; Trenholm et *al.*, 1994) et des reins pour 2,9 et 3,9 mg de DON/kg d'aliment (Friend et *al.*, 1986c; Rotter et *al.*, 1994; Trenholm et *al.*, 1994). Rotter et *al.* (1994) rapportent également une diminution du poids de la thyroïde de porcelets qui consomment un aliment contenant 3 mg de DON/kg.

L'examen anatomo pathologique du tractus digestif, pratiqué dans de nombreuses études, met en évidence des effets relativement limités pour des teneurs en DON de l'aliment allant de 0,6 à 19 mg/kg: décoloration de la muqueuse stomacale (Friend et *al.*, 1982, 1984), accroissement des plissements de la zone oesophagienne ou fundique de l'estomac (Rotter et *al.*, 1992, 1994, 1995; Trenholm et *al.*, 1984, 1994), épaissement et kératinisation (Trenholm et *al.*, 1984), ou au contraire amincissement et érosion de la muqueuse de la zone oesophagienne (Trenholm et *al.*, 1994). Dans d'autres études, aucune modification n'est rapportée pour une consommation d'aliments contaminés contenant jusqu'à 4,7 mg de DON/kg pendant plusieurs mois (Friend et *al.*, 1983d; Øvernes et *al.*, 1997). Cependant, Côté et *al.* (1985) rapportent une congestion vasculaire avec une érosion minime des muqueuses de l'estomac et de l'intestin grêle, ainsi qu'une dégénérescence et une déplétion lymphoïde faible à modérée des plaques de Peyer et des nodules lymphatiques chez des porcelets consommant un régime renfermant de 0,7 à 5,8 mg de DON/kg pendant 4 semaines.

* Transfert dans les tissus animaux

Absorption

Le DON est largement et rapidement absorbé chez le porc: à partir de bilans digestifs ou après administration intragastrique de DON marqué, comme l'atteste l'excrétion urinaire de 67 ou 68% de la toxine et de son dérivé déépoxyde DOM-1 (Friend et al., 1986c; Prelusky et al., 1988) ainsi que son apparition dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien dans les 2,5 min suivant l'instillation dans l'estomac (Prelusky et al., 1990). Le pic plasmatique de DON est atteint après 15 à 30 min, et son niveau reste élevé pendant environ 9 h (Prelusky et al., 1988). D'après Dänicke et al. (2004a), le pic est atteint 4,1 h après la consommation d'un aliment qui contient 4,2 mg de DON/kg.

Métabolisme

Le DON n'est pratiquement pas métabolisé par le porc: plus de 95% du DON marqué injecté par voie intraveineuse est excrété sans transformation (Prelusky et al., 1988), et seulement 4 à 8% du DON est retrouvé sous forme de DOM-1 dans l'urine et les fèces (Friend et al., 1986c; Prelusky et al., 1988; Dänicke et al., 2004b). Le DOM-1 n'est pas présent dans la bile (Doll et al., 2003). Le très faible métabolisme du DON chez le porc a été confirmé *in vitro* par Côté et al. (1987). Chez le porc, le DON n'est donc pas activé en un produit plus toxique, ni métabolisé en un composé moins toxique.

La demi-vie du DON dans le plasma est de 2,08 à 3,65 h (Coppock et al., 1985b). Selon Prelusky et al. (1988, 1990), le devenir plasmatique du DON peut être décrit par un modèle à 3 compartiments avec une phase initiale d'épuration rapide (demi-vie de 5,8 ou 5,2 min), suivie d'une phase de distribution plus lente (demi-vie 97 ou 66 min), puis d'une phase d'élimination très lente (demi-vie 510 ou 251 min). La clairance plasmatique du DON est de 1,81 ml/min/kg (Prelusky et al., 1988). Son volume apparent de diffusion, de l'ordre de 1,3 l/kg est beaucoup plus élevé que le volume de liquide extra-cellulaire (environ 0,17 l/kg) (Coppock et al., 1985b; Prelusky et al., 1988, 1990). La toxine serait donc captée par les tissus et largement distribuée dans l'organisme.

Le DON est retrouvé dans tous les tissus du porc dès 20 min après administration intraveineuse de 1 mg de toxine/kg pc (Prelusky et Trenholm, 1991). Les niveaux les plus élevés (1 à 2 µg/g de tissu frais) sont mesurés dans le plasma, les reins et le foie, l'urine et la bile. La graisse, la lymphe, les poumons et les surrénales présentent des teneurs en DON un peu moins élevées (200 à 500 ng/g), tandis que dans la rate, les testicules, le cerveau, le cœur, le muscle, la peau, l'intestin et le pancréas, les concentrations sont bien plus faibles (20 à 165 ng/g). Environ 1/5 des résidus sont retrouvés dans les graisses, ce qui représente 4% de la dose administrée. Ainsi, les profils de distribution du DON chez le porc ne montrent pas de capture ou de rétention importante de la toxine dans les tissus et suggèrent que les résidus de DON ne s'accumulent pas après consommation prolongée d'aliments faiblement contaminés (Prelusky et Trenholm, 1991). Le volume de distribution élevé de la toxine serait dû à sa répartition large dans l'organisme, ainsi qu'à une séquestration rapide, mais limitée et temporaire, dans certains tissus.

Excrétion et résidus

Des études basées sur la consommation d'un aliment contaminé par 5,3 mg de DON/kg (Friend et al., 1986c) ou l'administration intraveineuse de 0,3 mg de DON/kg pc (Prelusky et al., 1988) montrent que l'excrétion du DON est principalement urinaire (90 à 94% du DON absorbé) une faible fraction étant éliminée dans la bile (3,5%), et seules des traces sont détectées dans les fèces (Friend et al., 1986c). Après administration intra-gastrique de 0,6 mg de DON/kg pc, 68,2% du DON est récupéré dans l'urine, 2,2% dans la bile, et 20,3% dans les fèces (Prelusky et al., 1988). La proportion de DOM-1 dans les contenus digestifs augmente à partir de l'intestin grêle terminal jusqu'à atteindre 80% du total du DON et de ses métabolites dans le rectum (Dänicke et al., 2004a).

Le DON est éliminé rapidement avec environ la moitié en 5,8 h (Dänicke et al., 2004a) et la quasi totalité en 24 h (Prelusky et al., 1988), temps au bout duquel le DON n'est plus détecté que dans le rein. En particulier, on n'en retrouve pas dans les muscles squelettiques (Coppock et al., 1985b) et seules des traces sont retrouvées dans le foie et les graisses (Prelusky et Trenholm, 1991). Chez des porcs ayant consommé pendant 6 semaines un aliment renfermant 2,2 mg de DON/kg, aucune trace de DON n'est retrouvée dans le foie, les reins, le cœur, les poumons ou l'estomac si les animaux n'avaient plus accès à l'aliment pendant les 12 à 15 h précédant l'abattage (Pollmann et al., 1985). Dans le cas contraire, seules des traces de DON sont retrouvées (Côté et al., 1985; Pollmann et al., 1985; Prelusky et Trenholm, 1992).

* Conclusion

Les particularités du métabolisme du DON chez le porc expliquent sa plus grande sensibilité à cette mycotoxine que les autres animaux domestiques: le DON est largement et rapidement, distribué dans l'organisme, et n'est que très faiblement métabolisé. Toutefois, les risques de contamination du consommateur de viande porcine sont quasi-nuls, puisque seules des traces de DON sont retrouvées dans quelques tissus et organes dans les conditions normales d'abattage (cad 12 à 24 heures après arrêt de l'accès à la nourriture). Les principales conséquences de la consommation du DON par le porc sont donc d'ordre zootechnique et liées à la diminution de la consommation d'aliment induite au-delà d'une teneur de 1 mg/kg d'aliment (Tableau 4). Dans le cas de teneurs plus élevées, les interactions éventuelles du DON avec la fonction immunitaire mériteraient cependant d'être approfondies.

Tableau 4 : Principaux effets du DON observés chez le porc

Paramètre	Observations	Teneur en DON (aliment)
Consommation aliment	diminution	si > 1 mg/kg - 4 à - 5 % •mg DON ⁻¹ •kg ⁻¹
Vitesse de croissance	diminution	si > 1 mg/kg - 7 % •mg DON ⁻¹ •kg ⁻¹
Efficacité alimentaire	pas d'effet, voire amélioration	< 3 mg/kg
Rétention azotée	pas d'effet ou diminution	> 3 mg/kg
	pas d'effet	3,7 et 5,3 mg/kg
	amélioration	6,5 mg/kg
Reproducteurs	pas d'effet sur le développement sexuel	4 mg/kg
	↘ consommation alimentaire	2 et 3,5 mg/kg
	↘ réserves corporelles des truies	si consommation diminuée
	pas d'effet sur le poids des porcelets	de 2 à 6,2 mg/kg
	pas d'effet sur le nombre de nés vivants	de 2 à 6,2 mg/kg
	↗ nombre de mort-nés	5,7 mg/kg
	traces de DON dans le lait	2, 3,8, 6,2 mg/kg
Paramètres sanguins	<i>effets limités et épisodiques:</i>	
	↘ des leucocytes	3 mg/kg
	↘ de l'hémoglobine	10,5 mg/kg
	↘ protéines, albumine, globulines	3,5 mg/kg
	↗ T4	3 mg/kg
Fonction immunitaire	↗ très fréquente des IgA totales	entre 1,4 et 6,6 mg/kg
	<i>effets non systématiques pour autres paramètres:</i>	
	↗ ou ↘ des IgG	5,5 et 2,5 ou 1,6 mg/kg
	↗ ou pas d'effet sur prolifération lymphocytes	1,6 à 3,9 mg/kg ou 2,9 et 5 mg/kg
	Parfois après vaccination ou challenge immunitaire:	
	↗ IgA et IgG anti-ovalbumine	2,5 mg/kg
	↘ anticorps anti-SRBC ou toxine tétanique	3 mg/kg ou 1,8 et 4,7 mg/kg
	↘ prolifération spécifique des lymphocytes	2,5, 1,8 et 4,7 mg/kg
Effets sur organes et tissus	<i>effets non systématiques</i>	
	nécrose du pancréas, nodules lymphatiques	0,5 mg/kg PV en i.v.
	↗ poids relatif du foie	entre 2,9 et 8,7 mg/kg
	↗ poids relatif des reins	entre 2,9 et 3,9 mg/kg
	morphologie de l'estomac (plusieurs études)	0,6 à 19 mg/kg

6.1.2 Les volailles

• Effets sur la santé :

Comme dans la plupart des espèces d'élevage, l'intoxication par les trichothécènes peut se manifester chez les volailles sous la forme d'une intoxication aiguë ou chronique. La forme aiguë est relativement rare mais assez facile à diagnostiquer. La forme chronique est plus difficile à déceler, et souvent suspectée en élevage sans qu'un diagnostic de certitude puisse être toujours établi (Grevet, 2004).

Forme aiguë

Différentes DL 50 des trichothécènes ont été établies chez la volaille. A titre d'illustration, chez le poussin de 1 jour, elles varient de 1,75 à 2 mg/kg poids vif pour la T-2 et le DAS à 140 mg/kg poids vif pour le DON.

Les symptômes de l'intoxication aiguë sont dominés par des troubles nerveux et digestifs (Grevet, 2004). Dans les minutes qui suivent l'administration orale une hyperpnée apparaît, elle s'accompagne de léthargie, tête et ailes basses, avec perte d'équilibre. Les signes nerveux disparaissent rapidement pour faire place aux signes digestifs. Ces derniers se caractérisent par des efforts de déglutition

répétés, la présence de diarrhée et d'un refus total de prise d'aliment et d'eau. La mort survient 3,5-13,5 heures après l'administration de la toxine.

Les lésions sont dominées par un syndrome hémorragique de localisation digestive et musculaire. Dans le cas des scirpénols, des hémorragies massives des réseaux vasculaires du bec et des orteils sont observées. Des ulcérations du ventricule et du proventricule, une nécrose du gésier, et/ou une inflammation accompagnée de congestion généralisée à l'ensemble du tractus digestif sont décrites. L'examen histologique des tissus lymphoïdes révèle une déplétion leucocytaire, une nécrose et d'atrophie de tous les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Chez le poussin d'un jour, une goutte viscérale peut également être observée. Après 7 jours, les survivants ne présentent aucune lésion macroscopique. Il est intéressant de noter que ces études sont les seules à présenter un syndrome hémorragique rappelant celui évoqué dans les premiers rapports concernant des suspicions d'intoxication par les trichothécènes. Les doses massives utilisées, atteignant jusqu'à 8 fois la DL50, ainsi que le très jeune âge des animaux expliquent peut-être cette particularité.

Forme chronique

Comme dans les autres espèces, les symptômes de l'intoxication chronique par les trichothécènes sont particulièrement frustrés : les signes neurologiques et la diarrhée observés lors de l'intoxication aiguë ne sont pas présents et seule une altération des performances (altération de la croissance, de la production d'œufs) parfois accompagnée de lésions radiomimétiques (lésions cutanées rappelant dans leurs aspects macroscopiques une exposition à des radiations ionisantes) peut être mise en évidence. Quelques rares auteurs mentionnent également des anomalies du plumage (il est possible que ces altérations soient plus fréquentes mais non rapportées car peu spécifiques). Un tableau résumant ces effets en fonction de la dose et de la durée d'exposition est fourni pour la toxine T-2 et le DON (tableaux 5a et 5b).

Chez les animaux en croissance, les résultats expérimentaux sont relativement disparates, notamment en ce qui concerne les effets sur le GMQ et l'IC. L'analyse des résultats les plus probants et les plus nombreux démontre une diminution du GMQ et, contrairement à ce qui est observé chez l'espèce porcine, une augmentation de l'IC. Dans plusieurs études, les niveaux de contamination des aliments entraînant une altération du GMQ sont inférieurs à celles qui augmentent l'IC, suggérant un mécanisme diphasique : 1) baisse du GMQ liée à la baisse de consommation alimentaire, 2) baisse du GMQ provoquée par des effets cytotoxiques (tableau 5a et 5b). A doses inférieures, cette toxicité pourrait être masquée par la baisse de consommation alimentaire.

Chez les poules pondeuses, les effets observés sont dominés par un refus partiel de l'aliment sans conséquence significative sur le poids final, mais accompagné d'une chute de ponte (proportionnelle au niveau et à la durée de l'exposition) et la production d'œufs plus fragiles (tableau 5a et 5b). Les poules et coqs de reproduction seraient plus résistants, probablement en raison de réserves énergétiques plus importantes que chez les poules pondeuses d'œufs de consommation. La chute de ponte s'accompagne d'une diminution de l'éclosabilité. L'altération de ce paramètre semble plus importante si ce sont les femelles qui sont exposées et non les mâles. Les palmipèdes seraient plus sensibles que les gallinacés.

Les lésions observées lors d'intoxication chronique par les trichothécènes sont assez évocatrices pour orienter le diagnostic lorsque des troubles zootechniques sont rapportés dans un élevage (tableau 5a et 5b). Les plus utiles sont certainement les lésions cutanées et l'augmentation du poids relatif du gésier. Des lésions des organes lymphoïdes, inconstantes, peuvent également orienter le diagnostic. Il est intéressant de constater que la sévérité des lésions, leur vitesse d'apparition et les doses nécessaires à leurs apparitions varient selon le pouvoir démonécrosant des différents trichothécènes et l'espèce considérée (tableau 5).

Peu d'études font état d'altérations biochimiques ou hématologiques lors d'intoxication par les trichothécènes. Les seules altérations retrouvées régulièrement semblent être une diminution d'activité de la LDH, des PAL, ainsi qu'une baisse des protéines totales et de l'albuminémie, probablement secondaires à une altération des synthèses protéiques.

Tableau 5a : Effets d'une administration prolongée de toxine T-2 chez les volailles

	Espèce Dose* et durée	Manifestations	Références
Performances	P ; 0.2-2 mg/kg ; 3-9 sem.	RAS, sauf augmentation transitoire du GMQ à 0.2 mg/kg les 6 premières semaines.	Chi 1977b, Wyatt 1973
	P ; 2-16 mg/kg ; 2-4 sem. CA ; 0.2-4 mg/kg ; 7 sem	Baisse du GMQ et de consommation alimentaire (latence fonction de la dose)	Chi 1977b, Diaz 1994, Hoelher 1996, Huff 1988, Kubena 1989, Osborne 1982, Richard 1978, Wyatt 1973, Rafai 2000
	PP ; 8 mg/kg ; 8 sem.	Baisse de consommation alimentaire.	Chi 1977a
	P ; 0.2-4 mg/kg ; 9 sem.	Pas de modification de l'IC.	Chi 1977b
	P ; 1-16 mg/kg ; 3 sem.	Pas de modification de l'IC.	Wyatt 1973
	P ; 4-10 mg/kg ; 2-4 sem.	Augmentation de l'IC.	Hoelher 1996, Richard 1978
	PP ; 0.5-1 mg/kg ; 8 sem.	RAS	Chi 1977a
	PP ; 1-10 mg/kg ; 4-8 sem.	Chute de ponte, augmentation du nombre d'œufs infertiles (1 ^{ère} sem.) et chute de l'éclosabilité (à partir de la 3 ^{ème} sem.), proportionnelles à la dose	Chi 1977a, Tobias 1991
	Oie ; 0.2-3 mg/kg** ; 18 j	Chutes de ponte et de l'éclosabilité	Vanyi 1994
	DI ; 2-10 mg/kg ; 4 sem.	Baisse du GMQ	Richard 1978
	P ; 10 mg/kg ; 4 sem.	Augmentation de l'IC.	Richard 1978
Mortalité	CA ; 3-4 mg/kg ; 7 sem.	50%	Rafai 2000
	Oie ; 0.6-3 mg/kg** ; 18 j.	10-70%	Vanyi 1994
Peau muqueuses et	CA ; 0.2-4 mg/kg ; 7 sem.	L : nécrose cutanéomuqueuse de la langue, du palais, des commissures de la bouche et du pharynx pour les doses les plus fortes.	Rafai 2000
	DI ; 10 mg/kg ; 4 sem.	L : nécrose cutanéomuqueuse de la cavité buccale	Richard 1978
	PP ; 0.5-8 mg/kg ; 4-8 sem.	L : nécrose cutanéomuqueuse de la cavité buccale	Chi 1977a, Diaz 1994, Kubena 1989
	P ; 1-16 mg/kg ; 3-9 sem.	L : nécrose cutanéomuqueuse de la cavité buccale à partir de la troisième semaine.	Chi 1977b, Huff 1988, Wyatt 1973
	P ; 0.2-2 mg/kg ; 9 sem.	RAS	Chi 1977b
	P ; 2-10 mg/kg ; 4 sem.	RAS (sauf très légère nécrose chez quelques animaux à 10 mg/kg).	Richard 1978
App. digestif	P ; 8-16 mg/kg ; 3 sem.	S : stéathorrhée, diminution d'activité lipase, RNase, amylase, trypsine.	Osborne 1982
	PP ; 4-8 mg/kg ; 8 sem.	L : ulcère dans la partie antérieure du gésier.	Chi 1977a
Système immunitaire	DI ; 10 mg/kg ; 4 sem.	L : diminution de la taille de la bourse de Fabricius, involution thymique accélérée	Richard 1978
	P ; 8-16 mg/kg ; 3-4 sem.	L : diminution de la taille de la bourse de Fabricius	Richard 1978, Wyatt 1973
	P ; 4 mg/kg ; 3 sem.	L : augmentation du poids de la bourse de Fabricius	Kubena 1989
	CA ; 0.2-4 mg/kg ; 7 sem.	Diminution de la réponse des lymphocytes aux agents mitogènes et blastogènes, dépression lymphocytaire dans les organes lymphoïdes à 3-4 mg/kg.	Rafai 2000

* : sauf précision contraire, les doses de toxine sont exprimées en mg/kg d'aliment.

** : dose exprimée en mg/kg de poids vif.

Tableau 5b : Effets d'une administration prolongée de déoxynivalénol chez les volailles

	Espèce, dose* et durée	Manifestations	Références
Performances	P ; 0.3-1.87 mg/kg ; 4 sem.	RAS	Hulan 1982
	P ; 16 mg/kg ; 3 sem.	Diminution du GMQ (transitoire et avec une période de latence), augmentation de l'IC	Huff 1986, Kubena 1989
	PP ; 0.12-4.9 mg/kg ; 10-24 sem.	RAS, sauf œufs un peu plus petits et fragiles à 0.7 mg/kg pendant 10 sem.	Bergsjø 1992, Hamilton 1984
Mortalité	P ; 0.3-1.87 mg/kg ; 4 sem.	RAS	Hulan 1982
Peau et muqueuses	P ; 16mg/kg ; 3 sem.	L : nécrose cutanéomuqueuse de la cavité buccale	Kubena 1989
	PP ; 0.7-4.9 mg/kg ; 12-24 sem.	RAS	Hamilton 1984
App. digestif	P ; 0.3-1.87 mg/kg ; 4 sem.	RAS	Hulan 1982
	P ; 16 mg/kg ; 3 sem.	L : augmentation du poids relatif du gésier.	Huff 1986
Reproduction	PP ; 0.12-4.9 mg/kg ; 10 sem.	Augmentation de l'incidence de malformations à l'éclosion.	Bergsjø 1992
Système immunitaire	P ; 16mg/kg ; 3 sem.	L : augmentation du poids de la bourse de Fabricius	Kubena 1989
Hématologie	P ; 16mg/kg ; 3 sem.	Diminution du VGM	Kubena 1989
	P ; 16mg/kg ; 3 sem.	Diminution du nombre de globules rouges et de l'hématocrite	Huff 1986
Biochimie	P ; 16mg/kg ; 3 sem.	Diminution de PI-triglycérides et de l'activité de la LDH.	Huff 1986

* : sauf précision contraire, les doses de toxine sont exprimées en mg/kg d'aliment.

• **Toxicocinétique et transfert tissulaire**

L'absorption orale du DON et de la toxine T2 est faible chez les volailles (<10% à 6h). A titre d'exemple, chez la poule pondeuse, après administration par gavage de 0,25 mg/kg PV de DON, le pic plasmatique moyen est observé à 2,25 heures et la biodisponibilité moyenne est de 0,64 %, de grandes variations interindividuelles étant notées (Chi *et al.*, 1978b, Giroir *et al.*, 1991, Prelusky *et al.*, 1986a).

Comme dans les autres espèces, la distribution des trichothécènes est large et rapide (tableau 5c). Les concentrations tissulaires maximales en DON, T-2 et leurs métabolites sont observées à 3 heures pour le foie et les reins et à 4-6 heures pour le muscle, le tissu adipeux et l'oviducte. Les concentrations les plus importantes se retrouvent dans le tractus digestif antérieur, le rein, le foie, la vésicule biliaire et la rate. Les profils de distribution plasmatique ne montrent pas de pic secondaire révélateur d'un cycle entéro-hépatique (Chi *et al.*, 1978a, Prelusky *et al.*, 1986a).

Lors d'administrations répétées (tableau 5d) les teneurs maximales tissulaires en DON sont atteintes rapidement et restent sensiblement constantes sur la durée de l'exposition. Les concentrations les plus importantes sont observées dans les mêmes organes que lors d'administration unique (Prelusky *et al.*, 1986a). Une administration prolongée de trichothécènes entraîne leur persistance à des niveaux supérieurs à une administration unique ; décroissance des résidus est aussi plus lente (tableaux 5c et 5d).

Tableau 5c : Résidus en équivalent-toxine suite à une administration unique

Toxine	Espèce	Voie	Dose (mg/kg PV)	Tissus	Résidus (µg/kg)					t _{1/2}	Références
					6 h	12 h	24 h	2 j	4 j		
DON	Poule	VO	1.3-1.7	muscle	8.46	6.6	4.3	2.1	ND	15.7 h 8.2 h	Prelusky <i>et al.</i> , 1986a
				foie	74	56	30	13	ND		
				reins	165	123	44	19	2		
T-2	Poulet	VO	0.126/1.895	muscle			17/220				Chi <i>et al.</i> , 1978a
				foie			32/416				
				reins			24/327				
	Poulet/ Canard	VO	5	muscle	30	30	<10	<10			Giroir <i>et al.</i> , 1991
				foie	130/90	30/40	10/<10	<10			
				reins	30	20	<10	<10			

ND : non détectable

Tableau 5d : Résidus en équivalent-toxine suite à une administration prolongée

Toxine	Espèce	Voie	Durée	Dose	Tissus	Résidus (µg/kg)						Références
						2j	4j	6j	8j	10j	12j	
DON	Poule	VO	6 j	1.3-1.7 mg/kg PV	muscle	16	17	10	11	7	3	Prelusky <i>et al.</i> , 1986a
					foie	37	41	39	25	15	9	
					reins	60	51	55	21	15	9	
	Poulet	VO	28-190 j	5 mg/kg d'aliment	muscle	<10					El-Banna <i>et al.</i> , 1983	
			foie									
			reins									

Le métabolisme des trichothécènes chez la volaille est intense. Si *in vitro*, les microsomes hépatiques de poulet semblent moins actifs que ceux des mammifères pour biotransformer la toxine T-2 (Knupp *et al.*, 1987b, Kobayashi *et al.*, 1987), le profil métabolique de cette toxine dans les excréta de canard et de poulet 18 heures après une injection intra-péritonéale témoigne d'un métabolisme intense avec 41% de 3'-OH-HT-2, 18% de HT-2, 16.5% de 3'-OH T-2, 10% de 4-déacétylnéosalaniol, 5% de 4-acétoxy T-2 tétraol et des traces de T-2 tétraol, 8-acétoxy T-2 tétraol, T-2, T-2 triol et 3-acétoxy-3'-OH HT-2 formés (Visconti et Mirocha, 1985). Dans le foie, la toxine T-2 non métabolisée est la plus abondante, suivie du 3'-OH HT-2, suivi dans des quantités moindres de HT-2, T-2 triol et de traces de 4-déacétyl-néosalaniol, 4-acétoxy-T-2 tétraol, T-2 tétraol et T-2 (Giroir *et al.*, 1991, Visconti & Mirocha, 1985).

La flore digestive de poulet est très active dans la métabolisation du DON en DOM-1. Ainsi, au terme d'une culture en anaérobiose de 96 heures, seulement 1,8 % du DON n'est pas transformé en DOM-1 (He *et al.*, 1992, 1993), alors que 57 % du DAS sont métabolisés en MAS et en STO (Swanson *et al.*, 1988).

L'élimination des trichothécènes est rapide (plus de 50% en 24 heures) et essentiellement fécale. Chez le poulet et le canard, 30 minutes après gavage par 0,5 mg/kg poids vif de toxine T-2 radiomarquée, la radioactivité se concentre dans la bile pour atteindre un maximum au bout de 12 heures, alors que les teneurs rénales restent faibles. L'excréta contient 25 % de toxine au bout de 6 heures et 60 % au bout de 24 h. Au terme de ces 24 heures, le gros intestin et les caeca contiennent encore 25 % de la quantité de toxine administrée (Chi *et al.*, 1978a, Giroir *et al.*, 1991). L'élimination du DON se décomposerait en deux phases : une phase d'excrétion très rapide, durant environ 3 heures, et une phase d'élimination plus lente de 6 heures. Au-delà, seules des traces de toxines sont encore détectées dans le plasma. Au bout de 48 heures, la toxine et ses métabolites ne sont plus détectables. La bile semble la voie d'excrétion majeure du DON. La toxine s'y concentre très rapidement (excrétion maximale à 12 heures, avec une concentration 100 fois supérieure à la concentration plasmatique). Les concentrations en DON et ses métabolites sont faibles dans les autres organes ou tissus, y compris le rein (Prelusky *et al.*, 1986a).

La production d'œufs constitue pour les volailles une autre forme d'excrétion des trichothécènes. Essentiellement sous forme métabolisée, cette excrétion est quantitativement minime après d'administration unique. Ainsi, chez la poule, après administration de 0,25 mg/kg PV de toxine T-2 par intubation gastrique, le maximum d'excrétion dans l'œuf est atteint à 24 heures et ne représente que

0,175 % de la dose administrée . Après 2 et 7 jours, l'œuf ne contient respectivement plus que 0,1 et 0,025 % de la dose administrée. La toxine T-2 et/ou ses métabolites sont détectés dans le jaune, le blanc et les enveloppes (Chi *et al.*, 1978b).

Le DON suit le même profil que la toxine T-2. Après une administration orale unique de 1,3-1,7 mg/kg poids vif, le maximum atteint dans les parties comestibles de l'œuf à 24 heures est de 1,91 µg de DON et de ses métabolites, soit 0,087 % de la dose administrée. Après 2 et 4 jours, la teneur s'élève respectivement à 0.058 et 0.0049 %. La radioactivité spécifique à 24 heures est maximale dans le blanc, suivi des enveloppes et du jaune (dans un rapport de 1:5 environ par rapport au blanc). Seulement 10 % de la toxine se trouve sous sa forme originelle (Prelusky *et al.*, 1987a).

Lors d'administration chronique, même si les quantités excrétées dans les œufs sont plus importantes, elles restent modérées. Chez des poules, l'administration orale journalière de 0,1 mg/kg poids vif de toxine T-2 pendant 8 jours, entraîne une accumulation de la toxine et/ou ses métabolites dans le jaune alors qu'un plateau est atteint pour le blanc et les enveloppes au bout de 3 jours. A l'arrêt de l'exposition, la concentration en toxine diminue très rapidement dans toutes les parties de l'œuf. En moyenne, le niveau de contamination des parties comestibles de l'œuf serait de 0,9 µg avec un aliment contaminé à hauteur de 1,6 mg/kg, ce qui représente 0,56 % de la dose de toxine T-2 administrée quotidiennement (Chi *et al.*, 1978b).

Les résultats obtenus lors d'administration d'un aliment contaminé par du DON diffèrent peu de ceux obtenus avec T-2. La distribution pendant 65 jours d'un régime contaminé à hauteur de 5,5 mg/kg de DON détermine une contamination maximale de l'œuf au 8^{ème} jour après une accumulation plus rapide et plus forte dans le jaune que dans le blanc. Un œuf contient alors 1,7 µg de DON et de ses métabolites, soit 0,31 % de la dose quotidienne apportée. Seulement 0-10 % de la toxine se trouve encore sous sa forme originelle. La présence du DON et de ses métabolites diminue sensiblement jusqu'au 30^{ème} jour, pour se stabiliser ensuite : l'œuf n'en contient alors plus que 0.4 µg – soit 0.07 % de la dose quotidienne. Cette baisse pourrait être attribuée à une modification progressive de l'équipement enzymatique de la poule et donc du devenir du DON (El-Banna *et al.*, 1983, Prelusky *et al.*, 1987a, Prelusky *et al.*, 1989).

6.1.3 Les ruminants

La contamination possible des rafles de maïs et du maïs d'ensilage par le DON (Drochner *et al.* 1984 ; Oldenburg *et al.* 1996 ; Dieber et Kofer 1999 ; Hochsteiner et Schuh 2000, 2001) corrobore le risque d'exposition des ruminants. D'après une enquête menée en Allemagne sur le maïs destiné au fourrage (196 échantillons), les teneurs en DON étaient supérieures à 300 µg/kg pour 59% des échantillons, à 2000 µg/kg pour 9,2% et à 5000 µg/kg pour 2,6% (Oldenburg et Höppner, 2003).

Les fourrages traditionnels utilisés au pâturage ou stockés sous forme humide (ensilage, balles enrubannées) ou sèche (foin, herbe déshydratée) peuvent être contaminés par *Fusarium* spp. produisant du DON (Di Menna et Parle, 1970). La synthèse de DON peut cependant être considérée comme négligeable lors de la conservation des fourrages (Burmeister *et al.* 1965) puisque les conditions nécessaires au développement de ces champignons (aérobiose, présence d'eau libre) ne sont pas réunies simultanément.

• Effet sur l'état sanitaire et les performances des ruminants

Chez des vaches laitières taries , recevant du concentré à base de blé naturellement contaminé par 1,5 à 6,4 mg/kg de DON pendant 10 semaines, une diminution de la consommation de nourriture est observée à la plus forte concentration et un retour à la normale est obtenu après distribution du concentré contenant 1,5 mg/kg de DON ; dans cette étude, la présence d'autres toxines n'a pas été recherchée (Trenholm *et al.*, 1985). La consommation de maïs artificiellement contaminé par *Fusarium graminearum* (jusqu'à 66 mg/kg de DON dans la ration) ne modifie pas la consommation alimentaire, ni la production de vaches en lactation (Côté *et al.*, 1986b). D'après Whitlow *et al.* (1994), le DON peut entraîner une baisse significative de la production laitière de la vache, en partie explicable par une diminution des quantités d'aliments ingérés. Cependant, dans une expérimentation utilisant de l'orge contaminé, Ingalls (1996) n'observe pas d'effet significatif du DON sur les quantités d'aliments ingérées, sur le poids vif des animaux, sur la production ou la composition du lait ni sur le pH du contenu ruminal.

La concentration des acides gras volatils dans le rumen qui traduit l'efficacité des fermentations, n'a pas été modifiée par l'ingestion de blé contenant 3,1 et 3,5 mg/kg de DON. Selon l'EFSA (2004), la

distribution d'un concentré contenant 5,0 à 12,1 mg DON/kg de matière sèche n'aurait pas d'effet sur la consommation d'aliments ni sur la production laitière.

Des essais similaires ont été conduits sur des moutons en croissance. Chez des agneaux nourris pendant 28 jours avec un blé contenant 15,6 mg de DON/kg, aucune modification de la consommation de nourriture, ni des performances zootechniques n'a été observée (Harvey *et al.*, 1986). En revanche, une dose de 5 mg de DON par/kg p.c. introduite directement dans le rumen de moutons a entraîné une diminution de 44% de la consommation alimentaire et de 5% de la digestibilité de la ration (Brewer *et al.*, 1996). Toutefois, ces conditions extrêmes (dose unique et élevée de toxine pure) ne sont pas représentatives de conditions susceptibles d'être rencontrées sur le terrain.

Le ruminant semble relativement bien protégé contre le DON jusqu'à la dose de 12 mg/kg d'aliment (Eriksen et Pettersson, 2004).

Peu d'études ont été réalisées sur les effets de la T-2 chez les ruminants. Comme la déépoxydation de T-2 dans le rumen réduit fortement sa toxicité (Swanson et Corley, 1989), le jeune animal dont le rumen n'est pas fonctionnel pourrait être plus sensible. Chez de jeunes veaux, une contamination de l'ordre de 20 mg T-2 /kg d'aliment a entraîné des refus d'aliment, des diarrhées, des pertes de poids, ainsi qu'une diminution de la taille du thymus et des surrénales (Osweiler *et al.*, 1985).

En conclusion, les études menées montrent que l'état sanitaire et les performances zootechniques du ruminant ne semblent pas altérés lors de l'ingestion d'une teneur en trichothécènes d'une dizaine de mg/kg d'aliment.

- Devenir dans le rumen

Les microorganismes du rumen dégradent le DON en ouvrant le cycle –époxy pour former le diène 12,13-déépoxydéoxynivalénol ou DOM-1 (King *et al.*, 1984 ; Côté *et al.*, 1986a). Cette bioconversion du groupement –époxy (responsable de la toxicité) est effectuée par une époxyde réductase microbienne, entraîne une diminution significative de la toxicité du DON chez le ruminant. Selon Ueno (1980), l'époxyde réductase impliquée serait de type –thiol, groupement très actif vis à vis des groupements –époxy.

Le carbone-4 de La toxine T-2 est rapidement déacétylé dans le rumen pour former la toxine HT-2 qui est ensuite déacétylée au niveau du carbone-15 en T-2 triol (Yoshizawa *et al.*, 1981, 1985). L'isovaléryl-déacétylation du carbone-8 forme le néosolaniol (Westlake *et al.*, 1987). Les voies de bioconversion ruminale des trichothécènes sont résumées dans la figure 2. 90% de la déacétylation du DAS et de la T-2 provient de l'activité des protozoaires (Hussein et Brasel, 2001). Ainsi les protozoaires jouent un rôle plus important que les bactéries dans le métabolisme des trichothécènes dans le rumen (Westlake *et al.* 1989).

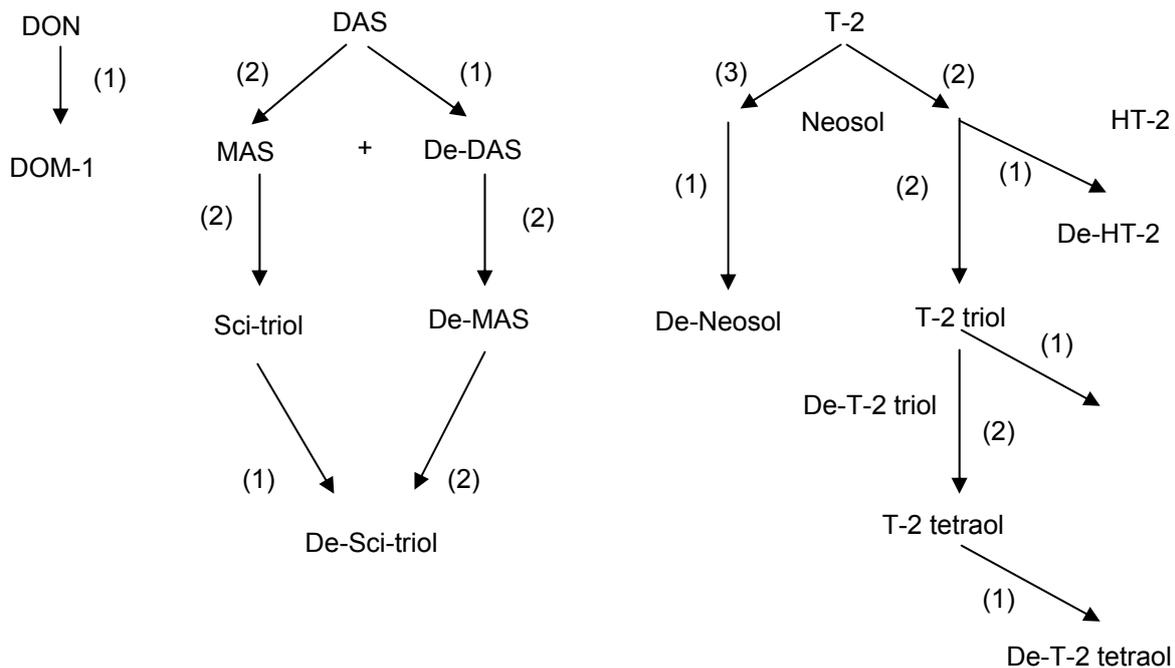


Figure 4 : Voies métaboliques possibles de transformation des trichothécènes dans le rumen (schéma de Mackie et White 1990 modifié par Jouany)

DON = deoxynivalenol; DOM-1 = deepoxy deoxynivalenol; DAS = diacetoxyscirpenol; MAS = monoacetoxyscirpenol; De-DAS = deepoxy diacetoxyscirpenol; Sci-triol = scirpentriol; De-MAS = deepoxy monoacetoxyscirpenol; De-Sci-triol = deepoxy scirpentriol; Neosol = neosolaniol; De-HT-2 = deepoxy HT-2; De-Neosol = deepoxy neosolaniol; De-T-2 triol = deepoxy T-2 triol; De-T-2 tetraol = deepoxy T-2 tetraol. [reactions of deepoxidation (1), deacetylation (2), isovaleryl deesterification (3)].

Les bactéries du rumen qui possèdent une activité estérase comme *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium* et *Anaerovibrio lipolytica*, sont vraisemblablement impliquées dans les réactions de déacétylation ruminale. Westlake *et al.* (1987) a notamment montré que la croissance de *B. fibrisolvens* en culture n'est pas affectée par 1 mg/mL de T-2. Aucun effet du DON (100 µg/mL) n'a été mis en évidence sur les deux bactéries du rumen *Ruminococcus albus*, qui joue un rôle déterminant dans la cellulolyse et produit de l'hydrogène et *Methanobrevibacter ruminantium* qui utilise cet hydrogène (May *et al.*, 2000).

• Absorption et excrétion chez les ruminants : cas du lait

Les propriétés physicochimiques du DON, faible poids moléculaire (296,3), hydrosolubilité (liée à la présence d'une fonction -alcool primaire et deux fonctions -alcools secondaires), expliquent sa vitesse d'absorption et son taux d'excrétion.

Chez deux vaches ayant reçu une dose orale unique de 920 mg de DON, les concentrations sanguines maximales étaient respectivement de 200 et 90 ng/mL 4,7 et 3,5 h après l'administration, et inférieures à 2 ng/mL après 24 h (Preluski *et al.*, 1984). La forme libre et la forme conjuguée représentent respectivement 24 et 46% du DON sanguin. En première approche, l'absorption du DON et de ses métabolites est estimée à 30% sur 24 heures. Les quantités extrêmement faibles détectées dans le lait (≤ 4 ng/mL) ont conduit les auteurs à considérer le DON ingéré n'est pas significativement transféré dans le lait. Des résultats similaires ont été obtenus par Côté *et al.* (1986b) : après distribution pendant 5 jours de maïs d'ensilage naturellement contaminé par du DON (66 mg/kg d'aliment) à trois vaches laitières, environ 20% du DON est excrété sous forme de déépoxy DON non conjugué (96%) et de DON (4%) dans l'urine et les fèces où ils ne sont plus détectés au-delà de 72 h ; dans le lait, aucune trace de DON libre n'a été détectée (LOD = 1 ng/ml) seules des concentrations de DOM-1 déépoxylé, à hauteur de 26 ng/mL ont été décelées pendant les cinq jours du traitement. Dans 3 lots de 6 vaches laitières, recevant respectivement 0, 3 et 6 mg de DON/kg pendant 10 semaines (blé et des épis de maïs naturellement contaminés), aucun transfert de DON ou de DOM-1 n'a pu être détecté dans le lait (Charmley *et al.*, 1993). Preluski *et al.* (1987b) en utilisant du 14 C-DON

chez des brebis ont indiqué la présence de DON ou de son métabolite conjugué dans le lait était réduite.

Ainsi, le transfert du DON ingéré dans le lait des ruminants n'est pas significatif. La présence du DOM-1 dans le lait ne présente pas de risque pour le consommateur compte tenu de l'excrétion réduite et de la toxicité faible de ce métabolite du DON.

Selon Eriksen et Pettersson (2004), la toxine T-2 serait très peu présente dans le lait commercialisé.

En conclusion, les données disponibles conduisent à considérer que le transfert des trichothécènes dans le lait de ruminants est négligeable et ne poserait pas de problème de santé publique.

6.1.4 Animaux de compagnie et de loisirs

Les animaux de compagnie et de loisirs ne diffèrent pas fondamentalement des animaux domestiques d'élevage en matière d'exposition et d'effets des mycotoxines, mais ils présentent une différence notable en rapport avec la durabilité de l'action toxique inhérente à leur longue espérance de vie. Pour ces espèces, il s'avère donc particulièrement pertinent de déterminer non seulement l'impact de consommation de faibles doses de TCT sur de très longues périodes avec ses répercussions sur la fonction sanguine, l'intégrité des épithéliums, la fonction hépatique, la fonction de reproduction ou la baisse d'immunité, mais aussi le risque ponctuel lié à des contaminations massives associés à un tableau clinique plus évident.

Les équidés

Les données disponibles sur la sensibilité des équidés consommant des aliments contaminés par les TCT sont de mieux en mieux documentées, notamment celles relatives au DON.

Toxine T-2 chez le cheval

Deux cas anciens d'intoxication par la toxine T-2 sont rapportés dans la littérature. Le premier concerne deux chevaux ayant consommé un aliment contenant de l'orge contaminée par la toxine T-2 (25 mg/kg) en Colombie Britannique (Greenway et Puls, 1976) et qui ont présenté une apathie, une hypersialorrhée et de l'hyperthermie. Le second concerne 30 chevaux adultes ayant consommé un mélange à base de maïs grain, de rafle de maïs et de son de blé contenant 204 mg/kg de toxine T-2, parmi lesquels 12 succombèrent dans un délai maximum de 4 semaines après avoir présenté des troubles locomoteurs graves. Des modifications importantes de la formule sanguine (leucocytose, anémie) et une dégénérescence graisseuse du foie furent notamment observées (Gabal et al., 1986). Par ailleurs, chez 6 juments, l'administration *per os* de 7 mg de toxine T-2 par jour pendant 30 à 42j, n'a permis d'observer qu'une dermatite périlabiale régressant rapidement à la fin de l'essai chez 3 des juments. Aucun effet délétère sur l'activité ovarienne et la fonction de reproduction n'a été observé (Juhasz et al., 1997).

DON perte de poids et atteinte hépatique chez le cheval

Dans une étude récente portant sur 5 chevaux adultes, aucune dépression de l'appétit, ni altération plasmatique ou hématologique notables n'ont été observées après consommation durant 40 jours, en complément du pâturage, de 1,3 kg d'orge naturellement contaminée par 36 à 44 mg/kg de DON (soit environ 50 mg / animal / jour) (Johnson et al. (1997). Par contre, dans un essai de 21 jours durant lequel des chevaux adultes ont consommé 2,8 kg/j de concentrés à base de céréales (blé et maïs) naturellement multicontaminés (15 mg/kg de déoxynivalénol soit environ 40 mg / animal / jour ; 0,8 mg/kg de 15-acétyldéoxynivalénol ; 9,7 mg/kg d'acide fusarique et 2 mg/kg de zéaralénone), une baisse significative de la consommation du concentré, ainsi qu'une augmentation transitoire de la gamma-glutamyl transférase plasmatique, signe d'une atteinte hépatique précoce, ont été relevées (Raymond et al., 2003). Le même type de protocole, conduit sur des chevaux consommant 3,5 kg/j de concentrés à base de céréales (blé et maïs) naturellement multicontaminés (11 mg/kg de déoxynivalénol soit environ 40 mg/animal/jour ; 0,7 mg/kg de 15-acétyldéoxynivalénol et 0,8 mg/kg de zéaralénone) a montré des résultats analogues, notamment une baisse significative de la consommation d'aliments et une perte de poids au terme des 21 jours de l'essai (Raymond et al., 2005). Peut-être l'acide fusarique, fréquemment associé aux autres mycotoxines dans les céréales multicontaminées, a-t-il accru la toxicité du DON. Cette action potentialisatrice de l'acide fusarique sur la toxicité du DON chez les chevaux a déjà été décrite chez d'autres espèces animales, le porc notamment (Smith et al., 1997).

Les céréales en grains ne constituent pas la seule source de contamination en DON. Ainsi, Zeyner *et al.* (2002) rapportent un épisode de perte de poids survenu sur environ la moitié d'un effectif de 104 chevaux ayant, durant plusieurs mois, eu accès à une litière faite d'une paille d'un stockage de plein champ et contaminée par 0,5 à 2,7 mg/kg de DON. L'atteinte hépatique observée parallèlement et matérialisée par des taux plasmatiques anormalement élevés en acide glutamique déshydrogénase (163 ± 108 ui/L) et en gamma-glutamyl transférase (151 ± 58 ui/L) n'a rétrocedé qu'après retrait de la paille avariée.

En définitive, les chevaux, initialement considérés comme relativement résistants à la contamination par DON, semblent, lors de consommation chronique, présenter une plus grande sensibilité, avec une baisse notable de la consommation alimentaire et une perte significative de poids. La disparité des niveaux de contamination associés à l'observation de désordres cliniques tient sans doute à des synergies entre les diverses mycotoxines produites par le *Fusarium*, généralement présentes et non toujours systématiquement recherchées. En consommation chronique, un seuil critique de 2 mg/kg de DON semble devoir ne pas être dépassé dans les aliments pour les équidés.

Les carnivores domestiques

De fréquentes remontées du terrain laissent à penser que les carnivores domestiques (canidés notamment) seraient susceptibles de manifester un refus alimentaire lors de la consommation d'aliments secs contenant des céréales avariées (blé notamment). En 1995, un fabricant d'aliment nord américain a d'ailleurs rappelé 16 000 tonnes d'aliments secs à la suite d'une contamination de ses croquettes par le DON. Une telle mésaventure s'explique d'autant mieux que le DON résiste à la stérilisation, à l'autoclavage, mais aussi à la cuisson-extrusion lors de la fabrication des aliments secs pour chiens ou pour chats (Hughes *et al.*, 1999 ; Wolf-Hall *et al.*, 1999). Aucune donnée de terrain n'est disponible pour les autres TCT (toxines T-2 et HT-2 notamment).

DON et refus alimentaire chez les carnivores domestiques

Hughes *et al.* ont conduit une série d'essais sur chiens et chats en utilisant du blé naturellement contaminé en DON (37 mg/kg). Les aliments secs produit selon un procédé d'extrusion classique ont été formulés pour contenir *in fine* 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg de DON par kg d'aliment.

Dans un essai conduit durant 14 jours sur des chiens, les animaux recevant les aliments dosés à 0, 1, 2 ou 4 mg/kg de DON ont consommé leur ration quasi-normalement et n'ont présenté aucun trouble digestif (vomissement notamment). Les 14 chiens recevant l'aliment contenant 6 mg/kg de DON ont progressivement réduit leur consommation d'aliment, en relation linéaire avec le temps, et perdu régulièrement du poids, mais n'ont pas présenté de vomissements. Le niveau de consommation d'aliments est revenu à la normale après distribution d'un aliment sain. Les 2 chiens recevant l'aliment contenant 8 mg/kg de DON ont très rapidement présenté des vomissements, puis ont fortement réduit leur niveau de consommation (jusqu'à 21% du niveau de référence), ont présenté une chute significative de poids et furent retirés de l'essai au 8^{ème} jour. Les 13 chiens recevant l'aliment le plus fortement contaminé (10 mg/kg de DON), ont majoritairement (en dépit de fortes variations individuelles) présenté des vomissements importants dès le premier jour, et comme les chiens précédents, ont très fortement réduit leur niveau de consommation (jusqu'à 15% seulement du niveau de référence pour certains), et ont perdu du poids. Pour les auteurs, le seuil de chute de la consommation alimentaire se situe chez le chien à $4,5 \pm 1,7$ mg de DON par kg d'aliment (soit 0,09 mg/kg pc/j) et la dose sans effet avoisine 0,06 mg/kg pc/j.

Par ailleurs, les auteurs ont également montré que les chiens initialement exposés à l'aliment contaminé, puis à un aliment sain, refusent ultérieurement de consommer à nouveau (en libre choix) l'aliment contenant du DON.

Dans l'essai conduit sur les chats, les animaux recevant les aliments dosés à 0, 1, 2, 4, 6 ou 8 mg de DON /kg durant 14 jours ont consommé leur ration quasi-normalement, n'ont présenté aucun trouble digestif (vomissement notamment à l'exception d'un cas isolé), mais ont tous perdu du poids (5 à 10 g/j). Les 8 chats recevant l'aliment renfermant 0 mg de DON /kg ont majoritairement, comme les chiens, (avec de fortes variations individuelles) présenté des vomissements importants dès le premier jour, ont fortement réduit leur niveau de consommation (46% seulement du niveau de référence en moyenne), et ont également fortement maigri (22 g/j). Pour les auteurs, le seuil de détérioration de la

consommation alimentaire se situe chez le chat à $7,7 \pm 1,2$ mg de DON par kg d'aliment (soit 0,135 mg/kg pc/j) et la dose sans effet avoisine 0,110 mg/kg pc/j.

En définitive, le DON, toxine fusarienne la plus fréquente, présente une toxicité similaire chez le chien, le chat et le porc, espèce considérée comme la plus sensible. Cependant, si dans les deux espèces carnivores, les vomissements surviennent pour un niveau de contamination de l'ordre de 8 à 10 mg de DON par kg d'aliment, la baisse de la consommation d'aliments peut survenir pour des valeurs plus basses en fonction des individus (3 mg chez le chien et 6 mg chez le chat). L'absence de neutralisation de cette mycotoxine lors du procédé habituel de fabrication des aliments pour carnivores domestiques et la consommation en continu d'un même aliment requièrent une grande vigilance des industriels vis-à-vis des approvisionnements en céréales et dérivés de céréales. Si, sur une courte période, le seuil de détérioration du niveau de consommation alimentaire se situe à 4,5 mg de DON par kg d'aliment chez le chien et à 7,7 mg de DON par kg d'aliment chez le chat, en consommation chronique, un seuil critique de 1 mg/kg de DON semble devoir ne pas être dépassé dans les conditions pratiques d'alimentation des carnivores.

Toxine T-2 chez le chat

La toxine T-2, la plus toxique des TCT, n'a jamais été impliquée dans des accidents de carnivores domestiques. Seules les données d'un essai toxicologique (Lutsky et Mor, 1981) conduit sur des chats pour tenter de reproduire les manifestations bien connues de l'aleucie alimentaire toxique de l'Homme, a été concluante avec mise en évidence du même tableau symptomatologique (aplasie médullaire, pancytopenie, troubles de l'hémostase, etc.) après l'administration *per os* de 0,08 mg/kg pc tous les 2 jours. Les 10 chats du test sont tous morts dans un délai maximal de 32 jours (temps moyen de survie de 21 jours). La sensibilité particulière des félinés vis-à-vis de la toxine T-2 ne serait qu'une preuve de plus de l'incapacité de cette espèce à recourir à la glucuronoconjugaison, voie habituelle de métabolisation de cette toxine.

6.1.5 Les poissons

• Intoxication aux TCT observées sur le terrain :

Comme des céréales sont susceptibles d'être contaminées par les TCT et d'être incorporées dans les aliments pour poissons, telles qu'elles ou après avoir été transformées, les poissons peuvent être exposés aux TCT. A notre connaissance, aucun cas d'intoxication aux TCT en pisciculture n'a été rapporté dans la littérature scientifique.

• Etudes expérimentales menées sur les poissons :

Gogal *et al.* (2000) ont montré l'induction de l'apoptose des cellules immunes (lymphoïdes) chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) après injection péritonéale d'une solution contenant de la toxine T-2, ce qui suggère que les poissons ont une réponse immunologique similaire à celle des mammifères après exposition à un composé immunotoxique.

Aucune autre donnée n'est disponible sur un quelconque effet des trichothécènes sur les poissons.

6.2. Exposition animale

La méthodologie générale est exposée en annexe 2

6.2.1. Données de contamination

2386 valeurs de contamination en DON ont été recueillies, réparties sur 30 types d'aliments. Pour certaines matières premières, ces données ne sont pas exploitables (moins de 5 données, problème de libellé), de sorte que 2343 données de contamination sur 15 types d'aliments sont disponibles.

Tableau 6a : Répartition des données de contamination par groupe de matières premières (n>= 5)

	Nombre de données	% < LOD	% > LOQ
avoine	19	0.0	68.4
blé	795	15.0	76.2
blé dur	267	30.0	64.0
coproduit de blé dur	16	0.0	100.0
corn feed	22	0.0	95.5
féveroles	19	100.0	0.0
gluten feed de blé	84	0.0	100.0
issues de céréales	21	0.0	100.0
maïs	633	3.9	93.4
orge	106	0.9	52.8
paille de blé	10	0.0	100.0
pois	101	94.1	4.0
remoulage	46	0.0	100.0
son	158	0.0	99.4
triticale	46	0.0	73.9
Total	2343	14.5	78.1

Parmi ces données, 14.5% des valeurs sont inférieures à la limite de détection et 78.1% sont supérieures à la limite de quantification.

Les estimations des teneurs > LOQ (moyennes et aux 75^{ème} et 95^{ème} percentiles comme décrit dans la méthodologie générale) sont comparées aux teneurs réglementaires pour les aliments complets (Recommandation 2006/576/CE).

Les données analytiques de « blé dur » provenant de l'enquête ONIC ont été distinguées des autres analyses « blé » : ces 2 matières premières présentent une différence non significative de la moyenne de contamination.. Cependant, toutes les autres sources de données, n'a pas fait de distinction sur le type (dur ou tendre), ce qui a pu avoir une influence sur lamoyenne de contamination reliée au le libellé « blé »..

On retrouve la gradation de la contamination entre les céréales, notamment le classement entre blé, remoulage et son, plus contaminé.

Les statistiques descriptives des niveaux de contamination selon les scénarii indiqués sont fournis en annexe (résultats sont présentés pour les niveaux de contamination en poids frais (12% d'humidité), tel que dans la recommandation.

6.2.1. Calcul de l'exposition

Les calculs de contamination des rations sont indiqués dans les tableaux 6b et 6c suivants (les tableaux détaillés des résultats sont en annexe II) :

Pour les herbivores, ruminants (notamment bovins) : l'exposition n'a pas été calculée car les régimes comportent, pour une très large part, des matières premières pour lesquelles les données de contamination sont manquantes ou insuffisantes (pâturages, ou encore ensilages et autres fourrages) (cf annexe 2 « Exposition animale : Méthodologie générale »).

- Pour les volailles

Espèces	Phases d'élevage	Contamination minimale calculée		contamination des positifs		Rec 2006/576/CE valeurs limites DON en µg/kg d'aliment	
		en µg/kg d'aliment	% de la ration	au p75 en µg/kg d'aliment	au p95 % de la ration		
Poulet standard	démarrage	305.6	58.5	369.8	1249.7	58.5	5000
	croissance	290.0	62.2	342.0	1252.2	62.2	5000
	finition	270.1	62.6	312.3	1212.6	62.6	5000
	retrait	295.3	68.4	341.5	1325.4	68.4	5000
Poulet label	démarrage	416.2	65.8	519.8	1565.6	65.8	5000
	croissance	492.3	77.6	615.7	1849.7	77.6	5000
	finition-retrait	472.2	79.7	597.7	1805.8	79.7	5000
Poule pondeuse	démarrage	404.3	68.8	509.5	1549.7	68.8	5000
	croissance	449.4	76.7	559.9	1730.8	76.7	5000
	repro-entretien	459.3	79.5	575.6	1771.3	79.5	5000
	pondeuse	418.1	65.1	517.0	1568.1	65.1	5000
Dinde	démarrage	200.1	40.9	238.7	844.4	40.9	5000
	croissance 1	188.6	47.5	221.6	871.4	47.5	5000
	croissance 2	221.0	55.0	261.8	1013.1	55.0	5000
	finition 1	280.7	58.3	333.5	1193.7	58.3	5000
	finition 2	250.8	66.0	296.4	1179.0	66.0	5000
	finition 3	269.3	64.3	308.9	1228.6	64.3	5000
Pintade	démarrage	422.2	58.2	548.2	1490.7	58.2	5000
	croissance	480.0	62.5	619.6	1671.5	62.5	5000
	finition-retrait	527.5	65.4	685.3	1804.0	65.4	5000
Canard Barbarie	canard démarrage	359.4	70.4	432.7	1485.9	70.4	5000
	canard croissance	400.4	79.1	481.0	1662.4	79.1	5000
	canard finition	400.0	81.8	476.9	1688.5	81.8	5000
Canard prêt à gaver	élevage	444.8	75.0	551.6	1718.5	75.0	5000
	gavage	825.3	98.0	1078.0	2779.3	98.0	5000

NB : La part de la ration (exprimée en pourcentage) prise en compte dans le calcul de l'exposition varie selon les scénarii :

- dans le cas de la contamination moyenne, elle correspond aux matières premières pour lesquelles on a des données (même si elles sont ND),
- dans le cas des scénarii de contamination aux p75 et p95 des teneurs positives, elle correspond aux matières premières pour lesquelles les teneurs sont supérieures à la LOD.

La contamination est la plus faible pour les dindes ainsi que pour les poulets standard (les pourcentages de la ration pris en compte sont les plus faibles : 55 à 60%). Aucun dépassement de la valeur recommandée n'est observé pour une espèce même aux forts percentiles de contamination. Pour les autres espèces, les pourcentage de la ration pris en compte sont approximativement de 75%.

- Pour les porcs

Tableau 6c : Calculs de contamination en DON des rations pour les porcins

Porcins	Contamination minimale calculée		contamination des positifs			Rec 2006/576/CE valeurs limites DON en µg/kg d'aliment
	en µg/kg d'aliment	% de la ration	en µg/kg d'aliment au p75	au p95	% de la ration	
1er âge	375.4	57.0	474.5	1382.8	57.0	900
2ème âge	349.8	78.0	430.2	1386.9	78.0	900
croissance corpen	324.4	83.0	431.7	1319.4	83.0	900
finition corpen	439.0	87.0	569.8	1679.0	87.0	900
truies gestantes	423.1	85.0	535.5	1564.7	85.0	900
truies allaitantes	419.5	80.0	532.1	1519.8	80.0	900

En fonction de la phase d'élevage, la moitié de la valeur limite recommandée est atteinte que ce soit dans les scénarii de contamination moyenne ou au p75. Au niveau extrême de contamination (p95), tous les régimes sont au dessus de la valeur limite.

Compte-tenu de son régime particulier, seul le calcul pour les porcins 1er âge ne prend en compte que moins de 60% de la ration. Pour les autres régimes, sont pris en compte jusqu'à 85% de la ration totale.

7. Réglementation

Pour l'alimentation humaine, dans le cadre du règlement 1126/2007/CE modifiant le règlement 1881/2006/CE (abrogeant lui même le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, des teneurs maximales ont été fixées pour le DON (tableau 7a). Aucune teneur n'a été fixée pour NIV, T-2 et HT-2 dans les denrées alimentaires. La fixation de ces teneurs maximales a été reportée pour permettre de collecter davantage de données sur la présence de ces toxines dans les produits végétaux.

Pour l'alimentation animale, aucune teneur maximale en trichothécènes n'est fixée dans les matières premières et les aliments pour animaux. Cependant, la Commission recommande⁸ d'appliquer des teneurs maximales en DON dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation animale (tableau 7b).

⁸ Recommandation 2006/576/CE de la Commission du 17 août 2006 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.

Tableau 7a : Teneurs maximales en DON dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg

Denrées	Teneur maximale en µg/kg
Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1 250
Blé dur et avoine bruts	1 750
Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide (*)	1 750
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 7, 8 et 9	750
Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500
Pâtes (sèches)	750
Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est > 500 microns 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 > 500 microns on destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 1904 10 10	750
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns auxquelles s'applique le code NC 1102 20 et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns on destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 1904 10 10	1 250

(*) 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 7b : Teneurs maximales en DON dans les aliments pour animaux selon la recommandation 2006/576/CE du 17 août 2006 :

Produits	Teneur maximale recommandée en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux :	
• Les céréales et produits à base de céréales, excepté les sous-produits du maïs	8000
• Les sous-produits du maïs	12000
Aliments complémentaires et complets excepté :	5000
• Les aliments complémentaires et complets pour les porcs	900
• Les aliments complémentaires et complets pour les veaux (<4mois), les agneaux et les chevreaux	2000

La recommandation indique que ces valeurs sont déterminées pour les espèces animales les plus tolérantes précisant ainsi que ces valeurs doivent être considérées comme des valeurs de référence supérieures.

8. Surveillance et contrôle en France

La contamination en T-2, HT-2 et DAS a été recherchée dans les céréales brutes (blé, orge, maïs) prélevées au champ ou en silo sur plus de 570 échantillons. Plus de 95 % des échantillons présentent des teneurs inférieures à la LOQ de 20 µg/kg. Plus de 75% des échantillons de céréales brutes présentent des teneurs en NIV inférieures à la LOQ (20 µg/kg). La contamination moyenne est

comprise entre 12 et 36 µg/kg, avec des valeurs maximales pouvant atteindre 485 µg/kg (cas du maïs prélevé au champ).

Dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle des services de l'Etat (Direction Générale de l'Alimentation – DGAL- et Direction Générale de la Consommation de la Concurrence et de la Répression des Fraudes- DGCCRF-), différents trichothécènes ont été recherchés sur des céréales brutes et des aliments prêts à consommer. Dans les cas de non-conformité, les actions correctives sont entreprises. Bien que les denrées prélevées au sein des catégories d'aliments réglementées soient de nature et d'origine variables selon les années, il peut néanmoins être dégagé les grandes tendances de conformité suivantes :

Concernant les céréales brutes, les plans (2004, 2005, 2006, 2007) conduits après les récoltes de 2003 à 2006, montrent que la contamination des orges, blés et maïs en trichothécènes non réglementés : DAS, toxine T2, toxine HT2, et NIV est faible. Avec une LOQ de 20 µg/kg pour chacune de ces quatre mycotoxines, aucun échantillon ne présente une teneur en DAS supérieure à la LOQ. Les toxines T2 et HT2 sont plus fréquentes car seulement 94% des orges, 94% des blés et 82% des maïs présentent des teneurs en toxine T2 inférieures à la limite de quantification, et 78% des orges, 91% des blés et 80% des maïs présentent des teneurs en toxine HT2 inférieures à la limite de quantification. Le nivalénol est plus présent que ces mycotoxines précédemment citées puisque seulement 76% des orges, 66% des blés et 51% des maïs ont des teneurs en nivalénol inférieures à la limite de quantification.

Ces plans montrent que le niveau de contamination en DON, seul trichothécène réglementé, est plus important et qu'il est variable selon la céréale. En effet, sur 192 échantillons d'orge, 286 de blé, et 223 de maïs, par rapport aux limites de conformité (voir réglementation au § précédent) aucun échantillon d'orge ne dépasse 1250 µg/kg, alors que 96% des échantillons de blé ne dépassent pas 1250 µg/kg et que 97% des échantillons de maïs ne dépassent pas 1750 µg/kg. Par ailleurs, la contamination est variable selon les années.

Les formes acétylées du DON (3aDON et 15aDON) sont quasiment absentes dans les blés et orges puisque près de 99% des échantillons ont une teneur inférieure à la LOQ ; par contre, ces formes acétylées ont été trouvées sur maïs, 65% des échantillons ayant une teneur en 3aDON supérieure à la LOQ et 53% ayant une teneur en 15aDON supérieure à la LOQ.

Concernant les aliments transformés (y compris les aliments pour nourrissons), les plans de contrôle n'ont montré aucune non conformité.

9. Conclusion - Recommandations

Les TCT sont des mycotoxines produites principalement par des *Fusarium* dans les pays au climat tempéré et humide. Les TCT représentent une famille de plusieurs centaines de molécules, mais seules quelques unes sont retrouvées sur les matières premières céréalières et les produits finis céréaliers, en raison de la grande stabilité de ces molécules aux fortes températures. Parmi ces mycotoxines, c'est le deoxynivalénol (DON) qui est le plus fréquemment retrouvé sur les céréales en France, à des taux variables qui dépendent principalement des conditions climatiques lors de la floraison et de la récolte. D'autres TCT méritent d'être suivis en raison de leur risque potentiel tant en terme de toxicité que de prévalence: le nivalénol (NIV), le diacetoxyscirpénol (DAS), et les toxines T-2 et HT-2. Parmi les TCT, le DON est la toxine la moins toxique et la plus souvent retrouvée dans les denrées alimentaires, alors que la toxine T-2, plus toxique que le DON est moins fréquemment retrouvée.

Les principaux effets toxiques des trichothécènes du groupe A (T2, HT2, DAS...), notamment l'hématotoxicité et l'immunotoxicité, qui se manifestent par une diminution du nombre de cellules sanguines circulantes, principalement les globules blancs et les plaquettes et par un affaiblissement des défenses immunitaires, y compris pour de très faibles niveaux de contamination. Les principaux effets toxiques des trichothécènes du groupe B (DON, NIV...) se traduisent par une diminution de la consommation alimentaire et du gain pondéral, ce qui entraîne une perte économique pour l'éleveur. Toutefois, l'exposition humaine au travers de la consommation de produits animaux provenant d'élevages exposés, apparaît faible. Les animaux de compagnie, et plus particulièrement les félinés,

sont également sujets à des troubles hématologiques et immunologiques induits par la consommation d'aliments contaminés par des TCT.

Le consommateur français est exposé à des doses inférieures aux doses considérées dépourvues d'effets toxiques, ce qui correspond à une Dose Journalière Tolérable (DJT) de 1 µg/kg pc /j pour le DON, de 0,07 µg/kg pc /j pour le NIV et 0,06 µg/kg pc /j pour les toxines T-2 et HT-2. Il faut cependant noter que ces valeurs toxicologiques de référence ont été fixées à partir d'études chez l'animal dont la qualité et la quantité sont insuffisantes. D'ailleurs, les agences internationales en charge de fixer les DJT ont souligné la carence en études toxicologiques de référence. Il est donc pertinent de suivre leurs recommandations visant à la mise en oeuvre d'études subchroniques (1/10 de la durée de vie de l'animal, 90 jours chez le rat) et chroniques (2 ans chez le rat) suivant les lignes directrices OCDE, sur les espèces les plus sensibles afin de fixer des valeurs toxicologiques de référence plus précises.

Les TCT n'ont pas été assez pris en compte au cours du siècle dernier en tant que contaminants alimentaires. Il est indispensable de disposer de données suffisamment solides à la fois en toxicologie conventionnelle et en exposition humaine pour caractériser le risque pour l'homme, mais également en termes d'échantillonnage et de dosage dans l'alimentation humaine et animale compte tenu des conséquences de leurs présence potentielles dans les produits céréaliers.

La Commission européenne a publié un règlement fixant des limites maximales en DON dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine. Toutefois, il convient de développer des méthodes de multidétection rapides et compatibles avec les limites réglementaires, utilisables dans les auto-contrôles. Ainsi, dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle, il conviendrait de rechercher les teneurs en toxines T-2 et HT-2, conjointement aux teneurs en DON et en NIV dans les produits céréaliers avec des limites analytiques permettant l'estimation de l'exposition.

Il est important également de prendre en compte la possibilité de multicontaminations par des TCT différents, ou des TCT et d'autres mycotoxines comme la zéaralénone, voire les fumonisines. Des études subchroniques sont à entreprendre pour évaluer les conséquences toxicologiques de telles multicontaminations.

Références bibliographiques : voir document spécifique

Chapitre 4 La zéaralène

coordination : Pierre Galtier et Michel Etienne

Introduction

La zéaralène (ZEA) est une mycotoxine à effet œstrogénique se développant dans les céréales (maïs, shorgo, orge, blé, riz, avoine...), principalement au champ (flore du champ), lors du stockage du maïs en cribs⁹ ou dans l'orge dans la phase de germination au cours du maltage. Des souches isolées à partir de bananes peuvent également produire la zéaralène (Jiménez *et al.*, 1997).

Les espèces de champignons productrices appartiennent pour la plupart au genre *Fusarium* : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*. Ainsi *Dactylium dendroïdes* utilisé pour la production de galactose oxydase a été identifié comme *Fusarium graminearum* (Wilbert *et al.*, 2003). Leur systématique repose actuellement essentiellement sur des critères morphologiques mais les méthodes moléculaires devraient permettre une clarification (Miller, 2002). Ces espèces ont des biologies différentes et sont aussi bien phytopathogènes, saprophytes qu'épiphytes. Toutes les souches ne sont pas productrices, et leur capacité à produire des toxines fusariennes n'est pas spécifique d'une espèce; un même composé peut être synthétisé par des voies différentes (Miller, 2002).

Par ailleurs, il a été montré que, dans des conditions d'humidité très élevées (74%), *Aspergillus oryzae*, *A. parasiticus* et *A. versicolor* pouvaient également produire la toxine dans des grains de blé (Atalla *et al.*, 2003).

1 Propriétés physiques et chimiques de la zéaralène

La zéaralène (C₁₈H₂₂O₅; Figure 1), de masse moléculaire de 318 Da, est une lactone de l'acide résorcylique (zéaralane) (Urry *et al.*, 1966 ; Mirocha *et al.*, 1967). Il s'agit d'un énantiomorphe de l'acide-β-résorcylique-6-(10'-hydroxy-6'-céto-trans-1'-undécényl)-μ-lactone .

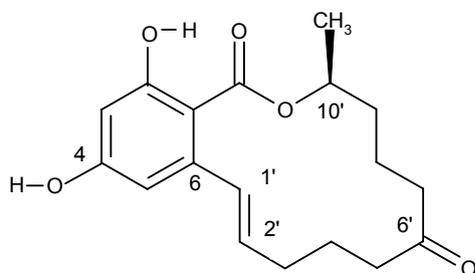


Figure 1 : structure moléculaire de la zéaralène

Les produits de réduction de la fonction cétone en 6' sont les α et β zéaralénols, métabolites naturels produits dans les organes des animaux (foie, compartiments fermentaires du tube digestif...) ou dans les céréales contaminées. L'action des UV produit la cis zéaralène dont l'activité est semblable à celle de l'isomère trans. La réduction catalytique de la fonction cétone en 6' et de la double liaison en 1' par l'hydrogène donne les α et β zéaralanols dont l'épimère α, purifié, est utilisé aux USA comme anabolisant (Bennett *et al.*, 1974). La réduction de la double liaison en 1' conduit à la zéaralanone.

La zéaralène, est un solide cristallin blanc dont le point de fusion est à 165°C. Le carbone asymétrique en 10' rend la molécule optiquement active, son pouvoir rotatoire α₂₅ est de -170,5° pour 10 g/L dans le méthanol. La molécule est très faiblement soluble dans l'eau (20 mg/L à 25°C) et dans l'hexane ; sa solubilité augmente avec la polarité des solvants : benzène, chloroforme, acétate d'éthyle, acétonitrile, acétone, méthanol, éthanol, acétone (Hidy *et al.*, 1977). L'acétate d'éthyle est d'ailleurs le solvant le plus utilisé pour son extraction dans les produits alimentaires.

⁹ Installation munie de grillages, dans laquelle on entrepose et sèche à l'air les épis de maïs

La molécule présente 3 maxima d'absorption dans l'UV à 236 nm, 274 nm, 314 nm ; les coefficients d'extinction molaire sont respectivement de 29700, 13909 et 6020 dans le méthanol (Mirocha *et al.*, 1977). Le maximum d'absorption à 274 nm, le plus caractéristique, est le plus souvent utilisé pour la détection UV. La molécule émet une fluorescence bleue avec un maximum d'émission à 450 nm lorsqu'elle est excitée entre 230 et 340 nm dans l'éthanol.

2 Méthodes d'analyse (voir principes généraux en Annexe 1)

2.1 Purification et séparation

De nombreuses revues bibliographiques détaillent les méthodes d'analyse de la zéaralénone (Krska et Josephs, 2001 ; Betina, 1993 ; Frisvad et Thrane, 1993 ; Scott, 1993 ; Lawrence et Scott, 1993 ; Steyn *et al.*, 1991).

Les procédures de purification consistent principalement en des extractions liquide-liquide (LLE), la purification sur phase solide (SPE) ou par immuno-affinité (IAC) ou encore la chromatographie liquide ou gazeuse.

La technique LLE met en jeu deux phases, l'une organique, l'autre aqueuse. Etant donné son caractère acide faible (phénol), un pH alcalin (NaOH ou KOH) permet de la transférer de la phase organique vers la phase aqueuse. Les solvants utilisés pour l'extraction liquide-liquide de la zéaralénone et de ses métabolites sont principalement l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'acétonitrile et le chloroforme, seuls ou en mélange, le mélange CH₃CN/H₂O restant le plus couramment utilisé. Lorsque la matrice est solide, des techniques comme des extractions accélérées par solvant, ultrasons ou micro-ondes, peuvent être mises en oeuvre (Pallaroni *et al.*, 2003a et 2003b).

L'extraction à partir de matrices biologiques (plasma, urine, matières fécales...) nécessite une étape d'hydrolyse des métabolites de phase II avant le processus de purification. Cette étape de clivage du conjugué peut être réalisée par voie enzymatique (suc d'*Helix pomatia*, β -glucuronidase d'*Escherichia coli*) ou par voie chimique (solvolyse ou méthanolyse). Une évaluation précise de la concentration en zéaralénone et/ou de ses métabolites dans des fluides biologiques implique la réalisation et la maîtrise de cette étape considérée généralement comme la plus critique dans l'ensemble du protocole opératoire (Zöllner *et al.*, 2002). Dans les matrices végétales, la présence de conjugués sulfate (Plasencia et Mirocha, 1991) ou glycoside (Gareis *et al.*, 1990) peut interférer et engendrer une sous-estimation de la contamination réelle en zéaralénone.

Une purification sur cartouche ou disque SPE (Ware *et al.*, 1999) permet de séparer les zéaralanols de manière plus fine d'éventuelles interférences. Toutes les phases stationnaires ou presque peuvent être utilisées : phase inverse (silice greffée type C18, C8 ou C4, ou copolymère type styrène, divinylbenzène), phase normale (Florisil, SiOH, NH₂) (Llorens *et al.*, 2002) ou encore échange d'anions (SAX). Il existe également des colonnes prêtes à l'emploi Mycosep® (Romer Labs Inc, Union, MT, USA, #224 pour ZON) qui permettent une purification rapide de l'échantillon (30 sec) sans rinçage avec rétention sélective des interférences (Silva *et al.*, 2001). Les phases stationnaires multifonctionnelles Mycosep sont alors des adsorbants type charbon, céélite ou résines échangeuses d'ions.

Des colonnes d'IAC ont également été développées pour cette classe de toxines et sont fréquemment utilisées (De Saeger *et al.*, 2003 ; Eskola *et al.*, 2002 ; Meyer *et al.*, 2002 ; Fazekas et Tar, 2001 ; Kruger *et al.*, 1999 ; Zöllner *et al.*, 1999 ; Schuhmacher *et al.*, 1998 ; Visconti et Pascale, 1998 ; Rosenberg *et al.*, 1998).

Enfin, l'HPLC semi-préparative a également fait l'objet de développements concernant les dosages de zéaralénone et de ses métabolites. Quoique d'utilisation plus lourde, son pouvoir séparatif est remarquable, rendant cette technique de purification idéale comme méthode de confirmation.

Il est à noter que la zéaralénone est photosensible, tout particulièrement en solution : des dispositions doivent être prises au cours de sa purification afin de prévenir sa photodégradation.

2.2 Détection et dosage

Plusieurs techniques immunologiques ont été développées pour la détection de la zéaralénone dans les céréales, le lait et les fluides biologiques. Elles incluent le RIA ou l'ELISA (Meyer *et al.*, 2002 ;

Pichler *et al.*, 1998) avec anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Cependant, ces kits peuvent donner des réactions croisées (Maragos *et al.*, 2004), avec l' α -zéaralénol et le β -zéaralénol et leur limite de détection, de l'ordre de la dizaine à la centaine de $\mu\text{g}/\text{kg}$, est faible. Ces techniques peuvent présenter un avantage lorsque l'objectif est uniquement de conclure en l'absence de contamination par cette mycotoxine dans un échantillon, sans besoin de quantification du composé ou de ses métabolites. En termes de techniques physico-chimiques, une méthode séparative est systématiquement couplée en amont de la détection. La structure chimique de ce groupe de mycotoxines permet à la fois de considérer l'approche HPLC et GC, la chromatographie couche mince étant pratiquement abandonnée de nos jours (Dawlatana *et al.*, 1998 ; De Oliveira *et al.*, 1998). Une majorité significative des travaux publiés a choisi pour stratégie la séparation par chromatographie liquide, en utilisant presque systématiquement le principe de la phase inverse ; les combinaisons phase stationnaire type C_{18} et phase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ sont nombreuses dans ce domaine. Des développements plus récents ont été introduits avec succès avec les empreintes moléculaires (MIP) beaucoup plus spécifiques de l'analyte (Weiss *et al.*, 2003).

Plusieurs types de détecteurs peuvent être utilisés: le fluorimètre (De Saeger *et al.*, 2003 ; Eskola *et al.*, 2002 ; Fazekas et Tar, 2001 ; Kruger *et al.*, 1999 ; Ware *et al.*, 1999 ; Visconti et Pascale, 1998), le détecteur UV à longueur d'onde fixe est le plus souvent remplacé par la barrette de diodes beaucoup plus spécifique (Llorens *et al.*, 2002 ; Fazekas et Tar, 2001). La sensibilité observée diffère selon les métabolites et est plutôt moindre pour les métabolites réduits (α -zéaralanol et β -zéaralanol). Avec l'introduction des techniques couplées comme la LC-MS, et en particulier des interfaces à pression atmosphérique, les approches méthodologiques dédiées aux lactones d'acide résorcylique progressent. La technique dite d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est probablement la plus utilisée (Pallaroni *et al.*, 2002a ; Jodlbauer *et al.*, 2000 ; Zöllner *et al.*, 2000 ; Zöllner *et al.*, 1999 ; Rosenberg *et al.*, 1998) suivie par l'électrospray (Kleinova *et al.*, 2002). Le rôle de la purification avant analyse LC-MS/MS, du fait de la très haute spécificité de la technique, a été discuté (Jodlbauer *et al.*, 2000 ; Pallaroni *et al.*, 2003b ; Zöllner *et al.*, 1999 ; 2000 ; 2002). Les interférences co-extraites nuisent à l'efficacité de l'ionisation et peuvent contribuer à sous estimer la concentration de l'analyte (mécanisme de suppression d'ions). La zéaralénone et ses métabolites peuvent également être analysés par GC-MS (Meyer *et al.*, 2002 ; Pillay *et al.*, 2002 ; Tanaka *et al.*, 2000 ; Ryu *et al.*, 1996), mais ils doivent au préalable subir une réaction de dérivation: la triméthylsilylation est fréquemment utilisée (Ryu *et al.*, 1996), tout comme la fluoroacylation, cette dernière permettant d'accroître de manière spectaculaire la sensibilité du signal, en particulier dans le mode d'ionisation chimique négative (Miles *et al.*, 1996 ; Kennedy *et al.*, 1998).

3 Facteurs influençant la teneur dans les denrées alimentaires

3.1 Facteurs liés au développement fongique et à la production de zéaralénone

La zéaralénone est produite par les champignons toxigènes en même temps que d'autres toxines, notamment les trichothécènes, au cours de la maturation des grains de céréales lorsque les conditions climatiques sont mauvaises (exposition des épis aux intempéries) dans les régions tempérées d'Europe, d'Amérique et d'Asie (Gajecki, 2002).

Les conditions de production dans les grains dépendent d'interactions entre la température, l'humidité et l'activité de l'eau (a_w), le substrat et la souche fongique. La production de zéaralénone est très faible à 32°C et maximale à 20°C mais dépend des différences génétiques des souches (Llorens *et al.*, 2004). Des auteurs ont montré que la production est considérablement augmentée lors de variations successives de températures (Sherwood *et al.*, 1974, Eugenio *et al.*, 1970), conditions qui peuvent se produire au cours du stockage du maïs en crib.

L'effet de compétition entre *F. graminearum*, *F. verticillioides* et *F. proliferatum*, se traduit sur la croissance de ces colonies de *Fusarium* mais pas sur la production de zéaralénone (Velutti *et al.*, 2000).

Au champ, dans les conditions de culture, la zéaralénone se trouve davantage dans le maïs et le sorgho que dans les céréales à paille.

La zéaralénone est produite dans le blé sous forme libre mais également sous forme du conjugué zéaralénone-4- β -D-glucoside (42% des échantillons positifs analysés) à des concentrations variant entre 17 et 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour des teneurs en zéaralénone de 10 à 860 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Schneweiss *et al.*, 2002). Les métabolites naturels (α et β zéaralénols) sont également présents dans les céréales contaminées (Hagler *et al.*, 1979 ; Schwadorf *et al.*, 1992).

Si les moisissures produisant la zearalenone colonisent principalement les céréales, elles ont été également détectées dans les foin et les pailles mal séchées (Scudamore et Livesey, 1998). Les fourrages ensilés peuvent aussi contenir de la zéaralénone dont l'origine est double : la toxine a pu être apportée par le fourrage contaminé au moment de sa mise en silo, ou être produite dans le silo. Il est vraisemblable que la production en silo est mineure par rapport à la contamination hors silo. Toutefois, un mauvais tassement du silo et une acidification réduite au cours des premières heures après la mise en silo peuvent favoriser le développement de *Fusarium* spp. et la production de zéaralénone.

Ces conditions sont fréquemment rencontrées avec les maïs ensilés sous forme de brins longs et à des teneurs en matière sèche supérieures à 35 %. Ainsi, Borreani *et al.* (2003) ont montré que la concentration en zéaralénone dans des silos de maïs est plus importante en périphérie que dans la zone centrale du silo où la teneur en oxygène est plus faible. Une enquête épidémiologique réalisée au Brésil de mai 1997 à 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 (Netto *et al.*, 2002).

Des espèces productrices de zéaralénone contaminent fréquemment les herbages pâturés en Nouvelle-Zélande (Di Menna et Parle, 1970). La zéaralénone a ainsi été détectée à des concentrations de 300 à 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de matière sèche dans de l'herbe pâturée (Towers, 1993 ; Towers et Sposen, 1993) et dans du foin (Mirocha *et al.*, 1968).

3.2 Impact des procédés technologiques sur la teneur en zéaralénone

La répartition de la zéaralénone dans les fractions issues de meunerie est semblable à celle du déoxynivalénol (voir chapitre « trichothécènes »), avec des teneurs dans les sons et les issues de céréales bien supérieures à celles de la farine (Lee *et al.*, 1987 ; Trigo-Stockli *et al.*, 1996).

La zéaralénone est nettement moins hydrosoluble que le déoxynivalénol et le nivalénol et de ce fait se répartit différemment dans les coproduits issus de l'amidonnerie de blé. Lauren et Ringrose (1997) ont montré que le gluten est plus fortement contaminé en zéaralénone que le grain (de 200 à 1200%). Les germes sont également très contaminés (de 80 à 522 % de la teneur des grains). La teneur en zéaralénone des fractions solubles diverge selon les auteurs : Lauren et Ringrose (1997) ne trouvent que peu ou pas de zéaralénone dans les eaux de trempage, à la différence de Bennett *et al.*, (1978).

En semoulerie de maïs, Bennett *et al.*, (1976) ont noté que la concentration en zéaralénone est la plus élevée dans les germes et atteint 2 à 3 fois celle des grains, notamment dans la matière grasse. Les sons s'avèrent plus contaminés que les grains mais moins que les germes, alors que les gritz (semoules) sont peu contaminés.

4 Propriétés toxicologiques

Les données toxicologiques disponibles ont été examinées par le SCF et le JECFA en 2000. Les données et conclusions mentionnées dans cette section sont largement tirées de ces deux sessions d'évaluation et ont été complétées par des travaux postérieurs à cette date.

4.1 Toxicocinétique

Les différentes études de pharmacocinétique et de métabolisme montrent que la zéaralénone est absorbée rapidement après administration orale et peut être métabolisée en α - et β -zéaralénol, sous l'action d'hydroxystéroïde deshydrogénases et en α - et β -zéaralanol, lesquels peuvent subir, ensuite une glucuronocouplage.

Des différences métaboliques ont été rapportées en fonction de l'espèce : chez le rat, la majorité de la zéaralénone est retrouvée sous forme libre ou conjuguée. En revanche, seule une petite quantité de zéaralénols et de leurs conjugués est formée (SCF, 2000 ; JECFA 2000). On observe une excrétion biliaire avec circulation entérohépatique chez le rat et la souris, alors que chez le lapin, c'est l'excrétion urinaire de la toxine qui prédomine. Cette dernière voie d'élimination est également majoritaire chez le porc en dépit d'une circulation entérohépatique démontrée de la zéaralénone, en raison d'une moindre réabsorption dans les viscères.

Des études *in vitro* ont confirmé cette forte disparité du devenir de la zéaralénone entre les espèces animales, notamment en termes d'activation par réduction stéréospécifique en α -zéaralénol ou de conjugaison à l'acide glucuronique (Malekinejad *et al.*, 2006a).

Il existe une seule donnée chez l'Homme : celle-ci suggère que la zéaralénone subit, comme chez le porc, une excrétion urinaire sous forme du composé parent glucuronoconjugué et d' α -zéaralénol (SCF, 2000 ; JECFA 2000). Dans le sang, la zéaralénone et le zéaralanol se lient aux globulines spécifiques des hormones sexuelles humaines (JECFA, 2000; Eriksen et Alexander, 1998).

4.2 Toxicité générale

4.2.1 Toxicité aiguë

La zéaralénone possède une faible toxicité aiguë après administration orale mais aussi intrapéritonéale chez la souris, le rat et le cobaye. La DL50 varie entre 4000 et plus de 20 000 mg/kg pc (JECFA, 2000).

4.2.2 Toxicité sub-aiguë et sub-chronique

Les études de toxicité orale sur 90 jours permettent de mettre en évidence que les effets observés aussi bien sur animaux de laboratoire que sur animaux domestiques dépendent des interactions de la zéaralénone et de ses métabolites avec les récepteurs aux œstrogènes. Les porcs et les moutons semblent plus sensibles que les rongeurs. Dans des études par administration répétée, la NOAEL chez le porc est égale à 40 μ g/kg pc/jour sur la base des effets œstrogéniques dans les tissus cibles et des performances en terme de reproduction. En revanche, la NOAEL chez le rat est de 100 μ g/kg pc/j (JECFA, 2000 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

4.2.3 Génotoxicité

L'IARC a établi (1993) que le chromo test SOS de réparation de l'ADN réalisé sur *B. subtilis* se révèle négatif tandis que le résultat du *rec*-essai sur cette même bactérie est positif. La zéaralénone n'induit pas de mutation génique sur la bactérie *Salmonella typhimurium* (test d'Ames) ou de recombinaison génique sur *S. cerevisiae*, tout en provoquant un échange de chromatides sœurs, des aberrations chromosomiques et une polyploïdie sur cellules CHO en l'absence d'activation métabolique (IARC, 1993). Des études plus récentes ont d'abord montré que cette toxine peut induire le système SOS de réparation de l'ADN chez une bactérie lysogénique et que cet effet est supprimé en présence de vitamine E (Ghedira-Chekir *et al.*, 1998). Cette même vitamine protège aussi l'induction de micronoyaux par la zéaralénone mise en évidence dans des cellules de rein de singes ou de moelle osseuse de souris (Ouanes *et al.*, 2003).

Concernant les effets génotoxiques observés *in vivo*, le pourcentage d'aberrations chromosomiques augmente dans la moelle osseuse de souris recevant des doses fractionnées et répétées équivalentes à 0,4 à 4 p.100 de la DL50 soit 10 à 40 mg/kg pc. Le prétraitement des animaux par la vitamine E, le 17 β -œstradiol ou la progestérone réduit significativement le pourcentage d'aberrations chromosomiques, suggérant que ces composés pourraient inhiber les processus moléculaires à l'origine de cette génotoxicité, notamment par compétition sur les récepteurs nucléaires (Ouanes *et al.*, 2005). La formation d'adduits à l'ADN a été recherchée sur des souris femelles BalB/c traitées par 2 mg/kg pc de zéaralénone par voie intrapéritonéale ou orale, après marquage du composé au phosphore. Douze à quinze adduits différents ont été retrouvés dans les reins et le foie. Le niveau total d'adduits à l'ADN se révèle supérieur dans le foie, surtout après administration intrapéritonéale. La co-administration de vitamine E (4 mg/kg pc/j) diminue significativement cette formation d'adduits à l'ADN (Grosse *et al.*, 1997). Dans les ovaires de souris, 6 adduits à l'ADN différents ont été observés après administration orale répétée de 1 mg/kg pc au jour 1, 5, 7, 9 et 10 (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1995). La formation de ces adduits est augmentée de façon dose-dépendante après traitement

préalable des souris par la β -naphtoflavone. Toutefois, l'augmentation n'est plus observée chez des souris déficientes en récepteur Ah. Cette observation est confirmée sur modèles *in vitro*, lesquels attestent de l'implication probable du cytochrome P450 1A2 dans cette possible voie d'activation métabolique (Pineau *et al.*, 1998). En revanche, aucun adduit à l'ADN n'a pu être détecté dans les organes de rats Sprague-Dawley femelles recevant une alimentation contenant 0,05 mg/kg de zéaralène (5 μ g/kg pc) pendant 3 semaines (Li *et al.*, 1992).

4.2.4 Cancérogénicité

La zéaralène a été évaluée par le CIRC/IARC en 1993 : elle a été classée, avec les autres toxines de *Fusarium*, dans le groupe 3, c'est à dire inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme en raison d'indications limitées chez l'animal (IARC, 1993).

Selon le rapport du NTP (1982), une étude sur des souris B6C3F₁ à qui l'on a administré durant 103 semaines des régimes contenant 0, 50 ou 100 mg/kg de zéaralène (soit chez les femelles 0, 9 ou 18 mg/kg pc/jour et chez les mâles 0, 8 ou 17 mg/kg pc/jour) a montré qu'aucune différence significative dans la survie ou la diminution du gain de poids corporel n'a été observée entre les groupes. Aucune lésion non-néoplasique due au traitement n'a été rapportée chez les mâles. Chez les femelles, des effets œstrogéniques dose-dépendants ont été observés dans certains tissus (fibrose de l'utérus, canaux cystiques des glandes mammaires), ainsi qu'une myélofibrose au niveau de la moelle osseuse. Des adénomes hépatocellulaires ont été trouvés chez 8, 6 et 14 % des mâles et chez 0, 4 et 14 % chez les femelles. L'augmentation était statistiquement significative chez les femelles. Une tendance statistiquement significative a été observée en ce qui concerne l'incidence d'adénomes hypophysaires aussi bien chez les mâles (0, 9 et 14 %) que chez les femelles (7, 5 et 31 %). Des carcinomes hypophysaires ont été observés chez un des mâles traités avec la faible dose et chez deux femelles traitées avec la forte dose. Cependant, l'incidence de ces carcinomes hypophysaires dans les groupes traités et témoins n'était pas significativement différente. De plus, ces tumeurs ayant été rapportées uniquement à des doses largement supérieures aux concentrations provoquant des effets hormonaux (notamment pour des doses de l'ordre de 8-9 mg/kg pc/j ou plus), le comité du SCF, en 2000, a conclu que ces tumeurs étaient les conséquences des effets œstrogéniques de la mycotoxine. La même conclusion avait été faite par le JECFA en 1998 lors de l'évaluation de l' α -zéaralanol.

Une étude menée sur rats Fisher (NTP, 1982) à qui l'on a administré durant 103 semaines des régimes contenant 0, 25 ou 50 mg/kg de zéaralène (soit 0, 1, 2 mg/kg pc/jour) a permis de montrer que le gain de poids corporel moyen était plus faible que celui des témoins et cette diminution du poids moyen (pour 19 % des mâles et 11 % des femelles traités à la plus forte dose après 44 semaines de traitement) était fonction de la dose administrée. Aucune différence significative de survie des animaux n'a été observée entre les différents groupes. Les lésions non-néoplasiques suivantes ont été observées : inflammation de la prostate, atrophie testiculaire, canaux cystiques dans les glandes mammaires des mâles, augmentation de l'incidence des vacuolisations cytoplasmiques hépatocellulaires chez les mâles et augmentation de l'incidence des néphropathies chroniques progressives dans les deux sexes pour les deux doses testées. Une augmentation de l'incidence des rétinopathies et des cataractes a été observée chez les mâles et pour la faible dose chez les femelles. Aucune augmentation dépendante du traitement au niveau de l'incidence des tumeurs n'a été trouvée dans cette étude.

Dans une étude menée sur rats Wistar nourris avec une alimentation contaminée en zéaralène pendant 104 semaines (0, 0,1, 1,0 ou 3,0 mg/kg pc/jour), une augmentation significative du poids du foie a été observée chez les mâles et les femelles exposés à la dose de 3 mg/kg pc. De plus, le poids de l'utérus a été augmenté pour deux femelles du groupe traité à la plus forte dose. Chez les rats ayant reçu la dose de 3 mg/kg pc, une augmentation de la trabéculatation du fémur a été observée. En dehors de cette observation, aucun changement biologique significatif n'a été observé et aucune tumeur due au traitement n'a été trouvée (Becci *et al.*, 1982). Les taux de survie et l'incidence des tumeurs n'ont pas été rapportés. Une NOAEL de 0,1 mg/kg pc/jour a pu être déduite de cette étude.

4.3 Toxicité d'organes

4.3.1 Immunotoxicité

Plusieurs altérations des paramètres immunologiques ont été montrées *in vitro* après exposition de lymphocytes à la zéaralène : inhibition de la prolifération lymphocytaire après stimulation par un mitogène, augmentation de la production d'IL-2 et d'IL-5 (JECFA, 2000).

Par contre, aucune étude réalisée *in vivo* ne montre d'immunotoxicité de la zéaralène.

Des souris B6C3F₁ ont reçu de la nourriture supplémentée par 10 mg/kg de zéaralène pendant 2 semaines. Après infection par *Listeria monocytogenes* (iv), le comptage de bactéries spléniques a montré une tendance à l'augmentation aux jours 1 et 4 comparée aux animaux témoins. Aucun effet négatif n'a été observé après administration de 8 semaines de nourriture contaminée (Pestka *et al.*, 1987).

Une autre étude a été menée sur des souris B6C3F₁ à qui une dose unique de 45 mg/kg pc était administrée par voie sous-cutanée, puis les animaux ont été infectés par *L. monocytogenes*. Aucune différence dans la survie ou le nombre de bactéries dans la rate n'a pu être observée entre les animaux exposés à la zéaralène et les témoins (Pung *et al.*, 1984).

Chez des souris femelles B6C3F₁ ayant reçu un aliment supplémenté par 10 mg/kg de zéaralène (1,5 mg/kg pc/jour) pendant 6 semaines, aucune variation de la concentration sérique d'IgG, IgM ou IgA ou encore du nombre de lymphocytes, neutrophiles, monocytes et éosinophiles (nombre global et individualisé) n'a été observée (Forsell *et al.*, 1986).

4.3.2 Toxicité pour la reproduction

Plusieurs études *in vitro* ont montré que la zéaralène ainsi que certains de ses métabolites se lient de façon compétitive aux récepteurs aux œstrogènes (ER). Cette liaison à des récepteurs spécifiques a été également démontrée *in vivo* dans l'utérus, les glandes mammaires, le foie et l'hypothalamus de différentes espèces. Les taux de liaison relatifs de la zéaralène et de ses dérivés aux récepteurs cytoplasmiques d'utérus de rat sont variés dans l'ordre suivant : α -zéaralanol > α -zéaralène > β -zéaralanol > zéaralène > β -zéaralène (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987 ; Eriksen et Alexander, 1998).

Il semblerait que la zéaralène puisse se lier et activer les récepteurs ER α et ER β dans les cellules transfectées avec les récepteurs ER α et ER β humains. La zéaralène s'avère être un antagoniste total pour ER α à la fois un agoniste et un antagoniste pour ER β (Kuiper *et al.*, 1998). Son potentiel œstrogénique, mesuré par le test de cornification vaginale de souris et comparé à celui de l'œstradiol, est respectivement de 0,001 et 0,01 après administration sous-cutanée et topique. L' α -zéaralanol possède approximativement le même potentiel œstrogénique dans ce dernier test, mais semble plus actif avec le test sur utérus (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

Dans des essais *in vitro*, des homogénats de prostate hyperplasique humaine ont métabolisé la zéaralène en α - et β -zéaralènes. Ce sont les 3 α - et 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénases qui sont responsables de cette réduction (Thouvenot *et al.*, 1981). Ces résultats ont été récemment confirmés sur des cultures de cellules de granulosa ou d'oocytes porcins (Malekinejad *et al.*, 2006b) et avec des fractions subcellulaires de foie de porc (Malekinejad *et al.*, 2005). La zéaralène se comporte comme un inhibiteur compétitif du 17 β -œstradiol dans le métabolisme de la testostérone en 5 α -dihydrotestostérone, métabolite responsable des effets androgéniques chez l'homme (Thouvenot *et al.*, 1980). Testée sur des cellules de granulosa lutéales humaines parmi d'autres phytoœstrogènes de l'alimentation (coumestrol, quercétine, biochanine A), la zéaralène inhibe l'activité de l'aromatase mais pas celle de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (Whitehead et Lacey, 2003). Sur le même modèle cellulaire, la zéaralène s'est avérée la plus efficace à inhiber la formation d'œstradiol à partir d'androstène dione, correspondant à l'activité de l'aromatase. Toutefois, cette modulation ne s'accompagne pas d'une diminution d'expression protéique de cette enzyme (Lacey *et al.*, 2005). De telles interactions moléculaires pourraient participer à l'activité œstrogénique de la zéaralène décrite chez de nombreuses espèces animales et suspectée chez l'homme.

La zéaralène induit des troubles de la reproduction chez les rongeurs et chez des animaux domestiques. Des effets œstrogéniques variés tels qu'une diminution de la fertilité, une augmentation

des résorptions embryolétales, une diminution de la taille des portées, des changements de poids des glandes surrénales, de la thyroïde et de l'hypophyse ainsi que des changements de niveaux sériques de progestérone et d'œstradiol ont été observés chez la souris, le rat, le cobaye et le lapin. Toutefois, aucun effet tératogène n'a été rapporté (JECFA, 2000).

Les porcs semblent plus sensibles aux effets reprotoxiques de la zéaralène que les rongeurs. Une étude a été réalisée sur des truies sexuellement matures non gestantes recevant 2 kg de nourriture contenant 0, 1, 5 ou 10 mg/kg de zéaralène entre le 5^{ème} et le 20^{ème} jour du cycle œstral (0, 40, 200 ou 400 µg/kg pc/jour). L'intervalle inter-œstrus augmente significativement de $21 \pm 0,3$ jours chez les témoins à $32,7 \pm 3,3$ jours chez les truies ayant consommé de la nourriture contaminée à 5 ou 10 mg/kg mais pas à 1 mg/kg. Une augmentation de la concentration plasmatique en progestérone et une persistance des corps jaunes ont été observées chez les truies ayant un cycle prolongé. Les corps jaunes régressent lorsque la zéaralène est retirée de l'aliment (Edwards *et al.*, 1987b).

Une étude réalisée sur un petit nombre de truies prépubères rapporte des effets œstrogéniques à faibles doses (Bauer *et al.*, 1987) : deux truies ont reçu une alimentation contaminée par 0,25 mg/kg de zéaralène, soit l'équivalent de 10 µg/kg pc/jour pendant 11 jours, suivi d'une alimentation dépourvue de zéaralène durant 5 jours ; deux autres truies ont reçu une alimentation contaminée à 0,05 mg/kg de zéaralène, soit l'équivalent de 2 µg/kg pc/jour pendant 21 jours, et un animal seulement a été utilisé comme témoin. La plus forte dose a provoqué une rougeur et une tuméfaction de la vulve ainsi qu'une tuméfaction mammaire. De plus, de nombreux follicules vésiculaires et de follicules kystiques ont été observés au niveau des ovaires. Avec la faible dose, aucune modification extérieure n'a été rapportée à la fin de l'expérience mais l'autopsie a mis en évidence que le nombre de follicules vésiculaires sur les ovaires était plus important chez les animaux traités que chez les témoins. Ces effets doivent être confirmés par une nouvelle étude utilisant un plus grand nombre d'animaux avant de pouvoir établir une DSE.

4.4 Valeur toxicologique de référence

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a proposé en 1999 une DJT de 0,1 µg/kg/j calculée à partir d'effets œstrogéniques observés sur la reproduction du singe, considérés comme les plus pertinents et caractérisés par une NOAEL de 50 µg/kg/j.

La même année, le comité du JECFA a établi une dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP) de 0,5 µg/kg pc/j calculée à partir de l'étude à court terme (15 jours) chez les truies adultes réalisée par Edwards *et al.*, (1987b). Utilisant un facteur de sécurité de 100, le comité a établi la DJMTP à partir de la dose sans effet observé de 40 µg/kg pc/j. Le comité a aussi considéré la plus faible dose entraînant un effet, 200 µg/kg/j, et la possibilité d'effet du métabolite α -zéaralanol. Le Comité recommandait que la dose journalière de zéaralène et de ses métabolites n'excède pas 0,5 µg/kg pc.

En 2000, le SCF a fixé une dose journalière temporaire (temporary TDI) de 0,2 µg/kg pc basée sur la même étude à court terme chez les truies adultes (Edwards *et al.*, 1987b). De cette recherche, une NOAEL de 40 µg/kg pc/j a été établie en considérant les effets hormonaux et en appliquant un facteur de sécurité de 200.

5 Exposition de la population française à la zéaralène

5.1 Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

La zéaralène a été mesurée dans l'endomètre de 49 femmes. Il a été rapporté 27 adénocarcinomes, 11 hyperplasies endométriques et 11 endomètres prolifératifs normaux pour lesquels les valeurs de zéaralène étaient respectivement, dans chacun de ces groupes, de 48 ± 6 , 167 ± 18 ng/ml et inférieur à la limite de détection. Dans 8 cas de tissus endométriques hyperplasiques et 5 cas de tissus néoplasiques, la zéaralène n'a pas été détectée (Tomaszewski *et al.*, 1998).

La zéaralène ou le zéaralanol ont été suspectés être les agents responsables d'une épidémie de modifications précoces de la puberté chez de jeunes enfants à Porto-Rico entre les années 1978 et 1981 (Sàenz de Rodriguez, 1984 ; Sàenz de Rodriguez *et al.*, 1985). Le zéaralanol ou ses métabolites ont été détectés dans le plasma sanguin. Les auteurs ont rapporté de forts taux de réponse dans le

test du récepteur cytosolique ER d'utérus de rat, lors de l'analyse d'homogénats de viande produite localement, ce qui tend à montrer la présence de substances capables de se lier aux ER. Des études entreprises par la FDA n'ont pas permis de mettre en évidence de facteurs de croissance œstrogéniques dans la nourriture. Plus tard, une corrélation statistique entre les changements de puberté et la consommation de produits carnés et de formules à base de soja a été trouvée. Cependant, les associations statistiques n'ont pas pu expliquer plus de 50 % des cas identifiés (Freni-Titulaer *et al.*, 1986). Les différentes études n'ont pas permis de conclure de manière définitive à l'implication de la zéaralène ou du zéaralanol dans les troubles observés. Une autre hypothèse mettant en cause des phtalates à effet œstrogénique a également été avancée (Colon, 2000 ; Larriuz-Serrano *et al.*, 2001).

5.2 Exposition de l'Homme

L'étude de l'alimentation totale (EAT) entreprise en 2000 (Leblanc *et al.*, 2005) afin de connaître le niveau de consommation et d'exposition de la population française à la zéaralène à partir d'aliments "prêts à consommer" montre que, sur 245 échantillons d'aliments analysés, 5 (2%) ont des niveaux de zéaralène supérieurs à la limite de détection, dont 2 supérieurs à la limite maximale de 50 µg/kg fixée par la Commission européenne (céréales petit déjeuner de type muesli et pétales de maïs enrichis avec 200 µg/kg et 22 µg/kg, soja appertisé avec 53 µg/kg, graines de sésame avec 18 µg/kg). L'exposition moyenne et des forts consommateurs (95^{ème} percentile) adultes et enfants de la population générale et végétarienne est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Estimation des apports alimentaires moyens et des forts consommateurs (P95) pour différents types de population française en zéaralène

Type de population		Apport moyen (µg/kg pc/j)	Apport au P95 (µg/kg pc/j)	% de la DJTP pour P95	% d'individus pouvant dépasser la DJTP
Population générale	Adultes (15 ans et +)	0,033	0,070	35	0,2
	Enfants (3-14 ans)	0,066	0,132	65	2,5
Population végétarienne (15 ans et +)	Ovolactovégétariens	0,050	0,110	55	0
	Lactovégétariens	0,060	0,120	60	0
	Végétaliens	0,200	0,570	285	31

¹ Le SCF a fixé une DJTP de 0,2 µg/kg pc/j

Les aliments contributeurs à l'exposition de la population française à la zéaralène sont le blé, les produits dérivés du blé, ainsi que le maïs et le riz.

La proportion d'individus dont l'apport théorique de zéaralène dépasse la DJT établie par le SCF est de 2,5% pour les enfants de 3 à 14 ans, et de 31% pour la population végétarienne.

A titre de comparaison, les niveaux d'exposition alimentaire moyenne de la population française déterminés lors d'une étude réalisée à l'échelle européenne (SCOOP Task, 2003) sont du même ordre de grandeur que ceux observés lors de l'étude française (tableau 2).

Tableau 2 : Exposition alimentaire moyenne de la population française à la zéaralène (Tâche Scoop, 2003)

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 population française présente une exposition alimentaire à la zéaralène relativement proche de celle calculée en Autriche (0,029 µg/kg/j), en Finlande (0,027), aux Pays-Bas (0,021) ou au Royaume-

Uni (0,014). Les populations d'Allemagne (0,005), de Norvège (0,008), d'Italie (0,001) et du Portugal (0,004) semblent moins exposées. Cependant, le type d'enquête alimentaire, le nombre d'échantillons analysés, les méthodes analytiques et les laboratoires étant différents selon les pays, il n'est pas possible de tirer de véritables conclusions comparatives des niveaux d'exposition entre les pays européens.

6 Exposition animale

6.1 Effets sur la santé animale et transfert dans les sous-produits

6.1.1 Les porcins

- Effets sur la santé

Les symptômes d'hyperœstrogénisme dus à la consommation de zéaralène purifiée ou d'un aliment contaminé naturellement ont été très fréquemment décrits chez les porcs impubères. Chez la femelle, un rougissement et un gonflement de la vulve et un prolapsus du vagin sont observés (Zwierzchowski *et al.*, 2006). L'utérus est hypertrophié, les ovaires sont atrophiés (Jakimiuk *et al.*, 2006) et l'épaisseur de l'épithélium vaginal est accrue. On constate une atrophie des testicules (Farnworth et Trenholm, 1981), un prolapsus du rectum chez le mâle et le développement des tétines dans les deux sexes. Ces symptômes apparaissent 3 à 7 jours après la consommation d'un aliment renfermant des quantités de zéaralène allant de 1,5 à 2 mg/kg, et disparaissent entre 7 et 14 jours après le retrait de l'aliment contaminé. La mort de l'animal peut intervenir par hémorragie ou infection des tissus prolapsés. Contrairement aux jeunes porcs, l'hyperœstrogénisme a rarement été observé chez les truies pubères, gestantes ou allaitantes chez lesquelles des niveaux de contamination beaucoup plus élevés sont nécessaires pour le provoquer (par exemple 64 mg/kg d'après Long *et al.*, 1982). Cependant, les performances de croissance de jeunes truies qui consomment un aliment renfermant jusqu'à 2,21 mg/kg de zéaralène ne sont pas affectées (Friend *et al.*, 1990).

Les conséquences de l'ingestion de zéaralène sur la maturité sexuelle des truies ne sont pas claires. La distribution pendant 2 semaines d'un aliment renfermant 10 mg/kg de zéaralène à des truies âgées de 178 jours (Green *et al.*, 1990), ou 1,5 à 2 mg/kg à partir de 70 jours d'âge (Rainey *et al.*, 1990) n'a pas d'effet sur la maturité sexuelle. Dans un essai sur trois, Edwards *et al.* (1987a) observent cependant un retard de puberté de 10 jours chez des truies consommant un aliment contenant 10 mg/kg de zéaralène entre 145 et 193 jours d'âge, mais la proportion d'animaux atteignant la puberté n'est pas affectée. Au contraire, d'après Rainey *et al.* (1990), la puberté de jeunes truies recevant un aliment avec 2 mg/kg de zéaralène à partir de l'âge de 70 jours est plus précoce. Ces divergences s'expliquent peut-être par des différences de doses, d'âge des animaux et de durée de distribution de l'aliment contaminé.

La durée du cycle œstral ou de l'intervalle sevrage-œstrus est augmentée chez les truies adultes consommant un aliment contaminé par 5 ou 10 mg/kg de zéaralène pendant 15 jours (Edwards *et al.*, 1987a, b). Cet effet ne s'observe pas pour une contamination de 1 mg/kg correspondant à une dose quotidienne de 40 µg/kg pc, cette dose a donc été choisie par le JECFA et le SCF comme NOAEL. Young *et al.* (1990) ont établi une relation linéaire entre le niveau de contamination et la durée du cycle. Au-delà d'un taux de 3 mg/kg, le retard d'œstrus peut devenir si important que certaines truies sont considérées en anœstrus. Ainsi, la moitié des truies (15/33) qui consommaient un régime naturellement contaminé à environ 4 mg/kg de zéaralène à partir de leur puberté n'avaient pas eu de nouvel œstrus 50 jours plus tard (Etienne et Jemmali, 1982). L'absence de cyclicité était confirmée à l'abattage par la présence de corps jaunes et l'absence de corps blancs sur les ovaires. Les cornes utérines étaient hypertrophiées et n'avaient pratiquement plus de lumière. La régression des corps jaunes interviendrait dans les 30 jours suivant le retrait de l'aliment contaminé (Edwards *et al.*, 1987b).

Les mécanismes impliqués dans la persistance des corps jaunes par la zéaralène sont discutés. Pour Flowers *et al.* (1987), la zéaralène agirait directement au niveau ovarien puisqu'à la différence du benzoate d'œstradiol, elle n'empêche pas l'augmentation de sécrétion de PGF_{2α} et n'inhibe pas la sécrétion de LH. Cependant, Green *et al.* (1990) observent une diminution des concentrations moyennes de LH chez des truies ayant reçu pendant une semaine un aliment renfermant 10 ppm de zéaralène, mais la fréquence et l'amplitude des pulses de LH et la sécrétion de FSH ne sont pas

modifiées. Enfin, d'après Diekman *et al.* (1986), la sécrétion de LH et de FSH est inhibée chez des truies ovariectomisées recevant une seule forte dose orale de 1 mg de zéaralène /kg pc.

Jusqu'à 10 mg/kg de zéaralène dans l'aliment distribué avant l'insémination, le taux d'ovulation, la fertilité et le taux de conception, la taille de la portée *in utero* ou à la naissance et la mortalité embryonnaire ne sont pas affectés. Avec des concentrations élevées pendant la gestation, la taille de la portée est diminuée, voire nulle dans certains cas (64 ppm : Long *et al.*, 1982 ; 60 et 90 mg/kg : Long et Diekman, 1984 ; 108 mg/j : Long et Diekman, 1986). L'importance de l'effet paraît reliée à la dose de toxine (Long et Diekman, 1984; Young *et al.*, 1990) et dans la plupart des études, même un taux inférieur à 60 ppm de zéaralène provoque des portées de plus faible taille et réduit la survie embryonnaire. Ainsi, Long *et al.* (1982) trouvent que la proportion de truies sans fœtus ou avec des portées de taille anormalement faible (1 à 3 fœtus) augmente lorsque la teneur en zéaralène de l'aliment passe de 0 à 7, 38 et 64 mg/kg. Une période limitée de consommation suffit à accroître la mortalité fœtale : seule une truie sur 4 était gestante lorsque la zéaralène était consommée entre le 7^{ème} et 10^{ème} jours de gestation, mais aucun effet n'était constaté entre les 2^{ème} et 6^{ème} ou les 11^{ème} et 15^{ème} jours (Long et Diekman, 1986).

La mort de fœtus a été confirmée par l'observation de membranes fœtales dégénérées présentes dans l'utérus à 40 jours de gestation dès un taux d'exposition de 7 mg/kg de zéaralène (Long *et al.*, 1982) ou au-delà de 30 mg/kg (Long et Diekman, 1984). De même, chez des truies recevant 1 mg de zéaralène /kg pc entre les 7^{ème} et 10^{ème} jours de gestation, Long *et al.* (1992) ont constaté une dégénérescence des blastocystes à partir du 11^{ème} jour qui s'aggravait au 13^{ème} jour. Les mécanismes d'action de la zéaralène sur la mortalité embryonnaire ne sont pas élucidés. Dans plusieurs études où les truies consommaient jusqu'à 108 mg/j de zéaralène, l'aspect macroscopique, histologique et microscopique des tissus utérins n'était pas affecté et conforme au stade physiologique des animaux (Long et Diekman, 1984, 1986 Long *et al.*, 1992). L'espacement des blastocystes et les concentrations en progestérone et en œstradiol-17 β dans l'utérus n'étaient pas modifiés, mais les teneurs en Ca, Mn et Zn différaient de celles des témoins (Long *et al.*, 1988). Une diminution des teneurs en progestérone et en prolactine, ainsi que du nombre de pics de LH a également été rapportée (Long et Diekman, 1984, 1986). Cependant, la relation entre ces altérations et la mort des embryons n'est pas établie.

La persistance des corps jaunes et l'absence de retour en œstrus ont été observées chez des truies n'ayant pas de fœtus à l'issue du premier tiers de la gestation (Etienne et Jemmali, 1982 ; Long *et al.*, 1982 ; Long et Diekman, 1984 ; Young et King, 1986). Cet effet pourrait être dû au fait que les truies non fécondées consommant la zéaralène sont pseudo-gestantes, tout comme les truies non inséminées qui n'ont plus de cycles œstraux (Etienne et Jemmali, 1982). Une autre raison du maintien des corps jaunes serait la mort de tous les fœtus chez les truies fécondées, celles-ci se retrouvant alors dans la même situation que les femelles non fécondées.

La croissance et le développement des fœtus peuvent être affectés par la zéaralène. La consommation de régimes renfermant environ 4 mg/kg de zéaralène à partir de l'insémination diminue de 24 % leur poids à 80 jours de gestation (323 vs. 423 g) et accroît considérablement l'hétérogénéité des portées (Etienne et Jemmali, 1982). Le poids des placentas est également réduit, suggérant une altération des échanges materno-fœtaux. De plus, les fœtus sont anémiés (-11% d'érythrocytes). Young et King (1986) ont aussi constaté que le poids des porcelets à la naissance diminue lorsque la teneur en zéaralène de l'aliment augmente (de 1,42 à 1,05 kg entre 0 et 9 mg/kg de zéaralène). Au contraire, Long et Diekman (1984, 1986) n'ont pas observé d'effet similaire, mais dans leur expérience, la période de consommation de zéaralène est très courte et les fœtus sont encore peu développés, les truies étant sacrifiées à 30-40 jours de gestation. Par ailleurs, des cas d'abduction des membres postérieurs (splayleg) ont été signalés sur des porcs nouveau-nés issus de truies consommant de l'aliment contaminé (Miller *et al.*, 1973).

Peu d'études se sont focalisées sur les conséquences de la présence de zéaralène dans le lait. D'après Young *et al.* (1982) et Dacasto *et al.* (1995), la survie post-natale des porcelets est affectée, alors qu'Edwards *et al.* (1987a) ne constatent aucun effet. Des symptômes d'hyperœstrogénisme chez des porcelets allaités ont été décrits dès les premiers jours de vie (Dacasto *et al.*, 1995), à partir du 8^{ème} jour (Palyusik *et al.*, 1980) et à l'âge de 35 jours (Young *et al.*, 1982). De l' α et du β -zéaralénol ont été détectés dans le lait de truies consommant un aliment qui artificiellement contaminé à 40

mg/kg de zéaralène purifiée (Palyusik *et al.*, 1980). Par contre, aucun de ces composés n'a été trouvé dans le placenta (Etienne et Jemmali, 1982).

Les effets de la zéaralène sur la reproduction du verrat paraissent limités. Chez l'animal impubère, la consommation d'un aliment contenant 40 mg/kg de zéaralène jusqu'à l'âge de 18 semaines diminue leur libido, mais n'affecte pas leur âge à la puberté, la taille et le poids des testicules et de l'épididyme, le nombre de spermatozoïdes ni la motilité des spermatozoïdes (Berger *et al.*, 1981). Chez le verrat reproducteur, Ruhr *et al.* (1983) ne constatent aucun effet d'un aliment ayant entre 0 et 200 mg/kg de zéaralène distribué pendant 8 semaines sur la taille des testicules, la libido, la testostérone et le 17β -œstradiol plasmatiques, et concluent à l'absence d'effet de cette mycotoxine sur le potentiel de reproduction des verrats.

- Transfert dans les tissus animaux

Il existe peu de données sur le stockage de la zéaralène ou de ses résidus dans les tissus du porc (Sundlof et Strickland, 1986).

Chez le porc, la zéaralène conjuguée et l' α -zéaralène sont les principaux métabolites de la zéaralène, l' α -zéaralène étant 3 à 4 fois plus œstrogénique que la zéaralène. De la zéaralène libre apparaît dans le sang 10 minutes après qu'elle ait été administrée par voie orale (de 0 à 11,5 mg/kg de poids vif) à des porcs de 20 à 30 kg (Farnworth et Trenholm, 1981). Sa teneur culmine 10 à 20 minutes plus tard, ce qui suggère qu'elle est rapidement absorbée. Elle décroît ensuite rapidement par métabolisation ou excrétion mais elle est encore retrouvée après 24 h dans le sang des porcs ayant reçu la plus forte dose. Dänicke *et al.* (2005) ont établi à 2,6 h la demi-vie d'élimination de la zéaralène dans le plasma. Chez un porc femelle recevant 192 μ g de zéaralène /kg pc/j pendant 4 jours, la zéaralène et l' α -zéaralène, tous deux sous forme liée à l'acide glucuronique, sont détectés jusqu'au 5^{ème} jour dans le sang et jusqu'au 4^{ème} jour dans l'urine (Olsen *et al.*, 1985). Après administration quotidienne pendant 7 jours de faibles doses de zéaralène (200 μ g, soit la LOAEL, ou 400 μ g/kg) à 24 porcs de 49 kg, Obremski *et al.* (2003) constatent une augmentation de la zéaralène et de l' α -zéaralène dans le sang 2 h après la 1^{ère} prise. Les concentrations en α -zéaralène sont toujours plus élevées que celles en zéaralène. Le foie de porcelets d'environ 10 kg consommant pendant 4 semaines un aliment contaminé à 40 mg/kg de zéaralène contenait au maximum 0,23 mg/kg de zéaralène et 0,31 mg/kg d' α -zéaralène (James et Smith, 1982). Dans le lait de 2 truies ayant consommé un aliment renfermant 40 mg/kg de zéaralène pendant 9 jours en lactation, Palyusik *et al.* (1980) retrouvent la toxine principalement sous forme de zéaralène (82 à 84 % sous forme de β -zéaralène et 13-17% d' α -zéaralène). Ces toxines étaient détectées à partir de 42-44 h après le début de la distribution du régime contaminé, la concentration maximale de zéaralène dans le lait étant de 0,58-0,79 mg/kg.

En injectant de la zéaralène tritiée par voie intraveineuse, Biehl *et al.* (1993) ont montré que la bile constitue une voie d'excrétion très importante de la zéaralène et de ses métabolites, et que ces produits sont recyclés grâce à un cycle entérohépatique qui contribue à augmenter leur durée de vie (86,6 h au lieu de 3,3 h chez des porcs dont la bile était collectée). La zéaralène, l' α et le β -zéaralène ont d'ailleurs été détectés dans la bile de la plupart des 792 truies présentant des problèmes de fertilité (Meyer *et al.*, 2000). Seule la bile renferme du β -zéaralène d'après Doll *et al.* (2003). Après 12 semaines de consommation d'un aliment renfermant 0,24 mg de DON et 0,009 mg de zéaralène/kg, le rapport entre la teneur totale en zéaralène et ses métabolites dans la bile et la teneur de l'aliment était de 4, contre seulement 0,009 dans le foie (Goyarts *et al.*, 2007). Seules des quantités minimales de zéaralène et de ses métabolites (0,05%) persistent dans les muscles de porcs ayant consommé pendant 18 jours un aliment multicontaminé, notamment par 1,37 mg/kg de zéaralène. Mais à la différence du foie ou de la bile, ils peuvent contenir du zéaralène, ce qui suggère que le métabolisme de la zéaralène ne serait pas limité aux sphères hépatique et gastro-intestinale (Zöllner *et al.*, 2002).

D'après Mirocha *et al.*, (1981), la zéaralène et ses métabolites sont éliminés dans les fèces et dans l'urine, 63% sous forme de zéaralène libre ou conjuguée, 32% sous forme d' α -zéaralène et 5% sous forme de β -zéaralène.

6.1.2 Les volailles

- Effets sur la santé

Parmi toutes les espèces animales étudiées, les volailles semblent être les plus résistantes à la zéaralène (Gaumy *et al.*, 2001a). Lors d'études expérimentales, des teneurs supérieures à 100 mg/kg sont en général nécessaires pour obtenir des signes cliniques. Ces manifestations sont résumées dans le tableau II.

Parmi les différentes espèces, les dindons seraient les plus sensibles. Chez le jeune, un effet anabolisant est constaté chez les animaux de 10-12 jours nourris avec une ration contenant 300 mg/kg de zéaralène. Une augmentation des sécrétions muqueuses dans les fèces, une hypertrophie de l'oviducte et du cloaque, suivie d'une éversion de ce dernier après 4 jours de traitement sont également observées (Mirocha *et al.*, 1971). Chez l'adulte, l'administration de 100 mg de zéaralène /kg d'aliment pendant 56 jours entraîne une diminution de 20 % de la production d'œufs chez les femelles (Allen *et al.*, 1983), alors que l'administration de 400 et 800 mg de zéaralène /kg entraîne un développement plus important des pendeloques chez les mâles (Allen *et al.*, 1981b). L'impact "économique" de la zéaralène dans les conditions industrielles de production ne semble pas documenté.

Tableau 3 : Effets de la zéaralène chez les volailles

(Allen *et al.*, 1981a et b, Allen *et al.*, 1983 ; Bacon et Marks, 1976 ; Chi *et al.*, 1980 ; Marks et Bacon, 1976 ; Mirocha *et al.*, 1971).

Espèce, sexe et âge	Zéaralène	Durée de l'exposition	Symptômes et lésions
Dindons de 3 semaines	10-25 mg/kg	3 semaines	GMQ, autopsie, histologie : RAS
Dindons de 10 j	300 mg/kg	4 jours	Augmentation GMQ et des sécrétions muqueuses fèces
Dindons mâles adultes	400-800 mg/kg	chronique	Développement des pendeloques, formule numération et biochimie sanguine : RAS
Poulets / cailles	1-10-30 mg/kg	4 semaines	RAS
Poulets de 6 semaines	50-100-400-800 mg/kg	3 semaines	Autopsie, histologie : RAS
Poules	15 g/kg pc	administration orale unique	Pas de lésion
	50-200-400-800 mg/kg	7 jours consécutifs	Augmentation linéaire du poids de l'oviducte
Poules reproductrices de 20 semaines	25-100 mg/kg	28 jours	Aucun effet sur la reproduction
Poules pondeuses de 30 semaines	10-25-50-100-200-400-800 mg/kg	chronique	Aucun effet sur la reproduction
Coqs adultes	100-800 mg/kg	chronique	Semence normale, diminution de phosphatémie, cholestérolémie, PAL

RAS : aucune anomalie, GMQ : gain moyen quotidien, PAL : phosphatases alcalines

- Métabolisme et persistance à l'état résiduel

Bien que le métabolisme de la zéaralène soit un facteur clef de sa toxicité (Gaumy *et al.*, 2001b), peu d'études sont disponibles chez les volailles. *Ex vivo*, les poules produisent presque entièrement l' α -zéaralénol avec la fraction microsomale et le β -zéaralénol avec la fraction cytosolique (Olsen et Kessling, 1983). Les hépatocytes de poule produiraient principalement du β -zéaralénol, seules des traces d' α -zéaralénol étant retrouvées (Pompa *et al.*, 1986). Ces résultats divergent de ceux obtenus *in vivo*. Chez le poulet, l'administration d'une ration contenant 100 mg de zéaralène /kg pendant 8 jours suivie de l'administration de 10^9 dpm/kg de zéaralène tritiée révèle que la cinétique de la

zéaralène est rapide, les temps de demi-vie tissulaires variant de 24 à 48 h (Mirocha *et al.*, 1982). En dehors du tube digestif et des excréta (incluant bile et vésicule), l'essentiel de la radioactivité retrouvée est présente dans le foie et les reins, le pic de concentration étant obtenu 30 minutes après l'administration. Le profil résiduel hépatique, en ng/g, est alors le suivant : zéaralène 681, α -zéaralène 1200, β -zéaralène 662. Après 24 h, les quantités totales retrouvées dans le foie, le gésier (sans la muqueuse), le muscle, le plasma, la peau et la graisse sont respectivement de 651, 297, 111, 91, 70 et 53 ng/g. Ces résultats sont voisins de ceux obtenus par Maryamma *et al.* (1992) suite à l'administration de 10 mg de zéaralène /kg pc à des poulets pendant 20 j. Des teneurs hépatiques de 207 ng/g et 170 ng/g dans les muscles sont retrouvées 24 h après la dernière administration. De même, chez le dindon, l'administration d'une alimentation contenant 800 mg de zéaralène /kg pendant 2 semaines conduit à des concentrations plasmatiques de 66 ng/ml en zéaralène et de 194 ng/ml en α -zéaralène, essentiellement sous formes conjuguées, seules des traces de β -zéaralène étant retrouvées (Olsen *et al.*, 1986). Toutes ces études ont été effectuées à l'aide de très fortes doses de zéaralène. Une expérimentation récente réalisée chez la poule par administration d'une ration contenant 1,58 mg/kg de zéaralène pendant 16 semaines semble confirmer leur validité pour de faibles doses. Les concentrations hépatiques mesurées en fin d'étude sont de 2,1 ng/g en zéaralène et 3,7 ng/g en α -zéaralène, essentiellement présents sous forme de conjugués (glucuroconjugés et sulfoconjugés), les teneurs en β -zéaralène étant inférieures aux limites de détection (3 ng/g) (Danicke, 2002). Aucune trace de zéaralène ou de ses métabolites n'est retrouvée dans les muscles, la graisse et les œufs à cette dose. Signalons toutefois que les auteurs ne précisent pas le délai entre la dernière administration d'aliment et la réalisation du bilan résiduel.

6.1.3 Les ruminants

- Effets sur la santé

Des problèmes d'infertilité de vaches laitières associés à la présence de zéaralène dans des foin ont été identifiés initialement par Mirocha *et al.* (1968). A partir d'enquêtes réalisées aux Etats-Unis sur des troupeaux laitiers, Linn et Chapman (2002) montrent que l'ingestion d'aliments contenant des doses supérieures à 500 μ g/kg de zéaralène entraîne une baisse de la fertilité. Des cas d'infertilité chez des brebis et des génisses au pâturage en Nouvelle-Zélande ont été attribués aussi à la zéaralène (Towers et Sposen, 1993).

En fait des troubles de la reproduction sont fréquemment observés chez les vaches laitières à haute production. Or 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 (Jouany, 2006).

Il est donc difficile aujourd'hui de préciser la part revenant à chacun des deux facteurs dans ces troubles de la reproduction.

- Devenir de la zéaralène dans le rumen

Plus de 90 % de la zéaralène peut être métabolisé en α -zéaralène et dans une moindre mesure en β -zéaralène par les microorganismes du rumen *in vitro* (Kiessling *et al.*, 1984) ; l'activité œstrogénique de l' α -zéaralène est supérieure à celle de la toxine parente alors que l'affinité du β -zéaralène pour les récepteurs œstrogéniques est moindre, mais il présente un fort effet inhibiteur sur la prolifération des cellules endométriales (Tiemann *et al.*, 2003). L'essentiel de la dégradation de la zéaralène a lieu pendant la première heure d'incubation dans le rumen (Moschini *et al.*, 1999).

Les protozoaires sont principalement impliqués puisque leur activité métabolique à l'égard de la zéaralène est environ neuf fois plus forte que celle des bactéries (Kiessling *et al.*, 1984). Le zéranol (ou α -zéaralanol) formé par saturation de la double liaison 1',2' du cycle non aromatique de l' α -zéaralène produit dans le rumen a été détecté dans la bile de bovin n'ayant pas reçu de zéranol de synthèse utilisé comme anabolisant¹⁰ (Meyer *et al.*, 2002). Ce résultat prouve que la zéaralène est métabolisée en zéranol chez les ruminants après ingestion. Du zéranol est également éliminé dans la bile de bovins ayant reçu des doses de 10 mg de zéaralène ou d' α -zéaralène par gavage : Meyer *et al.* (2002) ont montré que le rapport de concentrations urinaires « α -zéaralène/zéranol » est toujours supérieur à 5, et que ce résultat peut être utilisé pour différencier l'utilisation frauduleuse du

¹⁰ L'utilisation de cet anabolisant est interdite en France

zéranol comme facteur de croissance, d'une production naturelle de l'œstrogène. Le rapport « zéranol/taléranol » (le taléranol étant le métabolite spécifique retrouvé chez les animaux traités frauduleusement au zéranol) peut également être utilisé dans ce but chez les bovins (Launay *et al.*, 2004).

L'œstrogénicité de la zéaralène et de ses métabolites a été analysée par Kuiper-Goodman *et al.* (1987), et quelques études récentes ont pu discriminer des sous-types de récepteurs (Eriksen *et al.*, 2000). Ces travaux montrent que les métabolites ont des effets œstrogéniques égaux voire supérieurs à ceux de la toxine parente. Toutefois, si l'on considère que la réduction de la zéaralène en zéaralénol augmente sa polarité, l'absorption et l'excrétion du métabolite sera alors accrue. Une hydroxystéroïde-déshydrogénase qui est habituellement impliquée dans le métabolisme des stéroïdes intervient également dans la conversion de la zéaralène en zéaralénol au niveau du foie (Kiessling et Petterson, 1978 ; Olsen *et al.*, 1981). La disponibilité de l'enzyme hépatique est donc augmentée lorsqu'une partie de la conversion en zéaralénol a déjà eu lieu dans le rumen.

- Transfert dans le lait

Les données disponibles pour identifier si le taux de transfert de la zéaralène dans le lait est significatif sont issues d'expérimentations.

Des doses quotidiennes orales de zéaralène de 50 à 165 mg administrées à des vaches n'ont pas permis de détecter la présence de toxines ou de métabolites dans le plasma ou le lait (Prelusky *et al.*, 1990). Une ingestion quotidienne de 544,5 mg de zéaralène par une vache laitière, pendant 21 jours, a conduit à la détection de la toxine mère et d' α -zéaralénol dans le lait, avec un taux cumulatif de transfert de 0,06%. Une administration orale unique de 1,8 ou 6,0 g de zéaralène a également abouti à la détection d'une concentration maximale de 0,004 ou 0,0061 $\mu\text{g/mL}$ de zéaralène, 0,0015 ou 0,004 $\mu\text{g/mL}$ d' α -zéaralénol et de 0,0041 ou 0,0066 $\mu\text{g/mL}$ de β -zéaralénol dans le lait pendant 48 heures. Le taux de transfert a été faible et a varié avec la dose administrée : 0,016 et 0,008% correspondant respectivement aux doses orales de 1,8 et 6,0 g (Prelusky *et al.*, 1990).

Ces données montrent que la zéaralène ne présente pas de risque avéré pour le consommateur de produits laitiers (Guerre *et al.*, 2000). Néanmoins le taux de transfert dans le lait n'a été étudié qu'au travers de ces quelques expérimentations.

6.1.4 Animaux de compagnie et de loisirs

Si les animaux de compagnie et de loisirs ne diffèrent pas fondamentalement des autres animaux domestiques quant aux circonstances et aux conséquences du risque lié aux mycotoxines, ils présentent cependant une différence notoire : celle de la durée de l'action toxique inhérente à leur longue espérance de vie. Pour ces espèces, c'est tout autant l'impact de consommation de faibles doses sur de très longues périodes avec des répercussions sur la fertilité ou les performances, la baisse d'immunité ou la sensibilité accrue aux agents infectieux, que le risque ponctuel lié à des contaminations massives associées à un tableau clinique plus explicite, qu'il s'avère particulièrement pertinent de connaître.

- Les équidés

Les données disponibles quant à la sensibilité des équidés face à la consommation d'aliments contaminés par la zéaralène sont rares. Gimeno et Quintanilla (1983) rapportent un cas d'intoxication naturelle par des issues de maïs contaminées à 2,7 mg/kg de zéaralène. Les juments ont présenté refus alimentaires, prolapsus utérins et hémorragies internes. *A contrario*, dans un essai contrôlé, Juhasz *et al.* (2001) ont administré *per os* une faible dose de zéaralène (10 mg/j pendant 10 jours, ce qui correspond à une contamination moyenne de la ration de 1 mg/kg) à 6 juments, 10 jours après l'ovulation sans observer aucune détérioration des paramètres de la reproduction.

- Les carnivores

De fréquentes remontées du terrain laissent à penser que les carnivores domestiques (canidés et félidés) seraient susceptibles de présenter des signes cliniques de mycotoxicoses œstrogéniques suite à la consommation d'aliments secs contenant des céréales avariées (blé et surtout maïs). Cependant aucune de ces observations n'est clairement documentée et n'a fait l'objet de publication.

A l'occasion d'une enquête épidémiologique conduite entre mai 2001 et mai 2002 et portant sur la contamination des aliments destinés aux animaux domestiques, 45 échantillons d'aliments secs pour chiens disponibles en Pologne ont fait l'objet d'un dépistage de zéaralène (Gajecki, 2002). Quarante-deux se sont révélés positifs avec des valeurs comprises entre 5 et 299,5 µg/kg. L'enquête conduite par Zwierzchowski *et al.* (2004) dans le même pays fournit des résultats comparables : sur 57 aliments pour carnivores analysés, 48 (soit 86 %) se révèlent positifs à la zéaralène (de 0,5 à 299,5 µg/kg) avec un taux moyen de contamination de 36 µg/kg.

Cependant, les seules observations faisant clairement le lien entre zéaralène et reproduction des carnivores ont été faites dans des conditions de contamination expérimentale d'aliments à destination de chiens ou de visons. Aucune donnée n'est disponible dans l'espèce féline.

Hidy *et al.* (1977) font les premiers référence à un nombre significativement réduit de corps jaunes chez des chiennes recevant durant 13 semaines une alimentation contaminée expérimentalement par la zéaralène (1 mg/kg pv/j). Plus récemment, l'activité ciblée de la zéaralène sur la fonction de reproduction de la chienne a été confirmée (Gajecka *et al.*, 2004a et b). Des chiennes âgées de 6 mois ont reçu de la zéaralène pure additionnée à leur aliment, à la dose de 200 µg/kg pv durant 7 jours, équivalant à une concentration dans l'aliment de 10 mg/kg environ. Au terme de cet essai, les animaux ont été ovario-hystérectomisés. Les tissus prélevés ont fait l'objet d'un examen macroscopique et microscopique. L'utérus était œdématisé, hyperémique et hyperplasique avec un endomètre pulpeux et congestif. Le cervix et le vagin présentaient de nombreuses cellules métaplasiques. Quant aux ovaires, il était possible de noter une hyperémie, mais également une atrophie folliculaire. Avec un niveau de contamination inférieur (25 et 50 µg/kg pc durant 50 jours), il est noté un effet dépressif sur certains paramètres de l'immunité humorale (Gajecka *et al.*, 2004a).

In vitro, des cellules de la granulosa et de la thèque interne exposées à 25 ng/mL de zéaralène révèlent une dégénérescence vacuolaire, signant une atteinte fonctionnelle des tissus folliculaires (Skorska-Wyszynska *et al.*, 2004). Au vu de ces observations, il n'est donc plus possible d'écarter l'éventuelle responsabilité d'une contamination, même faible, des aliments pour carnivores dans la survenue de troubles de la fécondité en élevage chez les femelles potentiellement reproductrices (œstrus prolongé, kystes ovariens, pyomètre, etc.).

Parmi les animaux à fourrure, les visons (*Mustela vison*) constituent une catégorie à part compte tenu du caractère intensif de la conduite de la reproduction. L'impact d'un effet délétère éventuel de la zéaralène a été évalué par Yamini *et al.* (1997) : un quart seulement des femelles mises à la reproduction et recevant des aliments contaminés à 20 mg/kg de zéaralène ont mis bas. Les femelles vides ont toutes présenté une atteinte utérine (hyperplasie de l'endomètre, endométrite et/ou pyomètre) et ovarienne (atrophie folliculaire).

6.1.5 Les poissons

Toxicités à la Zéaralène observées en élevage

A notre connaissance, aucun cas d'une toxicité à la zéaralène en élevage piscicole n'a été rapporté dans la littérature scientifique. Par contre, des études expérimentales menées sur les poissons ont fait état d'effets de la zéaralène sur la reproduction.

Etudes expérimentales

In vitro, l'effet œstrogénique de la zéaralène et de ses métabolites (α -zéaralénol et β -zéaralénol) a été démontré sur des cultures primaires d'hépatocytes de saumon atlantique (*Salmo salar*) (Celius *et al.*, 1999) exposées à des concentrations variant de 10 à 1000 nM. Cette gamme de concentrations induit la synthèse des protéines ZR de la *zona radiata* des œufs et de la vitellogénine, l' α -zéaralénol étant le plus fort inducteur et les protéines ZR étant les plus sensibles. Des observations similaires ont été faites chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), où les affinités de la zéaralène et de l' α -zéaralénol pour les récepteurs à œstrogènes sont respectivement de 1/300 et de 1/150 environ par rapport à l'œstradiol (Arukwe *et al.*, 1999).

Arukwe *et al.* (1999) ont mené une étude *in vivo* chez la truite arc-en-ciel. Des truites témoins ont été comparées à des truites ayant reçu une injection de 1 ou 10 mg/kg pc de zéaralène, α -zéaralénol et β -zéaralénol ou encore une injection de 5 mg/kg pc de 17 β -œstradiol. Une induction dose-

dépendante de la vitellogénine et des protéines zr a été observée 7 jours plus tard avec la zéaralénone et l' α -zéaralénol. Aucun effet significatif n'a été observé avec le β -zéaralénol. La réponse des protéines zr à l' α -zéaralénol correspond approximativement à 50 % de celle au 17β -œstradiol. La sensibilité *in vivo* semble donc plus élevée que celle démontrée *in vitro* chez les poissons.

Il paraît probable que l'induction de la synthèse hépatique de la vitellogénine et des protéines zr par la zéaralénone et de ses métabolites chez les poissons soit causée par leur liaison au récepteur à œstrogène. Le potentiel œstrogénique de ces substances chez les salmonidés suit l'ordre suivant : α -zéaralénol > zéaralénone > β -zéaralénol (Arukwe *et al.*, 1999), comme chez la majorité des espèces animales. Cependant, il est à noter qu'une étude (Matthews *et al.*, 2000) a montré que la zéaralénone et ses métabolites ont une plus forte affinité pour les récepteurs à œstrogène de la truite arc-en-ciel, comparé aux récepteurs des humains, de la souris, du poulet ou encore de la grenouille. Par contre l'affinité et la spécificité des récepteurs à œstrogènes pour la zéaralénone est similaire quand on compare la truite arc-en-ciel au saumon atlantique (Tollefsen *et al.*, 2002).

Par ailleurs, chez la carpe (*Cyprinus carpio*), l'ingestion de zéaralénone provoque une réduction du nombre et de la qualité des spermatozoïdes mais les mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés (Sandor et Vanyi, 1990).

Transfert dans les tissus animaux

Bien qu'une méthode de dosage de zéaralénone, α -zéaralénol et β -zéaralénol dans les tissus de truites arc-en-ciel par LC-MS ait été mise au point (Lagana *et al.*, 2003), à notre connaissance, aucune donnée de transfert de zéaralénone ou de ses métabolites dans les tissus n'a été publiée.

6.2. Calcul de l'exposition animale en France

La méthodologie générale est décrite en annexe 2

6.2.1 Données de contamination

2162 valeurs de contamination ont été recueillies, réparties sur 17 types d'aliments (tableau 4). Quelques matières premières (manioc, rafles de maïs, seigle) disposant de moins de 5 données ne sont pas présentées dans le tableau 4, ni utilisées pour le calcul de l'exposition. Ainsi, une fois ces données retirées, il reste 2153 valeurs de contamination, regroupées en 14 types d'aliments.

Tableau 4 : Répartition des données de contamination en zéaralénone par groupe de matières premières (n ≥ 5)

	nombre de données	% < LOD	% > LOQ
Avoine	56	0.0	8.9
Blé	322	8.1	17.4
Corn feed	22	0.0	86.4
Farine basse	9	0.0	0.0
Féveroles	19	100.0	0.0
Gluten feed de blé	112	0.0	54.5
Issues de céréales	8	0.0	75.0
Maïs	972	11.6	26.3
Orge	258	11.2	5.4
Pois	150	60.0	14.7
Remoulage	55	0.0	18.2
Son	76	0.0	17.1
Sorgho	24	0.0	25.0
Triticale	70	0.0	50.0
Total	2153	12.9	23.4

Ces données comportent 12.9 % de valeurs inférieures à la limite de détection et 23.4 % de valeurs quantifiées (supérieures à la limite de quantification).

Les estimations minimales calculée ainsi que les estimations aux 75^{ème} et 95^{ème} percentiles des teneurs supérieures à la limite de quantification peuvent être comparées aux teneurs réglementaires pour les aliments complets (Recommandation 2006/576/CE).

Les 3 matières premières les plus contaminées sont le maïs, les issues de céréales, en particulier les poussières, ainsi que le gluten feed de blé. Il est généralement admis que le maïs et donc les produits issus du maïs sont plus contaminés que le blé.

Concernant les poussières de céréales, le problème est récurrent quant à leur niveau de contamination, non seulement en zéaralenone mais quelle que soit la mycotoxine considérée. Cette matière correspond à des déchets de céréales provenant de diverses sources (fond de silo, de bateau ou de camion, issues des filtres à poussière par exemple). Il serait recommandé de ne pas les utiliser pour l'alimentation animale.

Les statistiques descriptives des niveaux de contamination selon les scénarii indiqués sont fournis en annexes. Ces résultats sont présentés pour les niveaux de contamination en poids frais (12 % d'humidité), tel que stipulé dans la recommandation (Recommandation 2006/576/CE).

Calcul de l'exposition

Les calculs de contamination des rations sont les suivants (les tableaux détaillés des résultats sont en annexe 2) :

- Pour les herbivores, ruminants (notamment bovins)

L'exposition n'a pas été calculée ; en effet, les régimes comportent pour une très large part des matières premières pour lesquelles les données de contamination ne sont pas disponibles ou pas suffisantes : pâturages, ensilages et autres fourrages pour ce qui concerne le régime retenu (cf annexe 2 « Exposition animale : Méthodologie générale »).

- Pour les volailles

Tableau 5a : Calculs de contamination en zéaralénone des rations pour les volailles

		Contamination minimale calculée		Contamination des positifs		
		en µg/kg d'aliment	% de la ration	au p75 en µg/kg d'aliment	au p95	% de la ration
Poulet standard	démarrage	27.6	58.5	33.1	92.7	58.5
	croissance	23.3	62.2	27.7	69.8	62.2
	finition	19.7	62.6	23.2	52.2	62.6
	retrait	21.6	68.4	25.4	57.2	68.4
Poulet label	démarrage	42.1	65.8	51.0	157.6	65.8
	croissance	50.2	77.6	60.8	188.5	77.6
	finition-retrait	50.5	79.4	60.9	197.7	79.4
Poule pondeuse	démarrage	40.2	68.8	48.6	158.6	68.8
	croissance	40.9	76.7	49.6	157.9	76.7
	repro-entretien	41.8	79.5	50.7	166.2	79.5
	pondeuse	38.1	65.1	46.3	140.0	65.1
Dinde	démarrage	17.0	40.9	20.2	53.6	40.9
	croissance 1	14.3	47.5	16.8	43.6	47.5
	croissance 2	17.4	55.0	20.4	55.5	55.0
	finition 1	23.4	58.3	27.8	72.5	58.3
	finition 2	19.3	66.0	22.5	61.7	66.0
	finition 3	18.8	64.3	22.1	46.8	64.3

Pintade	démarrage	49.8	58.2	60.5	205.1	58.2
	croissance	56.0	62.5	68.1	225.6	62.5
	finition-retrait	62.9	65.4	76.7	257.0	65.4
Canard de Barbarie	canard démarrage	31.8	70.4	38.0	104.6	70.4
	canard croissance	35.1	79.1	41.9	114.5	79.1
	canard finition	33.9	81.8	40.3	106.8	81.8
Canard prêt à gaver	élevage	44.5	75.0	53.7	162.6	75.0
	gavage	100.4	98.0	122.4	414.0	98.0

NB : La part de la ration (exprimée en pourcentage) susceptible d'être contaminée par la zéaralénone utilisée dans le calcul de l'exposition varie selon les scénarii :

- dans le cas de la contamination minimale calculée, elle correspond aux matières premières pour lesquelles les données sont suffisantes (même si elles sont non déterminées),
- dans le cas du scénario contamination aux 75^{ième} et 95^{ième} percentiles des teneurs positives, elle correspond aux matières premières pour lesquelles les teneurs sont supérieures à la limite de détection.

Il n'existe pas de teneur maximale acceptable pour la contamination par la zéaralénone des aliments complets ou complémentaires pour les volailles.

Les valeurs de contamination moyenne de la ration varient entre 14 et 100 µg/kg.

On peut distinguer les poulets standards, les poules pondeuses et les dindes avec un niveau de contamination de la ration inférieur à 40 µg/kg d'aliment des autres volailles (poulet label, pintade, canard prêt à gaver) dont les niveaux de contamination moyens supérieurs à 40 µg/kg peuvent aller jusqu'à 100 µg/kg, en fonction du taux de maïs dans leur ration. La contamination de la ration des canards prêts à gaver est « extrême » compte-tenu de la teneur de 98% de maïs de leur régime . Aux percentiles élevés, cette teneur en maïs distingue d'autant plus les espèces de volailles.

Les matières premières pour lesquelles on dispose d'un nombre suffisant de données de contamination représentent une part importante de la ration dans le cas des canards, ainsi que des poulets labels et des poules pondeuses (environ 70%).

- Pour les porcs

Tableau 5b Calculs de contamination en zéaralénone des rations pour les porcs

Porcins	Contamination minimale calculée		Contamination des positifs			Rec 2006/576/CE valeurs limites
	En µg/kg d'aliment	% de la ration	au p75 en µg/kg d'aliment	au p95 % de la ration		
1er âge	40.5	56.5	49.1	155.8	56.5	100
2ème âge	26.9	78.0	33.5	100.0	78.0	100
croissance corpen	31.6	83.4	38.8	156.3	83.4	250
finition corpen	36.1	87.0	44.3	171.1	87.0	250
truies gestantes	31.3	84.8	40.5	146.2	84.8	250
truies allaitant	22.7	79.5	29.2	107.5	79.5	250

La recommandation 2006/576 prévoit des valeurs limites de contamination de la ration pour les porcins. Il faut cependant noter que les valeurs de teneurs maximales recommandées pour les matières premières sont définies pour les animaux les moins sensibles et donc ne sont pas utilisables pour les porcins.

Ainsi, les scénarii moyens de contamination représentent jusqu'à 40 % de la contamination autorisée pour les aliments 1^{er} âge porcins. On note relativement peu de différences pour l'exposition au 75^{ème}

percentile ; par contre au 95^{ème} percentile , les valeurs limites de la recommandation sont atteintes voire dépassées pour les porcelets.

L'interprétation de ces résultats doit être effectuée avec prudence en fonction du pourcentage de la ration prise en compte dans ce calcul. Dans le cas des porcs, hormis pour les aliments 1^{er} âge pour lesquels il n'a pu être tenu compte que de 57% de la ration totale, jusqu'à 87% de la ration a pu être pris en compte dans l'estimation de la contamination, permettant ainsi de s'approcher au mieux de la contamination totale.

7. Réglementation

Pour l'alimentation humaine, le règlement 1126/2007/CE modifiant le règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) fixe les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, notamment pour la zéaralénone (tableau 6a). Pour l'alimentation animale (matières premières et aliments), aucune teneur maximale en zéaralénone n'est fixée pour les matières premières et les aliments, bien que la Commission Européenne fasse des recommandations¹¹ (tableau 6b).

Tableau 6a : Teneurs maximales en zéaralénone dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg

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)

¹¹ Recommandation 2006/576/CE de la Commission du 17 août 2006 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.

Tableau 6b : Teneurs maximales 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 	2000 3000
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) 	100 250 500

8. Surveillance et contrôle en France

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- 2004, 2005, 2006, 2007) des récoltes 2003 à 2006 montrent que le maïs est plus à risque que les grains de céréales à paille. En effet, par rapport aux limites réglementaires (voir § précédent), 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 zéaralène alors que 11 % des échantillons de maïs en contiennent plus de 200 µg/kg. Par ailleurs, la contamination est variable selon les années puisque le pourcentage d'échantillons de maïs dont la teneur en zéaralène dépasse 200 µg/kg varie de 0 à 20 %.

Les semoules et farines de maïs sont les aliments les plus contaminés, avec une teneur moyenne en zéaralène de 13,3 µg/kg. Aucun échantillon ne dépasse la limite réglementaire de 200 µg/kg. Les autres produits à base de céréales, notamment les semoules et farines de blé, présentent des teneurs beaucoup plus faibles, comprises entre 2 et 4 µg/kg (plus de 80 % des valeurs n'ont pas été quantifiées (LOQ = 5 à 10 µg/kg)).

9. Conclusions et recommandations

L'effet toxique le plus préoccupant de la zéaralène est son caractère de perturbateur endocrinien à activité œstrogénique. L'effet sur l'homme n'est pas avéré. En revanche, les porcins sont sensibles à la zéaralène, et plus particulièrement les jeunes femelles. Chez cette espèce, la zéaralène est métabolisée en α -zéaralène, dont l'activité œstrogénique est supérieure à celle du composé parental. Cette bioconversion pourrait intervenir dans le tube digestif des ruminants. Le risque d'une contamination du lait des ruminants n'est pas avéré sur la base du taux de transfert non significatif. Néanmoins cette observation a été effectuée lors de quelques expérimentations chez des vaches laitières. La présence de zéaralène et de ses métabolites, notamment l' α -zéaralène, dans les produits animaux, devrait ainsi faire l'objet d'études complémentaires afin d'évaluer la réalité du transfert dans les denrées d'origine animale.

La Dose Journalière Tolérable Provisoire fixée par le SCF en 2000 a été retenue pour la caractérisation du risque pour le consommateur. L'exposition alimentaire humaine est inférieure à la dose journalière tolérable sauf pour 2,5% des enfants de 3 à 14 ans, et pour 31% de la population végétalienne.

Les principaux aliments vecteurs sont ainsi les céréales (maïs) contaminées au champ par des *Fusarium* producteurs. Les plans de surveillance devraient être confortés par la prise en compte des produits céréaliers à base de blé destinés à l'alimentation humaine et animale.

Les animaux d'élevage peuvent être exposés à la zéaralène contaminant les céréales et coproduits céréaliers à des teneurs élevées capables d'induire un risque d'apparition d'effets œstrogéniques, notamment chez le porc. Concernant les poussières de céréales (déchets de céréales), le problème est récurrent quant à leur niveau de contamination. Il serait recommandé de ne pas les utiliser pour l'alimentation animale.

Il serait également souhaitable de disposer de plus de données de contamination de certaines matières premières, et notamment de fourrages et d'ensilages.

Compte tenu de la part prépondérante prise par les aliments secs dans l'alimentation des carnivores domestiques, et de la contribution notable de certaines céréales à risque (maïs notamment) dans la formulation de ces aliments, des essais devraient être entrepris afin d'évaluer scientifiquement le niveau de réceptivité et de sensibilité des femelles reproductrices de ces espèces.

Il serait souhaitable que des études toxicologiques soient réalisées selon les lignes directrices reconnues internationalement afin de réviser les doses journalières tolérables provisoires fixées en 1999 et 2000 sur le fondement d'études insuffisantes.

Enfin, des études devraient également être conduites pour améliorer les connaissances toxicologiques sur les interactions entre la présence de zéaralène avec celle des autres perturbateurs endocriniens, ou des associations de toxines fusariennes, notamment de la zéaralène avec des trichothécènes et des fumonisines.

Références bibliographiques (*voir document spécifique*)

Chapitre 5 Les fumonisines

Coordination : Isabelle Oswald et François Grosjean

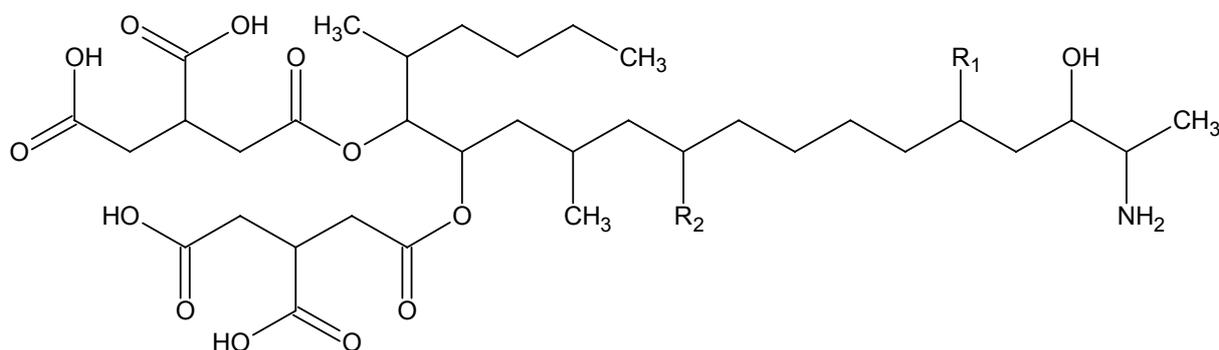
Introduction

Bien que la découverte de la structure de la fumonisine B1 (FB1) date de 1988 (Gelderblom *et al.*, 1988), les effets de cette famille de mycotoxines sont connus depuis longtemps dans plusieurs espèces animales, en particulier chez les équidés où elles se manifestent par une hépatotoxicité et une nécrose cérébrale. Cette famille de mycotoxines est principalement produite par *Fusarium verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*) et *F. proliferatum*.

Le mécanisme d'action des fumonisines est en partie élucidé. Au niveau cellulaire, les fumonisines perturbent les fonctions biologiques de plusieurs protéines intervenant dans la biosynthèse de certains lipides : les sphingolipides (molécules impliqués dans les structures cellulaires, la croissance, la différenciation et la transformation néoplasique). Les fumonisines ont une structure proche de celle de la sphinganine (Sa) et de la sphingosine (So), molécules qui constituent le squelette carboné des sphingolipides. Les fumonisines agiraient par inhibition des céramides synthases (= *N*-acyltransférases) qui interviennent dans la biosynthèse et le catabolisme des céramides (sous classe de sphingolipides). Différents travaux suggèrent une double compétition sur les sites enzymatiques des céramides synthases, par analogie structurale entre la FB1 et la Sa d'une part et la FB1 et l'acyl CoA, d'autre part. L'inhibition de la biosynthèse des sphingolipides conduit à l'accumulation de bases sphingoïdes libres (surtout la Sa, mais parfois également la So) et à une diminution des céramides et des sphingolipides complexes (Merrill *et al.*, 1996; Merrill *et al.*, 2001). Cette inhibition peut être révélée par l'augmentation du rapport Sa/So, observée dans divers tissus et dans le sérum d'animaux ayant consommé des fumonisines. Ce rapport constitue un marqueur précoce, dépendant de la dose et spécifique d'une exposition aux fumonisines, pouvant être utilisé à titre épidémiologique, dans le dépistage pré-clinique des intoxications (Wang *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1993).

1. Propriétés physiques et chimiques des fumonisines

Les fumonisines constituent un groupe de mycotoxines structurellement reliées. La fumonisine (FB1) est le diester en positions 14 et 15 de l'acide 1,2,3-propane tricarboxylique et du 2-amino-12,16-diméthyl-3,5,10,14,15-pentahydroyéicosane. La fumonisine B2 (FB2) est l'analogue du désoxy C-10 de la FB1. La structure des autres membres de cette famille est donnée dans la figure 1.



	R1	R2	Formule brute	Nombre CAS	Masse Moléc.
Fumonisine B1	OH	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	116355-83-0	721,8
Fumonisine B2	OH	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	116355-84-1	705,8
Fumonisine B3	H	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	136379-59-4	705,8
Fumonisine B4	H	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	136379-60-7	689,8

Figure 1 : Structure chimique des fumonisines.

Ces composés sont caractérisés par 4 fonctions acides carboxyliques qui leur confèrent une grande hydrophilie. Ce sont des composés polaires, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants apolaires.

2. Méthodes d'analyse (voir principes généraux en Annexe 1)

Le règlement 401/2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et les méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en toxines de *Fusarium* dans les denrées alimentaires.

Il existe une méthode normalisée pour la recherche des FB1 et FB2 dans le maïs et le maïs peu transformé¹² basée sur une extraction en phase solide et suivie d'une séparation par CLHP et détection en fluorimétrie après dérivation à l'OPA (o-phthaldialdéhyde). Il existe une norme analytique au CEN¹³ pour le dosage des FB1 et FB2 dans les produits dérivés du maïs¹⁴ (farine et céréales du petit-déjeuner).

2.1 Extraction et purification

L'extraction de FB1, FB2 et FB3 dans des aliments solides (rendements de 80 à 100%) peut être assurée par des mélanges d'acétonitrile et d'eau (Rice *et al.*, 1995 ; Dilkina *et al.*, 2001) ou de méthanol et d'eau. Le rendement d'extraction sur matrice solide peut être amélioré en utilisant le principe de l'extraction par fluide supercritique – le plus souvent du CO₂ – directement sur l'échantillon (Selim *et al.*, 1996) ; le temps d'analyse s'en trouve également diminué. L'extraction reste néanmoins l'une des étapes de leur analyse la moins bien maîtrisée.

La purification s'appuie sur la technique d'extraction en phase solide (SPE), utilisant des principes variables de rétention des toxines : l'échange d'anions (SAX) (Shephard, 1998), la phase inverse (C18) (Mateo *et al.*, 2002) ou encore l'immuno-affinité (IAC) (Dilkina *et al.*, 2001).

2.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC)

La technique de chromatographie en phase gazeuse a été appliquée au contrôle des fumonisines pour la première fois par Sydenham *et al.* (1990). Leur stratégie a consisté en une hydrolyse des deux chaînes d'acide tricarballoylique (TCA) de FB1 suivie d'une estérification et d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Dans ces conditions, seule la chaîne TCA a été détectée, ne donnant ainsi aucune information sur le squelette aminopolyol (AP1), lequel permet de différencier les fumonisines entre elles. C'est pourquoi cette approche n'a pu être utilisée qu'en méthode de dépistage. Jackson et Benett (1990) ont également publié l'une des rares méthodes de séparation par GC, en développant une étape de dérivation des toxines par triméthylsilylation avant détection par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par ionisation de flammes (CG-FID) et GC-MS (après ionisation EI).

2.3 Analyse par chromatographie liquide (LC)

Les fumonisines ne possèdent pas de groupement chromophore ; elles ne peuvent donc pas être analysées sans modification de leur structure chimique par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par absorption ultraviolette (HPLC-UV). Les acides carboxyliques de ces toxines impliquent l'utilisation systématique d'acide fort pour améliorer le comportement chromatographique, en particulier en phase inverse, sur phases stationnaires C18 (Sørensen et Elbæk, 2005 ; Molinie *et al.*, 2005), C8 (Wikes *et al.*, 1995) ou phénylhexyl (Pagliuca *et al.*, 2005). Plusieurs méthodes de dérivation sont proposées. Les plus anciennes méthodes utilisaient respectivement l'anhydride maléique pour une détection UV, et la fluoescamine pour une détection par fluorescence (Sydenham *et al.*, 1990). La première approche était insuffisante en terme de sensibilité (car limitée au µg/g) et de spécificité, en raison d'interférences matricielles, et la seconde était peu performante, en raison d'un double signal pour la FB1 (Holcomb *et al.*, 1993, Wilkes et Sutherland, 1993). La dérivation avec l'o-phthalaldéhyde (OPA) s'est développée car le dérivé offre une meilleure réponse en fluorescence, la limite de détection dans les échantillons ayant été abaissée à quelques dizaines de ng/g, bien que le dérivé synthétisé soit connu pour son instabilité dans le temps (Shephard *et al.*, 1990). La dérivation OPA des fumonisines est devenue une technique

¹² Norme NF EN 13585, février 2002 : Détermination des fumonisines B1 et B2 dans le maïs. Méthode CLHP avec purification par extraction en phase solide. Octobre 1999 (AFNOR : V03-124)

¹³ CEN : Centre européen de normalisation

¹⁴ Norme CEN : prEN 14352 (indice classement AFNOR : V03-140). Determination of fumonisins B1 and B₂ in maize based foods by HPLC and IAC cleanup (Méthode Visconti)

d'HPLC standardisée (Stack et Eppley, 1992 ; Thiel *et al.*, 1993 ; Shephard *et al.*, 1994b et 1995 ; Scott et Lawrence, 1996 ; Viquez *et al.*, 1996 ; Patel *et al.*, 1997 ; Shephard, 1998 ; Dilkina *et al.*, 2001 ; Ho et Durst, 2003 ; Pagliuca *et al.*, 2005 ; Molinie *et al.*, 2005) et adoptée par l'AOAC pour les FB1, FB2 et FB3 (Sydenham *et al.*, 1996).

D'autres dérivés fluorescents ont été proposés, tels que le 4-fluoro-7-nitrobenzofurazane (NBD-F) (Scott et Lawrence, 1992 et 1996) et le (9-fluorophénylméthyle) chloroformate (FMOC) (Mateo *et al.*, 2002). Dans ce dernier cas, les limites de détection atteintes ont été de 200 ng/g pour la FB1 dans de l'aliment supplémenté (Holcomb *et al.*, 1993), avec une stabilité du dérivé démontrée sur 72 heures. Enfin, un dérivé utilisant le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) a été développé pour l'analyse de FB1 et FB2 dans le lait, abaissant ainsi la limite de détection à 5 ng/ml et permettant une bonne stabilité des toxines dérivées (Maragos et Richard, 1994 ; Maragos *et al.*, 1996 ; Richard *et al.*, 1996). La première utilisation du couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse pour l'analyse de la FB1 est attribuée à Korfmacher *et al.* (1991), en particulier via un interfacement avec source électrospray (ESI). L'analyse simultanée de la FB1, de la FB2 et de la FB3 (non dérivées) sur une HPLC en phase inverse (phase stationnaire polymérique et phase mobile d'acétate d'ammonium) suivie d'une mesure ESI-MS a permis d'abaisser les limites de détection à quelques dizaines de ng.g⁻¹ dans des extraits d'échantillons de maïs (Doerge *et al.*, 1994). Dans ces premières approches, la spectrométrie de masse monodimensionnelle limitait la spécificité de la méthode, puisque seul un signal – celui de l'ion quasi-moléculaire (M+H)⁺ – pouvait être suivi ; des tentatives de fragmentation dans l'interface ont été initiées (technique dite de CID, i.e. dissociation induite par collision) sans succès.

L'introduction progressive de la spectrométrie de masse multidimensionnelle (triple quadripôle ou bien trappe ionique) a considérablement amélioré la spécificité de l'approche de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ; ainsi, l'ion (M+H)⁺ a pu être fragmenté en ions produits (dans la trappe ionique ou dans la cellule de collision), autorisant l'enregistrement d'une transition de l'ion précurseur vers l'ion produit (Josephs, 1996). En outre, l'utilisation d'étalons internes deutérés ou marqués au [¹³C] est devenue possible, ce qui constitue un progrès notable pour l'étape de quantification. Lucas *et al.* (1996) ont ainsi pu atteindre des limites de quantification (rapport signal/bruit > 10) inférieures au ng.g⁻¹ dans des extraits de maïs. Bien qu'elle soit plus coûteuse et plus exigeante dans sa mise en oeuvre, le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem après ionisation électrospray (LC-ESI(+)-MS/MS) aujourd'hui a tendance à se généraliser comme technique de confirmation (Sørensen et Elbæk, 2005).

2.4 Immuno-essais (ELISA) et techniques fluorescentes

L'utilisation d'un anticorps polyclonal a été mise à profit pour dépister les fumonisines par technique ELISA dans le maïs, les aliments pour animaux et les denrées alimentaires (Sutikno *et al.*, 1996). La comparaison des concentrations mesurées par cette technique avec celles obtenues par HPLC fluorimétrie (avec dérivation OPA) démontre une surévaluation quasi-systématique des concentrations par la technique immunologique, ceci pouvant s'expliquer par la non spécificité de l'anticorps et la réactivité croisée avec des interférences matricielles co-extraites (Sydenham *et al.*, 1996). Sous réserve d'une méthode de purification sélective, la technique ELISA peut néanmoins être considérée comme une méthode de dépistage adaptée, rapide, de coût modéré et facile à pratiquer.

3. Facteurs influençant la teneur en fumonisines dans les denrées

3.1 Facteurs de développement fongique au champ

Les fumonisines des céréales semblent être produites quasi exclusivement au champ, sur maïs et sorgho par des espèces de *F. verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*) et *F. proliferatum*. Les facteurs de variation sont moins bien connus que ceux concernant les autres fusariotoxines.

La présence importante de fumonisines est liée à des températures estivales élevées, comme on a pu le constater en France certaines années : ainsi, les maïs cultivés dans la partie septentrionale sont peu ou pas concernés par les fumonisines, alors que ceux cultivés dans la partie méridionale peuvent l'être. Les maïs cultivés en Europe du Sud seraient particulièrement exposés à la contamination par les fumonisines (SCOOP, 2003).

La présence d'espèces de *Fusarium* producteurs de fumonisines est aggravée par les attaques de pyrale (*Ostrinia nubilalis*), un insecte qui provoque des lésions dans les épis et les tiges, constituant des portes d'entrée pour ces *Fusarium* (Gatch et Munkvold, 2002 ; Alma *et al.*, 2005), à la différence des autres *Fusarium* pénétrant dans les épis par les soies. Aussi, la lutte contre la pyrale se justifie non seulement par le besoin de productivité de la culture, mais aussi par la nécessaire qualité sanitaire de la récolte. Cette protection s'opère classiquement par lutte chimique, un peu moins classiquement par la lutte biologique (utilisation de trichogrammes – insectes entomophages s'attaquant aux pyrales-) mais elle pourrait à l'avenir s'envisager par l'utilisation de variétés de maïs transgéniques contenant un gène de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bakan *et al.*, 2002 ; Wu, 2006). Des lésions provoquées par d'autres insectes foreurs tels que la sésamie (*Sesamia nonagrioides*) peuvent constituer des portes d'entrée dans les maïs de *Fusarium* producteurs de fumonisines (Avantaggiato *et al.*, 2003).

Certaines pratiques agronomiques interviennent également dans le développement de *F. verticillioïdes* et dans la production de fumonisines. Ainsi, plus la récolte est tardive et plus la teneur en fumonisines des grains de maïs est élevée (Bush *et al.*, 2004). De même, la teneur en fumonisines est liée à la durée entre la récolte et le séchage des grains de maïs.

3.2 Impact des procédés technologiques sur la teneur en toxine

Le nettoyage des grains est efficace pour réduire la teneur en fumonisines d'un lot (Scudamore et Patel, 2000), mais conduit à la production d'issues de nettoyage fortement contaminées. En semoulerie de maïs, des travaux de répartition des fumonisines à partir de lots commerciaux (Katta *et al.*, 1997 ; Brera *et al.*, 2004) montrent une plus forte contamination des sons (ils sont en moyenne de 1,6 à 2 fois plus contaminés que le grain). Les teneurs relatives en fumonisines des germes par rapport à celles des grains divergent selon les études alors les semoules et les farines ont des teneurs plus faibles que celle des grains. La répartition de la FB1 est identique à celle de la FB2 puisque le rapport FB1/FB2 est constant dans les différentes fractions (Katta *et al.*, 1997).

Le devenir des fumonisines concerne aussi la distillation des grains, bien que peu de travaux aient porté sur ce sujet. Bothast *et al.* (1992) ont rapporté que la FB1 ne se retrouve pas dans l'éthanol mais dans les drêches (résidu des grains après épuisement de l'amidon par fermentation).

Les fumonisines étant thermostables, elles persistent dans les produits alimentaires transformés à base de maïs comme la polenta (Brera *et al.*, 2004).

4. Propriétés toxicologiques

4.1 Toxicocinétique

4.1.1 Absorption et élimination

Chez le rat et la plupart des animaux, les études de la cinétique de la FB1 indiquent une faible absorption, une distribution rapide et une élimination selon un modèle à deux ou trois compartiments.

Après administration par voie orale, peu de FB est détectée dans le plasma et les tissus, indiquant une très faible absorption (inférieure à 4%). Chez les rats, après administration par gavage ou intra-gastrique de FB1 radio-marquée, 80 à 100 % du marquage sont retrouvés dans les fèces tandis que seulement des traces (au maximum 3%) de la toxine sont retrouvées dans l'urine (Shephard *et al.*, 1992 ; Norred *et al.*, 1993 ; Dantzer *et al.*, 1999). De même, chez le singe, avec un gavage de la FB1 radio-marquée, on retrouve 61 % de la dose administrée dans les fèces et 1,2 % dans l'urine (Shephard *et al.*, 1994b). Les études réalisées chez le rat ou le singe avec de la FB2 montrent également une faible absorption (Shephard *et al.*, 1995 ; Shephard et Snijman, 1999).

L'absorption de la FB1 par des entérocytes a également été étudiée *in vitro*. En utilisant, des cellules Caco-2 qui, en dépit de leur origine colique, sont représentatives de l'intestin grêle humain, Caloni *et al.* (2002) ont montré qu'aucune absorption de FB1 ou de métabolites partiellement hydrolysés n'avait lieu dans des cellules différenciées ou indifférenciées. En revanche, une absorption de FB1

totalelement hydrolysée (composé appelé AP1) est constatée dans les cellules Caco-2 différenciées, qui expriment des caractéristiques enzymatiques et métaboliques proches de celles des entérocytes matures. *In vivo*, chez des rats femelles gavés avec de la toxine marquée au [¹⁴C], la FB1 hydrolysée est davantage excrétée dans l'urine que la FB1 (17 % versus 0,7%). Les auteurs concluent donc que la FB1 hydrolysée est mieux absorbée que la FB1, bien que l'excrétion biliaire des deux formes de toxine soit semblable (Dantzer *et al.*, 1999).

La FB2 est moins biodisponible que la FB1, et proportionnellement la quantité de FB2 excrétée dans la bile est moindre (Shephard et Snijman, 1999).

4.1.2 Distribution

Après absorption, la FB1 se retrouve dans tous les tissus et majoritairement dans le foie et les reins, comme le montrent les études réalisées chez le rat ou le porc recevant par voie orale de la FB1 marquée au ¹⁴[C] (Shepard *et al.*, 1992b; Nored *et al.*, 1993; Prelusky *et al.*, 1994, 1996ab). Plusieurs études montrent que le foie contient plus de radioactivité que les reins, mais une étude de Nored (1993) conclut à une hiérarchie inverse. Comme cela a déjà été mentionné, la FB1 inhibe la céramide synthase, induisant une augmentation de la sphinganine libre. Les études animales montrent que l'augmentation tissulaire de la sphinganine libre mime la distribution de la radioactivité observée dans les études citées ci-dessus. Ainsi, par comparaison aux autres tissus, le foie et les reins montrent la plus grande augmentation de sphinganine après exposition des animaux à la fumonisine. Chez le rat, la concentration en sphinganine libre dans les reins mais non le foie, est plus persistante (Enongene *et al.*, 2000 et Garren *et al.*, 2001). Enfin, dans une étude conduite chez les rats Wistar mâles nourris par gavage avec de la toxine pure, les reins contenaient 10 fois plus de FB1 que le foie (Martinez-Larranaga *et al.*, 1999).

Les cellules intestinales sont très exposées à la toxine lorsque celle-ci est ingérée. En effet, 24 heures après l'administration de FB1 radio-marquée à des primates non humains, 25% du marquage est retrouvé dans les cellules épithéliales intestinales (Shephard *et al.*, 1995). La voie principale d'élimination de la FB1 se fait *via* la bile, la toxine excrétée étant toujours biologiquement active (Enongene *et al.* 2000 et 2002). La circulation entérohépatique augmente donc probablement le niveau d'exposition de l'intestin à la mycotoxine, au moins pour les rats et les porcs (Norred *et al.* 1993; Shephard *et al.*, 1994a; Prelusky *et al.*, 1994; Prelusky *et al.* 1996a).

Chez les rats et les lapins gravides, de faibles concentrations de FB1 ont été retrouvées dans l'utérus, le placenta, et les fœtus, indiquant peu de transfert placentaire de la toxine. Il y a également peu de preuves d'un transfert de toxine pendant la lactation (JECFA, 2001).

4.1.3 Biotransformation

Il y a très peu de preuves que les fumonisines soient métabolisées *in vitro* ou *in vivo*. En effet, Cawood *et al.* (1994) n'ont pas observé de métabolisme des fumonisines par les estérases microsomales ou par des monooxygénases à cytochrome P-450. Plus récemment, Spotti *et al.* (2001) n'ont pas décrit de métabolisme de la FB1 par des microsomes de foie bovin. Une étude dans laquelle des hépatocytes primaires ont été exposés à de la FB1 marquée au [¹⁴C] a montré que la toxine est associée aux membranes cellulaires, mais aucun métabolite n'a été détecté à l'issue d'une incubation de 44 heures.

Les fumonisines sont excrétées principalement dans les fèces, soit sous forme native soit sous forme partiellement hydrolysée après élimination d'un ester lié aux acides tricarboxyliques en position C14. Seules des traces de FB1 entièrement hydrolysée, AP1, ont été trouvées dans les fèces (Shephard *et al.*, 1994b). Aucun métabolite hydrolysé n'ayant été retrouvé dans l'urine ou dans la bile, on suppose que l'hydrolyse se produirait dans l'intestin, sous l'action de micro-organismes (Shephard *et al.*, 1995; Shephard *et al.*, 1994b).

Bien qu'il n'y ait pas de preuve que les fumonisines soient métabolisées par des cytochromes P450, quelques études réalisées *in vivo* ou *in vitro*, montrent que les fumonisines peuvent moduler l'activité de ces enzymes, souvent au travers de l'altération du métabolisme des sphingolipides (Merrill *et al.*, 1999; Spotti *et al.*, 2000). Par exemple, la FB1 empêche l'induction de CYP 1A1, une enzyme qui métabolise les hydrocarbures aromatiques tels que le méthyl-cholanthrène, dans des cellules HepG2

(Merrill *et al.*, 1999). Chez des rats gavés par la FB1 (2 mg/kg p.c.), CYP 2C11 et à un moindre degré CYP 1A2 sont également inhibés (Spotti *et al.*, 2000). L'inhibition de CYP 2C11 a été attribuée à la suppression de l'activité de protéine kinase due à l'inhibition de la biosynthèse des sphingolipides mais également à l'élévation de la concentration en sphingosine, une base sphingoïde qui s'accumule chez les animaux exposés à la FB1, (Merrill *et al.*, 1999).

4.2 Toxicité générale

Une toxicité a été observée, pour toutes les espèces animales étudiées, dans le foie qui est la principale cible de la FB1. Les reins sont également affectés chez de nombreuses espèces. Dans ces organes, la toxicité induite par la FB1 est souvent initialement caractérisée par une nécrose liée à des processus apoptotiques et oncotiques suivie d'une régénération et, dans le cas du foie, d'une hyperplasie des conduits de la bile. Chez les rongeurs, la toxicité de la FB1 dépend à la fois de la lignée utilisée et du sexe des animaux. Par exemple, des rats mâle BD IX sont plus résistants aux effets néphrotoxiques de la FB1 que des rats mâles Fischer 344N, Sprague-Dawley ou RIVM:WU (JEFCA, 2001).

4.2.1 Toxicité cellulaire

Les fumonisines agissent en particulier sur la synthèse des sphingolipides. Ceci a de multiples conséquences sur la physiologie cellulaire. En effet, les bases sphingoïdes et les céramides sont des seconds messagers impliqués dans de nombreuses fonctions telles que l'apoptose, la croissance et la différenciation cellulaire, l'inflammation, la sécrétion protéique, l'endocytose et la synthèse d'autres classes de sphingolipides (Ohanian et Ohanian, 2001; Baumruker et Prieschl, 2002; Pettus *et al.*, 2002; Ruvolo, 2003; Spiegel et Milstien, 2003). Par ailleurs, les sphingolipides sont des constituants structuraux essentiels des membranes cellulaires et la FB1 peut provoquer une atteinte de l'intégrité membranaire.

Les lésions observées chez différentes espèces animales suggèrent que les fumonisines sont des molécules cytotoxiques. Les signes de cytotoxicité sont très variables et fonction des types cellulaires. On peut constater une altération du cycle cellulaire avec inhibition de la prolifération (Yoo *et al.*, 1992; Abbas *et al.*, 1993; Dombrink-Kurtzman *et al.*, 1993; Gelderblom *et al.*, 1995; Ciacci-Zanella *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2007) ou un déclenchement de l'apoptose (Wang *et al.*, 1991) ou de la mitose (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 1993). Les altérations morphologiques associées à ces effets sont nombreuses : cellules arrondies et détachées de leur support (Abbas *et al.*, 1993), noyau désintégré et cytoplasme vacuolisé (Qureshi et Hagler, 1992; Gelderblom *et al.*, 1995), érythrocytes ressemblant à des érythroblastes (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 1993), poïkilocytes en forme de fuseau (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 1993). Enfin, des atteintes fonctionnelles peuvent être observées seules, comme par exemple, une baisse de phagocytose de macrophages de poulet (Qureshi et Hagler, 1992), une augmentation de la perméabilité membranaire de cellules d'endothélium vasculaire pulmonaire porcin (Ramasamy *et al.*, 1995) ou une altération de la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales (Bouhet *et al.*, 2004; Loiseau *et al.*, 2007).

Deux processus peuvent entraîner la mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. Si les processus nécrotiques pouvant être à l'origine de la cytotoxicité des fumonisines sont peu caractérisés, il n'en est pas de même pour les processus apoptotiques. Dans plusieurs modèles animaux, l'administration de FB1 induit une apoptose dans divers tissus (Lim *et al.*, 1996; Tolleson *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1997; Bucci *et al.*, 1998; Ciacci-Zanella et Jones, 1999; Lemmer *et al.*, 1999; Dragan *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Dombrink-Kurtzman, 2003; Gopee *et al.*, 2003). L'apoptose semble jouer un rôle important dans les effets toxiques de la FB1 y compris dans l'induction de tumeur. Dans les expériences réalisées sur animaux, les phénomènes d'apoptose sont observés à toutes les doses induisant des effets toxiques y compris les effets cancérigènes. La dose de toxine induisant l'apoptose dépend de la durée de l'exposition, de l'espèce animale considérée et varie de 0,9 à 12 mg FB1/kg p.c./j dans les expériences à long ou à court terme.

La suppression des chaînes latérales d'acides tricarboxyliques (produisant AP1) convertit cet inhibiteur de la céramide synthase en substrat pour l'enzyme. Le produit de cette réaction, PAP1, inhibe également la céramide synthase *in vitro*. On ne sait pas si ce produit est formé *in vivo*, mais il est plus toxique que la FB1 ou la FB1 hydrolysée pour les cellules HT-29 (Merrill *et al.*, 2001). Comme

la FB1 et la FB2 hydrolysées sont les principaux produits de la dégradation après cuisson en milieu alcalin du maïs et de ses dérivés et qu'elles sont également produites dans l'intestin à partir de la FB1 et de la FB2, la toxicité des toxines hydrolysées devrait être étudiée.

4.2.2 Toxicité aiguë

L'espèce animale domestique la plus sensible à la FB1 est le cheval. Des manifestations aiguës de la toxicité des fumonisines ont été mises en évidence : les chevaux développent une leucoencéphalomalacie, syndrome qui entraîne la mort des animaux (Marasas *et al.*, 1976 ; Marasas *et al.*, 1988). Ces syndromes font l'objet d'une description détaillée dans la partie « santé animale ». Chez les rongeurs, la DL₅₀ de cette toxine est inconnue.

4.2.3 Toxicité sub-aiguë et subchronique

Plusieurs études de toxicité orale subaiguë (allant de quelques jours à plusieurs semaines) de la FB1 ont été réalisées chez les rongeurs (Gelderblom *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1994; Bondy *et al.*, 1995; Bondy *et al.*, 1997; Bondy *et al.*, 1998; Bucci *et al.*, 1998; Gelderblom *et al.*, 1992; Gelderblom *et al.*, 1993a; Voss *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995). Dans toutes les études effectuées chez le rat des effets néphrotoxiques et hépatotoxiques ont été observés. L'incidence et la sévérité des altérations rénales ont été étroitement corrélées avec des concentrations accrues de sphinganine dans les tissus, le sérum et l'urine (Riley *et al.*, 1994). D'autres effets toxiques de la FB1 ont été également rapportés chez le rat, tels qu'une nécrose du myocarde et un œdème pulmonaire sévère (Gelderblom *et al.*, 1993b). La dose sans effet pour la toxicité rénale (< 15 mg/kg d'aliment) est inférieure à celle observée pour l'hépatotoxicité. Des hépatocytes et des cellules tubulaires proximales rénales contenant des corps apoptotiques ont été observés chez des animaux ayant reçu de la FB1, suggérant que la toxine induit une mort programmée accélérée dans le rein et le foie. Chez la souris, la toxicité observée dans le foie est semblable à celle décrite chez le rat, mais la toxicité rénale est faible et apparaît seulement chez les femelles (Bondy *et al.*, 1997).

Chez les rats, la toxicité se manifeste principalement au niveau rénal. Des lésions du tubule proximal situé dans la médula externe ont été observées chez les mâles F344 recevant un aliment contaminé avec 9 mg de FB1/kg (soit 0,6 mg/kg p.c./j) ou des aliments plus contaminés (27 et 81 mg de FB1/kg d'aliment) et chez les femelles recevant l'aliment le plus contaminé (81 mg/kg d'aliment) pendant 13 semaines (Voss *et al.*, 1995). Ces lésions sont du même type que celles observées dans une étude menée sur quatre semaines (Voss *et al.*, 1993). Le poids relatif des reins diminue chez les rats mâles nourris pendant 4 semaines avec un aliment contenant 27 mg de FB1/kg et chez les mâles et les femelles nourris pendant 13 semaines avec un aliment contenant 9 mg de FB1/kg. Dans le sérum, la créatinine augmente chez les mâles nourris pendant 13 semaines avec un aliment contenant au moins 27 mg de FB1/kg et chez les femelles nourries pendant 13 semaines avec un aliment contenant 81 mg de FB1/kg. Dans cette étude, la NOAEL est de 0,2 mg de FB1/kg p.c./j.

D'autres manifestations toxiques sont décrites chez le rat. En particulier, une thrombose cardiaque intraventriculaire a été observée chez tous les animaux ayant ingéré quotidiennement de fortes doses de culture de *F. verticillioides*, sur des périodes allant de 44 à 78 jours (Kriek *et al.*, 1981).

Chez les souris B6C3F1, une hépatotoxicité et des désordres biochimiques témoignant de cette atteinte hépatique ont été observés chez les femelles nourries pendant 13 semaines avec un aliment contaminé par 81 mg de FB1/kg d'aliment. Chez les souris mâles, on n'a pas retrouvé d'hépatotoxicité et aucune atteinte hépatique n'a été observée chez ces animaux, quel que soit leur sexe (Voss *et al.*, 1995). Dans cette étude, la NOAEL est de 1,8 mg de FB1/kg p.c./j.

En conclusion, les études de toxicité subchronique menées chez les rongeurs montrent au niveau des organes cibles des différences (entre le foie et le rein) selon l'espèce considérée. On observe également des différences selon le sexe des animaux : les rats mâles sont plus sensibles que les femelles alors que les souris femelles sont plus sensibles que les mâles.

4.2.4 Génotoxicité

La FB1 aussi bien que la FB2 ou la FB3 se sont révélées non mutagènes dans le test d'Ames réalisé avec différentes souches de salmonelles TA97a, TA98, TA100, TA102 en présence ou en absence de la fraction microsomale S9 (Gelderblom et Snyman, 1991; Park *et al.*, 1992; Knasmüller *et al.*, 1997).

La non-mutagénicité de la FB1 a été confirmée dans le test chromotest SOS avec la souche d'*Escherichia coli* PQ37, réalisé avec ou sans activation métabolique ainsi que par l'analyse de la réparation différentielle de l'ADN avec la souche K12 d'*E. coli* (343/753, *uvrB/recA* et 343/765, *uvr+/rec+*). A des concentrations de 0,04 à 80 µM/plaque et de 0,04 à 40 µM/plaque pour la FB1 et la FB2 respectivement, ces deux toxines sont non génotoxiques dans un test *in vitro* de réparation de l'ADN sur hépatocytes de rat ainsi que *in vivo* à une concentration de 100 mg de FB1 ou de FB2 /kg (Gelderblom *et al.*, 1989; 1992b). Cette constatation que la FB1 n'induisait pas une synthèse non-programmée d'ADN a été confirmée *in vitro* sur des hépatocytes primaires pour des concentrations de 0,5 à 200 µM (Norred *et al.*, 1990, 1992a).

En revanche, Sun et Stahr (1993) utilisant un test commercial de génotoxicité (*Vibrio fischeri*), ont montré que la FB1, dans la gamme de concentrations de 5 à 20 µg/ml, avait une activité génotoxique observée sans activation métabolique de la fraction S9. Dans une autre étude, quelques effets clastogènes ont été observés (Knasmüller *et al.*, 1997). De faibles concentrations de toxine (1 µg FB1/ml) augmentent la fréquence des micronoyaux et le nombre des aberrations chromosomiques, mais pour ces deux paramètres aucun effet-dose n'a été observé. Cette étude portant seulement sur l'analyse de 20 métaphases, et les résultats n'étant pas exprimés de manière conventionnelle, elle a été écartée de l'analyse effectuée par l'Union européenne.

4.2.5 Cancérogénicité

Plusieurs études ont été conduites chez différentes souches de rats (BDIX et F344/N), sur des périodes d'intoxication allant jusqu'à 2 ans (Marasas *et al.*, 1984; Jaskiewicz *et al.*, 1987; NTP, 2001).

La distribution à des rats d'aliments contaminés avec des extraits de culture de *F. verticillioides* produisant de fortes doses de fumonisines (principalement de la FB1) pendant 23 à 27 mois entraîne l'apparition de carcinomes hépatocellulaires, avec cirrhose et adénofibrose, mais aussi des carcinomes de l'épithélium gastrique et une hyperplasie des cellules basales de l'œsophage (Marasas *et al.*, 1984, Jaskiewicz *et al.*, 1987).

Deux études de toxicité à long terme de la FB1 ont été effectuées sur des rats BD IX (Gelderblom *et al.*, 1991; Gelderblom *et al.*, 1995). La première a été réalisée sur 25 rats mâles recevant pendant 26 mois un aliment contaminé avec 50 mg de FB1 semi-purifiée (équivalent à 2,5 mg FB1/kg p.c./j). Les animaux témoins ont reçu un aliment ayant une contamination résiduelle de 0,5 mg de FB1/kg (équivalent à 0,025 mg FB1/kg p.c./j) et exempt d'aflatoxine B1. Des animaux ont été autopsiés à 6, 12, 20 et 26 mois. Tous les animaux morts ou autopsiés après 18 mois de traitement développaient une atteinte hépatique. La sévérité des lésions hépatiques est corrélée avec la durée d'exposition et 10 des 15 rats (66 %) autopsiés entre 18 et 26 mois ont développé un hépatocarcinome primaire. Chez certains animaux, des métastases étaient visibles au niveau du cœur, des poumons et des reins (Gelderblom *et al.*, 1991). Bien que cette étude soit limitée (peu d'animaux, une seule dose, un seul sexe), elle indique clairement que la FB1 est cancérogène et souligne l'évolution de l'atteinte hépatique vers le cancer du foie. La deuxième étude a été réalisée avec des animaux recevant pendant 24 mois des aliments contenant 0, 1, 10 et 25 mg FB1/kg (équivalent à 0 ; 0,05 ; 0,5 et 1,25 mg FB1/kg p.c./j). Aucune tumeur n'a été observée, y compris chez les rats ingérant l'aliment le plus contaminé (Gelderblom *et al.*, 1995a). Ces deux études montrent qu'une exposition alimentaire à 50 mg de FB1/kg d'aliment induit des carcinomes hépatiques (Gelderblom *et al.*, 1991) tandis qu'une exposition à 25 mg de FB1/kg d'aliment n'en induit pas (Gelderblom *et al.*, 1995a). Elles permettent de déterminer une NOAEL non tumorigène équivalente à 1,25 mg de FB1/kg p.c./j.

La toxicité à long terme de la FB1 a également été étudiée sur rats F344/N (NTP, 2001). Les animaux ont été nourris pendant 105 semaines avec des régimes contenant de 0 à 150 mg FB1/kg d'aliment (équivalent à 0 à 7,5 mg FB1/kg p.c./j pour les mâles et 0 à 6,0 mg FB1/ kg p.c./j pour les femelles). La consommation de toxine n'a pas eu d'effet sur la survie, le poids corporel et la consommation alimentaire. Une élévation du ratio sphinganine/sphingosine (Sa/So) a été observée à partir de 26 semaines d'exposition dans l'urine des rats mâles nourris avec des régimes contenant au moins 15 mg de FB1/kg et dans les urines des femelles nourries avec des régimes contaminés au-delà de 50 mg FB1/kg. Cette élévation a également été notée dans les reins des animaux recevant des aliments contaminés avec 50 mg FB1/kg ou au delà. L'atteinte rénale s'est également traduite par une prolifération des cellules épithéliales (à partir de 26 semaines chez les mâles exposés à 50 et 150 mg FB1/kg d'aliment) par une diminution du poids des reins (à partir de 6 semaines chez les mâles

exposés à 50 et 150 mg FB1/kg d'aliment et à partir de 26 semaines chez les femelles les plus exposées). A l'issue des deux ans de l'étude, il y avait aussi une augmentation significative de l'incidence des adénomes, des carcinomes et des hyperplasies des tubules rénaux chez les rats mâles. Par contre, l'étude n'a pas montré d'activité cancérigène de la FB1 chez les rats femelles. Dans ce contexte, une dose sans effet (NOAEL) a été établie à 5 mg FB1/kg d'aliment (équivalent à 0,25 mg FB1/kg p.c./j pour les rats mâles et à 0,3 mg FB1/kg p.c./j pour les rats femelles) (NTP, 2001).

Une étude a été réalisée par le «National Toxicology Program» sur des souris mâles et femelles B6C3F1 nourries pendant 105 semaines avec des régimes contenant de 0 à 150 mg FB1/kg d'aliment (équivalent à 0 à 17 mg FB1/kg p.c./j pour les mâles et 0 à 12,5 mg FB1/ kg p.c./j pour les femelles) (NTP, 2001). Les poids corporels et la consommation moyenne d'aliment étaient généralement semblables chez les souris exposées et les animaux témoins. L'ingestion de toxine n'a pas eu d'effet sur la survie des souris mâles, alors que la survie des femelles nourries avec 80 mg de FB1/kg était inférieure à celle des animaux témoins. La diminution de la survie a débuté au bout d'un an de traitement et s'est poursuivie jusqu'à la fin de l'expérience. A l'issue des deux années d'expérience, une augmentation de l'incidence des adénomes et carcinomes au niveau du foie a été observée uniquement chez les souris femelles consommant les régimes contenant 50 et 80 mg de FB1/kg ; ceci s'accompagnait d'une augmentation de la prévalence des hypertrophies hépatocellulaires et de foyers de nécrose. L'hypertrophie hépatocellulaire était également visible dans le foie des mâles ayant consommé la plus forte concentration de FB1 mais elle n'était pas accompagnée d'une augmentation de l'incidence des tumeurs. En conclusion, cette étude montre clairement une activité cancérigène de la FB1 chez les souris B6C3F1 femelles mais pas chez les mâles. Une dose sans effet (NOAEL) a été établie à 15 mg de FB1/kg (équivalent à 1,9 mg de FB1/kg p.c./j) chez les souris femelles (NTP, 2001).

Chez la truite arc-en-ciel, une étude a été conduite pendant 34 semaines avec une nourriture contenant 0 ; 3,2 ; 23 et 100 mg de FB1 pure/kg d'aliment, en présence ou en l'absence d'un initiateur cancérigène (aflatoxine B₁ ou *N*-méthyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine). En l'absence de l'initiateur, aucune tumeur ou lésion n'a été observée, dans aucun des tissus examinés (foie, reins, estomac, vessie). Le régime alimentaire contenant la plus forte dose de FB1 n'a pas non plus induit la formation d'adduits de fumonisine B₁ acétylée à l'ADN. Au contraire, une augmentation de l'incidence des tumeurs du foie a été observée dans le groupe ayant subi une immersion dans un bain contenant l'initiateur. Dans cette étude, la NOAEL calculée pour la promotion des cancers hépatiques est de 0,2 mg de FB1/kg p.v./j (Carlson *et al.*, 2001).

Chez les singes Vervet, une étude a été réalisée en nourrissant pendant 4 ans et demi les animaux avec un aliment contenant 0,5 % d'un extrait de culture de *F. verticillioides*. On estime que les animaux ont reçu environ 0,3 mg de fumonisines totales /kg p.c./j. (la FB1 représentant environ 70 % des fumonisines totales). Une fibrose portale modérée dans le foie ainsi que des changements des paramètres sanguins (indicateurs des maladies vasculaires) ont été observés (Fincham *et al.*, 1992).

4.3 Autres Effets

4.3.2 Effets sur la reproduction, embryotoxicité et tératogénicité

Une suspicion d'effet toxique des fumonisines sur la reproduction a été émise suite aux observations suivantes:

- avortement chez des truies ayant consommé un aliment contaminé avec des fumonisines (Harrison *et al.*, 1990),
- défauts de naissance pouvant être corrélés à la consommation d'aliment contaminé par les fumonisines chez des habitants du Texas (Hendricks, 1999) ;
- inhibition de la synthèse de sphingolipides par les fumonisines (Wang *et al.*, 1991).

In vitro, les fumonisines et les extraits de culture de *F. verticilloides* et de *F. proliferatum* contenant de fortes quantités de fumonisines se sont avérés embryotoxiques chez le poulet (Bacon *et al.*, 1995; Flynn *et al.*, 1994, 1997; Javed *et al.*, 1993). L'injection de 1 à 100 µM de FB1 purifiée dans des oeufs fertiles de poulet entraîne une toxicité et une mortalité embryonnaire dépendant du temps et de la dose. Les altérations morphologiques précoces incluent des hydroencéphalies, des allongements du cou et des élargissements du bec, des altérations ayant été notées pour la plupart des organes

(Javed *et al.*, 1993; Bacon *et al.*, 1995). Il faut noter que les stades embryonnaires précoces sont plus sensibles que les stades tardifs à l'action de la FB1. La FB1 est aussi embryotoxique *in vitro* sur des embryons de rat, de même que l'aminopentol, produit d'hydrolyse de la FB1 (Flynn, *et al.*, 1997). Cependant ce dernier composé s'est révélé 100 fois moins toxique que la FB1 (Flynn *et al.*, 1997).

Dans la plupart des études réalisées *in vivo* chez la souris CD1, le hamster syrien, le rat Sprague-Dawley ou Fischer 344, le lapin de Nouvelle-Zélande ou le vison, des effets de la FB1 sur la reproduction ou le développement ont été observés seulement pour des doses ayant un effet toxique sur la mère. Des changements morphologiques suggérant des effets tératogènes n'ont été rapportés dans aucune de ces études (Lebepe-Mazur *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1995; Voss *et al.*, 1996a, LaBorde *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1998; Penner *et al.*, 1998). Seuls Floss *et al.* (1994a et 1994b) travaillant sur le hamster syrien, ont montré que la FB1 entraînait des malformations lors du développement à des doses de 12 à 18 mg FB1/kg p.c./j, doses qui n'avaient pas d'effet sur la mère.

Plus récemment, il a été suggéré que les fumonisines constitueraient un facteur de risque pour les malformations du tube neuronal, les anomalies craniofaciales et d'autres défauts de naissance affectant les cellules neurales des crêtes, et ce, en raison de la réduction apparente de l'utilisation de l'acide folique. En effet *in vitro* la FB1 entraîne des défauts de formation du tube neural et des altérations craniofaciales dans des embryons de souris, ces effets délétères peuvent être évités par une supplémentation de l'aliment en acide folique (Marasas *et al.*, 2004). Par ailleurs, des études conduites *in vivo* sur des souris LMBC montrent qu'une exposition à la FB1 (20 mg/kg p.c. par administration intra-péritonéale) augmente la fréquence des défauts de développement chez les fœtus. Dans ce modèle également, l'administration de folate ou d'un sphingolipide complexe a une action préventive. Enfin, une incidence plus élevée de défauts du tube neuronal chez l'homme a été constatée dans certaines régions du monde ayant une consommation importante de fumonisines (Guatemala, Afrique du Sud et Chine). Une étude récente réalisée au Texas, montre également une association significative entre ces défauts du tube neuronal et la consommation importante pendant le premier trimestre de la grossesse de tortillas de maïs contaminées (Missmer *et al.*, 2006).

4.3.3 Immunotoxicité

Les effets immunotoxiques des fumonisines ont été mis en évidence à la fois *in vivo* et *in vitro* et auraient des conséquences sur la sensibilité des animaux aux infections.

Plusieurs études montrent que la FB1 affecte le poids des organes immunitaires, en particulier le thymus. Chez des rats, après administration intra-péritonéale de 7,5 mg de FB1/kg p.c./j pendant 4 jours, on observe une diminution du poids du thymus et une nécrose de cet organe (Bondy *et al.*, 1995). De même, une injection sous-cutanée de 2,25 mg de FB1 /kg p.c./j pendant 5 jours chez des souris femelles entraîne une diminution du poids de la rate et du thymus. Cet effet n'est pas observé chez les souris mâles (Johnson et Sharma, 2001). Par contre, chez les animaux d'élevage, aucun effet de la fumonisine n'a été noté sur le poids des organes immunitaires. Par exemple, des porcs recevant pendant 8 semaines un aliment contaminé avec des extraits de culture fongique (10 mg FB1 /kg d'aliment) ou des poulets nourris pendant 21 jours avec un aliment contenant 80 mg toxine pure /kg ne présentent pas de diminution de poids du thymus ou de la rate (Henry *et al.*, 2000; Zomborsky-Kovacs *et al.*, 2002).

La réponse de type humoral est aussi affectée par les fumonisines. Chez des rats mâles immunisés avec des globules rouges de moutons, recevant 25 mg FB1/kg p.c./j pendant 14 jours, on a observé une diminution significative des immunoglobulines M (IgM) spécifiques de l'antigène (Tryphonas *et al.*, 1997). De même, chez les souris, la FB1 réduit le nombre de lymphocytes spécifiques de la réponse aux globules rouges de moutons, lorsque la toxine (5 à 100 mg) est administrée au moment de l'immunisation (Martinova et Merrill, 1995). Chez des porcs nourris pendant 4 semaines avec un aliment contaminé par des extraits de cultures fongiques (8 mg FB1/kg d'aliment) on constate également une diminution significative des anticorps spécifiques lors d'une immunisation avec un vaccin inactivé contre *Mycoplasma agalactiae* (Taranu *et al.*, 2005). Cet effet serait plus prononcé chez les mâles que chez les femelles (Marin *et al.*, 2006). Enfin des dindes recevant 200 mg de FB1 et vaccinées contre le virus de la maladie de Newcastle, présentent également une diminution significative des titres en anticorps lors de la réponse secondaire (Li *et al.*, 2000). En revanche, des porcelets recevant une dose élevée de FB1 pendant une période courte (100 mg /animal/j pendant 8 jours) ou une faible dose pendant une longue période (10 mg/kg d'aliment pendant 3 à 4 mois) ne

montrent pas de diminution de leur titre en anticorps après vaccination contre le virus d'Aujeszky (Tornyos *et al.*, 2003). La FB1 affecte aussi la concentration sérique en immunoglobulines totales, mais ceci nécessite des concentrations de toxines supérieures à celles requises pour moduler la concentration en anticorps spécifiques. Par exemple, une ingestion de nourriture contaminée par 8 mg/kg de toxine ne modifie pas les concentrations sériques d'IgM, d'IgG ou d'IgA chez le porc (Taranu *et al.*, 2005). Par contre, des injections quotidiennes intrapéritonéales de 7,5 mg FB1/kg p.c. pendant 4 jours, augmentent les concentrations sériques en IgM et IgG chez le rat (Bondy *et al.*, 1995). La consommation par des poulets d'une nourriture contaminée avec un extrait de *F. proliferatum* contenant 61 mg de FB1/kg provoque une diminution des Ig totales et des IgG (Qureshi *et al.*, 1995).

Les effets de la FB1 ont également été étudiés sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez l'homme, les rongeurs, le porc et les volailles. Une inhibition de la prolifération lymphocytaire a été observée en traitant directement *in vitro* les lymphocytes avec la toxine en présence d'un agent mitogène ou en prélevant les lymphocytes d'animaux traités *in vivo* et en analysant *in vitro* leur prolifération en présence d'un agent mitogène (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 2000 ; Johnson et Sharma, 2001 ; Dombrink-Kurtzman, 2003 ; Marin *et al.*, 2007). La synthèse des cytokines inflammatoires et régulatrices est aussi modulée par la FB1. Parmi des cytokines inflammatoires, la FB1 augmente la synthèse du TNF-alpha¹⁵, une cytokine impliquée dans l'effet hépatotoxique de la toxine (Sharma, 2004). L'expression d'autres cytokines inflammatoires telles que les interleukines IL-12, IL-1, IL-8 et IL-18 est également augmentée par la FB1 (Sharma, 2004). Cette induction de cytokines inflammatoires est corrélée avec une augmentation de la synthèse des cytokines de type Th1¹⁶ (telle que l'IFN-g¹⁷) et d'une diminution concomitante de la synthèse des cytokines du type Th2 (telles que l'IL-4 et l'IL-10). Le changement de la balance entre les cytokines Th1/Th2 pourrait expliquer la diminution de la réponse d'anticorps observée lors de vaccination (Taranu *et al.*, 2005; Marin *et al.*, 2006) et la sensibilité différentielle aux infections.

Les conséquences en termes de sensibilité aux infections et l'altération causée de la réponse immunitaire ont été documentées. Chez des porcelets ayant ingéré de la FB1 (0,5 mg/kg p.c./j pendant 7 jours) on observe une augmentation de la colonisation intestinale par une souche pathogène d'*Escherichia coli* (Oswald *et al.*, 2003). Chez des souris ayant ingéré 15 ou 25 mg FB1/kg p.c./j pendant 14 jours, on observe également une diminution de la clairance bactérienne de *Listeria monocytogenes* après infection intraveineuse (Tryphonas *et al.*, 1997). Chez des porcs ayant reçu la même dose de toxine pendant 7 jours, on observe également une diminution de la clairance de *Pseudomonas aeruginosa* (Smith *et al.*, 1996c). Au contraire, l'ingestion de fortes doses de toxines (aliment contaminé par des extraits de culture fongiques et contenant 150 mg FB1/kg) augmente la résistance des souris à l'infection par le parasite intracellulaire *Trypanosoma cruzi* (Dresden Osborne *et al.*, 2002). Cet effet « protecteur » de la FB1 pourrait être lié à sa capacité à induire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

4.3.4 Effets sur le système nerveux

Le syndrome de leucoencéphalomalacie équine est caractéristique de l'ingestion de fumonisines (Voir paragraphe 6.1.1).

Une étude de Kwon *et al.*, (1997) indique également que l'injection sous-cutanée de FB1 chez des rats nouveau-nés entraîne une élévation du rapport Sa/So dans les tissus cérébraux et réduit le dépôt de myéline, ce qui pourrait retarder le développement du système nerveux. Cette étude suggère également que le métabolisme des sphingolipides dans le système nerveux des rats nouveau-nés est très sensible à la FB1. En effet, après injection de 0,8 et 8,0 mg de FB1/kg p.v., le ratio entre l'aire sous la courbe en FB1 du plasma et celle du cerveau est de 0,02 chez les rats adultes, mais de 40 chez les rats nouveau-nés (Kwon *et al.*, 1997).

Plus récemment, il a été montré qu'une injection intracérébrale de 100µg de FB1 induit une neurodégénération avec une inhibition simultanée de la synthèse *de novo* de céramide, une stimulation des astrocytes et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Osuchowski *et al.*, 2005).

¹⁵ Tumor Necrosis Factor

¹⁶ T-helper

¹⁷ Interferon

4.3.5 Effets sur le système cardiovasculaire

Les premières démonstrations d'une toxicité des fumonisines sur le système cardiovasculaire ont été réalisées chez des babouins nourris avec des aliments contaminés par des extraits de *F. verticillioides* où un arrêt du cœur avec une congestion aiguë a été observé (Kriek *et al.* 1981). Des études sur porcs nourris pendant 7 mois avec un aliment contaminé (150 à 170 mg FB1/kg d'aliment) ont montré une hypertrophie ventriculaire du cœur droit et une hypertrophie des artères pulmonaires (Casteel *et al.*, 1994).

Les effets cardiovasculaires dus à une exposition à court terme aux fumonisines ont été examinés chez des porcs mâles anesthésiés et conscients. Les animaux ont été nourris avec des aliments exempts de fumonisines ou avec des aliments contaminés par des extraits de cultures fongiques (≤ 20 mg FB1+ FB2/kg). Chez les porcs ayant ingéré des fumonisines, une augmentation significative de la pression artérielle pulmonaire, accompagnée d'une diminution de la fréquence et du débit cardiaque a été observée. L'électrocardiogramme (ECG) de ces animaux était normal et ils ne présentaient pas d'œdème pulmonaire. Ces résultats suggèrent que l'hypertension pulmonaire provoquée par la vasoconstriction hypoxique est un événement précoce dans le développement de l'œdème pulmonaire observé chez le porc (Smith *et al.*, 1999). Les primates non-humains (singes Vervet) nourris avec un maïs naturellement contaminé par *F. verticillioides* (0,15 à 0,30 mg FB1/kg p.v./j) pendant une période prolongée ont montré une réponse athérogénique avec une hypercholestérolémie et des altérations hépatiques pouvant être liées aux effets secondaires de la réponse vasculaire (Fincham, 1992; Nair, 1998). Ces altérations sont compatibles avec une inhibition des canaux calciques de type L provoquée par l'augmentation de la concentration en sphingosine et/ou en sphinganine. L'œdème pulmonaire caractéristique chez le porc d'une intoxication à la fumonisine semble résulter de l'arrêt du cœur gauche provoqué par l'altération de la synthèse des glycolipides. Des études récentes semblent indiquer que l'encéphalomalacie équine et l'œdème pulmonaire porcin seraient dus à des effets secondaires de la toxicité cardiovasculaire de la FB1 (Constable *et al.*, 2000).

4.4 Valeurs toxicologiques de référence

Les fumonisines sont classées dans la catégorie 2B par le CIRC. Pour la FB1, le SCF (2000, 2003) a établi une dose journalière tolérable (DJT), de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j à partir de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL) de 0,2 mg/kg p.c./j estimée dans des études de toxicité chronique chez le rat (effets sur les reins) et en appliquant un facteur sécurité de 100. Le JECFA (2001) a établi une dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP) de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour le groupe des fumonisines FB1, FB2 et FB3, seules ou en combinaison, en se basant sur la même NOAEL que le SCF.

5 Exposition de la population humaine aux fumonisines

5.1 Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

Peu d'études épidémiologiques sont disponibles et la plupart ne sont pas concluantes dans la mesure où les données quantitatives ne permettent pas de conduire une évaluation du risque. Parmi ces études, celles réalisées en Afrique du Sud et en Chine semblent établir une corrélation entre la consommation de produits contaminés par la FB1 et une augmentation de l'incidence de cancer de l'œsophage, corrélation qui n'a pas été mise en évidence dans une étude réalisée en Italie (CIRC, 1993).

5.2 Exposition de l'Homme

5.2.2 Données de l'étude TDS

Une étude de l'alimentation totale (EAT, 2004) a été entreprise en 2000, afin de connaître le niveau de consommation et d'exposition de la population française et végétarienne aux fumonisines à partir d'aliments « prêts à consommer » (Leblanc *et al.*, 2005).

Tableau 2: Exposition alimentaire de la population française aux fumonisines ($\mu\text{g}/\text{kg p.c./j}$)

type de population		exposition moyenne (en $\mu\text{g}/\text{kg pc/j}$)	exposition au p95 (en $\mu\text{g}/\text{kg pc/j}$)	% de la DJT au p95	% d'individus pouvant dépasser la DJT
population générale	adultes (15 ans et+)	0.014	0.064	3	0
	enfants (3-14 ans)	0.046	0.175	9	0
population végétarienne (15 ans et +)	ovolactovégétariens	0.04	0.13	1	0
	lactovégétariens	0.05	0.12	1	0
	végétaliens	0.10	0.29	15	0

Ces résultats sont en moyenne moins importants d'un facteur 10 à 20 que ceux estimés lors de la dernière évaluation française de la tâche SCOOP publiée en 2003. Pour l'essentiel, la différence est due à la prise en compte dans le calcul de la tâche SCOOP de la catégorie d'aliments « céréales et produits céréaliers » en tant que vecteur d'exposition pour la fumonisine alors que dans l'étude TDS celui-ci n'a pas été pris en compte.

L'apport théorique est largement inférieur à la DJT ($2 \mu\text{g}/\text{kg p.c./j}$) pour l'ensemble des groupes étudiés et quel que soit le mode d'estimation.

5.2.1 Données de la Tâche Scoop

Tableau 1: Exposition alimentaire de la population française aux fumonisines ($\mu\text{g}/\text{kg p.c./j}$) (Tâche Scoop, 2003)

type de population	Fumonisine B1	Fumonisine B1 + B2
	exposition moyenne (en $\mu\text{g}/\text{kg pc/j}$)	exposition moyenne (en $\mu\text{g}/\text{kg pc/j}$)
population totale adulte	0.219	0.265
hommes adultes	0.227	0.282
femmes adultes	0.211	0.264
enfants	0.355	0.445

Les aliments contributeurs à l'exposition de la population française aux fumonisines sont les produits issus du maïs, du blé, du riz et autres produits céréaliers.

6 Exposition animale

6.1 Effets sur la santé animale et transfert dans les tissus animaux

6.1.1 Les porcins

Kriek *et al.* (1981) ont montré que des isolats de *Fusarium verticillioides* responsables de leucoencéphalomalacie chez le cheval en Afrique du Sud étaient capables d'induire un oedème pulmonaire chez le porc. Par la suite, des cas d'oedème pulmonaire ont été observés dans des élevages porcins aux USA (Harrison *et al.*, 1990; Colvin et Harrison, 1992; Osweiler *et al.*, 1992). Dans tous les aliments incriminés, *F. moniliforme* et/ou *F. proliferatum* étaient isolés et produisaient de la FB1 et de la FB2 après leur mise en culture (Ross *et al.*, 1990). Les aliments associés aux cas d'oedème pulmonaire avaient des teneurs en FB1 très variables, entre moins de 1 et 330 mg de FB1/kg. La consommation de culture de *F. moniliforme* ou l'injection de FB1 purifiée permettait de reproduire ces symptômes chez des porcs (Harrison *et al.*, 1990; Osweiler *et al.*, 1992). Les expériences réalisées par la suite ont surtout porté sur de jeunes porcs après le sevrage.

* Effets sur les performances

Dans la plupart des études, aucune conséquence n'est constatée sur les performances des porcs pour des concentrations de FB1 dans l'aliment inférieures à 100 mg/kg (Motelin *et al.*, 1994; Zomborszky *et al.*, 2000; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002a,b; Fodor *et al.*, 2005, 2006). Cependant, une réduction de vitesse de croissance limitée (Rotter *et al.*, 1996, 1997; Dilkin *et al.*, 2003) ou importante (Piva *et al.*, 2005), ou au contraire son augmentation (Prelusky *et al.*, 1996a), ont été observées pour des teneurs plus faibles. Hormis Harvey *et al.* (1996) qui ne notent pas d'effet, la consommation d'aliment, la vitesse de croissance des porcs, et en général l'efficacité alimentaire sont considérablement réduites pour un niveau de contamination d'au moins 100 mg/kg (Haschek *et al.*, 1992; Casteel *et al.*, 1993; Osweiler *et al.*, 1993; Motelin *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 1995, 2002; Meyer *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2005). Il semble donc qu'en dessous d'un seuil de l'ordre de 100 mg de FB1/kg d'aliment, les performances des porcs soient le plus souvent peu ou pas affectées, alors qu'elles sont considérablement réduites lorsque la concentration en FB1 est plus élevée. Cette dégradation se manifeste généralement chez des porcs qui présentent des symptômes d'intoxication ou des lésions tissulaires.

* Symptômes

Les symptômes d'intoxication apparaissent avec des aliments qui renferment au moins 100 mg de FB1/kg. Les porcs apparaissent déprimés. Ils manifestent une dyspnée avec hyperpnée, une faiblesse des membres postérieurs, leur rythme respiratoire s'accélère, leurs muqueuses se cyanosent (Colvin et Harrison, 1992; Osweiler *et al.*, 1992; Haschek *et al.*, 1992, 2001; Casteel *et al.*, 1994; Motelin *et al.*, 1994; Fazekas *et al.*, 1998; Gumprecht *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2003). Ils présentent parfois un ictère (Casteel *et al.*, 1993, 1994; Colvin *et al.*, 1993) et des diarrhées (Bane *et al.*, 1992; Colvin *et al.*, 1993). La mort peut intervenir quelques heures plus tard. Mais ces symptômes ont été observés avec un aliment moins contaminé (Dilkin *et al.*, 2003), alors que dans le cas d'une teneur de 200 mg de FB1/kg, les porcs ne présentaient pas de troubles du rythme respiratoire (Colvin *et al.*, 1993).

* Effets sur l'hématologie et certains paramètres sanguins

En général, les paramètres hématologiques ne sont pas affectés par la fumonisine (Motelin *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 1995, 1996; Rotter *et al.*, 1997; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002b; De Liguoro *et al.*, 2004; Fodor *et al.*, 2006). Une augmentation du nombre d'hématies et de leucocytes, de la teneur en hémoglobine et de l'hématocrite a cependant été observée avec un aliment renfermant 30 ou 100 mg de FB1/kg (Dilkin *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003).

L'activité de l'ASAT¹⁸, de la GGT¹⁹, de la PAL²⁰, de l'ALAT²¹, de la LDH²², de la SDH²³ et de la GOT²⁴, enzymes révélatrices d'effets hépato-toxiques, augmente dans le sérum sanguin des porcs auxquels on administre de la FB1 (Osweiler *et al.*, 1992; Casteel *et al.*, 1993; Colvin *et al.*, 1993; Riley *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 1995, 1996, 2002; Gumprecht *et al.*, 1998; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2000, 2002a,b; Dilkin *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003; De Liguoro *et al.*, 2004; Piva *et al.*, 2005). Cette augmentation est observée à partir de teneurs de 20 à 40 mg de FB1/kg d'aliment. L'amplitude de la variation dépend du taux de contamination et de la durée de distribution de l'aliment (Guzman *et al.*, 1997; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002b; Fodor *et al.*, 2006). La cholestérolémie (Haschek *et al.*, 1992; Casteel *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 1996; Guzman *et al.*, 1997; Rotter *et al.*, 1997; Gumprecht *et al.*, 1998; De Liguoro *et al.*, 2004; Piva *et al.*, 2005) et le taux de bilirubine sérique (Haschek *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1993; Casteel *et al.*, 1994; Gumprecht *et al.*, 1998) augmentent chez les porcs consommant un aliment contaminé par au moins 100 mg de FB1/kg.

Les fumonisines altèrent la biosynthèse des sphingolipides et provoquent une accumulation de sphingosine (So), et surtout de sphinganine (Sa), dans le sérum et les tissus du porc (Riley *et al.*, 1993; Rotter *et al.*, 1996; Gumprecht *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002a; Constable *et al.*, 2003). Le rapport Sa/So sérique augmente à partir d'une teneur de 5 mg de

¹⁸ ASAT : aspartate aminotransférase

¹⁹ GGT : γ - glutamyltransférase

²⁰ PAL : phosphatase alcaline

²¹ ALAT : alanine aminotransférase

²² LDH : lactate deshydrogénase

²³ SDH : succinate deshydrogénase

²⁴ GOT : glutamic oxalacetic tansaminase

FB1/kg de l'aliment dès le 3^{ème} jour de consommation, bien avant l'altération d'autres paramètres biochimiques ou l'apparition de lésions tissulaires (Zomborszky *et al.*, 2000). Le rapport Sa/So sanguin est donc un marqueur d'exposition précoce et sensible de la contamination de l'aliment par les fumonisines chez le porc. Il augmente dès le taux de 5 mg de FB1/kg d'aliment, alors qu'on ne constate pas d'effets pathologiques lorsque la teneur en FB1 de l'aliment est de moins de 25 mg/kg, ni d'augmentation d'activités enzymatiques quand elle est inférieure à 10 mg/kg.

* Effets sur l'immunité

Dans plusieurs études, la FB1 affecte la fonction immunitaire chez le porc avec diminution du nombre de monocytes et de neutrophiles (Müller *et al.*, 1999), de la prolifération des lymphocytes (Harvey *et al.*, 1995, 1996; Marin *et al.*, 2007) et modification de l'équilibre entre les cytokines (Taranu *et al.*, 2005; Marin *et al.*, 2006). La FB1 a aussi des effets dose-dépendants fortement cytotoxiques sur les macrophages alvéolaires de porcelets et altère leur activité phagocytaire (Liu *et al.*, 2002; Piva *et al.*, 2005). En présence de FB1, la réponse à *Mycoplasma* (Taranu *et al.*, 2005) est diminuée, mais pas à la maladie d'Aujeszky (Tornyos *et al.*, 2002). Lorsque des porcs reçoivent 0,5 mg de FB1/kg pc/j, la colonisation de l'intestin est beaucoup plus importante après inoculation d'*E. coli* (Oswald *et al.*, 2003) et les lésions de pneumonie sont plus étendues après inoculation de *Pasteurella multocida* (Halloy *et al.*, 2005). Par contre, la FB1 n'a aucun effet sur la réponse immunitaire de porcs contaminés par *Salmonella typhimurium*, ni sur le portage de *Salmonella* (Tanguy *et al.*, 2006). La FB1 peut donc accroître la sensibilité des porcs aux infections ou les risques d'échecs de vaccinations. Elle a également des effets cytotoxiques sur des cellules épithéliales intestinales porcines en culture, ce qui pourrait favoriser la translocation des bactéries pathogènes à travers l'intestin (Bouhet *et al.*, 2004, 2007).

* Effets cliniques

Le porc est plus sensible à la FB1 que les volailles, les veaux ou les ruminants (Diaz et Boermans, 1994; Fazekas *et al.*, 1998), mais il faut davantage de toxine pour induire un œdème pulmonaire et/ou un hydrothorax chez le porc qu'une encéphalomalacie chez le cheval (Palyusik et Moran, 1994).

Effets sur le foie

Des lésions hépatiques peuvent apparaître chez des porcs sans lésions pulmonaires (Osweiler *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1992; Colvin *et al.*, 1993; Dilkin *et al.*, 2003). Le foie est ferme, pâle, et son poids relatif augmente (Casteel *et al.*, 1993; Colvin *et al.*, 1993; Harvey *et al.*, 1996, 2002; Guzman *et al.*, 1997; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002b; Dilkin *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2005, 2006). On constate parfois une cholestase, une fibrose périlobulaire, une dégénérescence et une nécrose hépatocellulaire avec des figures de pycnose, de caryorexie ou de caryolyse, une vacuolisation cytoplasmique centrolobulaire (Haschek *et al.*, 1992, 2001; Casteel *et al.*, 1993; Colvin et Harrison, 1992; Colvin *et al.*, 1993; Motelin *et al.*, 1994; Gumprecht *et al.*, 1998; Dilkin *et al.*, 2003; Piva *et al.*, 2005). Les cordons hépatiques apparaissent désorganisés (Colvin et Harrison, 1992; Haschek *et al.*, 1992; Motelin *et al.*, 1994; Gumprecht *et al.*, 1998). L'accumulation de matériel membranaire a été observée dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer (Haschek *et al.*, 1992). Des figures mitotiques sont également présentes (Haschek *et al.*, 1992; Dilkin *et al.*, 2003). La gravité des lésions et la proportion des porcs atteints augmentent avec l'importance et la durée de l'exposition (Riley *et al.*, 1993; Motelin *et al.*, 1994; Haschek *et al.*, 2001). Riley *et al.* (1993) et Motelin *et al.* (1994) concluent que pour provoquer des lésions hépatiques, les aliments doivent contenir au moins 23 mg de FB1/kg. La régénérescence hépatique peut être rapide (Colvin *et al.*, 1993).

Effets sur les poumons

La trachée et les bronches contiennent un liquide mousseux blanc, et la cavité pleurale est plus ou moins remplie d'un fluide jaune-doré qui coagule à l'air (Harrison *et al.*, 1990; Haschek *et al.*, 1992; Osweiler *et al.*, 1992; Motelin *et al.*, 1994; Fazekas *et al.*, 1998; Dilkin *et al.*, 2003). Les poumons ne collapent pas (Haschek *et al.*, 1992; Osweiler *et al.*, 1992; Motelin *et al.*, 1994; Zomborszky *et al.*, 2000; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002b; Dilkin *et al.*, 2003). Un œdème inter- et intra-lobulaire grave se développe, et les septums interlobulaires sont dilatés, donnant un aspect réticulé qui est dû à la dilatation des canaux lymphatiques et des capillaires sanguins et à des infiltrations importantes entre les tissus conjonctifs (Harrison *et al.*, 1990; Haschek *et al.*, 1992, 2001; Osweiler *et al.*, 1992; Colvin *et al.*, 1993; Motelin *et al.*, 1994; Palyusik et Moran, 1994; Fazekas *et al.*, 1998; Dilkin, *et al.*, 2003; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002a,b; Zomborszky *et al.*, 2000). La présence de corps multilamellaires dans le cytoplasme des macrophages intravasculaires pulmonaires (Haschek *et al.*, 1992; Colvin *et al.*, 1993; Gumprecht *et al.*, 1998) et l'accumulation de matériel fibrillaire dans les vaisseaux

lymphatiques des alvéoles (Osweiler *et al.*, 1992) ou dans l'endothélium des capillaires pulmonaires (Gumprecht *et al.*, 2001) ont également été rapportées. La consommation d'au moins 16 mg de FB1/kg pc (Colvin *et al.*, 1993; Fazekas *et al.*, 1998; Gumprecht *et al.*, 1998) ou d'un aliment qui renferme plus de 100 mg de FB1/kg (Harrison *et al.*, 1990; Haschek *et al.*, 1992; Osweiler *et al.*, 1992; Motelin *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 2003) semble nécessaire pour induire un œdème pulmonaire. Cependant, l'incidence des lésions aux faibles doses augmente avec la durée d'exposition (Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002a), et des altérations des poumons ont été décrites lors d'intoxications moins importantes (Zomborszky *et al.*, 2000; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002b; Dilkin *et al.*, 2003; Piva *et al.*, 2005; Fodor *et al.*, 2005, 2006), alors qu'aucune anomalie pulmonaire n'est constatée avec près de 200 mg de FB1/kg d'aliment (Casteel *et al.*, 1993; Colvin *et al.*, 1993).

Effets cardiovasculaires

La cible primaire de la toxicité de la FB1 semble être le système cardio-vasculaire (Smith *et al.*, 1996a; Hsiao *et al.*, 2005). Le ventricule gauche et la couche musculuse des petites artères pulmonaires sont hypertrophiés (Casteel *et al.*, 1994). La FB1 provoque une hypertension dans l'artère pulmonaire, une diminution de la contractilité, de l'efficacité mécanique et de la vitesse de changement de pression du ventricule gauche, une réduction du rythme cardiaque et du débit sanguin, une baisse de la pression partielle en oxygène du sang et une acidose métabolique (Smith *et al.*, 1996a,b, 1999, 2000; Constable *et al.*, 2000, 2003). Ces modifications interviennent en même temps que l'augmentation de Sa et So plasmatiques (Smith *et al.*, 1999, 2000; Constable *et al.*, 2003). L'hypotension systémique provoquée par la fumonisine semble en partie médiée par l'augmentation des concentrations de Sa et de So, et l'hypertension pulmonaire par l'augmentation des concentrations de So-1-P (Hsiao *et al.*, 2005). L'œdème pulmonaire qui résulte de la consommation de FB1 par le porc est vraisemblablement provoqué par une déficience grave du cœur gauche (Smith *et al.*, 1996a, 2000; Constable *et al.*, 2000). Des mécanismes faisant intervenir la stimulation par So de la libération des réserves intracellulaires de Ca⁺⁺ dans les cellules des muscles lisses (Casteel *et al.*, 1994), et l'effet inhibiteur de So sur les canaux calciques de type L des myocytes cardiaques (Constable *et al.*, 2000) ont été proposés.

Effets sur d'autres tissus ou organes

D'autres lésions ont également été constatées à la suite de la consommation de FB1: hyperkératose et parakératose de la muqueuse oesophagienne (Casteel *et al.*, 1993), pétéchies, ulcération et érosion de la muqueuse de la zone oesophagienne gastrique (Harvey *et al.*, 1996; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002b; Fodor *et al.*, 2006), nécrose des tubules rénaux (Colvin *et al.*, 1993; Harvey *et al.*, 1996; Bucci *et al.*, 1998; Fazekas *et al.*, 1998; Dilkin *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2005, 2006), nécrose, dissociation de cellules acineuses avec noyaux pycnotiques et présence de corps multilamellaires, et œdème entre les acini du pancréas (Haschek *et al.*, 1992; Osweiler *et al.*, 1992; Palyusik et Moran, 1994), signes de nécrose de la rate (Fazekas *et al.*, 1998). Un cas d'œdème cérébral avec malacie de la partie caudale du cerveau a également été rapporté par Fazekas *et al.* (1998).

Effets sur les reproducteurs

De nombreux avortements de truies ont été constatés lors des cas d'intoxication par la FB1 dans des élevages aux USA (Osweiler *et al.*, 1992). En conditions expérimentales, les œdèmes pulmonaire et les lésions hépatiques constatés chez des porcs nouveau-nés montrent que la FB1 traverse la barrière placentaire chez cette espèce (Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2000). La mycotoxine est également retrouvée dans le lait à une concentration inférieure à 30 µg/kg (Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2000).

* Métabolisme

La FB1 est très peu biodisponible chez le porc ; au maximum 4% de la toxine est excrétée dans l'urine (Prelusky *et al.*, 1994b, 1996a). La FB1 est largement distribuée dans l'organisme : son volume de distribution est de $2,4 \pm 0,55$ L/kg. Sa clairance métabolique est de $9,1 \pm 1,1$ mL/min/kg. La recirculation entéro-hépatique contribue à augmenter la demi-vie de la FB1 ou de ses métabolites et à en accroître la toxicité (Prelusky *et al.*, 1994b, 1996b). Au cours des 72 heures suivant l'administration intra-gastrique de FB1, la toxine est principalement retrouvée dans les fèces [environ 90% d'après Prelusky *et al.* (1994) et Dilkin *et al.* (2003)]. La FB1 s'élimine lentement, et une quantité significative de résidus de FB1 s'accumule donc dans l'organisme du porc (Prelusky *et al.*, 1996a).

* Résidus

Les teneurs en FB1 des tissus sont très variables entre les porcs d'un même lot (Meyer *et al.*, 2003). Les teneurs en FB1 sont très variables également selon les tissus : les teneurs les plus élevées de FB1 sont trouvées dans le foie et les reins (Prelusky *et al.*, 1996a,b; Hashek *et al.*, 2001; Dilkin *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2005, 2006), des teneurs plus faibles dans la rate, le myocarde et les poumons (Meyer *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2005, 2006), alors qu'elles sont extrêmement faibles, et parfois même non détectables, dans les muscles et les graisses (Prelusky *et al.*, 1996a; Meyer *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2005, 2006). Son accumulation dans les organes augmente avec la durée de consommation de l'aliment contaminé, et des taux élevés de résidus peuvent être atteints chez des porcs exposés à de faibles niveaux de FB1 pendant de longues périodes (Prelusky *et al.*, 1996b). La gravité des effets de la FB1 et la teneur des tissus en résidus semblent liées (Meyer *et al.*, 2003). La FB1 captée par les tissus est relarguée lentement (Prelusky *et al.*, 1994b, 1996b). Un retrait d'au moins 2 semaines d'un aliment contaminé par la FB1 est donc nécessaire avant l'abattage des porcs afin de s'assurer d'une teneur minimale de résidus dans les organes (Prelusky *et al.*, 1996a). Compte tenu des très faibles niveaux dans les muscles et les graisses, le risque de contamination pour le consommateur humain est cependant très limité (Hashek *et al.*, 2001; Dilkin *et al.*, 2003).

6.1.2 Les volailles

Diverses affections des volailles sont associées depuis 1973 à la consommation de maïs contaminé par *F. moniliforme* ou *F. proliferatum* : refus de s'alimenter, diminution des performances, faiblesse, diarrhée, mortalité. Des cas de mortalité dus à la consommation de grains contenant *F. moniliforme* ont aussi été rapportés chez des oiseaux sauvages (Weibking *et al.*, 1993b). Toutes ces pathologies ne sont sans doute pas imputables aux fumonisines, leur impact sur la production aviaire apparaissant expérimentalement surtout limité à une altération de la croissance. Signalons qu'une embryotoxicité des fumonisines a également été rapportée après administration directe des toxines dans les œufs (Javed *et al.*, 1993, Henry et Wyatt, 2001). Ces études ne seront pas détaillées ici étant donnée la très faible absorption orale de ces composés (Bluteau, 2005) et leur faible passage dans les œufs depuis la circulation plasmatique (Vudathala *et al.*, 1994).

Comme pour les autres espèces, les effets de la FB1 chez la volaille dépendent de la dose utilisée et du temps de traitement. A court terme, à de fortes doses (supérieures à 100 mg/kg aliment) l'administration de FB1 peut provoquer une augmentation de la mortalité, et ce d'autant plus que l'administration est précoce. Le plus souvent, la distribution d'un aliment contaminé à hauteur de 10 à 300 mg/kg de FB1 ne se traduit toutefois que par une baisse de l'indice de consommation alimentaire, une diminution du poids moyen et diverses altérations du poids des organes. Une diarrhée noirâtre et collante, qui serait due à une diminution de la digestibilité de l'aliment, a également été rapportée (Tableau 3). Paradoxalement, au moins chez le canard, les altérations de croissance seraient plus importantes lorsque la toxine est administrée sur 1 à 7 semaines que lorsqu'elle est administrée sur plus de 10 semaines. Ces résultats suggèrent une «adaptation» des animaux.

A ces effets sur la croissance, assez homogènes entre espèces, s'ajoutent des modifications plus variées des paramètres biochimiques (Tableau 4). Dans toutes les études où il a été recherché, le rapport sphinganine sur sphingosine (Sa/So) plasmatique se révèle être le biomarqueur le plus sensible et le plus précoce d'une exposition aux fumonisines. Pour ce qui est des marqueurs biochimiques plus conventionnels, une élévation de l'ASAT, de la GGT, de la LDH, des protéines totales et du cholestérol est rapportée chez le poulet alors qu'une diminution de la cholestérolémie et une augmentation des activités de la LDH, de l'ASAT et de la GGT sont observées chez la dinde. De même, chez le canard en croissance, on constate une élévation transitoire de l'ASAT, de l'ALAT, de la LDH, des PAL, des protéines totales et du cholestérol lors d'exposition aux fumonisines ; un retour progressif à la normale se faisant lors d'une exposition prolongée. Ces paramètres ne sont pas utilisables au cours du gavage en raison de l'impact du gavage lui-même sur la physiologie hépatique.

Des altérations variées du système immunitaire ont été rapportées *in vivo* ou *in vitro* : diminution de l'épaisseur du cortex thymique, baisse de l'immunoglobulinémie, diminution de la viabilité des lymphocytes périphériques, modifications morphologiques et fonctionnelles des macrophages et altération de la capacité d'élimination des bactéries et diminution de la réponse vaccinale (Qureshi et Hagler, 1992, Dombink-Kurtzman *et al.*, 1993, Qureshi *et al.*, 1995, Javed *et al.*, 1995, Li *et al.*, 1999).

Métabolisme et persistance à l'état résiduel

Aucune donnée n'est disponible concernant un éventuel métabolisme de la FB1 chez la volaille et de très rares données concernent son devenir.

L'absorption orale de la toxine serait très modérée chez la poule pondeuse (<1%) mais plus importante chez le canard en croissance (2,5 à 3,5%) et voisine des taux d'absorption décrits chez les rongeurs, le porc et les primates non humains (Vudathala *et al.*, 1994; Bluteau, 2005). Les teneurs musculaires seraient environ 10 fois inférieures aux teneurs plasmatiques, aucun transfert dans les œufs n'étant constaté. Comme dans les autres espèces, le foie et les reins constitueraient les tissus marqueurs.

La constatation d'une faible présence de FB1 dans les tissus, et les œufs conduit à conclure que les résidus de fumonisines dans des produits alimentaires d'origine animale sont trop faibles pour présenter un risque alimentaire pour les consommateurs.

Tableau 3 : Effets de la FB1 chez les volailles.

Espèce, âge	Dose	Durée	Symptômes et lésions aux plus fortes doses	Références
Poussins, 1 jour	8,5 mg/kg aliment	15 jours	Diarrhées collantes noires ; réduction du poids vif	(Prathap Kumar <i>et al.</i> , 1997)
	100, 300, 375, 450 et 525 mg/kg aliment	14, 19 et 21 jours	Réduction de la croissance; augmentation du poids relatif du foie, du rein de la rate, des proventricules ; prolifération des hépatocytes avec hyperplasies	(Brown <i>et al.</i> , 1992; Kubena <i>et al.</i> , 1997a; Ledoux <i>et al.</i> , 1992; Weibking <i>et al.</i> , 1993a)
	10, 40 et 80 mg/kg p.v./	6 ou 21 jours	Augmentation de poids relatif du foie et de la rate ; réduction de la matière grasse du foie	(Espada <i>et al.</i> , 1994; Henry <i>et al.</i> , 2000)
Poussins, 7 jours	25 et 50 mg/kg aliment	7 semaines	Réduction du poids relatif des proventricules	(Broomhead <i>et al.</i> , 2002)
Poulets, 21 jours	100 et 200 mg/kg aliment	60, 120 et 180 min	Diminution de la capacité d'élimination d' <i>E. coli</i> du système circulatoire	(Li <i>et al.</i> , 1999)
Poules pondeuses, 21 et 72 semaines	8, 16, 100 et 200 mg/kg aliment	30, 112 et 420 jours	Diarrhées ; foies agrandis, friables et pâles ; réduction de production des œufs pendant le premier cycle de 28 jours ; réduction du poids du rein	(Kubena <i>et al.</i> , 1999; Prathap Kumar <i>et al.</i> , 1997)
Dindes, 1 jour	25, 50, 100, 175, 200, 300, 325, 400 et 475 mg/kg aliment	21 – 28 jours	Réduction du GMQ et du poids relatif de la rate ; augmentation de poids relatif du foie, pancréas, gésier et proventricule ; augmentation de l'hémoglobine et des hématocrites ; hyperplasie biliaire ; hypertrophie des cellules de Kupfer; diminution du taux en anticorps	(Kubena <i>et al.</i> , 1997b; Kubena <i>et al.</i> , 1995a, b; Ledoux <i>et al.</i> , 1996; Li <i>et al.</i> , 2000; Weibking <i>et al.</i> , 1993b)
Dindons, 7 jours	25 et 50 mg/kg aliment	14 semaines	Réduction de consommation	(Broomhead <i>et al.</i> , 2002)
Canetons, 1 jour	100, 200, 400 mg/kg aliment	21 jours	Réduction de consommation et de GMQ ; augmentation de poids absolu du foie, du cœur, du rein, du pancréas et des proventricules ; hyperplasie hépatocystique et biliaire ; foie brun foncé	(Bermudez <i>et al.</i> , 1995)
Canetons, 7 jours	2, 8, 32, 128 mg/kg aliment	11 semaines	Diminution transitoire du poids corporel, augmentation relative du poids du foie, de la rate, du gésier. Pas d'altération histologique du foie et des reins.	(Tran <i>et al.</i> , 2005)
Canards, 28 jours	5, 15, 45 mg/kg p.v./j	12 jours	Diminution du gain de poids, augmentation de poids absolu du foie avec apparition de structures tubulo-acineuses. Induction de différents systèmes enzymatiques.	(Bailly <i>et al.</i> , 2001 ; Raynal <i>et al.</i> , 2001)
Canards, 12 semaines	10, 20 mg/kg aliment	12 jours	Diminution non significative du poids corporel, du poids du foie, et augmentation non significative de l'indice de conversion alimentaire. Modification du type de stéatose hépatique.	(Tardieu <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 4 : Effets de la FB1 chez les volailles sur différents paramètres plasmatiques.

Espèce, âge	Dose	Durée	Sa/So	PROT	CHOL	ASAT	GGT	LDH	PAL	Références
Poussins, 1 jour	30, 75, 100, 200, 300 et 400 mg/kg aliment	16, 19 et 21 jours	AS	ns ou AS	AS	AS	ns ou AS	ns	RS	(Espada <i>et al.</i> , 1994, 1997; Kubena <i>et al.</i> , 1997a; Ledoux <i>et al.</i> , 1992; Weibking <i>et al.</i> , 1993a)
	20, 40, 80 mg/kg p.v./j	21 jours	AS	ns	ns			ns	ns	(Henry <i>et al.</i> , 2000)
Poules pondeuses, 21 et 72 semaines	200 mg/kg aliment	112 jours		AS		AS				(Kubena <i>et al.</i> , 1999)
Poussins, 7 jours	25 et 50 mg/kg aliment	7 semaines	AS	ns	ns	ns	ns		ns	(Broomhead <i>et al.</i> , 2002)
Dindes; 1 jour	25, 75, 100, 200, 300, 400 et 475 mg/kg aliment	21 jours	AS	ns	RS	AS	AS	AS	ns	(Kubena <i>et al.</i> , 1997b; Kubena <i>et al.</i> , 1995a, b; Ledoux <i>et al.</i> , 1996; Weibking <i>et al.</i> , 1993b)
Dindons, 7 jours	25 et 50 mg/kg aliment	14 semaines	AS	ns	ns	ns	ns		ns	(Broomhead <i>et al.</i> , 2002)
Caneton, 1 jour	100, 200, 400 mg/kg aliment	21 jours	AS	ns	ns	ns	AS			(Bermudez <i>et al.</i> , 1995)
Canetons, 7 jours	2, 8, 32, 128 mg/kg aliment	11 semaines	AS	AS	AS	ns	ns	AS	AS	(Tran <i>et al.</i> , 2005)
Canards, 28 jours	5, 15, 45 mg/kg p.v./j	12 jours	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	(Tran <i>et al.</i> , 2003)
Canards, 12 semaines	10, 20 mg/kg aliment	12 jours	AS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	(Tardieu <i>et al.</i> , 2004)

5 **AS**: Augmentation significative; **RS** : Réduction significative ; **ns**: non significative ;
Sa/So : sphinganine/sphingosine ; **PROT** : Protéines totales ; **CHOL** : cholestérol ; **CREA** : créatinine ; **ALAT** ; alanine aminotransférase ; **ASAT** : aspartate
aminotransférase ; **GGT** : γ - glutamyltransférase ; **LDH** : lactate déhydrogénase ; **PAL** : phosphatase alcaline

6.1.3 Les ruminants

Action et devenir des fumonisines dans le rumen

Les études réalisées *in vitro* par Caloni *et al.* (2000) et par Gurung *et al.* (1999) concordent et montrent que l'écosystème microbien ruminal peut dégrader de 10 à 18% de FB1 au cours d'incubations de 72 heures. Les auteurs n'ont pas identifié la nature des métabolites formés, mais ils n'ont pas détecté la présence d'aminopolyols ou d'aminopentol dans le milieu ruminal. Ce taux de dégradation est faible et ne peut expliquer à lui seul la sensibilité moindre des ruminants à la toxicité de la FB1.

Chez les vaches, l'absorption de la FB1 après ingestion orale est très faible. En effet, après gavage oral avec 1 ou 5 mg FB1/kg p.v, aucune toxine ou métabolite n'a pu être détecté dans le plasma. De plus, aucun effet n'a pu être mis en évidence sur la concentration en sphingolipides ou le rapport Sa/So du plasma (Prelusky *et al.*, 1995).

Effet des fumonisines sur la santé des ruminants

Des études portant sur la réponse de différentes espèces animales à la toxicité des métabolites secondaires de *F. moniliforme* ont montré que les ovins étaient particulièrement sensibles à la FB1 (Kriek *et al.* 1981). Osweiler *et al.* (1993) ont observé que la distribution d'aliments naturellement contaminés en FB1 aux doses respectives de 15, 31 ou 148 mg/kg pendant 31 jours, à de jeunes taurillons de 230 kg, n'a pas modifié leur consommation alimentaire ni leur gain de poids vif. Une diminution de l'appétence de la ration a toutefois été notée avec la dose de 148 mg/kg. En outre, parmi les six bouillons recevant cette dose, deux ont eu des lésions hépatiques bénignes accompagnées d'une augmentation de l'aspartate amino transférase, de la gamma glutamyl transpeptidase, de la lactate déshydrogénase, de la bilirubine et du cholestérol, traduisant des troubles de la fonction hépatique.

Transfert des fumonisines dans le lait

Les rares mesures effectuées montrent que les taux de transfert des fumonisines dans le lait sont nulles ou faibles (de l'ordre de 0,05%) (Scott *et al.*, 1994 ; Richard *et al.*, 1996 ; Hammer *et al.*, 1996 cités par Spahr *et al.*, 2000). De plus, une étude menée aux USA, indique une contamination par la FB1 d'un seul échantillon de lait, sur 165 échantillons testés, à une concentration de 5 ng/ml (Maragos et Richard, 1994). Il n'y a donc pas de risque avéré des fumonisines pour le consommateur de produits laitiers de ruminants.

6.1.4 Animaux de compagnie et de loisirs

Les équins

Les équidés répondent à la présence de fumonisines dans leur alimentation (notamment à la FB1, la plus toxique) généralement sous la forme d'un syndrome neurologique dénommé leuco-encéphalomalacie (LEM). Décrit aux USA notamment suite au décès de plus de 5000 chevaux lors de l'hiver 1934-1935 (Graham, 1936), puis régulièrement par la suite dans de nombreux pays, d'Amérique centrale et d'Amérique du sud (Ono *et al.*, 2004), ce syndrome a tué une vingtaine de chevaux en France, principalement dans le sud-ouest, entre 1994 et 1996 (Bailly *et al.*, 1996).

Le syndrome équin de LEM est caractérisé par la présence de lésions nécrotiques liquéfiées dans l'encéphale. La maladie semble être spécifique aux équidés, bien que des lésions du cerveau aient été également rapportées chez les lapins (Bucci *et al.*, 1996), les porcins (Fazekas *et al.*, 1998) et la carpe (Pepeljnjak *et al.*, 2000). Cependant, les lésions du cerveau observées chez les lapins et les porcs n'ont pas été reproduites (T. Bucci, données non publiées; Zomborszky *et al.*, 2000), et l'étude sur la carpe n'a pas été répétée. En plus des lésions du cerveau, une atteinte hépatique grave peut être observée (notamment lors de forte contamination) (Marasas *et al.*, 1988). Des études récentes suggèrent que la FB1 est également toxique pour le système cardiovasculaire des chevaux (Smith *et al.*, 2002), ainsi que pour les fonctions rénale et hépatique. Par contre, l'implication supposée des fumonisines dans le syndrome duodénite/jéjunite proximale du cheval n'a jamais été confirmée.

On pense que la LEM équine est le résultat d'un œdème cérébral consécutif à une détérioration du fonctionnement des muscles lisses (par inhibition des canaux calciques) des sphincters du réseau

capillaire artériel cérébral, d'où une incapacité à moduler le flux sanguin vers le cerveau lorsque le cheval abaisse sa tête pour manger et boire (Smith *et al.*, 2002 ; Foreman *et al.*, 2004).

L'analyse des aliments (généralement du maïs mal trié ou des aliments composés en contenant) provenant de cas confirmés de LEM équine aux Etats-Unis montre que la consommation d'aliment contenant plus de 10 mg FB1/kg (équivalent à 0,2 mg/kg p.v./j) est associée à un risque accru de développer la maladie, le risque restant très limité si la concentration est inférieure à 6 mg/kg (équivalent à 0,12 mg/kg p.v./j) (Ross *et al.*, 1992). Wilson *et al.* (1992) observent épisodiquement des troubles neurologiques chez des poneys consommant durant 122 jours (à raison de 0,8% du poids vif) puis durant 58 jours (à raison de 1,6% du poids vif) des concentrés contaminés par 8 mg/kg de FB1 et 2,56 mg/kg de FB2. Aucune lésion encéphalique visible ne fut cependant observée à l'autopsie. Dans les cas d'intoxications naturelles rapportées au Brésil, la concentration en FB1+FB2 dans le maïs consommé par les chevaux variait entre 2,1 et 10,5 mg/kg (Ono *et al.*, 2004). Dans ceux observés dans le sud-ouest de la France, des concentrations de FB1 comprises entre 20 et 30 mg/kg d'aliment ont été retrouvées (dans un cas, plus de 200 mg/kg ont été retrouvés) (Bailly *et al.*, 1996).

La LEM équine a été reproduite expérimentalement en administrant de la FB1 purifiée par voie orale ou intraveineuse, mais également en nourrissant les animaux avec des maïs naturellement contaminés par *F. verticillioides* ou avec des aliments fabriqués à partir de cultures de *F. proliferatum*, contenant principalement de la FB1 et de la FB2, mais l'implication de la FB2 dans la genèse de la LEM n'est toujours pas clairement démontrée (Ross *et al.*, 1994). Quant à la FB3, elle semble non toxique chez le cheval. Des études réalisées avec des aliments naturellement contaminés indiquent que la dose orale minimale de FB₁ suffisante pour induire la LEM est comprise entre 15 et 22 mg/kg d'aliment (équivalent à 0,30 mg/kg p.v./j de FB1 pendant 150 jours ou à 0,44 mg/kg p.v./j de FB1 pendant 241 jours). Avec des aliments contaminés avec du matériel de culture de *F. moniliforme* durant 27 jours et contenant 65, 130 ou 200 mg de FB1/kg, Goel *et al.* (1996) retrouvent systématiquement des lésions neurologiques centrales à l'autopsie ainsi qu'une élévation du taux sérique de sphinganine libre.

La dose orale minimale de FB1 pure induisant une LEM chez le cheval n'a pas été déterminée.

Foreman *et al.* (2004) ont administré durant 28 jours par voie intraveineuse des doses de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,10 et 0,20 mg de FB1 par kg p.v./j en vue de déterminer une courbe dose-réponse pour les signes neurologiques. Tous les chevaux qui ont reçu une dose supérieure à 0,05 mg/kg p.v./j ont présenté rapidement des signes neurologiques (baisse de tonicité de la langue, ataxie des membres antérieurs puis des postérieurs avec difficultés de placement, puis dépression, hyperesthésie ...) dont la gravité et la rapidité d'apparition ont été dose dépendantes. Certaines altérations du liquide céphalorachidien ont également été notées : élévation du taux de protéines, d'albumine, des IgG et du ratio albumine/protéines. La dose intraveineuse minimale de FB1 pure qui provoque des anomalies neurologiques est donc supérieure à 0,01 mg/kg (qui est la dose sans effet) mais inférieure à 0,05 mg/kg p.v./j.

Si on fait l'hypothèse que la dose intraveineuse représente 5% de la dose orale (Smith *et al.*, 2002), la dose orale sans effet serait donc de 0,2 mg/kg p.v. (ce qui équivaut à environ 8 mg/kg aliment). La dose orale qui provoque des anomalies neurologiques est comparativement inférieure à 1,0 mg/kg p.v./j.

Selon Smith *et al.* (2002) la dose sans effet pour des anomalies cardiovasculaires est de 0,2 mg/kg p.v./j, mais la dose sans effet pour des anomalies biochimiques sériques est inférieure à ce seuil.

Le changement du métabolisme des sphingolipides est un indicateur précoce de l'exposition des chevaux aux fumonisines. Par exemple, des poneys nourris avec des aliments contaminés par des fumonisines (≥ 22 mg/kg, principalement de la FB1) ont tous montré une augmentation importante de leur concentration sérique en sphinganine. Cette augmentation réversible de la concentration en sphinganine, ainsi que l'augmentation du rapport sphinganine/sphingosine se produisent avant que n'apparaissent les signes cliniques de la LEM ou l'augmentation des transaminases dans le sérum.

En définitive, les équins représentent un groupe cible particulièrement sensible à la présence de fumonisines. Cependant, seule la responsabilité de la FB1 est actuellement clairement démontrée. Il est important de souligner que l'évolution des manifestations cliniques est toujours aiguë (24h), fatale

même suite à une exposition prolongée sans signe précurseur. Aussi il convient de ne pas faire consommer aux chevaux des aliments dans lesquels le taux de fumonisines dépasse la recommandation européenne établie à 5 mg/kg. Il serait par ailleurs souhaitable d'interdire toute distribution d'écart de tri de maïs grains aux chevaux.

Les carnivores domestiques

Aucun trouble n'a jamais été rapporté chez les carnivores domestiques en relation avec cette contamination qui ne semble pas poser de problème pratique à l'industrie des aliments secs pour carnivores.

Une seule enquête épidémiologique a été réalisée et laisse cependant à penser que les carnivores domestiques (chiens et chats) pourraient être potentiellement exposés au risque toxicologique lié à la présence de fumonisines dans les aliments secs contenant des céréales ou des tourteaux. Un échantillon de 35 aliments secs pour chiens et de 35 aliments secs pour chats disponibles sur le marché britannique a fait l'objet d'une recherche des fumonisines B1 et B2 (seuil de détection respectivement de 3 et de 8 µg/kg). La FB1 a été identifiée dans un seul aliment pour chiens (105 µg/kg) et dans 3 aliments pour chats (90, 240 et 690 µg/kg). La FB2 a également été identifiée dans le même aliment pour chiens (30 µg/kg) et dans 2 des 3 aliments pour chats déjà contaminés par la FB1 (80 et 60 µg/kg) (Scudamore *et al.*, 1997).

6.1.5 Les poissons

Toxicités à la FB1 observées en élevage

A notre connaissance, aucun cas d'une toxicité de la FB1 en élevage de poissons n'a été rapporté dans la littérature scientifique. Néanmoins quelques études expérimentales montrent un effet toxique à des doses susceptibles d'être rencontrées dans des aliments leur étant destinés en aquaculture.

Etudes expérimentales

Les données disponibles concernent principalement le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) et la carpe (*Cyprinus carpio*), car l'alimentation qui leur est délivrée en aquaculture peut contenir du maïs, matière première susceptible d'être contaminée par les fumonisines.

L'âge semble être un facteur important de la sensibilité, les jeunes animaux étant plus sensibles que les plus âgés. Chez le poisson chat, 20 mg FB1/kg d'aliment réduisent la vitesse de croissance des animaux d'un an, alors que ceux âgés de deux ans voient seulement leur gain poids réduit quand ils sont exposés à 80 mg de FB1/kg (Lumlertdacha *et al.*, 1995). Li et Robinson (1995) et Brown *et al.* (1994) ont également rapporté une forte tolérance des poissons chat adultes exposés aux fumonisines (à 40 et 313 mg/kg d'aliment respectivement). La sensibilité du poisson chat aux fumonisines est comparable à celle du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Tuang *et al.*, 2003).

Les concentrations de fumonisines affectant le métabolisme et le système immunitaire des poissons sont plus faibles que celles affectant les performances. Chez la carpe, de faibles doses de FB1 (0,5 mg/kg d'aliment) affectent déjà la fonction hépatique (élévation des activités de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et des concentrations en bilirubine) et la fonction rénale (concentrations plus élevées en créatinine) (Pepeljnjak *et al.*, 2002). Chez la truite arc-en-ciel, Meredith *et al.* (1998) ont montré qu'une exposition de seulement 5 à 7 jours à des aliments contenant de 5 à 500 mg de FB1/kg est suffisante pour faire évoluer le ratio sphinganine/sphingosine, ce qui montre que la FB1 alimentaire est rapidement absorbée par les truites et affecte rapidement la biosynthèse des sphingolipides. Le changement dans le métabolisme des sphingolipides peut affecter la morphologie des érythrocytes. Pepeljnjak *et al.* (2002) suggèrent que ces changements dans la membrane des érythrocytes pourraient expliquer l'augmentation du nombre des petits érythrocytes observés lors d'une exposition aux fumonisines. Le taux de plaquettes plus élevé pourrait être dû à une thrombocytose secondaire causée par un dommage cellulaire plus important lié à une infection. Chez la crevette blanche (*Litopenaeus vannamei*), les fumonisines affectent les activités de la trypsine et de la collagénase, indiquant un effet négatif potentiel sur la fonction digestive et des modifications histologiques de leur hépatopancréas (Burgos-Hernandez *et al.*, 2005).

Le plus gros problème posé par les fumonisines en aquaculture semble être leur capacité à altérer la fonction immunitaire. Vingt mg de FB1 dans l'aliment suffisent à réduire la production d'anticorps. Les modifications à ce niveau n'augmentent pas la mortalité chez le poisson chat lors d'une infection expérimentale avec *Edwardsiella ictaluri*. Toutefois quand les poissons sont exposés à 80 mg FB1/kg d'aliment, la résistance à ce pathogène est significativement réduite (Lumlertdacha et Lovell, 1995 ; Lumlertdacha *et al.*, 1995). Sous différentes conditions expérimentales, les modifications immunologiques ont été observées à des niveaux d'exposition plus faibles. Pepeljnjak *et al.* (2002) a rapporté qu'une exposition chronique à de plus faibles doses de fumonisines prédispose la carpe à des infections et maladies. Une incidence plus élevée des infections dermatologiques d'*Erythrodermatidis cyprini* causées par *Aeromonas salmonicidae* subsp *nova* a été observée chez des carpes recevant 5 mg FB1/kg d'aliment comparé à des doses plus faibles.

Les données expérimentales citées suggèrent une dose sans effet inférieure à 0,5 mg de FB1/kg d'aliment chez les poissons, mais cela mérite d'être confirmé.

6.2 Calcul de l'exposition animale en France

La méthodologie générale est décrite en annexe 2

6.2.1 Données de contamination

Les données de contamination présentées ci-dessous ne portent que sur la fumonisine B₁. 677 valeurs de contamination ont été recueillies, réparties sur 12 types d'aliments. Pour quelques matières premières (rafles de maïs, matières premières végétales diverses) nous ne disposons que de moins de 5 données. Ces données ne sont pas présentées dans le tableau 5, ni utilisées pour le calcul de l'exposition. Ainsi, une fois ces analyses retirées, il reste 674 valeurs de contamination, regroupées en 10 types d'aliments.

Tableau 5 : Répartition des données de contamination en FB1 par type de matières premières (n>= 5) :

Matière première ²⁵	nombre de données	% < LOD	% > LOQ
corn gluten feed	20	0,0	2,2
issues de céréales	13	0,0	1,8
maïs	301	7,9	31,6
pois	104	12,8	2,7
blé	61	0,0	1,3
son	32	0,0	0,3
gluten feed de blé	49	0,0	0,4
orge	52	0,0	0,0
remoulage	23	0,0	0,0
féveroles	19	2,8	0,0
Total	674	23,4	40,4

Ces données comportent 23,4% de valeurs inférieures à la limite de détection et 40,4% de valeurs quantifiées (supérieures à la limite de quantification).

Les estimations moyenne et aux 75^{ème} et 95^{ème} percentiles des teneurs supérieures à la LOQ (comme décrit dans la méthodologie générale) sont à comparer aux teneurs réglementaires pour les aliments complets (Recommandation 2006/576/CE).

Le corn gluten feed, les issues de céréales et le maïs sont les trois matières premières les plus contaminées.

²⁵ le corn gluten feed et le wheat gluten feed sont les produits résultant des grains de maïs et de blé dont on a extrait l'amidon dans les processus d'amidonnerie.

Les statistiques descriptives des niveaux de contamination selon les scénarii indiqués sont fournies en annexes. Ces résultats sont présentés pour les niveaux de contamination en poids frais, tel que dans la réglementation.

Les teneurs recommandées portent sur la somme FB1 + FB2 et on considère que la FB2 représente 20% du total (FB1 +FB2) (Shepard *et al.*, 1996). Aux données de contamination doivent donc être ajouté 20% pour tenir compte de la FB₂ et être comparées aux teneurs de la recommandation 2006/576/CE.

6.2.2. Calcul de l'exposition

Les calculs de contamination des rations sont les suivants (les tableaux détaillés des résultats sont en annexe 2) :

- Pour les volailles

Tableau 6a : Calculs de contamination en FB1 des rations destinées aux volailles

Espèces	Phases d'élevage	contamination minimale calculée		contamination des positifs			valeurs limites recommandées ⁽¹³⁾ en µg/kg d'aliment
		en µg/kg d'aliment	% de la ration	en µg/kg d'aliment		% de la ration	
				au p75	au p95		
Poulet standard	démarrage	208,5	58,5	206,3	1151,4	58,5	20 000
	croissance	168,0	62,2	141,9	897,1	62,2	20 000
	finition	135,5	62,6	94,2	698,1	62,6	20 000
	retrait	148,4	68,4	103,4	764,9	68,4	20 000
Poulet label	démarrage	332,8	65,8	375,9	1895,8	65,8	20 000
	croissance	397,6	77,6	450,3	2266,6	77,6	20 000
	finition-retrait	393,4	79,7	467,8	2304,1	79,7	20 000
Poule pondeuse	démarrage	308,5	68,8	371,2	1820,7	68,8	20 000
	croissance	310,0	76,7	364,6	1815,1	76,7	20 000
	repro-entretien	312,9	79,5	382,3	1867,2	79,5	20 000
	pondeuse	297,2	65,1	330,7	1682,1	65,1	20 000
Dinde	démarrage	124,9	40,9	114,0	677,6	40,9	20 000
	croissance 1	94,0	47,5	78,5	523,1	47,5	20 000
	croissance 2	115,5	55,0	103,8	654,1	55,0	20 000
	finition 1	170,8	58,3	152,1	922,0	58,3	20 000
	finition 2	123,0	66,0	109,8	708,2	66,0	20 000
	finition 3	126,6	64,3	78,4	639,7	64,3	20 000
Pintade	démarrage	400,2	58,2	491,0	2380,9	58,2	20 000
	croissance	458,3	62,5	561,0	2667,2	62,5	20 000
	finition-retrait	518,5	65,4	643,4	3028,7	65,4	20 000
Canard Barbarie	canard démarrage	237,8	70,4	229,4	1305,9	70,4	20 000
	canard croissance	261,7	79,1	249,7	1433,7	79,1	20 000
	canard finition	249,1	81,8	227,0	1351,0	81,8	20 000
Canard prêt à gaver	élevage	348,6	75,0	382,1	1972,2	75,0	20 000
	gavage	830,6	98,0	1041,7	4865,7	98,0	20 000

NB : La part de la ration (exprimée en pourcentage) susceptible d'être contaminée par la fumonisine B₁, utilisée dans le calcul de l'exposition varie selon les scénarii :

- dans le cas de la contamination minimale calculée, la part de la ration susceptible d'être contaminée correspond aux matières premières incluses dans la ration pour lesquelles on a des données (même si elles sont ND)
- dans le cas des scénarii de contamination aux p75 et p95 des teneurs positives, la part de la ration susceptible d'être contaminée correspond aux matières premières incluses dans la ration pour lesquelles les teneurs en fumonisine sont supérieures à la LOD.

La réglementation recommande une valeur limite de contamination de la ration pour les volailles de 20000 µg/kg pour la somme des fumonisines B₁ et B₂.

Les poulets standards ainsi que les dindes ont les plus faibles niveaux de contamination de la ration, avec ensuite les canards de Barbarie. Ces 3 catégories de volailles ont également des valeurs de contamination au p75 inférieures au niveau moyen. Cela s'explique par la contamination du blé qui comporte de nombreuses valeurs égales à la LOQ et quelques valeurs quantifiées, ce qui élève la moyenne par rapport au 75^{ème} percentile.

Compte-tenu de la contamination de la ration estimée ici, en ajoutant 20% pour tenir compte de la FB2, on reste dans des niveaux de contamination très inférieurs à la valeur limite définie dans la recommandation. Le régime le plus contaminé (facteur 4 pour atteindre la valeur limite) est celui des canards prêts à gaver au p95 de la contamination des matières premières (à savoir le maïs pour 98% de la ration).

Les pourcentages de la ration pris en compte dans ces estimations varient de 40% pour les dindes à 80 voire 98% pour les canards.

- Pour les porcs

Tableau 6b : Calculs de contamination en FB1 des rations destinées aux porcs

Porcins	contamination minimale calculée		contamination des positifs			teneurs limites FB1+FB2 recommandées ⁽¹³⁾
	en µg/kg d'aliment	% de la ration	en µg/kg d'aliment au p75	en µg/kg d'aliment au p95	% de la ration	en µg/kg d'aliment
1er âge	324,6	56,5	377,4	1863,7	56,5	5000
2ème âge	180,7	78,0	199,0	1018,1	78,0	5000
croissance CORPEN	201,0	83,4	327,2	1389,3	83,4	5000
finition CORPEN	243,3	78,0	374,3	1622,1	78,0	5000
truies gestantes	200,9	84,8	306,8	1300,0	84,8	5000
truies allaitantes	136,2	79,5	215,8	889,9	79,5	5000

Il faut noter que pour la majorité des régimes, une grande part de la ration (jusqu'à 85%) est pris en compte dans les calculs de contamination de la ration. Seuls les calculs de contamination réalisées avec les aliments premier âge porcins ne prennent en compte que moins de 60% de la ration.

La réglementation recommande pour les porcins une valeur limite de contamination de la ration de 5000 µg/kg pour la somme des fumonisines B₁ et B₂. Les scénarii de contamination moyenne sont très largement en deçà de la valeur limite. Même au p75, la marge est encore très importante. Au 95^{ème} percentile, la contamination de la ration calculée est toujours au moins 2,5 fois inférieure à la teneur recommandée en ajoutant 20% pour la fumonisine B₂.

7. Réglementation

En alimentation humaine, dans le cadre du règlement 1126/2007/CE modifiant le règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, des teneurs maximales ont été fixées pour les fumonisines (tableau 7a).

En alimentation animale, aucune teneur maximale en fumonisines n'est fixée dans les matières premières et les aliments pour animaux par la Directive 2002/32. Néanmoins, la Commission recommande²⁶ d'appliquer des teneurs maximales en fumonisines B₁ + B₂ dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation animale (tableau 7b).

Tableau 7a : Teneurs maximales en fumonisines (somme B₁+B₂) dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg

Produit	Teneur maximale en µg/kg
Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide (*)	4 000
Maïs destiné à la consommation humaine directe, aliments à base de maïs destiné à la consommation humaine directe, à l'exception des aliments figurant aux points 3 et 4	1 000
Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs et collations à base de maïs	800
Préparations à base de maïs et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est > 500 microns 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 > 500 microns ou destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 1904 10 10	1 400
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns auxquelles s'applique le code NC 1102 20 et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est ≤ 500 microns ou destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 1904 10 10	2 000

(*) 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 7b: Teneurs maximales dans les aliments pour animaux recommandées par l'UE en fumonisines B₁+B₂ ⁽¹⁴⁾

Produits	Teneur maximale recommandée en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux : <ul style="list-style-type: none"> Le maïs et les produits à base de maïs 	60000
Aliments complémentaires et complets pour : <ul style="list-style-type: none"> Les porcs, les équidés, les lapins et les animaux familiers Les poissons La volaille, les veaux (<4mois), les agneaux et les chevreaux Les ruminants adultes (>4mois) et les visons 	5000 10000 20000 50000

²⁶ Recommandation 2006/576/CE de la Commission du 17 août 2006 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.

8. Surveillance et contrôle en France

Dans le cadre 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-), les teneurs en fumonisines B₁ et B₂ commencent à être appréhendées aussi bien sur les matières premières que sur les produits transformés. Dans les cas de non-conformité, les actions correctives sont entreprises telles qu'interdiction de mise le marché et saisie ou refus de lots contaminés à l'importation. Bien que les denrées prélevées au sein des catégories d'aliments réglementées soient de nature et d'origine variables selon les années, il peut néanmoins être dégagé les grandes tendances de conformité suivantes :

Les plans conduits après les récoltes de 2003 à 2006 ont surtout porté sur le maïs et depuis peu sur le blé et l'orge. Ces plans confirment que la survenue de contamination est plus sur le maïs que sur les autres céréales, avec en moyenne 37,7 % des lots qui avaient une valeur supérieure à 2000 mg/kg sur les 223 échantillons collectés en silo. Ces plans montrent par ailleurs que cette teneur est variable d'une année sur l'autre.

Concernant les produits prêts à consommer à base de céréales, la contamination moyenne des farines et semoules de maïs est de 233 µg/kg d'aliment. Les céréales pour petit déjeuner et autres produits à base de céréales ont une teneur comprise entre 18 et 37 µg/kg, avec plus de 90 % des échantillons non quantifiables. Sur 21 échantillons de produits à base de céréales destinés aux enfants en bas âge prélevés avant l'entrée en vigueur de la réglementation communautaire, 3 échantillons dépassent la teneur de 200 µg/kg. Il est à signaler qu'en 2005 dans une farine de maïs en provenance d'Europe méridionale a été identifiée une teneur élevée en fumonisine B1 de 1600 µg/kg, cet aliment même s'avérant contenir de l'aflatoxine B1 à 7,5 µg/kg, montrant non seulement l'émergence de cette dernière toxine dans des productions européennes mais encore la possibilité de concomitance de plusieurs mycotoxines élaborées par des genres de moisissures différents.

9. Conclusions et recommandations

Parmi les différentes fumonisines, les effets de la fumonisine B1 (FB1) sont les mieux caractérisés : on assiste notamment à une altération du métabolisme des sphingolipides dont toutes les conséquences toxicologiques ne sont pas connues. En terme d'effets cliniques majeurs, l'œdème pulmonaire porcin et la leucoencéphalomalacie équine sont les principaux effets observés sur la santé animale.

La population française est peu exposée aux fumonisines en raison de la faible consommation de maïs et du faible transfert de ces toxines dans les produits animaux. Cependant, les teneurs mesurées dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle dans les produits à base de céréales destinés aux enfants en bas-âge montrent qu'il conviendrait de renforcer les contrôles sur ces produits.

En revanche, la population animale est plus exposée, le maïs pouvant constituer un élément majeur de son alimentation. Particulièrement contaminées, les issues de maïs utilisées dans l'alimentation des animaux, notamment celle des équidés, présentent un risque particulier et devraient être réglementées. D'une façon générale, les teneurs maximales recommandées (Recommandations de la Commission¹⁴ et de la FDA²⁷) pour les maïs destinés aux animaux apparaissent trop laxistes au regard de la protection de la santé animale.

La connaissance de la toxicité des fumonisines autres que la FB1 est très limitée et le différentiel toxique entre fumonisines n'est pas connu. Il faudra à l'avenir engager des recherches sur le danger toxique des fumonisines, notamment les dangers immunotoxique et cancérigène à doses faibles.

Outre la recherche sur les dangers toxiques des fumonisines, plusieurs voies d'amélioration sont à considérer :

- du point de vue réglementaire, la réglementation devrait concerner non seulement à la somme FB1+FB2 mais également la seule FB1 ;

²⁷ FDA. Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Animal Feed, FDA 2001.

- du point de vue analytique, des progrès sont attendus pour le dosage en routine des fumonisines dans les matières premières et produits finis ;
- du point de vue de la surveillance, la conduite des plans devra se poursuivre sur le maïs afin de prendre en compte l'évolution du climat. En effet, la contamination naturelle en fumonisines peut être fréquente selon les années dans le maïs du sud de l'Europe. Par ailleurs, les plans de surveillance devront être étendus au sorgho.

Références bibliographiques (voir document spécifique)

chapitre 6 La patuline

coordinateur : Pierre Galtier et Daniel Thouvenot

Introduction

La patuline a été découverte dans les filtrats de culture d'*Aspergillus clavatus* par Waksman *et al.* (1942). Identifiée pour ses propriétés antibiotiques envers les bactéries Gram+ et Gram -, cette toxine est potentiellement produite par un grand nombre de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Byssoschlamys*. De nos jours, elle suscite l'intérêt en raison de son caractère contaminant naturel de certains fruits et notamment de la pomme et ses produits dérivés. D'autres substrats naturels permettent la toxinogénèse, il s'agit des céréales (blé, riz), des pulpes de betterave ou de la paille.

1 Propriétés physiques et chimiques

La patuline, illustrée en figure 1, est une lactone hétérocyclique insaturée de poids moléculaire 154, et de formule brute $C_7H_6O_4$ répondant à la structure 4-hydroxy-2H-furo[3,2-c]pyrane-2(6H)-one (Woodward et Singh, 1949) (CAS n°149-29-1).

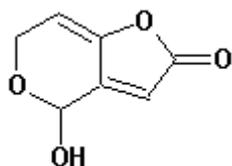


Figure 1 : structure moléculaire de la patuline

Caractérisée par un point de fusion de 111°C et un maximum d'absorption à 275 nm, elle est soluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques, à l'exception du benzène et de l'éther de pétrole. Elle est stable en milieu acide mais perd son activité en milieu alcalin (Windholz, 1983).

2 Méthodes d'analyse (voir principes généraux en Annexe 1)

Le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et les méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en patuline dans les denrées alimentaires.

Les premières méthodes visant à doser la contamination des aliments en patuline se sont adressées au jus de pomme. La première méthode « référence » était celle approuvée en 1974 par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists). La préparation de l'échantillon était alors limitée à une simple extraction liquide-liquide (LLE) de l'échantillon par de l'acétate d'éthyle et une purification sur colonne de silice ; le contenu de l'extrait était alors déterminé par chromatographie sur couche mince (CCM). Après dépôt et migration, la détection de la patuline se trouvait améliorée par pulvérisation de la plaque par le 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH). Depuis 30 ans, les techniques de préparation de l'échantillon et les méthodes de mesure ont considérablement évolué.

La première étape d'extraction de l'échantillon liquide (jus de fruit) reste très communément basée sur l'utilisation de l'acétate d'éthyle (Roach *et al.*, 2002, Sewram *et al.*, 2000, Gokmen et Acar, 1996 et 1999, Durakovic *et al.*, 1993, Gertz et Boschemeyer, 1980). Les procédés d'extraction - purification utilisés ont suivi les améliorations techniques successives qui ont concerné globalement le domaine de l'analyse des contaminants dans les aliments. Les cartouches d'extraction en phase solide (SPE) ont été utilisées dès 1991 avec une grande variabilité concernant les principes de séparation. Les

chromatographies ont utilisé le principe de la phase normale avec des phases stationnaires de type silice pure (Young, 1979, Stray, 1978, Ware, 1975), silice-oxyde de magnésium (florisil : Koch *et al.* 1979), ou encore terre de diatomées (Leuenerger *et al.*, 1978). La séparation des analytes selon le principe de la phase inverse a été généralement appliquée ; les phases stationnaires ont été de type silice greffée octadécylsilyle (Eisele et Gibson, 2003), cyano (Hurst *et al.*, 1987), ou copolymérique de nature styrène - divinylbenzène (Trucksess et Tang, 1999). De manière plus anecdotique, l'utilisation originale de l'exclusion stérique peut être soulignée (Josefsson et Moller, 1977). La dialyse diphasique d'ordinaire peu répandue dans le domaine des résidus dans les aliments s'avère assez utilisée dans ce domaine d'activité (Prieta *et al.*, 1993, Sheu et Shyu, 1999).

Beaucoup d'auteurs ont continué à développer la CCM avec des phases stationnaires de nature diverse et des procédés de révélation originaux et variés ; la plupart des méthodes affichait des limites de détection de l'ordre de 20 à 100 µg/L. Cette technique s'est vue supplantée à la fin des années 1980 par la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette dernière s'est imposée en permettant de diminuer nettement le temps d'analyse, d'augmenter la sensibilité de la mesure, d'améliorer la résolution chromatographique donc la qualité de l'analyse et surtout en séparant la patuline d'une interférence omniprésente et récurrente, le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) (Gokmen et Acar, 1999). Les premières CLHP étaient basées sur une séparation en phase normale alors que les travaux plus récents sont basés pour l'essentiel sur le principe de la phase inverse. Néanmoins, du fait de sa petite taille et de sa forte polarité, la patuline implique l'utilisation de phase mobile faiblement éluotrope (moins de 5-10% d'acétonitrile ou de méthanol). Les modes isocratiques ou gradients ont été indifféremment utilisés. La détection UV est particulièrement bien adaptée à la détection de la patuline puisque cette toxine polaire possède un spectre d'absorption bien fourni. La détection a été assurée à longueur d'onde fixe (selon les auteurs à 254 nm, 273 nm, 276 nm ou 280 nm) ou variable par l'intermédiaire de détecteur à barrettes de diodes.

Pour améliorer la spécificité et la sensibilité de la détection basée sur la spectrométrie enUV, détection basée sur la spectrométrie de masse a été envisagée dès 1986 avec l'utilisation d'une interface thermospray, puis ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et électrospray (ESI) en polarité négative ou positive. Les méthodes les plus performantes utilisent la spectrométrie de masse en tandem, mais sont encore peu appliquées en routine. Selon la technique retenue, les limites de détection pour la CLHP peuvent atteindre de 1 à 10 µg/L dans le jus de pomme. Même si les méthodes se basant sur la CLHP semblent préférées, des approches utilisant la CPG ont été rapportées. Elles impliquent généralement au préalable la dérivation de la patuline étant donné son faible poids moléculaire et son apolarité réduite, même si quelques rares applications relatent l'injection directe de la patuline non dérivée. Deux principales approches de dérivation peuvent être relevées : la silylation avec l'introduction d'un groupe triméthylsilyle (TMS), et l'acylation avec incorporation d'un acétyle (Sheu et Shyu, 1999). L'impact électronique est souvent la méthode d'ionisation de choix. Les analyseurs de masse sont classiquement de simples quadripôles ou des trappes ioniques mais l'utilisation de secteur magnétique avec acquisition haute résolution du signal peut être soulignée ; dans ce dernier cas des sensibilités remarquables sont avancées par les auteurs (jusqu'à 12 ng.L⁻¹). Lorsque la spectrométrie de masse est utilisée en détection, des étalons internes type patuline marquée au deutérium (²H) ou au carbone 13 (¹³C) peuvent être introduits dans la procédure technique et contribuent ainsi à l'amélioration de la qualité de l'analyse (Rychlik et Schieberle, 1999).

La méthode reconnue et validée actuellement disponible est celle publiée en 2002 par l'AOAC (AOAC 2000.02. Determination of Patulin in Clear and Cloudy Apple Juices and Apple Puree by HPLC) et reprise dans la norme CEN prEN 14177 (réf AFNOR V03-123).

3 Facteurs influençant la teneur dans les aliments

3.1 Moisissures toxigènes et contamination naturelle

La patuline est connue sous une grande diversité de noms (expansine, clavacine, claviformine, clavatine, mycoïne C3, pénicidine). La patuline a été extraite de culture de *P. patulum* (aussi nommé *P. griseofulvum*, *P. urticae*, *P. expansum*, *P. glandicola* (aussi nommé *P. granulatum*), *P. vulpinum* (aussi nommé *P. claviforme*), *P. paneum*, *P. carneum*, *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *Byssoschlamys nivea* et de *B. fulva*. Un rapport de Pittet (1998) recense le grand nombre de substrats susceptibles de transmettre la patuline dans l'alimentation humaine et animale.

3.1.1. Fruits

Parmi les espèces fongiques toxigènes, *Penicillium expansum*, contaminant commun des *pomaceae* (pommes, poires) et particulièrement de la pomme, est certainement l'espèce la plus importante du point de vue économique et sanitaire. En effet, ce champignon saprophyte de la pomme est responsable en majeure partie de la contamination des jus de fruits, compotes et autres produits de la transformation des pommes. La production de patuline est favorisée par la blessure des fruits (choc, attaque d'insectes,...). Les productions maximales ont été obtenues, sur la pomme, 13 à 14 jours après inoculation par le *P. expansum*. Bien que la filière "pomme" constitue la source principale de contamination du régime alimentaire de l'homme, bien d'autres denrées alimentaires peuvent être contaminées par la patuline. Outre les *pomaceae*, *P. expansum* est un saprophyte de bien d'autres cultures maraîchères et arboricoles. La patuline a été détectée dans des bananes, pêches, abricots, raisins, jus de raisin et vin, mais en général le taux de patuline demeure bien plus faible comparé à celui observé dans les produits issus de la filière "pomme".

3.1.2 Ensilages

Les ensilages de maïs et d'herbe peuvent être des sources de patuline. Une enquête épidémiologique réalisée en France par Escoula (1977) a montré que 59% de 34 ensilages de maïs testés contenaient de la patuline. Les espèces de *Paecilomyces* étaient responsables de la production de patuline dans les ensilages d'herbe. La présence simultanée d'acide byssochlamique montrait que *Byssochlamys nivea* était l'organisme producteur de patuline dans les ensilages de maïs. Cette moisissure n'est détectée que tardivement après la mise en silo, environ après une durée de six mois de conservation en silo (Le Bars et Escoula, 1974). Elle apparaît fréquemment dans les fronts de coupe des ensilages (Escoula, 1974). Des souches toxigènes de *B. nivea* peuvent également se développer dans les ensilages de pulpes de betteraves (Legrand 2003). *P. granulatum* a été identifié dans les ensilages contaminés avec de la patuline (Escoula, 1977).

3.1.3 Autres substrats végétaux

D'autres ingrédients comme les résidus d'orge maltée peuvent être colonisés par des souches d'*A. clavatus* et de *P. urticae*. La patuline a pu être détectée dans des pailles de céréales contaminées par *A. clavatus*. Les grains de céréales conservés dans de mauvaises conditions peuvent également être des vecteurs de patuline (Forgacs *et al.*, 1954). Enfin, il faut noter que des sous-produits de l'industrie agro-alimentaire comme ceux issus de la transformation des pommes peuvent être contaminés par la patuline. Leur recyclage dans l'alimentation des ruminants constitue donc un risque supplémentaire de contamination.

3.2 Conditions de toxigenèse et voie de biosynthèse

La production de patuline par des *Aspergillus* et *Penicillium* est optimale entre 20 et 25°C sur des milieux contenant des sucres et notamment du glucose. Le maximum de production débute une à deux semaines après la mise en culture de la moisissure. Deux espèces de *Penicillium* proches phylogénétiquement de *Penicillium roqueforti* (*P. paneum*, *P. carneum*) produisent la patuline. En revanche, aucune souche de *P. roqueforti* utilisée dans l'industrie fromagère n'a jamais été trouvée productrice de patuline, aussi bien en conditions de laboratoire qu'en industrie. Des expérimentations ont été réalisées afin d'essayer de faire produire de la patuline sur le fromage par d'autres espèces de *Penicillium* (*P. patulum*, *P. claviforme*, *P. roqueforti*) réputées productrices. Ces expérimentations ont échouées en dépit d'une bonne croissance de ces espèces, probablement en raison de la pauvreté du substrat en sucres, sa richesse en protéines ainsi que son activité en eau (a_w) bien inférieure à l'activité optimale pour la production de la toxine (Puel, 2007).

Concernant la biosynthèse de la patuline, il a été montré que dans des cultures de *P. patulum* (*P. griseofulvum*), la patuline était dérivée de l'acide 6-méthylsalicylique. Dans une étude de cinétique, dans laquelle de l'acétate radiomarqué au carbone 14 avait été incorporé, six précurseurs présumés (acétate, acide 6-méthylsalicylique, m-crésol, m-hydroxybenzylalcool, m-hydroxybenzaldéhyde, et gentisaldéhyde) conduisaient à la synthèse de la patuline. Par contre, le toluquinol et le gentisylalcool, deux autres métabolites secondaires de *P. patulum* n'étaient pas convertis en patuline. Des travaux mettant en œuvre la création de mutants bloqués, ont permis d'identifier d'autres intermédiaires de la voie de biosynthèse de la patuline, tel l'isoépoxydon, la phyllostine, la néopatuline ainsi que l'ascladiol précédemment isolé de culture d'*A. clavatus*. L'ensemble de ces travaux a permis de dresser la voie quasi-complète de la biosynthèse de la patuline. Un seul gène, celui codant pour la première enzyme

de la voie de la biosynthèse de la patuline, l'acide 6-méthylsalicylique synthétase (MSAS) a été identifié, isolé et séquencé chez *P. patulum*. La séquence d'un gène homologue a été déterminée chez *A. terreus* (Puel, 2007).

Chez *Byssochlamys nivea*, la production est optimale 12 jours après le début de la culture en milieu liquide puis elle régresse lentement au cours du mois suivant. Chez cette espèce, la séquence du gène de l'acide 6-méthylsalicylique synthétase (MSAS) a été déterminée (Puel *et al.*, 2007). Toutes les séquences protéiques de l'acide 6-méthylsalicylique synthétase ainsi déterminées présentent de fortes homologues avec les acides gras synthétases de vertébrés. En effet contre toute attente, les acides gras synthétases de champignons (levures et *P. patulum*) ont beaucoup moins d'homologies avec l'acide 6-méthylsalicylique synthétase que leurs homologues des vertébrés. L'acide 6-méthylsalicylique synthétase présente la même organisation structurale et fonctionnelle que l'acide gras synthétase à l'exception de l'absence d'un site thio-estérase.

4. Propriétés toxicologiques

4.1 Toxicocinétique

4.1.1 Devenir *in vivo*

Dailey *et al.* (1977a) ont décrit le devenir d'une dose unique de 3 mg/kg de ¹⁴C-patuline administrée par voie orale chez le rat. Sept jours après administration, 36 et 49 % de la radioactivité étaient éliminés respectivement par l'urine et les fèces, majoritairement dans les 24 premières heures. Seuls 2 à 3 % sont retenus dans le sang et les principaux organes alors que 1 à 2 % sont excrétés sous forme ultime de ¹⁴CO₂.

4.1.2 Absorption

Une étude *in situ* sur modèle d'estomac perfusé de rat a montré que 26 à 29 % de la patuline étaient absorbés en 55 minutes. De cette quantité, 17 et 2 % étaient transférés vers la circulation alors que seulement 3 et 0,06 % se retrouvaient dans le tissu gastrique. La disparition de la plus grande partie de la toxine est attribuée à une réaction avec le glutathion intracellulaire, dont la déplétion est forte lors de l'exposition à la forte dose de patuline (Rychlik *et al.*, 2004).

Utilisant un essai de dilution par isotope stable, Rychlik (2003) a mis en évidence l'absence de patuline sérique (< 200 ng/L) chez 5 consommateurs humains de jus de pomme contenant un taux maximal admissible en toxine. Une étude complémentaire *in vitro* sur le sang humain montre qu'après addition de 100 µg de patuline à 9 ml de sang, seulement 6,1 % de toxine étaient détectés à l'issue de 2 minutes d'incubation. Il est conclu que même de fortes concentrations alimentaires en patuline seraient rapidement transformées avant d'atteindre d'autres tissus que le tractus digestif.

4.1.3 Liaison de la patuline aux protéines

Trois études *in vitro* successives de Fliege et Metzler (1999, 2000a, 2000b) ont permis d'identifier des produits d'addition de la patuline à divers résidus aminés de protéines. D'abord, ces auteurs ont qualifié l'induction par la patuline de liaisons croisées (crosslinks) intra ou intermoléculaires impliquant des chaînes latérales de cystéine, lysine ou histidine et des groupements alpha aminés. Comme la patuline est censée exercer son effet de dommage chromosomique à travers la formation d'adduits covalents à des thiols essentiels intracellulaires, les mêmes auteurs ont identifié 16 adduits à diverses molécules nucléophiles dont le 4-bromothiophénol. Enfin les propriétés électrophiles de la patuline ont été étudiées par la réaction non enzymatique avec le glutathion et son produit de dégradation, la N-acétyl-L-cystéine. Ainsi, trois adduits cycliques se forment avec le glutathion, provenant de l'activité nucléophile des groupements alpha aminés des résidus d'acide glutamique et de cystéine du tripeptide, induite lors de l'interaction avec la patuline.

4.1.4 Interaction avec les protéines de biotransformation

Une étude a été entreprise chez la souris recevant la toxine par voie intrapéritonéale, soit en administration unique (1, 3 ou 4,5 mg/kg p.c.), soit par injection quotidienne de 1 mg/kg p.c. pendant 5 ou 14 jours (Siraj *et al.*, 1980). Si l'administration chronique ne conduit à aucune variation des activités hépatiques de biotransformation, certaines inductions apparaissent après injection unique. Ainsi, une augmentation de 12 % du cytochrome P450 total est relevée 48 heures après l'administration de 3 ou 4,5 mg/kg p.c. Cette induction est d'ailleurs associée à l'augmentation de certaines activités comme

l'hydroxylation de l'aniline, la déméthylation de l'aminopyrine et de l'éthylmorphine ou de la NADPH-cytochrome C réductase. La patuline ne serait au plus qu'un faible inducteur enzymatique.

Entreprise plus récemment, l'étude de Lewis *et al.* (1999) compare la cytotoxicité de huit mycotoxines sur des cellules recombinantes d'origine humaine exprimant divers cytochromes P450. Des neuf P450 introduits, les P450 1A2 et 3A4 s'avèrent les plus propices à entraîner la formation de métabolites cytotoxiques. La patuline comme la toxine T-2, l'acide cyclopiazonique, la fumonisine B1 ou le déoxynivalénol ne subit pas de dégradation en métabolites cytotoxiques produits par ces P450. Seules les aflatoxines B1, G1 et l'ochratoxine A sont réellement bio-activables par ces hémoprotéines. Considérée sur les cellules témoins non recombinantes, la patuline n'est pas classée parmi les toxines les plus cytotoxiques.

4.2 Toxicité générale

4.2.1 Toxicité aiguë

Mesurée chez les rongeurs, les DL 50 par voie orale se situent entre 29 et 55 mg/kg p.c. chez le rat, la souris ou le hamster. La volaille paraît moins sensible avec une DL50 de 170 mg/kg p.c. chez le coq. Administrée par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée, la patuline s'avère 3 à 6 fois plus toxique pour les mêmes espèces. Chez tous les animaux, les signes toxiques correspondent à une neurotoxicité (agitation, convulsions) associée à une congestion pulmonaire avec ulcération et inflammation intestinales.

Certains composés modulent ces propriétés, ainsi les inhibiteurs de cytochrome P450 comme le SKF 525A augmentent fortement la toxicité de la patuline alors que les inducteurs (phénobarbital, 3-méthylcholanthrène) ne la modifient pas (Hayes *et al.* 1979). En revanche, la cystéine associée à la patuline parvient à annuler ses effets toxiques (Ciegler *et al.*, 1976).

4.2.2 Toxicité subaiguë

Essentiellement étudiée chez le rat, l'administration orale à court terme de patuline conduit à une perte pondérale, des altérations gastriques et intestinales avec perturbation de la fonction rénale. Une répétition de dose conduit à des signes de neurotoxicité (tremblements, convulsions) et à une inhibition caractérisée d'enzymes (ATPase) dans l'intestin et le cerveau avec des conséquences notamment en terme de métabolisme des lipides (Devaraj et Devaraj, 1987).

Des tableaux cliniques comparables ont été décrits chez la souris, le hamster ou le poulet. Chez le singe, aucun signe de toxicité n'a été observé après des traitements quotidiens par 0,005 ; 0,05 ou 0,5 mg/kg p.c./j. pendant 4 semaines. Seule l'administration orale de 5 mg/kg p.c./j. entraîne un refus alimentaire au cours des trois derniers jours d'exposition (Garza *et al.*, 1977).

Selmanoglu et Kockaya (2004) ont mesuré diverses activités hormonales thyroïdiennes et testiculaires chez le rat recevant la patuline par voie orale à raison de 0,1 mg/kg p.c./j. pendant 60 ou 90 jours. Un traitement de 60 jours provoque une augmentation du niveau sérique en testostérone (66%) et une diminution du taux en hormone T4²⁸ (17%) alors qu'il n'apparaît aucun changement pour les T3²⁹, TSH³⁰, LH³¹ et GH³². Quand le traitement est appliqué pendant 90 jours, des augmentations en testostérone (75%) et en LH (146%) sont observées sans autre perturbation clinique. L'examen histologique des testicules montre un œdème, une fibrose, une hyperplasie des cellules de Leydig et une désorganisation de l'épithélium des tubules séminifères. Au niveau de la thyroïde, on enregistre une infiltration des cellules lymphoïdes et un élargissement du tissu interstitiel interfolliculaire.

Hors de cette dernière étude, la patuline est reconnue pour ne provoquer que des désordres gastro-intestinaux avec ulcérations, distension et hémorragies, voire des perturbations de la fonction rénale, à plus forte dose. Le tableau 1 résume les études de toxicité chronique de la patuline.

²⁸ T4 : [Tétra-iodothyronine](#)

²⁹ T3 : [Triiodothyronine](#)

³⁰ TSH : Hormone thyroïdostimulante

³¹ LH : Hormone Lutéinisante

³² GH : Hormone de croissance

Tableau 1 : Etudes de toxicité de la patuline après administration répétée par voie orale

espèce	Dose	rythme	durée	observations	auteurs
souris	24/36 mg/kg pc	1 ou 2 jours	14 j	désordres intestinaux	Mc Kinley et Carlton (1980a)
rat	28/41 mg/kg pc	1 ou 2 jours	14 j	désordres intestinaux	Mc Kinley et al (1982)
rat	25 à 295 mg/L dans l'eau de boisson	quotidien	28 j	Réduction pondérale Réduction CI créatinine Ulcères gastriques à fortes doses NOEL = 25 mg/L eau de boisson = 3,3 mg/kg	Speijers <i>et al</i> (1985)
rat	0,1mg/kg pc	quotidien	30 j	réduction lipides réduction triglycérides augmentation cholestérol inhibition ATPase intestinale	Devaraj et Devaraj (1987)
rat	6 à 150 mg/L dans l'eau de boisson	quotidien	13 s	réduction alimentaire réduction pondérale à forte dose perturbation fonction rénale à dose moyenne NOAEL = 6 mg/L eau boisson = 0,8 mg/kg/j	Speijers <i>et al</i> (1986)
rat	0,1 mg/kg pc	quotidien	90 j	augmentation testostérone et LH sériques atteinte testiculaire et thyroïdienne	Selmanoglu et Kockaya (2004)
rat	1 mg/kg puis 2,5 mg/kg pc	3 jours	4 s 70 s	pas effet sur le poids absence de tumeurs	Osswald <i>et al</i> (1978)
rat	0,1/ 0,5/ 1,5 mg/kg pc	2 jours	104 s	mortalité à forte dose réduction pondérale aux doses moyenne et forte absence de tumeurs NOEL = 0,1 mg/kg (sur 2 jours)	Becci <i>et al</i> (1981)
hamster	16/24 mg/kg pc	1 ou 2 jours	14 j	désordres intestinaux	Mc Kinley et Carlton (1980b)
poulet	100 µg	2 jours	30 j	désordres intestinaux perturbation fonction rénale inhibition ATPase rénale et intestinale	Devaraj <i>et al</i> (1986)
singe	5/ 50/ 500 µg/kg pc et 500 puis 5 mg/kg pc	quotidien	30 j 45 j	pas de toxicité refus alimentaire à forte dose perturbation fonction rénale à dose moyenne	Garza <i>et al.</i> (1977)

4.3 Génotoxicité

La patuline, tout comme la citrinine ou l'ochratoxine A, ne provoque pas de mutations reverses pour *Salmonella typhimurium* TA102 (Wurgler *et al.*, 1991). Testée parmi d'autres mycotoxines par un test de SOS sur microplaque, la patuline apporte une réponse négative en génotoxicité (Sakai *et al.*, 1992). Une comparaison entre la cytotoxicité et l'activité antitumorale de la patuline et de ses adduits à la cystéine a été conduite sur des cellules murines de leucémie (L1210 et P388). La cystéine réduit de 2 à 4 fois les propriétés antiprolifératives de la patuline par addition sur les positions chimiques responsables de cette activité (Krivobok *et al.*, 1994).

Les effets aneuploïdogènes et clastogènes de la patuline ont été comparés sur cellules V79 en mesurant l'inhibition de l'assemblage des microtubules et l'induction de l'arrêt mitotique et des micronoyaux. La toxine inhibe la polymérisation des microtubules, et se lie de façon covalente aux thiols des microtubules. A des concentrations n'induisant pas de cytotoxicité, l'arrêt de la mitose et la présence de chromatides sœurs témoignent de l'effet aneuploïdogène de la toxine. La patuline est reconnue clastogène car elle induit des micronoyaux contenant des fragments non centrés reconnus par coloration de CREST (Pfeiffer *et al.*, 1998).

Sur les mêmes cellules V79 et sur lymphocytes humains, Alves *et al.* (2000) ont montré l'induction de dommages à l'ADN par la patuline à travers deux voies différentes, l'induction des micronoyaux (lymphocytes) et l'apparition d'aberrations chromosomiques (V79). Par ailleurs la présence de 80 µM d'acide ascorbique permet d'abolir la clastogénicité de 0,8 µM de patuline.

Trois types cellulaires différents (CHO³³, HEK³⁴ et lymphocytes humains) ont été utilisés pour évaluer les dommages oxydatifs et les risques génotoxiques induits par la patuline (Liu *et al.*, 2003). La toxine provoque une augmentation dose-dépendante de la fréquence des chromatides sœurs en CHO et lymphocytes. Elle accroît aussi le nombre d'altérations de l'ADN en CHO et induit des coupures de l'ADN en HEK au-delà de 15 µM. Ce travail montre aussi que la patuline est clastogène et peut provoquer des dommages oxydatifs sur l'ADN.

4.4 Cancérogénicité

Les rares études de toxicité à long terme de la patuline (Oswald *et al.*, 1978 ; Becci *et al.*, 1981) ont mis en évidence l'absence de tumeurs chez des rats exposés à des doses orales trihebdomadaires de 0,1 à 2,5 mg/kg p.c./j. pendant 74 à 104 semaines.

Concernant le caractère cancérogène de la patuline, cette toxine a été classée par le CIRC (1986) dans le groupe 3, où figurent les produits pour lesquels il est impossible de se prononcer quant à la cancérogénicité pour l'homme.

4.5 Autres effets

4.5.1 Cytotoxicité

La cytotoxicité de la patuline a été mesurée sur des hépatocytes immortalisés de rat en considérant la survenue de divers désordres oxydatifs (Barhoumi *et al.*, 1996). La toxine ajoutée à raison de 1, 2 ou 10 µM pendant 20 minutes engendrait le tableau chronologique de réponses suivant : suppression des communications intercellulaires (« gap junctions ») et déplétion en glutathion intracellulaire / génération de radicaux oxygénés / dépolarisation de la membrane des mitochondries / augmentation du calcium intracellulaire et acidification cytoplasmique / dépolarisation de la membrane cellulaire.

Deux lignées cellulaires épithéliales humaines d'origine intestinale (HT-29 et Caco-2) ont été exposées à des concentrations micromolaires en patuline (Mahfoud *et al.*, 2002). Une diminution rapide et importante de la résistance transépithéliale est enregistrée sans signe apparent de cytotoxicité. Cet effet serait associé à la réactivité de la patuline à l'égard des groupes thiols car la cystéine ou le glutathion préviennent ce désordre, lequel est potentialisé par le sulfoximine de buthionine, un agent de déplétion du glutathion. De plus, cet effet est mimé et potentialisé par l'oxyde de phenylarsine, un inhibiteur spécifique de la protéine tyrosine phosphatase (PTP) dont le site actif contient un résidu cystéine en position 215. En conséquence, il est suggéré que la patuline agit par inactivation de ce site enzymatique dont l'activité est essentielle dans la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.

4.5.2 Embryotoxicité et tératogénèse

Dailey *et al.* (1977b) ont observé *in vivo*, une réduction de la taille des portées de rats soumis à un traitement par la patuline, alors qu'à la deuxième génération il y a diminution du poids des fœtus sans apparition de malformations. Une observation similaire est effectuée par Reddy *et al.* (1978) chez des rats recevant 1,5 mg/kg par voie intrapéritonéale ; la dose de 2 mg/kg provoque l'avortement de tous les embryons.

Chez la souris, une même dose orale provoque la mort de la progéniture avec des hémorragies cérébrales, pulmonaires et cutanées (Oswald *et al.*, 1978). Une plus forte dose orale (3,8 mg/kg/jour pendant 12 jours) ne modifie pas l'implantation embryonnaire et n'entraîne aucune malformation, contrairement à l'intoxication intrapéritonéale qui se traduit par des fentes palatines et des néphropathies (Roll *et al.*, 1990).

³³ Chinese Hamster Ovary

³⁴ Human Embryonic Kidney

Injectée dans la poche d'air de l'œuf de poule, la patuline peut provoquer une embryotoxicité au-delà de 24 µg par œuf, la cystéine co-administrée parvient à limiter cet effet (Ciegler *et al.*, 1976).

L'effet embryotoxique de la patuline a été testé *in vitro* sur des cultures d'embryons de rat à raison de 0 à 62 µM pendant 45 heures d'exposition (Smith *et al.*, 1993). La plus forte concentration s'avère létale au-delà de 40 heures, entraînant une diminution des protéines, de l'ADN et du diamètre du sac vitellin ainsi qu'une augmentation du nombre de résorptions embryonnaires. A de plus faibles concentrations, les anomalies incluent un retard de croissance, une hypoplasie du mésencéphale et du télencéphale ainsi qu'une hyperplasie des processus mandibulaires.

4.5.3 Immunotoxicité

De nombreuses études *in vitro* démontrent que la patuline inhibe de multiples fonctions des macrophages. Ainsi, Sorenson *et al.* (1986) ont montré que la synthèse des protéines était inhibée dans des macrophages alvéolaires de rat exposés *in vitro* et que la fonction membranaire était aussi altérée par la patuline. Dans les mêmes cellules de souris, il a été prouvé que la toxine diminuait significativement la production de radicaux oxygénés (O²⁻), la fusion phagosome-lysosome et l'activité des lysosomes (Bourdiol *et al.*, 1990).

Plus récemment, comparée à la citrinine et à la gliotoxine, la patuline ne parvenait à inhiber que très modérément l'expression de l'interféron γ ou de l'interleukine 4 par les macrophages humains (Wichmann *et al.*, 2002). Par ailleurs, Marin *et al.* (1996) utilisant des cellules EL-4 de thymome ont montré le caractère suppresseur de la patuline sur la production des interleukines 2 et 5, à partir de concentrations de 500 ng/ml, ces effets intervenant toutefois pour des doses bien plus fortes que pour la toxine T-2 testée dans le même essai.

Des études *in vivo* chez la souris montrent des effets variés sur le système immunitaire. Ces effets incluent une augmentation des lymphocytes T d'origine splénique associée à une diminution des immunoglobulines sériques (Escoula *et al.*, 1988b), une atténuation des réponses d'hypersensibilité (Paucod *et al.*, 1990) ou une augmentation des neutrophiles avec résistance accrue à l'infection par *Candida albicans* passant d'un taux de mortalité de 80 % chez les témoins à 50 % chez les traités (Escoula *et al.*, 1988a).

Une étude à moyen terme sur la même espèce (0,08 à 2,56 mg de patuline /kg p.c./j. administrée pendant 28 jours par voie orale) montre une diminution des leucocytes et notamment des lymphocytes du sang périphérique (à 1,28 et 2,56 mg/kg p.c./j.), une augmentation des monocytes et des cellules NK³⁵ spléniques (dès 0,08 mg/kg p.c./j.), une augmentation des lymphocytes T cytotoxiques (à 2,56 mg/kg p.c./j.) avec altération des taux en immunoglobulines et en CD3+, CD4+ CD8- et en CD4-CD8+ dans la rate. Toutefois, ces variations n'ont pas de conséquences fonctionnelles et il n'y a pas de changement significatif dans la fonction immune des souris traitées par la patuline pour des paramètres comme la réponse des anticorps aux globules rouges de mouton (SRBC) ou la fonction cellulaire dite « natural killer ». Les auteurs concluent que la patuline n'altère pas la réponse immunitaire à des niveaux correspondant à l'exposition alimentaire humaine possible (Llewellyn *et al.*, 1998).

Chez le rat comme chez le lapin, la patuline supprime l'explosion oxydative habituellement décrite dans les macrophages péritonéaux (Escoula *et al.*, 1988b) alors que l'augmentation des neutrophiles serait attribuée par Mc Kinley *et al.* (1982) à l'inflammation gastro-intestinale provoquée par la mycotoxine.

4.5.4 L'usage thérapeutique de la patuline

Les propriétés antibiotiques de la patuline ont entraîné son introduction en thérapeutique vétérinaire et humaine. Elle fut ainsi utilisée avec succès dans la brucellose bovine (Rossi et Bruyère, 1950) et contre les agents des rhumes et bronchites mais sa neurotoxicité l'a fait abandonner chez l'homme, en dépit de quelques succès dans le traitement local de plaies infectées et pour la cicatrisation des blessures de la cornée (Dulong, 1952).

³⁵ Natural Killer

4.6 Valeurs toxicologiques de références

En 1990, le JECFA³⁶ a déterminé une dose journalière tolérable provisoire (DJTP) de 7 µg/kg p.c./j, fondée sur une dose sans effet de 0,1 mg/kg p.c./j obtenue dans une étude chez le rat (Becci *et al.*, 1981) qui visait à évaluer les effets sur la reproduction, la toxicité à long terme et la cancérogénicité, ainsi que dans les conclusions du CIRC en 1986. La dose de patuline a été administrée 3 fois par semaine pendant 2 ans. Les effets observés consistaient en une diminution pondérale des rats mâles et une mortalité par inflammation pulmonaire et laryngotrachéale accrue chez les animaux des deux sexes exposés à 1,5 mg/kg p.c./j.

En 1995, aucune nouvelle étude pertinente à long terme n'étant disponible, le JECFA a reconsidéré cette DJTP et a fixé une dose journalière maximale tolérable provisoire (DMJTP) de 0,4 µg/kg p.c./j. Cette DMJTP a été fixée en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet de 43 µg/kg p.c./j recalculée à partir de l'étude chez le rat. En 2000, le Comité scientifique européen de l'alimentation humaine a confirmé cette valeur, aucune nouvelle étude à long terme ayant été réalisée.

Enfin, étant donné le caractère récent et inédit de l'étude de Selmanoglu et Kockaya (2004) décrivant des perturbations endocriniennes chez des rats recevant de faibles doses de patuline, ces résultats devront être confirmés sur le long terme car ils pourraient constituer la base d'une réévaluation des doses de référence de la patuline.

5 Exposition de la population française

Une étude de la ration alimentaire totale (EAT) a été entreprise en 2000, afin de connaître le niveau de consommation et d'exposition de la population générale française et de la population végétarienne à la patuline à partir d'aliments "prêts à consommer" (Leblanc *et al.*, 2005). La patuline a été analysée dans 20 échantillons de pâtisseries aux pommes, de pommes fraîches, de compotes, de jus de pomme et de cidres. Les résultats montrent que plus de 80% des produits analysés présentent des niveaux de contamination en patuline inférieurs à la limite de détection.

L'exposition moyenne et des forts consommateurs (95^{ème} percentile) adultes et enfants de la population générale a été estimée ainsi que celle la population végétarienne (tableau 2).

Tableau 2 : Estimation des apports alimentaires moyens et des forts consommateurs (p95) pour différents types de population en patuline issus de l'EAT

Type de population		Apport moyen (µg/kg p.c./j)	Apport au P95 (µg/kg p.c./j)	% de la DJTP fixée par le SCF ¹	% d'individus pouvant dépasser la DJMTP
Population générale	Adultes (15 ans et +)	0,018	0,057	14	0
	Enfants (3-14 ans)	0,030	0,106	26	0
Population végétarienne (15 ans et +)	Ovolactovégétariens	0,044	0,100	25	0
	Lactovégétariens	0,050	0,120	30	0
	Végétaliens	0,034	0,090	22	0

¹ Le JECFA a fixé une DJMTP de 0,4 µg/kg p.c./j

A titre de comparaison, les données de contamination utilisée dans la Tâche scoop européenne³⁷ réalisée en 2002 (tableau 3) pour la population française conduisent à des niveaux d'exposition plus faibles que ceux observés dans l'étude de l'alimentation totale (EAT). Les différences observées peuvent s'expliquer par des limites de détection élevées et la prise en compte dans l'étude EAT de produits à base de pomme (pâtisseries, fruits frais). Cependant, ces niveaux sont du même ordre de

³⁶ JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

³⁷ Scoop report 3.2.8 (2002). Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States

grandeur lorsque l'on considère l'estimation de l'exposition pour l'ensemble de la population de l'Union européenne.

Tableau 3 : Exposition alimentaire de la population française et de l'Union européenne (UE) à la patuline ($\mu\text{g}/\text{kg p.c./j}$) issue des données de la tâche Scoop

Type de population		Exposition de la population française ($\mu\text{g}/\text{kg p.c./j}$)		Exposition de la population de l'UE ($\mu\text{g}/\text{kg p.c./j}$)	
		Moyenne	p95	Moyenne	p95
Population	Adultes	0,001	0,006	0,003	0,022
	Enfants	0,005	0,023	0,028	0,093
Seuls consommateurs	Adultes	0,005	0,014	0,021	0,057
	Enfants	0,013	0,049	0,064	0,199

Les aliments contributeurs à l'exposition de la population française à la patuline sont le jus de pomme, le cidre et les compotes. La population française semble moins exposée que l'ensemble de la population européenne, notamment l'Italie, où la population est la plus exposée.

6. Exposition animale à la patuline

6.1 Effets sur la santé animale et transfert dans les produits animaux

Les données disponibles ne concernent que les ruminants

Accidents rapportés chez les ruminants

Comme déjà mentionné, de nombreuses moisissures produisant de la patuline ont été isolées de l'alimentation des ruminants et notamment des ensilages. D'ailleurs, des accidents à symptomatologie nerveuse ont été observés chez des ruminants qui recevaient des aliments contaminés et attribués à la présence de patuline (Moreau et Moreau, 1960), notamment la mort de vaches recevant de l'orge maltée ou de l'ensilage (Ciegler, 1977). Si des syndromes hémorragiques ont été aussi rapportés chez des bovins nourris avec des ensilages de mauvaise qualité contenant de la patuline, les manifestations toxiques ont été plutôt rares chez les ruminants alors que la présence de moisissures productrices de patuline dans les ensilages est fréquente.

Action et devenir de la patuline dans le rumen

La patuline a été initialement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques et antimicrobiennes à l'égard de nombreux microorganismes (Madhyastha *et al.*, 1994), mais sa toxicité a limité son développement médical ou vétérinaire. Elle inhibe la croissance à la fois des bactéries gram positif et gram négatif, ainsi que celle des protozoaires. *Bacillus brevis* semble particulièrement sensible à l'action antibiotique de la patuline (Wouters et Speijers, 2003). La patuline possède également une action cytotoxique à l'égard des protozoaires libres comme *Tetrahymena pyriformis* ($\text{ID}_{50} = 0,32 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Nishie *et al.*, 1989). Bien qu'aucune étude spécifique n'ait été réalisée sur des microorganismes isolés du rumen, sa présence dans les aliments consommés par le ruminant est susceptible d'avoir un effet négatif sur l'écosystème microbien ruminal. Plusieurs expérimentations ont été conduites *in vitro* pour mesurer l'effet de la patuline sur la digestion et la production de métabolites fermentaires dans le rumen. Escoula (1992) a montré que la patuline avait un effet négatif sur la production d'acides gras volatils, d'acétate en particulier, et sur la synthèse de protéines microbiennes mesurée avec des doses variant de 20 à 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tapia *et al.* (2002) ont fait un bilan des effets de la patuline dans le rumen grâce à l'utilisation de rumens artificiels à flux continu qui sont censés reproduire assez fidèlement les processus fermentaires *in vivo*. Les auteurs ont montré que la digestion d'une ration mixte composée de foin de luzerne (38%), d'ensilage de maïs (28%), de maïs grain (27%), de tourteau de soja (5%) et d'un mélange minéral, était diminuée de 27 à 43% lorsque la concentration de patuline dans la ration passait de 30 à 90 mg/kg . La réduction de la production d'acides gras volatils n'était significative ($p < 0,05$) qu'à la dose de 90 mg/kg . Parmi les acides, seule la production d'acétate était diminuée alors que celles du butyrate et du valérate étaient augmentées. Les flux d'azote microbien ont été plus

faibles dans les fermenteurs recevant la patuline, indépendamment de la dose, alors que l'efficacité de la synthèse microbienne (g d'azote microbien/kg de matière organique fermentée) n'a été diminuée significativement ($p < 0,05$) qu'à la dose de 90 µg/kg.

Morgavi *et al.* (2003) ont montré que la dégradation du foin de luzerne était diminuée significativement dès la dose de 25 µg/ml de patuline dans des fermenteurs de type « batch ». Cet effet a augmenté régulièrement jusqu'à la dose de 50 µg/ml et s'est stabilisé ensuite jusqu'à la dose de 100 µg/ml. Les auteurs ont indiqué que la production d'acides et de gaz diminuait régulièrement lorsque la dose de patuline augmentait. Au niveau des acides synthétisés au cours des fermentations, ils ont confirmé que l'effet négatif de la patuline se manifestait principalement sur l'acétate, ce qui confirme l'effet négatif sur la cellulolyse ruminale révélé au cours de la digestion de la luzerne.

Voie d'élimination de la patuline chez le ruminant : transfert dans le lait

La patuline est une molécule polaire de petite taille qui est de ce fait rapidement absorbée et métabolisée. Elle est donc prioritairement excrétée dans l'urine (voir § « toxicocinétique »). Ces caractéristiques montrent qu'elle ne devrait pas être stockée dans les structures cellulaires lipophiles, et que son excrétion dans le lait devrait être réduite. Aucune étude démontre la présence de patuline ou de ses métabolites dans le lait.

Par ailleurs, la toxicité chronique de la patuline chez les ruminants n'est pas connue. Les intoxications aiguës qui ont été décrites chez la vache laitière sous forme de manifestations nerveuses ou de syndromes hémorragiques sont rares.

Procédés limitant les effets de la patuline dans le rumen

La patuline est une molécule électrophile qui exerce ses effets délétères en se liant par covalence aux groupements sulfhydryles –SH des protéines et du glutathion (Ciegler, 1977 ; Riley et Showker, 1991). Cette affinité au groupement –SH peut être utilisée pour détoxifier la patuline (Lindroth et von Wright, 1990). D'autres agents réducteurs comme l'acide ascorbique ont pu inactiver la patuline (Fremy *et al.*, 1995 ; Brackett et Marth, 1979).

Morgavi *et al.* (2003) ont testé l'effet détoxifiant de plusieurs agents réducteurs dans leur système *in vitro*. Seuls les composés ayant un groupement thiol actif, comme la cystéine ou le glutathion, ont pu détoxifier la patuline dans le rumen. Le glutathion à la concentration de 4 mM a totalement éliminé les effets négatifs de la patuline utilisée à la concentration de 50 µg/ml. La cystéine a été moins efficace puisqu'à 4 mM elle n'a pas permis de retrouver totalement la production initiale d'acides gras volatils. La cystine, qui est un dimère de la cystéine fréquemment rencontré dans les cellules vivantes, n'a eu aucun effet protecteur à l'égard de la patuline. D'autres agents réducteurs comme l'acide ascorbique ou l'acide férulique qui sont présents dans les aliments du ruminant, n'ont pas permis de protéger la population microbienne ruminale contre la patuline. En conclusion, les auteurs recommandent d'ajouter de la cystéine, qui est un acide aminé non essentiel, à la ration des ruminants pour les préserver d'une action délétère de la patuline.

6.2 Calcul de l'exposition des espèces animales

Il n'existe pas de données pouvant permettre de calculer l'exposition animale à la patuline.

7 Réglementation

Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'homme, des teneurs maximales ont été fixées pour la patuline.

Les teneurs maximales dans les produits sont de :

- 50 µg/kg pour les jus de fruits (y compris ceux reconstitués à base de concentrés), les nectars de fruits, les spiritueux et les cidres et autres boissons produites à base de jus de pommes et pommes,
- 25 µg/kg pour les produits solides à base de pommes (compotes, purées),
- 10 µg/kg pour les jus et produits à base de morceaux de pomme et

- 10 µg/kg pour les aliments (autres que ceux préparés à base de céréales) destinés au nourrisson et à l'enfant en bas âge.

8 Surveillance et contrôle

Des plans de surveillance et de contrôle sont réalisés chaque année par les services de l'Etat (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes-DGCCRF-) pour rechercher la patuline dans les aliments destinés à la consommation humaine, y compris les aliments pour nourrissons et enfants en bas-âge. Dans les cas de non-conformité, les actions correctives sont entreprises telles qu'interdiction de mise sur le marché, retrait du marché et saisie. Bien que les denrées prélevées au sein des catégories d'aliments réglementées soient de nature et d'origine variables selon les années, il peut néanmoins être dégagé les grandes tendances de conformité suivantes :

Les résultats révèlent que les contaminations en patuline des jus de pomme, des cidres et apéritifs à base de pomme sont inférieures mais souvent proches de la limite réglementaire avec 6 à 15% de non conformité selon les années et les produits.

Concernant les compotes de pomme pour adultes et enfants en bas-âge, ainsi que les jus de pomme destinés aux enfants en bas-âge, la teneur en patuline n'a pas pu être quantifiée dans plus de 85% des 56 échantillons (LOQ = 5 µg/kg) et sont tous conformes à la réglementation.

9 Conclusion et recommandations

La patuline est une mycotoxine susceptible d'être retrouvée à l'état de contaminant naturel d'un grand nombre d'aliments d'origine végétale notamment issus des fruits et particulièrement la pomme. A ce titre, la patuline fait l'objet d'une réglementation drastique pour tous les aliments de cette filière et spécifiquement pour les jus et compotes de pomme destinés aux enfants et aux personnes âgées. Néanmoins, de grandes incertitudes existent quant au devenir de cette mycotoxine dont le suivi analytique est difficile dans les matrices biologiques. En effet, la liaison avec les groupements thiols des peptides et des protéines interdit toute détection ultérieure de la toxine, de métabolites ou de ses composés d'addition.

Les études entreprises concernant la toxicité chronique de la patuline, peu nombreuses et relativement anciennes, ont surtout démontré, à doses moyennes, des désordres intestinaux et des perturbations de la fonction rénale. Les symptômes nerveux suspectés d'être associés lors d'accidents d'élevage ne sont pas rapportés dans les études expérimentales. Ces mêmes études ne n'ont jamais révélé un pouvoir cancérigène *in vivo* chez l'animal. C'est la raison pour laquelle cette toxine a été classée par le CIRC (1986) dans le groupe 3 des produits pour lesquels il est impossible de se prononcer quant à la cancérogénicité pour l'homme.

Néanmoins, une étude récente de toxicité subaiguë entreprise chez le rat exposé à la patuline durant 90 jours, rapporte des perturbations des hormones stéroïdes circulantes corrélées à des atteintes testiculaire et thyroïdienne. Cette information mériterait confirmation en raison du souci actuel des toxicologues à statuer sur le caractère perturbateur endocrinien de tout constituant ou contaminant alimentaire.

L'exposition alimentaire de l'homme reste très inférieure pour les enfants comme pour les populations végétariennes à la dose journalière maximale tolérable provisoire fixée en 1995 par le JECFA à 0,4 µg/kg p.c./j. La réglementation en vigueur pour la présence de patuline dans les aliments dérivés de la pomme peut apparaître comme particulièrement protectrice au regard des niveaux d'exposition observés. Néanmoins les plans de contrôle de la réglementation sont à maintenir.

L'exposition alimentaire des animaux d'élevage est envisageable chez les ruminants par la consommation des ensilages ou des écarts de tri de pommes. Toutefois, le danger réel chez l'animal demeure mal évalué, compte tenu de la méconnaissance de la toxicité et du devenir de cette toxine. Il serait souhaitable de mettre en place un plan de surveillance sur les aliments conservés par voie acide (ensilages de fourrages ou de grains, fourrages enrubannés).

Références bibliographiques (voir document spécifique)

chapitre 7 Les autres mycotoxines

coordination : Philippe Guerre et Virginie Hossen

Il existe plusieurs mycotoxines qui, sans être largement répandues, présentent une importance pour les populations humaines et animales. Le tableau 1 illustre ces mycotoxines ainsi que les moisissures qui les produisent.

Tableau 1 : Mycotoxines et moisissures productrices associées ayant des impacts ponctuels sur la santé humaine et la santé animale

	Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Mycotoxines pouvant être retrouvées dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux	Toxines de <i>Claviceps</i> (dit ergot de seigle)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. fusiformis</i>
	Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
	Toxines d' <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i>
	Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> <i>Penicillium</i> dont <i>P. camembertii</i> et <i>P. cyclopium</i>
	Toxines trémorgènes produites par <i>Penicillium</i> et <i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberrelum</i> <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>
Mycotoxines principalement retrouvées en alimentation animale	Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
	Toxines de <i>Stachybotrys</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>
	Toxines d'endophytes	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>
	Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>

Le tableau 2 illustre les mycotoxicoses animales (le nom des maladies que ces mycotoxines entraînent), les substrats les plus fréquemment vecteurs dans ces affections et le(s) pays qui est (sont) le(s) plus sévèrement touché(s) par la maladie.

Tableau 2 : Mycotoxicoses animales, substrats et pays touchés et mycotoxines responsables

Mycotoxicoses observée chez l'animal	Mycotoxines	Substrats les plus fréquemment contaminés	Pays le(s) plus fréquemment touché(s)
Ergotisme	Alcaloïdes (clavines, ergotamine...)	Céréales Graminées	Etats Unis , Afrique du Sud, Nouvelle Zélande, Australie, Europe
Eczéma facial des ruminants	Sporidesmines	Fourrages en fin de cycle (Dactyle, Ray Grass, et parfois Trèfle blanc) et débris végétaux au ras des pâtures	Nouvelle Zélande, Afrique du Sud, Australie, France
Stachybotryotoxose	Stachybotryotoxines (trichothécènes macrocycliques)	Foins, pailles et ensilages mal stockés	Pays d'Europe de l'Est (Hongrie surtout)
« Fescue foot disease » = Boiteries lors de consommation de fétuque	Alcaloïdes (ergovaline)	Graminées fourragères du genre fétuque (<i>Festuca arundinacea</i>)	Nouvelle Zélande, États Unis
« Rye-grass stagger disease » = tremblements lors consommation de Ray-Grass	Alcaloïdes (lolitrème B)	Graminées fourragères du genre Ray Grass anglais (<i>Lolium perenne</i>)	Nouvelle Zélande, États Unis
Lupinose	Phomopsines	Plantes fourragères de la famille des lupins (<i>Lupinus spp.</i>)	Australie

Des cas de maladies résultant de l'ingestion de ces mycotoxines ont déjà été rapportés en France, à l'exception de la lupinose. Ces intoxications sont donc à connaître dans notre pays, même si elles sont considérées comme exceptionnelles. Ce caractère exceptionnel est sans doute une des raisons pour lesquelles peu de données sont disponibles sur la prévalence naturelle de ces mycotoxines et la contamination des substrats incriminés.

1. Les toxines de *Claviceps*

La « maladie de l'ergot » ou « ergotisme », est plus spécifiquement lié à l'ingestion d'ergot du seigle (*C. purpurea*). Celui-ci est connu pour être responsable des « feux de Saint Antoine » ou « mal des ardents » observés chez l'Homme surtout du 8^{ème} au 16^{ème} siècle en Europe où cette affection provoqua la mort de centaines de milliers de personnes. Les temps ont changé ensuite et les animaux sont aujourd'hui les principales victimes de l'ergot. Les symptômes mais aussi les impacts de cette affection sont variables selon l'espèce de *Claviceps* contaminant la denrée consommée. Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont : *Claviceps purpurea*, *Claviceps paspali* et *Claviceps africana*.

1.1. Présentation et biologie

Le genre *Claviceps* attaque les inflorescences ou épis de la plupart des graminées et forme des sclérotés ou ergots (Cole *et al.*, 1977). Ces derniers sont des amas mycéliens durs, dont les formes, dimensions et couleurs varient selon les espèces et les graminées atteintes. Ils remplacent la graine et contiennent des alcaloïdes, toxines responsables des maladies observées aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (EHC 105).

Dans les régions tempérées comme la France, c'est l'espèce *Claviceps purpurea* qui est la plus souvent rencontrée et contamine les graminées céréalières : seigle principalement mais aussi blé, orge et avoine et de nombreuses espèces de graminées fourragères et gazons cultivés en France (ray-grass, féтуque, dactyle, fléole...). Les sclérotés de cette espèce sont allongés, noirs à l'extérieur, blancs violacés à l'intérieur. Dans certaines céréales, la taille des sclérotés peut être jusqu'à 10 fois plus grande que celle des grains qu'ils remplacent: ils sont facilement repérables dans le grain non nettoyé. Au contraire dans les graminées fourragères, les sclérotés restent petits et élancés.

Claviceps paspali possède la même biologie que *C. purpurea* mais ne contamine que les graminées du genre *Paspalum*. Ses sclérotés diffèrent de ceux de *C. purpurea* ; ils sont globuleux, de petite taille et de teinte beige clair ou rosée. Il pose problème dans les régions chaudes des Etats-Unis, d'Afrique du Sud, de Nouvelle Zélande et d'Australie où des cas apparaissent fréquemment mais de façon sporadique. Il a été signalé pour la première fois en Europe, en Italie, au Portugal et en Yougoslavie dans les années 1950. En France un cas a été rapporté, en 1991, en Camargue (Raynal, 1992). Enfin, et depuis les années 1990, la contamination du sorgho par *C. africana*, s'observe dans tous les pays où cette céréale est cultivée. En 1997, *C. africana* a été identifié en Afrique mais aussi, en Asie du Sud en Australie, au Mexique et aux Etats-Unis alors qu'on pensait que sa prévalence était uniquement africaine.

1.2. Facteurs favorisant le développement

Il s'agit surtout des conditions climatiques. La formation d'ergot est favorisée par des températures voisines de 20 °C et par une humidité relative de 100% (Lorenz, 1979). Les printemps frais et humides favorisent la germination des sclérotés (Duval, 1994).

Les conditions agronomiques, comme un faible apport d'engrais, peuvent retarder la maturité des cultures et contribuer à la formation de fleurs plus ouvertes, donc plus vulnérables à l'infection (Pearse, 2006).

1.3. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse

L'ergoline, molécule tétracyclique illustrée en figure 1, constitue la structure de base de tous les alcaloïdes de l'ergot. La quantité d'alcaloïdes contenue dans une sclérote varie de 0,01 à 0,5 % (Lorenz, 1979).

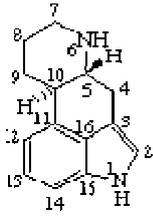


Figure 1 : Structure chimique de l'ergoline

Plus de 40 alcaloïdes ont été isolés des sclérotés de *Claviceps*. Ils peuvent être divisés en trois classes (Lorenz, 1979):

- les clavines
- les ergopeptides (ergotamine par exemple, synthétisée également par les endophytes), qui sont des dérivés de l'acide lysergique
- les dérivés de l'acide isolysergique (ergotaminine par exemple).

C. africana produit majoritairement des alcaloïdes de la classe des clavines et de la dihydroergosine (Bailey *et al.*, 1999). *C. purpurea* synthétise majoritairement des ergopeptides tels que l'ergotamine et l'ergocristine. Enfin, *C. paspali* synthétise des clavines mais aussi des toxines trémorgènes de la classe des indoles diterpénoïdes (CAST, 2003). Il s'agit de la paspalinine et des paspalitrèmes A et B (Lacey *et al.*, 1991).

La plupart des alcaloïdes de l'ergot forme des cristaux incolores solubles dans de nombreux solvants organiques, et très peu solubles voire insolubles en solution aqueuse. Ces alcaloïdes sont très instables aux UV et à la chaleur. Leur toxicité diminue au cours de stockage prolongé. Ils sont extrêmement sensibles à l'oxydation photolytique, l'hydratation et l'épimérisation du cycle ergolène en position C₈, qui peut se produire aussi bien en conditions acides que basiques (Komarova *et al.*, 2001).

Bien que la réglementation soit uniquement fondée sur la quantité relative de sclérotés dans un prélèvement de grains (qui peut être évaluée par triage manuel ou par flottaison en solution saline), c'est la nature et la quantité en alcaloïdes qui lui confère sa toxicité (Bailey *et al.*, 1999) or la quantité totale d'alcaloïdes n'est pas proportionnelle au nombre de sclérotés.

Il existe de nombreuses procédures d'extraction, isolement et identification des alcaloïdes d'ergot de *Claviceps* (Porter *et al.*, 1995). Les techniques analytiques usuelles telles que la CCM³⁸, l'HPLC³⁹ ou la GC/MS⁴⁰ ont été mises en œuvre après extraction des alcaloïdes par des solvants organiques tels que le benzène (Komarova *et al.*, 2001, Porter, 1995). Des méthodes spécifiques propres à chaque matrice donnée ont été mises en place, notamment pour l'analyse des alcaloïdes de *C. purpurea* dans les céréales, les produits à base de céréales et le lait, mais aussi dans le plasma humain et animal (Mantle, 1996).

Un test ELISA a été développé et permet l'analyse spécifique de la dihydroergosine, alcaloïde caractéristique de la contamination du sorgho par *C. africana* (Molloy *et al.*, 2003).

D'autres méthodes ont également été mises en œuvre ; tel, le bioessai sur cobaye réalisé afin de mettre en évidence la présence de toxines trémorigènes synthétisées aussi par *C. paspali* (Mantle *et al.*, 1977).

1.4. Propriétés toxicologiques

Les alcaloïdes de *C. purpurea* tels que l'ergotamine ou l'ergométrine, provoquent la stimulation des muscles lisses en inhibant les récepteurs α et β adrénergiques. Cela entraîne une vasoconstriction des tissus périphériques. Le flux sanguin chute alors brutalement d'où une gangrène fréquente des extrémités. De plus, les ergopeptides, en agissant comme des agonistes de la dopamine, induisent une diminution du taux de prolactine sérique. Ceci entraîne différents effets (cf chapitre sur la « Rye-

³⁸ Chromatographie sur couche mince

³⁹ Chromatographie liquide haute performance

⁴⁰ Chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse

grass stagger disease et la Fescue foot disease), notamment une agalactie et une diminution du gain de poids corporel chez l'animal nouveau-né (Environmental Health Criteria 105, OMS, 1990).

Les alcaloïdes trémorgènes de *C. paspali* se fixeraient au niveau des canaux chlorures des récepteurs GABA_A du système nerveux central, inhibant de ce fait leur fonctionnement (Grant *et al.*, 1998). L'inhibition des canaux chlorures en modifiant le potentiel membranaire rendrait les cellules plus excitables ce qui pourrait expliquer les convulsions observées. Expérimentalement, des tremblements sévères sont observés sur des bovins ayant ingéré 1g d'ergot/kg p.c./j pendant au moins 4 jours (Mantle *et al.*, 1977).

Les trois groupes d'alcaloïdes synthétisés par le genre *Claviceps* entraînent des effets toxiques sur les fonctions de reproduction chez des visons : l'ingestion de 3 mg/kg p.c. provoque un allongement de la durée de gestation et une diminution du taux de prolactine sérique (Sharma *et al.*, 2002). Chez les animaux gestants, certains ergopeptides comme l'ergotamine peuvent également activer la contraction des muscles utérins et provoquer un avortement (Komarova *et al.*, 2001).

Peu d'études ont été menées concernant les effets de la dihydroergosine, principal alcaloïde synthétisé par *C. africana* (>90 % des alcaloïdes totaux). Cette toxine cause des pertes de production significatives dès 1 mg/kg dans l'alimentation animale (Molloy *et al.*, 2003). Sur de jeunes porcs, cette toxine, ingérée durant 28 jours à 9 mg d'alcaloïdes/kg d'aliment (0,6% du poids en ergot), diminue le taux de prolactine sérique (Blaney *et al.*, 2000a). Toutefois, 15 mg/kg p.c./j de dihydroergosine apportés par un régime contenant 50 % d'ergot de *C. africana* ne semblent pas induire d'effets chez la souris (Bandyopadhyay *et al.*, 1998 ; Blaney *et al.*, 2000a,b,c). Il semblerait que les alcaloïdes déshydrogénés soient moins actifs que les alcaloïdes parents (Blaney *et al.*, 2000a,b,c). Les différences d'effets observés expérimentalement et sur le terrain pourraient donc être liées à une différence de métabolisme entre les monogastriques et les ruminants.

Enfin, l'agroclavine, synthétisée par *C. paspali* et dans une moindre mesure par *C. africana*, augmente l'activité NK (Natural Killer) lors de tests *in vitro* mais aussi *in vivo* sur souris. Ceci suggère un effet immunomodulateur de cette toxine (Starec *et al.*, 2001). Cet effet pourrait être lié à l'action dopaminergique de l'agroclavine puisque l'administration d'halopéridol (qui inhibe les récepteurs à la dopamine), provoque une diminution de l'activité NK.

1.5 Ergot et effet sur la santé humaine

La « maladie de l'ergot » ou « ergotisme », est connue pour être responsable des « feux de Saint Antoine » ou « mal des ardents » observés chez l'Homme depuis le Moyen Age en Europe où cette affection provoqua la mort de centaines de milliers de personnes du 8^{ème} au 16^{ème} siècle. Mais c'est depuis le XIX^e siècle qu'une relation a été faite entre cette « maladie » et l'ingestion de sclérotés produits par le genre *Claviceps* contenant des mycotoxines de type alcaloïdes pour en faire une mycotoxicose aiguë et depuis le XX^e siècle que des alcaloïdes responsables contenus dans l'ergot ont été identifiés.

Les maladies liées à la présence d'ergot apparaissent surtout à l'automne. Les symptômes comprennent un ralentissement de la circulation sanguine, qui provoque l'alternance d'une sensation de grande chaleur et de grand froid, puis de la gangrène aux extrémités du corps. Des convulsions nerveuses se produisent parfois pouvant entraîner la mort.

Même si ce type de mycotoxicoses est devenu rare, des cas d'intoxications aiguës survenus au XX^e siècle sont rapportés : en France un épisode se serait produit en 1951 à Pont Saint-Esprit, dans le Gard, après la consommation de pain, mais qui est resté non confirmé. Les derniers épisodes mentionnés dans la littérature se sont produits :

- D'une part en Ethiopie en 1978 suite à la consommation d'un mélange de céréales contenant 0,75% d'ergot de *C. purpurea*, 93 personnes ont été intoxiquées dont 47 moururent. L'alcaloïde ergométrine fut détectée dans les sclérotés (IPCS, 1990)
- D'autre part dans un village en Inde en 1975 suite à la consommation de millet contenant 1,5-17,4% d'ergot de *C. fusiformis*. Le groupe des alcaloïdes clavines fut détecté dans les sclérotés à une teneur totale de 15-199 mg/kg. Dans un village voisin où la population a consommé du millet contenant 0,1-3,8% d'ergot avec une teneur en même type d'alcaloïdes de 15-26 mg/kg, aucun cas d'intoxication n'a été rapporté (IPCS, 1990).

L'AESA/EFSA, dans son avis d'avril 2005 (EFSA, 2005), indique qu'« aujourd'hui, les données sur les propriétés toxicologiques des alcaloïdes de l'ergot pris individuellement sont trop limitées pour

sélectionner des marqueurs toxiques individuels permettant de surveiller l'étendue de la contamination.

1.6. Ergot et effet sur la santé animale

Selon les espèces animales, l'importance des effets est variable, quelle que soit l'espèce de *Claviceps*. Une diminution de la prise alimentaire associée à une réduction de gain de poids corporel sont les symptômes communs. Les porcins, ovins, bovins et caprins sont les plus exposés mais les volailles, les chevaux, voire les carnivores domestiques peuvent être affectés.

1.6.1 Ergotisme du à *C. purpurea*

On distingue deux formes d'intoxications liées à la consommation d'aliments contaminés par l'ergot de *C. purpurea*. La forme convulsive se caractérise par hyperexcitabilité, titubations, spasmes, tétanies, paralysies, suivis parfois de la mort. Elle s'observe le plus souvent lors d'intoxications aiguës. La forme gangreneuse dont les signes (poil terne, gangrène sèche ou humide) apparaissent d'abord aux extrémités du corps, s'observe lors d'une exposition chronique aux toxines. La vasoconstriction entraîne une nécrose des tissus, extrémités des pattes, oreilles et queue, qui peuvent tomber dans certains cas. Ceci s'observe d'autant plus que la température est basse.

Chez les porcins, dans les cas les plus graves, on rapporte un arrêt de lactation conduisant à une mortalité élevée des porcelets.

Chez les bovins, la lactation est diminuée, une enflure des pieds et une boiterie peuvent être les premiers signes visibles de toxicoses. En outre, les animaux présentent une diarrhée, et une hyper-salivation excessive accompagnée de soif intense.

Chez les ovins, des difficultés respiratoires, une hyper-salivation, des diarrhées voire des saignements digestifs sont rapportés. Le taux de gestation est également diminué.

Chez les volailles, on observe une diminution de la croissance et du taux de ponte ainsi qu'une forte mortalité des poussins. Une gangrène de la crête, de la langue et du bec peut également se produire.

Chez les chevaux, les intoxications sont rares mais souvent aiguës. Les principales manifestations observées sont agalactie et morti-natalité. Deux épisodes ont été décrits au Brésil (Riet-Correa *et al.*, 1988 ; Copetti *et al.*, 2001). Dans l'épisode le plus récent, un groupe d'une douzaine de juments gestantes a consommé un lot d'avoine contaminé par des sclérotés de *C. purpurea* à hauteur de 0,22% en masse des grains présents. Le signe le plus évident fut une absence de préparation de la mamelle suivi d'agalactie. Les juments ont donné naissance à des poulains faibles, dépourvus de réflexe de succion. Les poulains sont décédés en quelques heures.

Même les carnivores domestiques peuvent être concernés. Brosig (1993) rapporte un cas d'ergotisme chez un chat ayant mâché des graminées (Ray grass anglais) contaminées par *C. purpurea*. Ce chat a présenté un syndrome gangreneux (queue, nez). Après euthanasie, l'autopsie a révélé la présence d'un sclérote resté coincé entre les prémolaires.

1.6.2 Ergotisme du à *C. paspali*

Les toxicoses dues à *C. paspali* sont plus fréquentes chez les bovins que chez les ovins et les chevaux (Mantle *et al.*, 1977). Le bétail consommant régulièrement des graminées du genre *Paspalum* infectées est atteint de douleurs abdominales, de diarrhées, se nourrit peu et cesse de produire du lait. Les symptômes gangreneux semblent absents (Raynal, 1992). Les intoxications aiguës induisent des degrés variés de tremblements, d'hyperexcitabilité et d'ataxie. Dans les cas d'intoxications sub-aiguës, des convulsions peuvent entraîner la mort de l'animal, le plus souvent accidentellement (Selala *et al.*, 1991). Il semblerait que les altérations nerveuses soient réversibles en cas d'arrêt d'exposition (Botha, *et al.*, 1996 ; Grant *et al.*, 1998).

1.6.3 Ergotisme du à *C. africana*

L'ergot du sorgho dû à *C. africana* peut avoir des effets variables sur les performances zootechniques des animaux intoxiqués. Aux Etats-Unis, les quantités d'alcaloïdes retrouvées dans le sorgho sont

assez faibles et n'ont jamais entraîné d'effets néfastes sur les animaux consommateurs, contrairement à l'Australie, d'où proviennent les cas décrits ci-après (Stack, 2000).

Chez les porcins et le bétail laitier, la consommation de sorgho contaminé par des ergots de *C. africana* entraîne un refus alimentaire et une agalactie. Ces symptômes s'accompagnent d'une forte diminution de prolactine sérique, dont l'importance est corrélée à la concentration d'alcaloïdes d'ergot dans la ration. Des diarrhées sont également rapportées dans ces deux espèces. Chez les porcins, en ce qui concerne l'agalactie, le niveau de tolérance semble se situer entre 1 et 5 mg d'alcaloïdes par kilogramme d'aliment pendant 28 jours. Chez le bétail laitier, un niveau de 0,2 mg/kg p.c. permet d'observer ce même effet (Blaney *et al.*, 2000a,b,c).

Chez les volailles, des difficultés respiratoires et des diarrhées, pouvant entraîner la mort, sont rapportées pour des niveaux de contamination allant de 2,5 à 5 % de sclérotés dans la ration. Avec des taux de 1,25 %, seule une faible diminution de la croissance et de la prise alimentaire est observée (Blaney *et al.*, 2000a,b,c).

1.6.4 Autres effets dus à l'ergotisme

Les pertes économiques occasionnées par les différentes formes de l'ergotisme ne peuvent être négligées. Aux pertes directes liées à une dévalorisation de la qualité de la récolte s'ajoutent les pertes liées à une altération de la production (Bacon *et al.*, 1982, Bandyopadhyay *et al.*, 1998). A titre d'exemple, un cas a été rapporté en 2000 en Australie, dans lequel il est mentionné que la production laitière, après consommation de grain de sorgho contenant 17% d'ergot de *C. africana*, a brutalement diminué de 850 à 650 L/jour sur l'ensemble du troupeau de bovins affecté. De même, un troupeau de bovins laitiers recevant une alimentation contenant du seigle ergoté à 0,15% par *C. purpurea* pendant 10 jours, a vu sa production laitière diminuer de 16,7 à 12,4 L/jour (Blaney *et al.*, 2000a,b,c). Ainsi, l'ergot coûterait chaque année 4 millions d'euros à l'industrie céréalière (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

1.6.5 Persistance à l'état résiduel

Bien qu'aucune donnée spécifique ne soit disponible concernant le transfert des alcaloïdes de l'ergot dans les tissus, ces composés sont retrouvés dans le lait d'animaux consommant des graminées contaminées. En effet, chez les porcelets allaités par des truies exposées, on observe parfois une gangrène des extrémités des oreilles et de la queue (Duval, 1994). Par ailleurs, en tant qu'alcaloïdes, ces molécules présentent les caractéristiques physico-chimiques (composés basiques dont la forme non ionisée est liposoluble) très favorables à leur passage dans le lait (Guerre, 2000).

1.7 Réglementation

En Europe, en alimentation humaine, comme en alimentation animale, les mycotoxines de *Claviceps* sont réglementées indirectement par une limite sur la proportion pondérale d'ergot.

En alimentation humaine, cette limite est de 0,5 g par kg de blé tendre et de blé dur et uniquement pour les lots destinés à l'intervention⁴¹ (règlement européen 824/2000 modifié).

En alimentation animale, la directive européenne 2002/32 et l'arrêté français du 12 janvier 2001 limitent à 1 g d'ergot par kg d'aliment pour animaux 'contenant des céréales non moulues'.

En Australie, face à l'importance croissante de l'ergot du sorgho, les autorités (Queensland Stockfod Regulations) ont introduit en octobre 1997, une valeur limite de 0,3% d'ergot dans le sorgho et ses dérivés en alimentation animale (Blaney *et al.*, 2001). Cette valeur pourrait être toutefois modifiée au regard de l'avancée des recherches concernant les alcaloïdes produits par cette espèce de *Claviceps* et être prise en compte lors d'importation de sorgho.

Au Canada, des seuils en ergot établis par la Commission Canadienne des Grains (CCG) dans les céréales sont aussi exprimés en pourcentage du poids des ergots par rapport au poids net de l'échantillon: ils sont à 0,04%-0,05% pour la plupart des céréales destinées à la consommation humaine. Les céréales sont déclassées pour l'alimentation animale pour une valeur comprise entre ces taux et celui de 0,10%, au delà duquel elles sont interdites aussi pour l'alimentation animale.

⁴¹ intervention = exportation de céréales décidée par les autorités européennes avec aide financière permettant au lot d'être commercialisable sur le marché mondial à un cours moins cher que le cours du marché intérieur

Conclusion

Les champignons du genre *Claviceps* peuvent entraîner la formation d'ergots sur toutes les graminées. Leur présence diminue les rendements des céréales et la valeur nutritive du grain et entraîne des risques pour la santé humaine et animale.

Les problèmes d'ergotisme, aussi bien convulsif que gangréneux, surviennent chez des animaux consommant librement des aliments contaminés au pâturage ou à qui des céréales non contrôlées sont fournies. Chez l'homme, les alcaloïdes de *C. purpurea* ne semblent plus constituer un risque sanitaire majeur pour la santé, étant donné que la problématique est bien connue et que l'occurrence d'une contamination au champ est bien visible et qu'un tri sélectif peut s'opérer. En Europe, l'occurrence de l'ergot de *C. purpurea* est réglementée en alimentations humaine et animale mais de manière indirecte puisque basée sur une limite de proportion pondérale en ergot. Les données sur les propriétés toxicologiques des alcaloïdes de l'ergot pris individuellement restent encore limitées.

Néanmoins au regard de l'évolution à la fois des pratiques culturales visant à diminuer les intrants (engrais et/ou traitements fongicides), et des conditions climatiques, favorables à la survenue d'épisodes de contamination par le genre *Claviceps*, l'information auprès des producteurs de céréales et la surveillance par les autorités compétentes devraient être renforcées. De plus la réglementation actuelle pour l'alimentation humaine concerne le seul blé et devrait évoluer pour s'appliquer à toutes les céréales, et après acquisition des connaissances toxicologiques sur les toxines, prendre en compte la teneur en quelques alcaloïdes au lieu de la teneur pondérale d'ergot dans un lot de céréales ou d'aliment.

2. La citrinine

La citrinine a été décrite pour la première fois en 1931 (Phillips *et al.*, 1980). Cette mycotoxine, produite par différentes espèces de *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. verrucosum* coproducteur d'OTA associée et *P. expansum* coproducteur de patuline associée) et d'*Aspergillus* (*A. terreus*, *A. carneus*, *A. niveus*) est susceptible de contaminer certaines denrées alimentaires. Elle a été retrouvée dans du maïs, du riz, de l'orge, de l'avoine, du seigle, du blé, des noix, des arachides, des graines de tournesol, des fruits secs, du jus de pomme, des produits secs de salaisonnerie et du fromage (IARC monographs, 1986). Elle a également été isolée d'espèces de ferments fongiques du genre *Monascus* utilisés à des fins industrielles pour produire un colorant rouge alimentaire et couramment utilisé en Asie (Bennett *et al.*, 2003 ; Blanc *et al.*, 1999 ; Sabater-Vilar *et al.*, 1999). La citrinine, au même titre que l'OTA, est suspectée d'être l'un des facteurs impliqués, dans l'étiologie de la néphropathie endémique des Balkans chez l'Homme et dans les néphropathies porcine et aviaire. Effectivement, la citrinine est connue pour être néphrotoxique chez toutes les espèces animales testées, même si des lésions d'autres organes ont pu être observées.

Bien que la citrinine soit régulièrement associée aux aliments, son impact sur la santé humaine et celle des animaux d'élevage reste méconnu (Bennett *et al.*, 2003).

2.1 Facteurs influençant la teneur en citrinine dans les denrées

Une étude a été menée afin de déterminer si les souches de *Penicillium* synthétisant de la citrinine en culture étaient capables de produire également ces toxines sur du fromage. Les résultats de cette étude montrent qu'une contamination accidentelle du fromage par *Penicillium citrinum* et *P. expansum* conduit à la synthèse de citrinine lors d'un stockage à 20 °C, mais pas à 4 °C. La toxine serait stable dans ce milieu, plus de 70% du contenu initial en citrinine est encore présent dans le fromage de chèvre utilisé dans l'étude après 8 jours de stockage (Baillly *et al.*, 2002).

Une autre étude permet de mettre en évidence l'influence de l'activité en eau (a_w) sur la croissance de *Penicillium citrinum* et l'accumulation de citrinine dans le blé. La citrinine n'est pas détectée pour une a_w inférieure à 0,8. En revanche, quand l' a_w augmente la citrinine est produite plus précocement et à des teneurs plus élevées (on passe d'un niveau de production de 65 µg/kg pour une a_w de 0,81 à 22 mg/kg pour une a_w de 0,885) (Comerio *et al.*, 1998).

La température optimale de croissance de *Penicillium expansum* est de 25°C, il ne peut plus se développer au delà de 37°C. Les spores peuvent infecter les pommes et germer même lors d'un stockage à 0°C. En milieu liquide, 38 % des souches de *P. expansum* produisent de la citrinine à des taux allant de 0,07 à 9 mg/kg (Pepeljnjak *et al.*, 2002).

2.2 Propriétés physico-chimiques de la citrinine et méthodes d'analyse

La citrinine (C₁₃-H₁₄-O₅) est un benzopyrane phénolique acide de poids moléculaire 250, répondant à la structure 3,4-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-triméthyl-6H-6-oxobenzo(c)pyran-7-acide carboxylique. La figure 2 ci-dessous illustre sa structure moléculaire (IARC monographs, 1986).

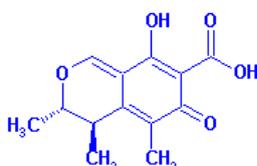


Figure 2 : structure chimique de la citrinine (C₁₃-H₁₄-O₅)

Caractérisée par un point de fusion à 172°C, cette mycotoxine est relativement insoluble dans l'eau mais elle est totalement soluble dans la plupart des solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile (Betina, 1984). La citrinine est thermolabile en solution acide ou basique. Elle se lie facilement aux protéines. Son instabilité relative implique des protocoles d'extraction complexes (Harwig *et al.*, 1977).

Différentes méthodes d'analyse sont utilisées afin de détecter la citrinine dans les denrées alimentaires. Une méthode rapide de multidétection par CCM permet de détecter des concentrations minimales en patuline et en citrinine de 120 – 130 et 15 – 20 µg/kg respectivement (Martins *et al.*, 2002). Des techniques immunologiques par ELISA ont été également développées et sont caractérisées par une bonne sensibilité (Abramson *et al.*, 1995).

L'HPLC permet d'estimer les teneurs en citrinine dans les céréales, les fluides biologiques (urine et bile) et les milieux de fermentation (Abramson *et al.*, 1995). Il faut noter que l'efficacité des méthodes HPLC dépend tout particulièrement de l'étape d'extraction qui ne doit pas dégrader le composé. La détection s'effectue en UV à 254 ou 366 nm (Betina, 1984). Une limite de détection de l'ordre de 10 µg/kg est ainsi obtenue dans les céréales. Une méthode semi-quantitative fluorimétrique a également été mise au point pour analyser la citrinine produite par des cultures fongiques isolées de fromage (Vasquez *et al.*, 1997).

2.3 Propriétés toxicologiques de la citrinine

L'organe cible de la citrinine est le rein. Toutefois, lors d'exposition à des taux élevés, des lésions hépatiques sous forme d'infiltration lipidique ont été observées (Braunberg *et al.*, 1994a).

2.3.1 Mécanisme d'action de la citrinine :

Des études utilisant des cellules rénales de hamsters et des cellules hépatiques de rats ont permis de déterminer le mécanisme d'action de la citrinine. Cette mycotoxine est capable de pénétrer dans les mitochondries en modifiant la fluidité membranaire puis d'interférer avec le système de transport d'électrons mais aussi avec les défenses enzymatiques des cellules du fait de l'inhibition de la glutathion réductase et de la transhydrogénase. De ce fait, la toxine provoque une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, notamment d'anion superoxyde. La respiration cellulaire est inhibée par la toxine qui est donc susceptible d'entraîner une nécrose cellulaire par un mécanisme de stress oxydatif (Ribeiro *et al.*, 1997). Enfin, une étude menée sur explants tissulaires de cortex rénal de porc et sur cellules en culture (lignée V79) a montré que la citrinine est capable d'inhiber la

synthèse d'ARN, surtout les ARNr (dès la concentration de 200 µM) de façon dose- et temps-dépendante, mais aussi les synthèses d'ADN et de protéines (Braunberg *et al.*, 1994a,b; Wasternack *et al.*, 1992).

D'autres effets de la citrinine ont été rapportés. Par administration intra-péritonéale à la dose de 15 à 35 mg de citrinine/kg pc à des souris la toxine provoque une diminution de l'utilisation du glucose, une inhibition de l'activité de l'aniline hydroxylase hépatique et une augmentation du taux de cytochrome P450 (Braunberg *et al.*, 1994a).

2.3.2 Toxicocinétique :

Il semblerait que la citrinine (25-50 mg/kg pc) soit faiblement absorbée lors de son administration par voie orale. Cette absorption se ferait au niveau du tractus gastro-intestinal chez le rat, voire dès la muqueuse buccale chez le chat (IARC monographs, 1986).

Une étude décrit le devenir d'une dose unique de 3 mg/kg pc de citrinine marquée au ¹⁴C administrée par voie intra-veineuse chez le rat. Trente minutes après son administration, 14,7 et 5,6 % de la radioactivité sont respectivement distribués dans le foie et dans les reins. Après 6 heures, ces valeurs sont respectivement à 7,5 % et 4,7 %. La concentration plasmatique en ¹⁴C est de 9,2 % après 30 minutes et 4,7 % après 6 heures. Après 24 heures, environ 80 % de la radioactivité est retrouvée dans l'urine et les fèces (Phillips *et al.*, 1979). Deux phases d'élimination successives ont été déterminées : elles sont caractérisées par des demi-vies de 2,6h et 14,9h.

Après administration sous-cutanée de 35 mg/kg pc de citrinine ¹⁴C à des rats femelles CD-1 Charles River au 12^{ème} jour de gestation, une élimination biphasique a également été observée avec des demi-vies de 2h et 40h. Cette étude a permis de montrer que la citrinine ¹⁴C traverse la barrière placentaire (IARC monographs, 1986; Reddy *et al.*, 1982b).

Enfin, la citrinine serait fortement fixée aux protéines plasmatiques, cette fixation étant saturable. Dans une étude *in vitro*, 95 % de la toxine serait fixé pour une concentration de 1 mg/100 ml, ce taux de liaison diminuant à 82 % de liaison pour 5 mg/100 ml (Phillips *et al.*, 1980).

2.3.3 Toxicité générale

Toxicité aiguë :

La citrinine est néphrotoxique chez toutes les espèces animales mais sa toxicité aiguë varie en fonction de l'espèce testée : la DL50 par voie orale chez le rat est de 50 mg/kg pc, chez le canard de 57 mg/kg pc, chez le poulet de 95 mg/kg pc et chez le lapin de 134 mg/kg pc. L'examen nécropsique faisant suite à l'administration de doses létales de citrinine à des lapins, des cobayes, des rats et des porcs révèle une augmentation du volume des reins et une nécrose tubulaire. Ces effets dépendent de la dose et de la durée d'exposition (Betina, 1984).

Une mortalité voisine de 30% avait également été rapportée au cours de l'étude de toxicocinétique de Phillips *et al.* (1979) lors d'administration de 50 mg/kg pc de citrinine par voie intra-péritonéale à des rats. Parmi les survivants, après un délai de 4 jours, deux groupes ont pu être identifiés. Certains étaient atteints de protéinurie et de glucosurie tandis que pour d'autres les effets néphrotoxiques de la citrinine avaient cessé dans ce même laps de temps (Phillips *et al.*, 1979). On peut ainsi supposer que la sensibilité individuelle joue un rôle dans l'importance des effets toxiques de la citrinine.

Toxicité chronique :

De faibles doses de citrinine (0,02 mg/kg p.c.) administrées par voie intra-gastrique à des porcs pendant 57 jours n'ont pas entraîné d'effets cliniques ni de lésions histologiques. La concentration plasmatique moyenne en citrinine chez ces porcs a été dosée en fin d'étude : elle est de 0,11 mg/L (Keblys, 2004 ; Pepeljnjak *et al.*, 2002).

2.3.4 Toxicité spécifique :

Néphrotoxicité :

Chez le chien de race Beagle, une dose de citrinine de 10 mg/kg pc entraîne des lésions rénales au niveau des tubules proximaux et distaux. Chez le rat, l'administration d'une dose de citrinine de 50 mg/kg pc induit des dommages au niveau des cellules épithéliales des tubules proximaux.

Ces dommages des tubules proximaux se traduisent par une disparition de la bordure en brosse, une raréfaction cytoplasmique, une condensation mitochondriale ainsi qu'une azotémie, une acidose, une hypokaliémie, une glycosurie, une augmentation de la créatinine sérique et une diminution de sa clairance chez le lapin pour des doses de 67 et 130 mg/kg p.c. (Pfohl Leszkowicz *et al.*, 2002). Une diminution de la clairance de l'inuline a également été mise en évidence chez des rats ayant reçu 5 et 50 mg/kg pc de citrinine par voie intra-péritonéale (Phillips *et al.*, 1980).

Cytotoxicité :

Le test de cytotoxicité cellulaire utilisant le MTT montre que la citrinine est toxique pour une concentration supérieure à 50 µg/ml sur lignée cellulaire SK. Le test d'exclusion au bleu trypan indique que la concentration en citrinine permettant un taux de survie de 90 % des cellules est de 60 µM après 6h d'incubation (Pfeiffer *et al.*, 1998).

Immunotoxicité :

Une exposition à de fortes doses de citrinine provoque une lymphopénie mais également une stimulation des réponses contre les antigènes (Sharma *et al.*, 1992). Une seconde étude *in vitro* mettant en œuvre un test de prolifération lymphocytaire de porc a permis de montrer que la citrinine entraîne bien une inhibition de la prolifération, mettant en évidence un effet immunosuppresseur de la toxine : l'IC₅₀ estimé est de 10 mg/L. Cette valeur correspond à celle obtenue lors de l'inhibition de production des interférons gamma par des lymphocytes T humains en culture (IC₅₀ = 8,3 mg/L) (Wichmann *et al.*, 2002).

Il faut noter que ces valeurs sont 100 fois plus élevées que la concentration plasmatique moyenne de 0,11 mg/L obtenue chez le porc après administration intra-gastrique de 0,02 mg/kg pc de citrinine pendant 57 jours (Keblys, 2004).

Reprotoxicité:

Chez la souris, la citrinine est embryotoxique et fœtotoxique après injection de doses maternotoxiques. Chez le rat, elle induit des effets similaires et de fortes doses sont également tératogènes (Reddy *et al.*, 1982a). La citrinine est retrouvée inchangée dans des fœtus de rats dont la mère avait reçu de la toxine radiomarquée, ce qui suggère que les effets embryo- et fœtotoxiques de la citrinine sont dus au composé parent et non à un de ses métabolites (Reddy *et al.*, 1982b). La citrinine détermine également des effets tératogènes sur embryons de poulet avec une malformation des extrémités et du bec, une exencéphalie et une exophtalmie. La relation dose – effet est linéaire (Ciegler, *et al.*, 1977). Une étude ancienne montre que le niveau de dose de citrinine entraînant une embryotoxicité chez le poulet s'étend de 1 à 10 µg par œuf embryonné (Vesela *et al.*, 1983).

Génotoxicité:

Des résultats aussi bien positifs que négatifs ont été obtenus lors du rec-assay sur *Bacillus subtilis*. La citrinine n'est pas mutagène chez *Salmonella typhimurium* (souches TA98, TA100, TA1535, TA1538 et TA97) en absence ou en présence d'un système d'activation métabolique. Elle n'induit pas de recombinaisons chez *Saccharomyces cerevisiae* et le test *in vitro* de réparation non programmée de l'ADN sur cellules de mammifères est négatif. Des aberrations chromosomiques structurales ont été rapportées sur cellules de hamster V79 après activation métabolique (IARC monographs, 1986). Une étude de Pfeiffer *et al.* en 1998 a permis de mettre en évidence le potentiel aneuploïdogène dose-dépendant de la citrinine sur ce même type cellulaire car à des concentrations n'induisant pas de cytotoxicité, l'arrêt de mitose et la présence de chromatides sœurs ont été observés. Le mécanisme de l'aneuploïdogénicité de la toxine est encore méconnu mais il semblerait que la citrinine interagisse de façon non covalente avec les protéines ou d'autres constituants des microtubules. Sans activation métabolique, la citrinine n'est pas considérée comme clastogène car elle ne provoque pas l'apparition de micronoyaux contenant des fragments non centrés reconnus par coloration de CREST (Pfeiffer *et al.*, 1998). Pour de fortes concentrations, la citrinine induit des cassures simple brin dans l'ADN d'*E. coli* et de cellules CHO. *In vivo*, des aberrations chromosomiques ont été détectées sur des cellules de moelle osseuse de souris traitées (Pfohl – Leszkowicz, *et al.*, 2002 ; Sabater-Vilar, *et al.*, 1999). Enfin, une étude *in vitro* récente montre que la citrinine n'apparaît pas génotoxique pour des cellules embryonnaires de reins humains HEK, mais qu'elle augmente le niveau des ARN messagers (heat shock proteins70) (Liu *et al.*, 2003).

Une étude de cancérogenèse a été menée en administrant par voie orale 1 g de citrinine / kg pc à des rats Fischer 344 durant 80 jours. A la fin de l'expérimentation, 70% des animaux traités portaient des tumeurs bénignes des reins (adénomes à cellules claires) (Liu *et al.*, 2003).

Aussi, le CIRC a considéré cette mycotoxine comme inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme malgré la présence d'indications limitées de sa cancérogénicité pour l'animal (groupe 3) (IARC monographs, 1986).

2.4 Exposition humaine

2.4.1. Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

Aucune indication n'est disponible en ce qui concerne les effets de la citrinine chez l'Homme. Toutefois, la citrinine pourrait être impliquée au même titre que l'OTA dans la néphropathie endémique des Balkans (NEB). Celle-ci est caractérisée par une dégénérescence tubulaire, une fibrose interstitielle et une hyalinisation des glomérules accompagnée par une enzymurie, des maux de tête fréquents, des douleurs lombaires, une asthénie mais aussi anémie, perte de poids, xanthodermie et polyurie sans hypertension. Des changements de la biochimie urinaire et sérique sont également rapportés : diminutions de la protéinurie (0,15 à 0,5 g/24h), de la glucosurie et augmentation de la créatine sérique. Ces troubles s'accompagnent d'une infiltration rénale par des cellules mononucléaires (20 à 250 leucocytes/mm³) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002). Néanmoins, la piste « mycotoxines » n'est pas la seule avancée, d'autres options étant envisagées, pour expliquer l'étiologie de la NEB (voir chapitre « Ochratoxines », § 5.1).

2.4.2. Exposition de l'Homme au travers des denrées brutes et des produits finis ou transformés et impact des procédés technologiques sur la présence ou la réduction dans les aliments tels que consommés

La citrinine a été retrouvée à des teneurs allant de 0,07 à 80 mg/kg dans de l'orge, de l'avoine, du seigle, du blé (Allen *et al.*, 1984). Elle a également été retrouvée dans du maïs, du riz, des noix, des arachides, des graines de tournesol, des fruits secs, du jus de pomme et du fromage (Ribeiro, *et al.*, 1997). Toutefois, la citrinine se dégrade rapidement dans les céréales en présence d'humidité ou d'eau. (Harwig *et al.*, 1977). Dans les fromages, bien que de la citrinine puisse être produite au cours de l'affinage, et qu'elle soit stable pendant plusieurs jours, la contamination serait accidentelle et le retrait de la couche superficielle du fromage de chèvre (0,5 cm) permettrait de réduire de 96% la quantité de citrinine produite (Bailey *et al.*, 2002).

Une étude récente a permis de déterminer la teneur de patuline et de citrinine dans des pommes au Portugal (Martins *et al.*, 2002). Le pourcentage de contamination par la patuline est plus important que celui de la citrinine (68,6% contre 3,9%) mais ces deux mycotoxines sont présentes simultanément dans 19,6 % des échantillons testés. Les différentes variétés de pommes présentent un faible taux de contamination en citrinine puisque la gamme s'étend de 0,32 à 0,92 mg/kg.

2.5 Exposition animale

En raison de sa présence conjointe avec l'OTA, la citrinine a été impliquée dans la néphropathie porcine observée au Danemark, en Suède, en Norvège et en Irlande, et dans les néphropathies aviaires. Des symptômes similaires ont été obtenus chez des porcs consommant une nourriture contenant 200 à 400 mg/kg de citrinine pendant 1 à 2 mois (Krogh *et al.*, 1973). Toutefois, l'implication de la citrinine seule dans la survenue de néphropathies semble mineure en raison de sa faible prévalence naturelle dans les aliments (Harwig *et al.*, 1977).

Une synergie OTA-citrinine a été démontrée expérimentalement (injection intrapéritonéale conjointe d'OTA et de citrinine) dans l'espèce canine. Les chiots sont particulièrement sensibles à cette synergie. Alors que la dose de 0,1 mg/kg pc d'OTA administrée seule par voie intrapéritonéale est bien supportée, son association avec 5 mg/kg pc de citrinine induit une mortalité rapide en moins de 2 semaines suite à une détérioration de la fonction rénale (Kitchen *et al.*, 1977a,b).

La toxicité rénale induite par la citrinine chez le porc est caractérisée par des lésions et une desquamation des cellules épithéliales rénales. Le volume urinaire excrété peut être jusqu'à 2,5 fois supérieur à la normale (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002).

Les volailles sont, au même titre que les porcs, sensibles à la citrinine : l'administration de maïs contaminé par *P. citrinum* provoque la mort de 58 % des poulets en 2 semaines. Microscopiquement, on observe une déplétion des tissus lymphoïde et cardiaque, une myopathie squelettique, une nécrose des hépatocytes centrolobulaires, une atrophie glomérulaire et une hyperplasie. Les facteurs toxiques contenus dans le maïs contaminé par *P. citrinum* ne sont pas identifiés (Roberts *et al.*, 1978). Toutefois, l'administration orale de 130 à 260 mg/kg de citrinine à des jeunes poulets pendant 6 semaines n'entraîne pas de mortalité mais provoque une toxicité aiguë avec une augmentation de la consommation en eau et des diarrhées. A l'autopsie, on observe des hémorragies digestives (au niveau du jéjunum) pour ces deux doses ainsi qu'une augmentation du volume rénal. Même à de plus faibles doses (33 et 65 mg/kg aliment), des infiltrations lipidiques sont constatées au niveau du foie, des reins et du pancréas. De plus, des zones d'anaplasie au niveau des reins et du pancréas ainsi qu'une augmentation des mitoses des cellules épithéliales tubulaires rénales observées à la dose de 260 mg de citrinine/kg d'aliment montrent que la toxine pourrait être carcinogène chez le poulet. Une autre étude menée sur des poulets adultes a montré que l'administration de 0, 50 et 250 mg/kg de citrinine dans l'aliment pendant 3 semaines n'a pas eu d'effet sur le poids corporel de l'animal, sa consommation alimentaire, la production d'œufs, leur poids et la qualité de leur coquille. Une diarrhée a été observée trois jours après administration de la forte dose (250 mg/kg d'aliment) (Ames, *et al.*, 1976).

Une étude expérimentale de toxicité aiguë menée sur des dindons et des canards mâles âgés de 7 jours a mis en évidence une néphrotoxicité chez les deux espèces. Les lésions rénales étaient plus importantes chez le dindon et se caractérisaient par une nécrose de l'épithélium tubulaire. Chez cette même espèce, des lésions ont également été observées dans le foie où des nécroses hépatocytaires et une hyperplasie biliaire ont été rapportées. Aussi bien chez le dindon que chez le canard, une nécrose lymphoïde avec déplétion a été observée tant sur le thymus que sur la bourse de Fabricius. Ces dernières lésions sont prédominantes chez le canard.

Une autre étude a permis de montrer que l'administration pendant 15 jours de 250 ou 500 mg/kg de citrinine dans l'aliment par gavage à des canards mâles âgés de 1 jour provoque une néphropathie (Mehdi *et al.*, 1984).

En 1991, chez la vache, la citrinine a été suspectée d'être à l'origine de prurit, de pyrexie et d'hémorragie sur 8 individus d'un troupeau de 175 têtes ayant consommé de la pulpe de citrus pendant 21 jours. Celle-ci était visiblement moisie et contenait 30 à 40 ng/kg de citrinine. Ce rapport indique aussi que 5 veaux de vaches ayant consommé ce fourrage sont nés avec un prognathisme supérieur (Griffiths et Done, 1991).

Conclusion

Il est peu probable que la citrinine seule présente un risque pour l'homme dans les conditions d'exposition connues actuellement. Toutefois son association à l'OTA pouvant engendrer une synergie, la surveillance de la contamination simultanée de ces deux toxines en particulier dans les produits tels que consommés mériterait d'être réalisée. En alimentation animale, le risque d'intoxication provient surtout de la consommation de céréales contaminées utilisées à l'état brut, en particulier chez les porcs et les volailles.

3. Les toxines d'*Alternaria*

Les moisissures du genre *Alternaria* ont une répartition mondiale aussi bien dans les cultures que dans le sol et les déchets alimentaires ménagers (Visconti *et al.*, 1994). Bien que les spores de ces moisissures soient connues pour être fortement allergisantes lors de leur inhalation (Downs *et al.*, 2001), ce chapitre se limitera aux toxines d'*Alternaria* pouvant avoir un impact sur la santé humaine et animale par ingestion.

Alternaria alternata et *Alternaria solani* sont les champignons les plus fréquemment retrouvés dans les denrées alimentaires contaminées par les toxines d'*Alternaria*. Les mycotoxines produites sont principalement : alternariol, alternariol méthyl ether, acide tenuazonique, altenuène, altertoxines (1 à 3 avec prédominance de l'altertoxine 1 dans les aliments) et quelques toxines particulières à *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (toxines AAL).

Il est important de mentionner d'emblée que la présence de ces toxines dans les aliments est très faible : l'exposition de l'homme et des animaux est donc limitée. Toutefois, les études toxicologiques

expérimentales prouvent la toxicité de certaines d'entre elles, certains travaux suggérant leur implication dans le cancer de l'œsophage en Chine et dans une maladie hématologique en Afrique, l'Onyalai.

3.1. Facteurs favorisant le développement

Les fruits et les légumes sont susceptibles d'être contaminés par *Alternaria* aussi bien au champ qu'après la récolte : il s'agit surtout des produits dérivés de la pomme et la tomate, mais la moisissure a également été identifiée sur des graines de tournesol, olive et colza. *Alternaria* se développe beaucoup plus facilement sur les fruits abîmés ou lors d'un stress dû au froid par exemple. Sur les tomates contaminées par *A. alternata*, on retrouve majoritairement de l'AOH et de l'AME (Da Motta *et al.*, 2001).

Les *Alternaria* ont besoin d'un taux d'humidité de 28 à 34 % pour proliférer, mais elles peuvent se développer à basse température. Ainsi les fruits et les légumes réfrigérés durant le transport ou lors du stockage peuvent être contaminés (Magan *et al.*, 1984 ; Stack *et al.*, 1986).

La présence de moisissure a été rapportée dans le blé où elle se développe sous le péricarpe. La moisissure peut contaminer le sorgho, l'orge, l'avoine, le riz et le tabac (Meronuck *et al.*, 1972). Il semblerait que la principale toxine synthétisée par *A. alternata* dans les céréales soit l'acide ténuazonique. Toutefois, si la contamination par la moisissure est importante et que la denrée est altérée, d'autres toxines telles que l'alternariol et l'alternariol méthyéther peuvent être synthétisées (Meronuck *et al.*, 1972 ; Webley *et al.*, 1998). Une étude a permis de déterminer les conditions de toxogénèse d'*A. alternata* en culture et sur des grains de blé au laboratoire. Il semblerait qu'aussi bien l'humidité que la température affectent la production d'ALT, AOH et AME. Les trois toxines sont produites de façon optimale à 25°C pour une a_w de 0,98, aussi bien sur les grains de blé qu'en culture. La production est toutefois fortement variable selon la température et l'humidité (Magan *et al.*, 1984). Les altertoxines sont présentes à des quantités bien moindres dans les aliments, mais ces mycotoxines font partie des plus dangereuses de par leur effet mutagène (Visconti *et al.*, 1994). Il n'existe pas de données concernant la prévalence des toxines AAL dans les aliments.

3.2. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse

Les espèces d'*Alternaria* produisent environ 30 métabolites secondaires de structures variées. La classe la plus importante est celle des dibenzopyrones, appelés également polyketides. L'alternariol (AOH), l'alternariol méthyéther (AME) et l'altenuène appartiennent entre autre à cette classe de toxines.

L'acide ténuazonique (TeA) est un acide tétramique tandis que l'altertoxine 1 (ATX-1) est un dérivé pérylène.

D'autres métabolites isolés appartiennent aux classes des quinones, des peptides ou des composés hétérocycliques. La plupart de ces autres métabolites sont phytotoxiques.

Les structures de certaines de ces toxines sont illustrées en figure 3.

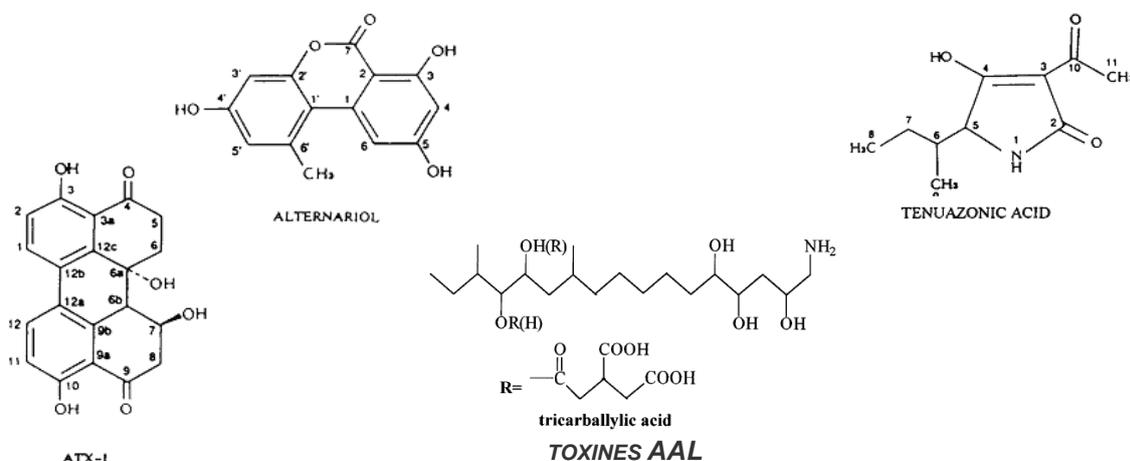


Figure 3 : structure chimique de quelques toxines d'*Alternaria*

Le poids moléculaire de ces toxines est très variable du fait de leur nature chimique très différente : TeA : 197 – AOH : 258 – AME : 272 – ATX1 : 352 – AAL : 679 (Visconti et al., 1994).

Les alternariols (AOH, AME) et les altertoxines peuvent être analysés par CCM - UV (254 ou 360 nm). La GC associée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) a également été mise en œuvre pour détecter et quantifier ces toxines (l'alténuène doit être préalablement dérivé en triméthylsilyl – ALT). Cette technique permet d'obtenir une limite de détection de 20 µg/kg. Toutefois, l'HPLC ne nécessitant pas d'étape de dérivation préalable est préférée pour l'analyse de ces toxines. Bien que différentes méthodes soient disponibles, la grande majorité d'entre elles fait état d'une séparation sur colonne en phase inverse C₁₈ suivie d'une détection en UV. Une extraction sur phase solide destinée à purifier l'échantillon peut être réalisée avant son analyse par HPLC-UV (Fente *et al.*, 1998 ; Delgado *et al.*, 1998). Les limites de détection pour les différentes altertoxines, l'AOH et l'AME varient de 3 à 10 ng/g. Une méthode par HPLC-DAD (détection par barrettes de diodes) a été mise au point afin de quantifier l'AOH et l'AME dans les produits à base de tomates. Leurs LOQ respectives sont de 5 ng/g et 2 ng/g (Da Motta *et al.*, 2000).

L'analyse de l'acide ténuazonique fait appel aux mêmes outils pour que les toxines précédentes. La LOD obtenue par GC – FID est de 1 mg/kg tandis que la détection par spectrométrie de masse permet d'obtenir une meilleure sensibilité avec une LOD de 10 µg/kg. La CCM, la GC-MS et l'HPLC en phase inverse permettent d'analyser les toxines AAL.

Il faut noter qu'aucun kit rapide de type ELISA n'a été mis en œuvre pour tester la présence de toxines d'*Alternaria*, à l'exception des toxines AAL où des essais ont été menés (Szurdoki *et al.*, 1996 ; Webley *et al.*, 1998). Ce manque de méthodes rapides disponibles contribue certainement à la rareté des informations concernant la prévalence des toxines d'*Alternaria* (John *et al.*, 1989).

3.3. Propriétés toxicologiques

Diverses activités biologiques : phytotoxique, cytotoxique, insecticide, antivirale, antifongique, antibactérienne, mutagène, tératogène, ou foetotoxique, ont été mises en évidence pour les différentes mycotoxines synthétisées par *Alternaria* (Harvan *et al.*, 1976).

L'acide ténuazonique est le métabolite le plus étudié en raison de la disponibilité des techniques permettant sa production et son isolement à partir de cultures fongiques. De plus, il s'agit du métabolite le plus toxique en terme de DL50 (John *et al.*, 1989). Les toxines AAL sont également particulièrement étudiées de par leurs similarités structurales avec la fumonisine B1 (Wang *et al.*, 1996).

3.3.1 Mécanisme d'action

Etant donné les différences structurales des toxines d'*Alternaria*, leurs mécanismes d'action sont extrêmement variés.

L'acide ténuazonique entraîne une inhibition de l'incorporation des acides aminés dans les protéines, qui interfère avec le relargage de protéines néo-formées par les ribosomes (Davis *et al.*, 1977).

La cible principale des toxines d'*Alternaria alternata f. sp. Lycopersici* (toxines AAL) dans les cellules de mammifères est l'enzyme sphinganine (sphingosine) N-acétyl transférase encore appelée céramide synthase. Cette cible est également celle des fumonisines (cf. chapitre spécifique). *In vivo*, l'inhibition de la céramide synthase conduit à une accumulation des bases sphingoïdes libres. Aussi, l'augmentation des taux de sphinganine libre et le rapport sphinganine/sphingosine peuvent servir de marqueur d'exposition aux toxines AAL et aux fumonisines (Abbas *et al.*, 1994). De plus, ces deux sphingolipides ont été rapportés comme ayant des rôles critiques dans la communication cellulaire et la transduction du signal. Une étude de Wang (1996) indique en effet que les toxines AAL aussi bien que les fumonisines induisent l'apoptose dans des cellules rénales de singe (CV-1). Cependant, si la FB1 provoque un arrêt des cellules en phase G1, ceci n'est pas le cas des toxines AAL, ce qui suggère des différences d'action entre les deux familles de toxines (Wang *et al.*, 1996).

3.3.2 Toxicité générale :

Toxicité aiguë :

L'injection intra-péritonéale d'extraits bruts purifiés d'*Alternaria* à 300 mg/kg est létale chez la souris. Cette dose est également létale lors de l'administration par voie orale à des rats (Harvan *et al.*, 1976).

Les DL₅₀ (voie intra-péritonéale) de l'AME et l'AOH chez la souris sont supérieures à 400 mg/kg pc. Celle de l'ALT varie de 75 à 100 mg/kg pc. Les animaux présentent des spasmes gastriques occasionnels et des halètements périodiques (Da Motta *et al.*, 2000).

Les altertoxines ATX-I et ATX-II sont létales pour la souris à la dose de 200 mg/kg pc. Elles entraînent une inactivité, des hémorragies sub-endocardiques et sub-arachnoïdiennes. A l'autopsie, du sang est retrouvé au niveau des ventricules cervicaux.

La DL₅₀ de l'acide ténuazonique (voie orale) est de 174 mg/kg pc chez le rat et de 37,5 mg/kg pc chez le jeune poulet. Au cours des différentes études de toxicité menées chez le rat, le cobaye, la souris, le lapin, le chien et le singe rhésus les animaux présentent hypersalivation, vomissements, anorexie, hémorragies intestinales et convulsions. Chez le poulet, des doses quotidiennes de 1,25 mg/kg de TeA dans la nourriture provoquent une diminution du gain de poids corporel.

En revanche, les AAL toxines purifiées ont été administrées à des rats par voie intra-gastrique à la dose de 100 mg/kg pc sans produire d'effets toxiques (Visconti *et al.*, 1994).

Toxicité sub-aiguë :

Aucun signe de toxicité n'a été mis en évidence chez le rat ou chez le poulet à qui l'on a administré de l'AME, AOH et ALT pendant 21 jours aux doses respectives de 24, 39 et 10 mg/kg pc. L'absence de toxicité de l'AME chez le poulet a été confirmée dans une étude de Griffin *et al.* (1983) après administration de toxine pure dans la nourriture à des doses allant jusqu'à 100 mg/kg pendant 4 semaines.

Des chiens ayant reçu chaque jour 10 mg/kg d'acide ténuazonique par voie orale sont morts 8 à 9 jours après le début de l'étude (Visconti *et al.*, 1994).

3.3.3 Toxicité d'organe :

Cytotoxicité :

Des études *in vitro* sur cellules de bactéries et de mammifères ont permis de classer les différentes toxines d'*Alternaria* quand à leur cytotoxicité. Il ressort de ces travaux une cytotoxicité décroissante suivante : ATX-II > AOH > AME > ATX-I > ALT. En revanche, l'AME n'est pas cytotoxique (Visconti *et al.*, 1994). D'autres études révèlent également une grande hétérogénéité dans la sensibilité des lignées utilisées. Ainsi, sur les 15 lignées cellulaires utilisées, seules les cellules épithéliales de reins de chien MDCK étaient sensibles aux toxines AAL (Shier *et al.*, 1991).

Reprotoxicité :

L'administration d'AOH seule et conjointe avec de l'AME (1 :1 à 25 mg/kg) par voie sous-cutanée est foetotoxique et tératogène chez la souris. L'AME entraîne une toxicité maternelle et s'avère également foetotoxique chez le hamster après administration intra-péritonéale de 200 mg/kg pc au 8^{ème} jour de gestation.

Aucune mortalité ni effet tératogène n'ont été rapportés après injection d'AME, d'AOH et d'ALT à travers la vésicule ombilicale d'embryons de poulet âgés de 7 jours respectivement à 0,5, 1,0 et 1,0 mg/œuf. En revanche, l'acide ténuazonique présente une DL50 de 0,55 mg/œuf (Griffin *et al.*, 1983 ; Visconti *et al.*, 1994).

Génotoxicité :

Un des aspects de la toxicité des *Alternaria* est la mutagénicité de certaines des toxines synthétisées, principalement les altertoxines (ATX).

L'AOH et l'acide ténuazonique n'entraînent pas de mutation génique sur *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 avec et sans activation métabolique. Plusieurs études ont en revanche montré que l'AME est fortement mutagène sur la souche TA98 et sur *E. coli* ND-160 sans activation métabolique (Visconti *et al.*, 1994 ; Scott *et al.*, 1980). Cependant, d'autres travaux semblent prouver que l'AME n'est pas mutagène ni sur TA98 ni sur TA100 avec et sans activation métabolique et que les résultats positifs obtenus précédemment sont dus à la présence de traces d'autres toxines mutagènes telles que les ATX (Davis *et al.*, 1994). En effet, l'ATX-III, l'ATX-II et l'ATX-I entraînent des mutations géniques sur *S. typhimurium* TA98, TA100 et TA1537 avec et sans activation métabolique, l'ATX-III étant la plus mutagène suivie de ATX-II puis ATX-I (Davis *et al.*, 1994 ; Stack *et al.*, 1986).

3.4. Exposition humaine

Une surveillance de la patuline, de l'AOH et de l'AME dans les jus de pomme et produits à base de pomme a été menée par la FSA (Food Standard Agency) en 2003. Les résultats montrent que, sur 300 échantillons analysés, la patuline a été retrouvée dans 3 échantillons à des teneurs inférieures à la limite réglementaire, l'AOH a été retrouvée dans 2 échantillons à faibles taux (dans un jus et un concentré), tandis qu'aucun échantillon ne contenait d'AME (FSA, 2003).

Une étude plus restreinte a été menée afin de déterminer la prévalence d'AOH et AME dans des jus de pomme concentrés d'origine espagnole. Ces deux toxines ont été détectées sur la moitié des 32 échantillons analysés : les niveaux de contamination en AOH varient de 1,35 à 5,42 ng/ml tandis que l'AME est présent le plus souvent à l'état de traces ; le maximum de contamination étant de 1,71 ng/ml dans un échantillon (Delgado *et al.*, 1998).

Les graines de tournesol sont également susceptibles d'être contaminées par les toxines d'*Alternaria*. En effet, la surveillance de 150 échantillons de graines de tournesol a mis en évidence que 85 % contenaient de l'AOH (avec une moyenne de contamination de 187 µg/kg), 47 % de l'AME (moyenne : 194 µg/kg) et 65 % de l'acide ténuazonique (moyenne : 6,7 µg/kg). De plus, l'AME et l'acide ténuazonique ont été retrouvés dans l'huile (Chulze *et al.*, 1995). En revanche, une surveillance des olives et de l'huile d'olive destinées à la consommation humaine menée en Italie n'a pas mis en évidence de toxines (Bottalico *et al.*, 1993).

Les moisissures du genre *Alternaria* posent un problème en santé humaine par inhalation car ce sont de puissants allergènes qui peuvent augmenter la sévérité de l'asthme principalement chez les enfants qui y sont fortement exposés (Downs *et al.*, 2001).

En revanche, aucun cas avéré de mycotoxicose humaine due à l'ingestion d'aliments contaminés par des toxines d'*Alternaria* n'a été rapporté. Certaines études suggèrent toutefois qu'elles pourraient être impliquées dans certaines affections humaines notamment le cancer de l'œsophage au Linxian, en Chine. En effet, *Alternaria alternata* est fréquemment retrouvée dans les grains provenant du Linxian, une région chinoise présentant une incidence élevée de cancer de l'œsophage.

Une étude de Dong *et al.* (1987) a rapporté que des extraits d'*A. alternata* isolés de maïs au Linxian induisaient des effets mutagènes sur des cellules de mammifères (V79, fibroblastes murins NIH/3T3) sans nécessiter d'activation métabolique préalable. Les auteurs suggèrent donc que la consommation de céréales contaminées par *A. alternata* pourrait contribuer à la forte incidence de ce type de cancer. De plus, une étude de Liu *et al.* (1992) a conforté cette hypothèse en montrant que l'AOH et l'AME pouvaient se combiner avec l'ADN isolé d'épithélium œsophagien de fœtus humain, activer les oncogènes c-H-ras et c-mys de ces cellules et promouvoir la prolifération de celles-ci *in vitro*.

Un rapport sur la prévalence naturelle des toxines d'*Alternaria* dans le blé en Chine révèle que la fréquence moyenne d'infection par *A. alternata* est de 87,3 % (Li *et al.*, 2000). Sur les 22 échantillons analysés, 20 contenaient de l'AOH de 116 à 731 µg/kg (moyenne : 335 µg/kg) et 21 contenaient de l'AME de 52 à 1426 µg/kg (moyenne : 443 µg/kg). Dans tous les échantillons analysés, de l'acide ténuazonique a été détecté à une concentration moyenne de 2419 µg/kg (teneur maximale : 6432 µg/kg). Il convient de noter que les échantillons contenant de fortes teneurs en AOH et AME contenaient également des teneurs élevées en acide ténuazonique. Toutefois, aucun des 22 échantillons ne contenait d'altenuène ou d'altétoxine.

Signalons enfin que l'acide ténuazonique est une des causes possibles de l'Onyalai, une maladie hématologique endémique de l'Afrique surtout des régions au Sud du Sahara. Cette atteinte aiguë se caractérise par des lésions hémorragiques buccales (Davis *et al.*, 1977 ; John *et al.*, 1989).

3.5. Effets sur la santé animale

Très peu de cas de mycotoxicose naturelle dus aux toxines d'*Alternaria* ont été rapportés.

Cependant en 1997, elles ont été suspectées d'être la cause de « locoïsme » chez un troupeau de bovins au Mexique. Peu de données sont disponibles sur ce cas (Braun *et al.*, 1997).

L'administration de nourriture artificiellement contaminée par 100 mg d'AME par kg pendant 4 semaines à des poulets âgés de 1 jour n'a eu aucune conséquence zootechnique (Griffin *et al.*, 1983).

Conclusion

Au vu des données disponibles, il n'existe pas actuellement de raisons objectives de considérer le danger des toxines élaborées par *Alternaria* comme une priorité en sécurité sanitaire des aliments destinés à l'homme ou aux animaux d'élevage. Toutefois, les études toxicologiques essentiellement réalisées *in vitro* laissent apparaître des caractères mutagènes qui devront être confirmés ou infirmés par des études *in vivo* réalisées chez des animaux recevant des doses compatibles avec les données de contaminations existantes. De plus la vigilance doit être maintenue sur la qualification du caractère contaminant naturel de ces toxines, au travers d'enquêtes voire de plans de surveillance.

4. L'acide cyclopiazonique

L'acide cyclopiazonique (CPA) est une mycotoxine produite par différentes espèces d'*Aspergillus*, notamment *Aspergillus flavus* et *A. tamarii*, et de *Penicillium*, notamment *Penicillium camembertii* et *P. cyclopium*. Elle peut être produite avec d'autres mycotoxines comme les aflatoxines (produites par *A. flavus*), ou la camembertine (produite par *P. camemberti* et *P. cyclopium*).

Bien que l'acide cyclopiazonique ait été identifié dans de nombreux aliments (céréales, légumineuses, viande, lait, fromages ...) très peu de mycotoxicoses animales lui sont attribuées en raison de sa faible toxicité et de sa faible teneur dans les denrées contaminées. Cependant, il faut noter qu'en raison de sa présence conjointe avec les aflatoxines, son implication réelle peut être sous-estimée. Cette hypothèse a notamment été avancée pour expliquer les symptômes observés au cours des cas de « Turkey X disease » qui se sont produits en Angleterre au début des années 1960 (Cole, 1986).

Par ailleurs, un seul cas de mycotoxicose humaine a été associé à cette toxine.

4.1. Présence d'acide cyclopiazonique dans les denrées

La présence commune d'acide cyclopiazonique et d'aflatoxine B1 a été rapportée dans de nombreuses denrées, particulièrement le maïs et les arachides, contaminés par *A. flavus* (Smith *et al.*, 1992). Ainsi, sur 45 souches d'*A. flavus* isolées à partir d'aliments pour volailles commercialisés au Portugal et testées quant à leur potentiel toxigène *in vitro*, 19 étaient capables de produire du CPA et 23 de l'AFB1, alors que 10 isolats co-produisaient du CPA et de l'AFB1. L'étude a relevé d'ailleurs que le CPA était présent dans 5 cas sur 80 (teneur moyenne de 0,16 mg/kg) contre 36 sur 80 pour l'AFB1 (teneur de 0,001 à 0,016 mg/kg) (Martins et Martins, 1999). Des résultats similaires ont été observés sur des arachides en provenance d'Argentine (Fernandez Pinto *et al.*, 2001) et différents aliments en provenance d'Inde (Bamba et Sumbali, 2005, Balachandran et Parthasarathy, 1996).

L'acide cyclopiazonique est également synthétisé par *Penicillium camembertii* qui est une moisissure fréquemment utilisée lors de l'affinage du fromage. Ainsi, la présence de CPA a été mise en évidence dans 11 croûtes de fromages commerciaux (sur 20 analysés), à des niveaux de 0,05 à 0,2 µg/g dans 8 échantillons et 0,4 ; 1 et 1,5 µg/g dans les 3 autres. Toutefois, la toxine n'a pas été détectée dans la pâte (Le Bars, 1979). Bien que toutes les souches de *P. camembertii* isolées de ces fromages semblent aptes à produire du CPA en culture, le niveau de production dépend largement de la souche et des paramètres environnementaux (milieu de culture, température, temps d'incubation). Le pourcentage de souches productrices augmente avec le temps et atteint 100% après 22 jours d'incubation à 25 °C ou après 33 jours à 13 °C et 4 °C (Le Bars, 1979).

4.2. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse de l'acide cyclopiazonique

L'acide cyclopiazonique (C₂₀H₂₀N₂O₃) est un acide indole tétramique de poids moléculaire 336 g/mol, répondant à la structure 9H-Pyrrolo(1',2':2,3) iso-indolo (4,5,6-cd) indol-9-one,10-acétyl-2,6,6a,7,11a,11b-hexahydro-11-hydroxy-7,7-diméthyl-, (6a alpha,11a beta,11b alpha)-(8Cl)(9Cl). La figure 4 ci-dessous illustre sa structure moléculaire.



Figure 4 : structure chimique de l'acide cyclopiazonique

L'acide cyclopiazonique est synthétisé par la voie des acides aminés : cette toxine dérive du tryptophane, du mévalonate et de deux molécules d'acétate (Betina, 1989).

Différentes méthodes d'analyse sont utilisées afin de détecter le CPA dans les denrées alimentaires et les fluides biologiques.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est largement utilisée afin de détecter et de quantifier le CPA dans les céréales et les produits laitiers (Martins et Martins, 1999).

Pour l'analyse dans le lait, des méthodes ont été mises au point : l'électrophorèse capillaire micellaire, la chromatographie liquide en phase inverse (Prasongsidh *et al.*, 1998a) et en, une méthode par LC-ESI/MS-MS⁴² (Losito *et al.*, 2002).

Différents dosages par chromatographie en phase liquide associés à une détection UV ont également été développés pour la détection dans les fromages (Zambonin *et al.*, 2001), les produits à base de tomates (Da Motta *et al.*, 2001) et les céréales et produits dérivés, notamment les cornflakes, où la méthode permet en outre la quantification simultanée de l'OTA et des acides mycophénoliques (Aresta *et al.*, 2003).

Des techniques ELISA permettent d'analyser le CPA dans le maïs, les muscles et le plasma (Byrem *et al.*, 1999) mais aussi le foin, l'ensilage et les fourrages (Yu *et al.*, 1999).

4.3. Propriétés toxicologiques de l'acide cyclopiazonique

4.3.1 Mécanisme d'action :

L'acide cyclopiazonique est un inhibiteur spécifique et réversible de la pompe Ca²⁺ ATP-ase du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (Seidler *et al.*, 1989 ; Burdock et Flamm, 2000). Cette enzyme régule le cycle de contraction / relaxation dans le muscle via le transport de Ca²⁺ du cytoplasme jusqu'au lumen du réticulum sarcoplasmique couplé à l'hydrolyse d'ATP.

Une étude menée sur diaphragme de souris a montré que des concentrations entre 3 et 10 µM de CPA provoquent une contraction initiale rapide suivie d'une forte augmentation du tonus musculaire (Hong *et al.*, 2003). Ces effets sont inhibés par le retrait du calcium extracellulaire mais pas par des bloqueurs des canaux calciques de type L (dépendants d'un potentiel d'action) ou des bloqueurs des canaux calciques dépendants d'un récepteur (par exemple la nifédipine) (Hong *et al.*, 2003). Une autre étude sur des fibroblastes gingivaux humains en culture démontre que le CPA diminue les stocks de calcium intracellulaire ce qui induit un influx de calcium à travers la membrane plasmique (Matsumoto *et al.*, 2003). Il semble également que le CPA agisse en diminuant l'affinité de la pompe Ca²⁺ ATP-ase pour le calcium en réduisant son activité spécifique (Martinez-Azorin, 2004).

4.3.2 Toxicologie générale :

Les principaux organes cibles de l'acide cyclopiazonique chez les mammifères sont le tractus gastro-intestinal et les reins (Cole, 1986).

Toxicité aiguë et sub-aiguë :

Les principaux symptômes rapportés à la suite à une intoxication aiguë par le CPA chez les mammifères sont des signes nerveux caractérisés par une ptose des paupières par paralysie du muscle releveur, de l'hypokinésie, de l'ataxie avec hypothermie mais aussi des tremblements, des convulsions et une diminution de la prise alimentaire (Burdock et Flamm, 2000).

Les DL50 par voie orale du CPA exprimées en mg/kg de p.c. sont les suivantes : 64 chez la souris femelle, 36 chez le rat mâle contre 63 chez le rat femelle et 12 chez le poulet et la poule.

⁴² Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem après ionisation

Les effets aigus du CPA semblent réversibles si la dose ingérée n'est pas trop élevée. Chez les rats mâles ayant reçu de 8 à 50 mg de CPA/kg par voie intrapéritonéale, la mort survient en deux heures avec des symptômes neurologiques tels que l'apathie, l'ataxie et des spasmes. Les animaux ayant reçu 2,5 et 4,5 mg/kg meurent en 1 à 3 jours. En revanche, à la dose de 0,8 mg/kg, les animaux se rétablissent des symptômes neurologiques (Burdock et Flamm, 2000).

Après administration unique ou répétée de 50 mg/kg de p.c. de CPA chez le rat, il a été observé une augmentation importante des activités enzymatiques des GPT (glutamate pyruvate transaminase) et GOT (glutamate oxaloacétate transaminase), ainsi que des GGT (gamma glutamyl transpeptidase). Ces altérations confirment l'hépatotoxicité du CPA et suggèrent son implication dans l'apparition de lésions pré-néoplasiques du foie chez le rat (Antony *et al.*, 2003).

Une étude de toxicité sub-aiguë a été conduite sur 16 porcs pendant 14 jours : chaque groupe de 4 animaux a reçu du CPA par voie orale aux doses respectives de 0 ; 0,1 ; 1 ou 10 mg/kg p.c./j. Les auteurs indiquent la présence de signes cliniques de toxicité à partir du 7^{ème} jour chez les porcs ayant reçu la forte dose : il s'agit de faiblesse, d'inactivité, d'anorexie, de pelage rêche et de perte de poids. Des diarrhées apparaissent à partir de la 2^{ème} semaine de traitement. Les animaux traités à la dose de 1 mg de CPA /kg p.c./j montrent également des signes d'inactivité et un pelage rêche à partir de la 2^{ème} semaine. A l'autopsie, seuls les animaux ayant reçu les doses de 1 et 10 mg/kg p.c./j montrent des lésions. Les lésions macroscopiques sont dominées par une atteinte digestive : ulcères gastriques, hyperémie des muqueuses et hémorragies intestinales chez les animaux traités par la forte dose et un cas d'ulcération gastrique chez un des 4 animaux ayant reçu 1 mg/kg p.c./j. Les lésions microscopiques sont les suivantes : nécrose tubulaire rénale et infiltration lipidique des lobules hépatiques périphériques chez les animaux traités par 10 mg CPA/kg p.c./j et gastro-entérite nécrosante dont la sévérité est fonction de la dose pour les animaux traités par 1 et 10 mg CPA/kg p.c./j. On observe également une nécrose des muqueuses et une inflammation de l'estomac chez 2 des 4 porcs traités à la dose de 0,1 mg/kg p.c./j (Lomax *et al.*, 1984).

Toxicité chronique :

Chez la plupart des espèces animales, les premiers signes de toxicité chronique du CPA se caractérisent par une diminution de la prise alimentaire et du gain de poids corporel. Ils apparaissent pour des niveaux d'exposition compris entre 1 et 5 mg/kg p.c./j, avec des variations selon l'âge, la voie et la durée d'administration (Byrem *et al.*, 1999).

Une étude a été menée sur 25 chiens recevant pendant 90 jours 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 2 mg de CPA /kg p.c./j par voie orale. Tous les animaux ayant reçu les doses de 1 et 2 mg/kg p.c./j et un chien ayant reçu la dose de 0,5 mg/kg p.c./j sont morts ou ont été abattus avant la fin de l'expérience. Entre 0,5 et 2 mg/kg p.c./j, les signes cliniques d'intoxication sont liés à la dose. Ils se caractérisent par de l'anorexie, des vomissements, de la diarrhée, une perte de poids et de l'abattement. L'étude lésionnelle révèle des dommages vasculaires (hyperémie, hémorragies focales) et des ulcérations au niveau du tractus gastro-intestinal, des reins, du foie, de l'épididyme et des tissus lymphoïdes. Aucun signe n'a été rapporté chez les animaux traités à 0,1 mg/kg p.c./j (Nuehring *et al.*, 1985).

Une autre étude a été conduite sur des primates non humains (singes Vervet) : un mâle a reçu par voie intra péritonéale 1 mg CPA/kg p.c./j et cette dose a été doublée tous les trois jours jusqu'à atteindre 60 mg/kg p.c./j. Par ailleurs, 20 mg CPA/kg p.c./j ont été administrés par voie orale à deux mâles et trois femelles pendant 60 et 120 jours respectivement. Les résultats de ces études ont montré que le CPA est faiblement toxique chez le primate non humain ; seules des altérations histologiques modérées du réticulum endoplasmique rugueux des hépatocytes et des vaisseaux du myocarde sont observés (Jaskiewicz *et al.*, 1988).

Reprotoxicité :

On ne peut pas conclure quant à la reprotoxicité du CPA car de nombreuses données concernant la toxicité péri- et post-natale et l'interférence potentielle avec la fertilité ne sont pas disponibles.

Toxicologie génétique et cancérogenèse :

Les résultats concernant la mutagénicité de l'acide cyclopiazonique sont contradictoires et ont fait l'objet d'une revue (Burdock et Flamm, 2000). Certaines études de mutation génique sur *S. typhimurium* TA 98 et TA 100 (Ames) donnent un résultat positif avec activation métabolique alors que des résultats négatifs avec et sans activation métabolique ont été obtenus sur ces mêmes souches.

Des impuretés ou des différences de doses pourraient expliquer ces différences. Ainsi, la mutagénicité de l'aflatoxine B1 sur test d'Ames avec activation métabolique est diminuée en présence de CPA, probablement en raison d'une inhibition de sa bioactivation (Kuilman-Wahls *et al.*, 2002). Comme le CPA inhibe également la formation de certains métabolites de la caféine et de la testostérone, il a été supposé qu'il pouvait inhiber l'activité des cytochromes P450 3A4 (Sabater-Vilar *et al.*, 2003).

4.3.3 Toxicocinétique :

L'acide cyclopiazonique est lipophile sous forme non ionisée. Il est donc susceptible de subir une absorption rapide et une distribution dans les tissus (Byrem *et al.*, 1999). L'administration de doses croissantes de CPA chez le poulet semble démontrer que plus l'animal souffre des dommages induits par la toxine, plus l'élimination de cette dernière dans la viande est lente (Norred *et al.*, 1988).

Les paramètres toxicocinétiques cités ci-dessous, obtenus le plus souvent avec de fortes doses de CPA, ne peuvent donc pas être directement utilisables pour apprécier le taux de transfert et le risque de persistance à l'état résiduel de la toxine dans les conditions naturelles d'exposition.

Du CPA marqué au ^{14}C a été administré à des rats Sprague-Dawley par voie intragastrique (5 mg/kg p.c.) et intra péritonéale (1 mg/kg p.c.) (Norred *et al.*, 1985). Les concentrations sanguines maximales ont été rapportées 6 heures après administration intragastrique et 1 heure après administration intra péritonéale. Les temps de demi-vies du CPA sont de 33 ± 12 heures lors d'injection par voie intrapéritonéale et de 43 ± 25 heures lors d'administration orale. Les organes qui concentrent le plus de radioactivité sont les poumons, le cœur, les reins, le foie et le muscle squelettique. Douze heures après l'administration, 45 à 50 % du CPA ou de ses métabolites marqués sont retrouvés dans le muscle. 72 heures après administration, 17 à 23 % de la radioactivité est éliminée dans les urines et 37 à 48 % dans les fèces. A cette échéance, le foie contient moins de 1 % de la dose administrée, quelle que soit la voie d'administration.

Le devenir du CPA a été étudié chez le porc (Byrem *et al.*, 1999). Une concentration plasmatique moyenne de 464 ng/ml a été détectée chez 3 porcs adultes ayant consommé un aliment contenant 10 mg de CPA/kg pendant 6 jours. A la fin de l'expérimentation, les muscles *longissimus* et *semitendinosus* contenaient en moyenne la même concentration en CPA que le plasma. Il convient de noter que la présence de CPA dans l'alimentation des porcs n'a pas affecté leur prise alimentaire quotidienne. L'administration intraveineuse unique de 20 mg de CPA à 3 porcs adultes a par ailleurs permis de déterminer un temps de demi-élimination de 24 heures.

Chez le poulet, la présence de CPA a été recherchée dans la viande, après administration orale de 0,5 ; 5 et 10 mg/kg p.c. (Norred *et al.*, 1988). Les niveaux de toxine les plus importants ont été trouvés dans le muscle 3 heures après administration. Pour les animaux recevant 0,5 et 5 mg/kg p.c., le CPA est éliminé rapidement de la viande en 24 à 48 heures. Les auteurs indiquent également une corrélation significative entre la perte de poids et le taux de CPA dans la viande 48h après administration de 10mg de toxine /kg pc mais pas aux autres niveaux de doses ou temps de sacrifice (24 et 96h).

Deux études ont été menées chez la poule recevant 0 ; 2,5 ; 5 et 10 mg/kg/j p.c. pendant 9 jours et 0 ; 1,25 et 2,5 mg/kg/j p.c. pendant 4 semaines (Dorner *et al.*, 1994). Les œufs de tous les animaux, quel que soit le groupe, contenaient du CPA dès le premier jour d'exposition. Les auteurs montrent que la concentration en toxine est plus élevée dans les blancs que dans les jaunes (en moyenne 100 ng/g et 10 ng/g respectivement). Des signes de toxicité ont également été rapportés. La totalité des animaux ayant reçu 10 mg/kg p.v./j et 4 animaux sur les 5 ayant reçu 5 mg/kg/j p.v. pendant 9 jours sont morts après avoir présenté une diminution de l'ingéré, du poids corporel et de ponte. Les principaux autres signes observés sont une réduction de la production d'œufs et de la qualité des coquilles.

Afin de déterminer la présence de CPA dans le lait, 3 brebis ont reçu 5 mg CPA/kg pv/j. pendant 2 jours (Dorner *et al.*, 1994). La concentration moyenne en CPA retrouvée dans le lait est de 236 ng/g (maximum à 568 ng/g), ce qui correspond à un taux de transfert inférieur à 0,6%. Aucune trace de toxine n'est détectée 9 jours après l'arrêt de l'exposition. Il convient de souligner que le CPA a un effet important sur les performances zootechniques des brebis puisque dès les premières 24h, la production laitière et la consommation alimentaire des animaux chutent brutalement. Après 48h, la production laitière est de 20% par rapport à la production normale, la fréquence respiratoire ainsi que

la température corporelle des animaux sont augmentées. Le niveau de production laitière redevient normal après 7 à 10 jours.

Ainsi, sur la base de ces études expérimentales, la toxicocinétique de l'acide cyclopiazonique révèle une persistance assez importante de la molécule et un tropisme musculaire. Cela est à mettre en relation avec la fixation de la toxine par les ATPases calcium dépendantes. Mais ces résultats ont été obtenus à partir de doses expérimentales élevées de plusieurs mg/kg pv/j et ne peuvent donc pas être directement utilisables pour apprécier le risque de persistance à l'état résiduel de la toxine dans les conditions naturelles d'exposition.

4.4. Exposition humaine

4.4.1 Effets chez l'être humain

L'acide cyclopiazonique est suspecté d'être impliqué dans une mycotoxicose aiguë chez l'Homme appelée le Kodua, qui se caractérise par une somnolence, une perte d'équilibre et des troubles nerveux. Elle résulte de la consommation de millet, et est particulièrement fréquente chez les habitants du Nord de l'Inde. Les graines de cette céréale sont souvent contaminées par *Aspergillus tamaritii* Kita, une espèce de moisissure capable de synthétiser du CPA (Lalitha Rao et Husain, 1985). C'est le seul cas suspecté connu.

4.4.2 Voies et niveaux d'exposition

L'Homme pourrait être exposé directement à l'acide cyclopiazonique à travers la consommation de céréales, maïs et arachides (cf. ci-dessus) mais aussi de certains fromages ou produits de salaisonnerie affinés par des moisissures productrices de CPA (Tabuc *et al.*, 2004) et indirectement à travers la consommation de viande, de lait et d'œufs d'animaux ayant consommé des aliments contaminés. L'éventualité de la présence de CPA a aussi été mise en évidence dans des produits à base de tomate au Brésil (Da Motta et Valente Soares, 2001) ou de citrons en Inde (Bamba et Sumbali, 2005).

Aucune donnée n'est disponible pour estimer l'exposition du consommateur français.

4.5. Exposition animale

4.5.1 Cas cliniques :

Cette toxine a été suspectée en Indonésie, chez des cailles ayant consommé une alimentation contenant jusqu'à 9 mg/kg de CPA (Smith *et al.*, 1992).

En Angleterre, Harrison en 1971 attribue la mort de 10 veaux ayant montré des tremblements puis des convulsions à la présence de CPA dans l'orge consommée (Burdock et Flamm, 2000).

Par ailleurs, l'analyse de 63 échantillons d'aliments destinés aux animaux (25 échantillons de foin et 38 échantillons d'ensilages, dont un ensilage de maïs, et de fourrages) révèle que 87,3 % contenaient du CPA, avec une moyenne de contamination de 0,34 mg/kg (Yu *et al.*, 1999). Bien que l'on ignore si cette analyse est représentative du niveau moyen de contamination des fourrages et ensilages en France, il semble que du CPA puisse fréquemment être mis en évidence dans ce type de produit sans problème apparent de santé.

De ce fait, peu de cas d'intoxications naturelles dues à l'ingestion de CPA ont ainsi été rapportés, ce résultat étant à mettre en relation avec les niveaux modestes de contamination observés dans les aliments et les doses élevées nécessaires à l'apparition de signes cliniques.

4.5.2 Etudes expérimentales menées sur animal d'élevage :

Chez le poulet de 3 semaines, l'administration de 50 mg CPA/kg d'aliment pendant 3 semaines, entraîne une diminution significative du gain de poids dès la 1^{ère} semaine d'exposition. Cette diminution laisse suggérer une toxicité cumulative : le gain de poids diminue de 22,5 % la 1^{ère} semaine, de 30,5 % la 2^{nde} semaine et de 32,6 % la 3^{ème} semaine. Il est également observé une augmentation du poids relatif du foie, des reins et du proventricule ainsi qu'une diminution significative du poids de la bourse de Fabricius. Le poids relatif des gésiers ne semble pas affecté par le traitement. Une augmentation significative de l'acide urique et du cholestérol sérique est également observée (Smith *et al.*, 1992).

Les mêmes observations ont été faites à partir d'une seconde étude sur des poulets âgés de 1 à 3 semaines recevant 34 mg CPA/kg d'aliment pendant 3 semaines (Gentles *et al.*, 1999).

Par ailleurs, une analyse rétrospective de l'épidémie de "Turkey X disease" en 1960 en Angleterre, qui avait été imputée aux seules aflatoxines, a été réalisée en 1986 par Cole. L'auteur suggère que les signes cliniques observés à l'époque n'étaient pas tous typiques d'une aflatoxicose. Aussi, tend-il à montrer l'implication de l'acide cyclopiazonique dans l'étiologie de cette affection. Il évoque par exemple la posture mortuaire des animaux (opisthotonos et pattes tendues) qui est reproduite chez le poussin de 1 jour par administration d'une dose unique de CPA (12 mg/kg p.c.) mais pas d'aflatoxine (4 mg/kg p.c.) (Cole, 1986).

4.5.3 Transfert dans les produits animaux :

Une enquête réalisée au Brésil sur du lait commercial a montré que le CPA était présent aux doses de 6,4 et 9,7 µg/L dans 2 échantillons sur les 48 analysés (Oliviera *et al.* 2006). Les auteurs concluent que la présence simultanée d'AFM1 et de CPA doit inciter à plus de vigilance à l'égard de cette mycotoxine. Spahr *et al.* (2000) considèrent, dans leur revue bibliographique consacrée au risque de transfert des mycotoxines dans le lait, que le CPA est une des rares mycotoxines dont le transfert est possible dans le lait. Mais ce taux est faible, inférieur à 1% (voir § 4.3.3)

Peu de données sont disponibles sur le transfert du CPA dans les tissus, en dehors des données de toxicocinétique préalablement citées. Par ailleurs, en raison des très fortes doses utilisées au cours de ces études (doses souvent toxiques, plusieurs mg/kg de p.c.) les paramètres de transfert observés ne peuvent pas être directement extrapolés dans les conditions naturelles d'exposition.

4.5.4 Effets du stockage et des procédés de transformation :

Le CPA semble stable au cours du stockage du lait cru à basse température ainsi que lors de sa transformation en poudre (Prasongsidh *et al.*, 1997). De même, l'autoclavage du lait contaminé n'entraîne qu'une diminution de la teneur en CPA de 33-36 % (Prasongsidh *et al.*, 1998b). La transformation du lait en yaourt entraîne une diminution de 70% de la concentration en CPA dès le premier jour qui s'explique en partie par l'acidification du milieu (Prasongsidh *et al.* 1998c). Une concentration résiduelle égale à 12% de la concentration initiale subsiste après 21 jours de conservation du yaourt. La teneur en CPA est environ 2 fois plus importante dans le caillé que dans le lait lors de sa transformation en fromage selon Prasongsidh *et al.* (1999). Cette contamination initiale s'ajoute donc à une production possible de CPA pendant la maturation de certains fromages. Un taux de transfert du CPA de 5% du lait vers du beurre (Prasongsidh *et al.*, 1999)..

Par ailleurs, du CPA peut être produit au cours du stockage des produits de salaisonnerie ; la toxine est alors stable dans le temps (Bailly *et al.*, 2005).

Conclusion

Il est peu probable que l'acide cyclopiazonique présente un risque sanitaire majeur pour l'Homme dans des conditions normales. Le risque d'exposition pourrait provenir surtout de la consommation de céréales contaminées alors que celui provenant des produits laitiers est très hypothétique. En Amérique du Nord, la présence de ce co-contaminant de l'aflatoxine B1 est considérée sans conséquence néfaste car le CPA est supposé participer à l'atténuation du danger des aflatoxines en participant à leur inhibition métabolique.

5. Les toxines trémorgènes d'*Aspergillus* et de *Penicillium*

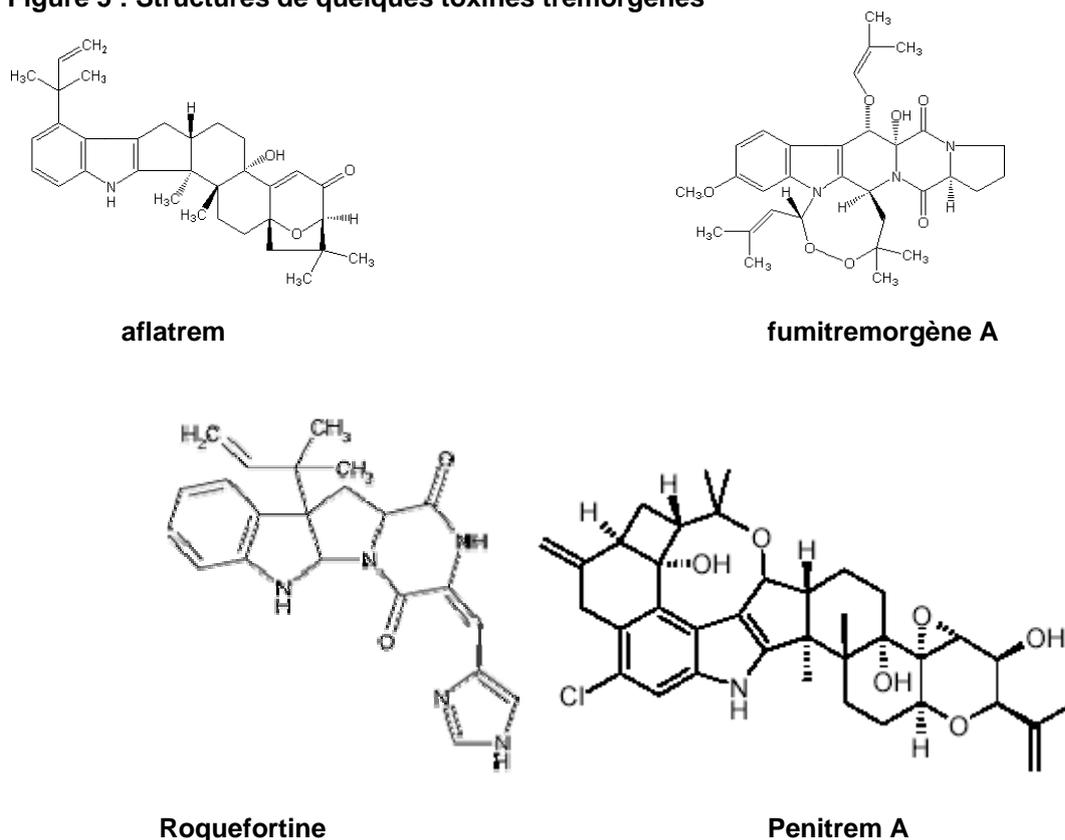
De nombreuses mycotoxines (plus d'une vingtaine) produites par *Aspergillus* et *Penicillium* possèdent des propriétés trémorgènes. Ces mycotoxines sont qualifiées de trémorgènes car elles entraînent comme manifestation principale des symptômes neurologiques qui vont des tremblements à des crises de type épileptique pouvant conduire à la mort. A ces symptômes sont associés chez l'homme une confusion mentale. Parmi les différentes toxines trémorgènes, certaines posent problème tant en santé humaine qu'en santé animale. Des cas d'intoxications ont été rapportés chez les animaux

d'élevage mais surtout chez les animaux de compagnie. Les toxines les plus souvent incriminées dans ces intoxications sont le penitrem A et la roquefortine. D'autres toxines trémorgènes comme l'aflatrem, les fumitremogènes et le verrucologène sont également étudiés. Le verrucologène apparaît comme étant la plus toxique et la plus étudiée de ce groupe de mycotoxines. Les connaissances sur les mycotoxines trémorgènes sont encore parcellaires.

5.1. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse

Les mycotoxines trémorgènes sont des indoles diterpènes de structure variée dont quelques exemples sont donnés en figure 5 .

Figure 5 : Structures de quelques toxines trémorgènes



La CCM et aussi la LC-MS permettent de détecter et de quantifier le penitrem A et la roquefortine dans des aliments (Naude *et al.*, 2002).

5.2. Facteurs favorisant le développement

De nombreuses espèces de moisissures sont capables de synthétiser des mycotoxines trémorgènes comme l'illustre le tableau suivant :

Mycotoxine	Moisissures productrices
Penitrem A	<i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Penicillium verruculosum</i> , <i>Penicillium crustosum</i>
Penitrem E	<i>Penicillium crustosum</i>
Aflatrem	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>
Roquefortine, PR toxine	<i>Penicillium commune</i> , <i>Penicillium palitans</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Penicillium roqueforti</i>
Verrucologène	<i>Penicillium verruculosum</i> , <i>Penicillium simplicissimum</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Aspergillus caespitosus</i>
Verrucosidine	<i>Penicillium verruculosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Fumitremogène A, B	<i>Penicillium brasilianum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus caespitosus</i> , <i>Neosartorya fischeri</i>

Des mycotoxines trémorgènes peuvent être produites par différentes espèces de *Penicillium* en culture à des températures allant de 4°C à 28-30 °C et après 7 à 120 jours d'incubation. Une large variété de milieux de culture peut être utilisée pour des pH initiaux allant de 3,9 à 6,8. Bien que cette gamme de situations suggère que les conditions de culture ne sont pas restrictives, elles affectent le niveau de production. Ainsi, la production de toxines serait maximale entre 20 °C et 26 °C, augmenterait avec le temps d'incubation et serait réduite lorsque la culture se fait sous agitation (Di Menna *et al.*, 1986).

Certaines mycotoxines trémorgènes ont été isolées sur du maïs, des ensilages et différents fourrages (Valdes *et al.*, 1985), également dans de la bière, du fromage frais, des noix et sur de la viande fermentée (Sabater-Vilar *et al.*, 2003).

La roquefortine et la PR toxine (pour « *P. roqueforti* toxin ») sont deux mycotoxines trémorgènes produites par *Penicillium roqueforti*, des souches de cette moisissure sont utilisées dans la maturation des fromages bleus type roquefort ou gorgonzola. La PR toxine est instable dans le fromage bleu et réagit avec l'ammoniaque et les acides aminés libres, composés présents à fortes concentrations dans cette matrice alimentaire (Arnold *et al.*, 1978). La sélection des souches non toxigènes utilisées en technologie fromagère évite la présence de toxines. Bien que *P. roqueforti* soit présent sur les céréales conservées dans des conditions acides et dans les ensilages fermentés, il semblerait que la roquefortine n'ait pas été isolée de céréales ou d'aliments destinés à l'animal (Haggblom, 1990).

5.3. Propriétés toxicologiques

Les mycotoxines trémorgènes sont neurotoxiques. Les symptômes caractéristiques d'une intoxication sont des tremblements musculaires et une hyperexcitabilité (Valdes *et al.*, 1985).

5.3.1 Mécanisme d'action :

Les mécanismes d'actions des mycotoxines tremorgènes sont complexes et incomplètement connus. Le verruculogène et le penitrem A augmenteraient la libération spontanée de glutamate et d'aspartate (neurotransmetteurs excitateurs) sur des synaptosomes isolés à partir de différentes régions cervicales de rats et de moutons. Elles diminuent par ailleurs la libération de GABA, neuromédiateur inhibiteur. Ces effets apparaissent dans les tissus sub-corticaux et sont totalement réversibles.

L'aflatre modulerait également la libération de neurotransmetteurs mais serait aussi capable à faible dose d'induire une dégénérescence du processus neuronal au niveau des systèmes de neurotransmetteurs de l'hippocampe (Norris *et al.*, 1980 ; Valdes *et al.*, 1985 ; Bradford *et al.*, 1990).

Une anesthésie aux barbituriques bloque les effets de doses létales de trémorgènes tandis que le diazépam diminue les tremblements sans les arrêter totalement. Ce dernier résultat montre que cet anxiolytique anticonvulsif n'a pas d'action spécifique sur les trémorgènes. En effet, les barbituriques auraient un effet pré synaptique sur l'inhibition GABA-ergique tandis que le diazépam augmente l'efficacité des synapses au neurotransmetteur GABA en agissant sur ses récepteurs. Ainsi, en se liant à une sous-unité spécifique du récepteur GABA, les benzodiazépines ne stimulent pas directement le récepteur mais le rendent plus efficace d'où la diminution et non l'inhibition complète de l'activité nerveuse (Peterson *et al.*, 1982).

5.3.2 Toxicocinétique :

Peu d'études sur la toxicocinétique des toxines tremorgènes sont disponibles. Chez le rat, le verruculogène radiomarqué se distribuerait dans de nombreux tissus, notamment les reins, le cœur, les intestins et différentes régions cervicales mais s'accumule préférentiellement dans le foie avant de subir une excrétion biliaire (Perera *et al.*, 1982).

Chez le mouton, 2 heures après l'administration intra-veineuse de 75 µg/kg p.v. de verruculogène radiomarqué au ¹⁴C à un animal pré-traité au barbiturique afin d'éviter les tremblements et les convulsions, 28 % de la toxine ont été retrouvés dans le foie et l'intestin grêle, 0,5 % étant excrété dans les urines. Quelques traces de radioactivité ont été détectées dans le cortex et le corpus striatum (Perera et Mantle, 1982). Le verruculogène est métabolisé dans le foie en quatre métabolites plus hydrophiles, qui sont ensuite excrétés par voie biliaire. Aucun composé glucuronocconjugué n'est retrouvé (Laws *et al.*, 1987).

5.3.3 Toxicité aiguë et sub-aiguë :

Le tableau suivant illustre la toxicité aiguë de certaines mycotoxines trémorgènes (d'après Peterson *et al.*, 1982) :

Mycotoxine	Toxicité
Penitrem E	2,25 mg/kg ip* souris : tremblements
Aflatrem	0,5 mg/kg ip* souris : tremblements
Penitrem A	250 µg/kg ip* souris : tremblements DL ₅₀ souris = 1,05 mg/kg 24 – 25 µg/kg vo mouton: létal 2,2 – 4,4 µg/kg iv* mouton : tremblements
Roquefortine	1/10 ^{ème} de l'activité du penitrem A
Verruculogène	3,0–4,0 µg/kg vo* mouton : tremblements 13,3 µg/kg vo* mouton : létal DL ₅₀ = 2,4 mg/kg ip*
Fumitremorgène	1/10 ^{ème} de l'activité du verruculogène

* administrations par voie : intra-péritonéale : ip, intra-veineuse : iv , orale : vo.

Chez le rat, 2,5 mg/kg pc de verruculogène administrés par voie intra-veineuse entraînent des tremblements et de l'incoordination motrice dans les 6 à 25 minutes suivant l'injection. Les symptômes deviennent plus sévères après 25 minutes.

Chez le veau, les principaux troubles observés sont: tremblements, ataxie, rigidité musculaire et épisodes convulsifs. Des augmentations significatives des concentrations plasmatiques d'acide lactique, acide pyruvique, de glucose et de l'activité de la créatine phosphokinase sont rapportés. Ces modifications plasmatiques ont été interprétées comme étant le résultat d'effets secondaires de l'intoxication. Le seul changement microscopique observé dans les tissus est une accumulation de lipides au niveau du foie (Cysewski, 1975).

Chez le chien, après administration intrapéritonéale de penitrem A, aucun trouble n'est observé à la dose de 0,125 mg/kg alors que des tremblements et une crise convulsive apparaissent en 10 minutes à la dose de 0,5 mg/kg (Hayes *et al.*, 1976). Une nécrose hépatique massive est notée chez les chiens recevant de 2,5 à 5 mg/kg. Un traitement aux barbituriques fait régresser rapidement les signes cliniques, les paramètres plasmatiques retrouvant également leur valeur normale.

Une étude comparative a été menée sur des moutons et des porcs ayant reçu respectivement du verruculogène et du penitrem A. Des doses orales de verruculogène allant de 3,0 à 4,0 µg/kg induisent des tremblements moyens à forts chez le mouton. Ce même degré de tremblements est observé chez le porc pour des doses de 6,0 à 8,2 µg/kg (Peterson *et al.*, 1982). La dose de verruculogène la plus élevée, 13,3 µg/kg, est létale pour le mouton par défaillance respiratoire et circulatoire faisant suite aux convulsions. En revanche, chez le porc, cette dose provoque des tremblements sévères mais l'animal commence à se rétablir après 2 heures. Le penitrem A apparaît comme moins toxique puisqu'il faut des doses de 24 µg/kg chez le porc et de 25 µg/kg chez le mouton pour produire des tremblements de même sévérité que ceux observés avec 13,3 µg/kg de verruculogène. L'administration répétée de cette toxine ne permet pas de mettre en évidence une augmentation des effets observés (Peterson *et al.*, 1982).

La roquefortine provoque des crises d'épilepsie lorsqu'elle est administrée par voie intra-péritonéale à des souris mais à des doses très élevées, de 50 à 100 mg/kg pc. La PR toxine a une DL₅₀ de 11 mg/kg chez le rat et de 5,8 mg/kg chez la souris. La PR toxine réagissant avec l'ammoniaque et les acides aminés libres, présents à fortes concentrations dans le fromage bleu, les dérivés formés à partir de cette toxine ont également été étudiés : leur toxicité aiguë par voie intra-péritonéale est considérablement plus faible que celle du composé parent (Arnold *et al.*, 1978).

5.3.4 Toxicologie génétique :

La génotoxicité de 5 mycotoxines trémorgènes (fumitremorgène B, paxilline, penitrem A, verruculogène et verrucosidine) isolées de viandes fermentées a été évaluée par des tests de mutations géniques (sur *S. Typhimurium* et MLA/TK sur cellules de mammifères) ainsi que par un test d'altération primaire de l'ADN (comète sur lymphocytes humains) (Sabater-Vilar, 2003). A l'exception du penitrem A, toutes les mycotoxines analysées présentaient un certain niveau de génotoxicité :

- la verrucosidine est apparue comme ayant le potentiel génotoxique le plus important : les résultats du test d'Ames sur souche TA1538 après activation métabolique et du test de comète sur lymphocytes humains sont positifs,
- le verruculogène est positif sur test d'Ames, avec les souches TA1537, TA1535, TA1538 et TA98 après activation métabolique et sur souches TA1537, TA1535, TA1538 et TA100 sans activation métabolique,
- le fumitrimorgène B a donné des résultats positifs sur le test comète.

Seul le verruculogène a été étudié *in vivo*. Cette mycotoxine n'inhibe pas la réplication cellulaire dans la moelle osseuse de souris NMRI (Sabater-Vilar, 2003).

5.4. Exposition humaine

5.4.1. Effets sur la santé humaine (données épidémiologiques)

Un cas d'encéphalopathie chez un jeune homme exposé à de fortes concentrations de poussières issues d'un ensilage de céréales moisies a été rapporté (Gordon *et al.*, 1993). Les symptômes observés consistaient en une démence et des tremblements caractéristiques. Ces troubles ont disparu en une semaine. En l'absence d'autres hypothèses de source(s) pouvant induire ces symptômes, les auteurs ont conclu à une intoxication due à l'inhalation de mycotoxine(s) trémorgène(s). C'est le seul cas rapporté de mycotoxicose susceptible d'être relié à ces toxines.

5.4.2. Exposition de l'Homme

La roquefortine a pu être retrouvée dans les fromages de type bleu à des concentrations pouvant atteindre 6,8 mg/kg (Scott *et al.*, 1977). L'utilisation de souches non toxigènes en technologie fromagère évite la présence de cette toxine. Certaines autres toxines trémorgènes (penitrem A en particulier) peuvent être synthétisées à la température du réfrigérateur et/ou à température ambiante habituelle sur de nombreux substrats : pain, fromages frais, noix et cacahuètes, pâtes et riz cuits, déchets alimentaires divers ...

Néanmoins il n'y a pas de données récentes suffisantes pour estimer l'exposition humaine.

5.5. Exposition animale

La plupart de ces intoxications naturelles dues aux mycotoxines trémorgènes produites par *Penicillium* et *Aspergillus* concernent les animaux de compagnie et plus particulièrement les chiens.

5.5.1 Chez le chien

Le penitrem A et la roquefortine sont le plus souvent incriminés. La sensibilité de l'espèce canine à la toxicité aiguë du Penitrem A est connue depuis de nombreuses années. En l'absence de traitement, une dose de 0,5 mg/kg pc est mortelle en quelques heures (Hayes *et al.*, 1976), et les nombreux cas d'intoxication naturelle décrits dans la littérature soulignent la fréquence élevée de l'exposition (liée au comportement détritivore) et la particulière sensibilité des chiens à cette toxine.

La première description (Arp et Richard, 1979 ; Richard et Arp, 1979), se réfère au cas de deux jeunes chiens (âgés de 3 mois et un an) ayant consommé du fromage frais, qui après avoir été conservé trop longtemps au réfrigérateur, et jeté (car moisi), fut récupéré dans la poubelle par les deux chiens puis consommé par eux. S'en sont suivis des vomissements et d'un syndrome neurologique avec tremblements et crise convulsive.

La seconde description se réfère à un cas d'intoxication faisant suite à la consommation de noix moisies (car laissées sur le sol tout l'hiver après la récolte et envahies de moisissures) (Richard *et al.*, 1981). Les mêmes désordres neurologiques sont observés. Dans ces 2 observations initiales faites aux Etats-Unis, la moisissure responsable (*Penicillium crustosum*) et la toxine (penitrem A) ont été identifiées mais aucune quantification de cette dernière n'a pu être réalisée.

Un troisième cas a été rapporté (en Australie) chez un jeune chien ayant consommé un petit pain moisi (Hocking *et al.*, 1988). Le même tableau clinique de type convulsif est observé. Une concentration de 35 µg/g de penitrem A y a été retrouvée dans le reliquat de pain, mais pas de verruculogène. La quantité globale de penitrem A consommée par ce chien a été estimée à 3,5 mg soit environ 175 µg/kg p.c. La consommation d'un fromage à pâte bleue altéré a également conduit à un tableau clinique voisin (tremblements, spasmes tétaniformes, opisthotonos) associé à la présence de roquefortine (Puls et Ladyman, 1988).

Un cas faisant suite à la consommation de riz contaminé par *Penicillium crustosum* a été rapporté chez deux chiens en Afrique du Sud en 2002. L'analyse de cet aliment a révélé la présence de 2,6 µg/g de penitrem A et 34 µg/g de roquefortine. Le riz incriminé était resté durant un temps indéterminé dans un réfrigérateur et était couvert de moisissures gris-vert. Les deux chiens intoxiqués ont développé des signes caractéristiques peu de temps après l'ingestion : vomissements, salivation, tremblements, ataxie. Cependant aucune quantification précise de la quantité de mycotoxine effectivement consommée par chaque animal n'a pu être réalisée (Naudé *et al.*, 2002).

Un cas d'intoxication concernant 4 chiens provenant d'un même foyer a été observé aux Etats-Unis. Un tableau clinique dominé par des manifestations convulsives a été décrit suite à la consommation de déchets ménagers altérés. Le diagnostic a été confirmé par l'analyse du contenu stomacal d'un des chiens. Du penitrem A ainsi que de la roquefortine C ont pu être identifiés (Boysen *et al.*, 2002). Un cas d'intoxication assez similaire (avec polypnée, tachycardie et ataxie) a été décrit au Canada (Walter, 2002).

Young *et al.* (2003) ont décrit l'intoxication de 2 chiens ayant consommé des aliments trouvés dans les ordures ménagères et contenant de la roquefortine et du penitrem A. Suite à l'ingestion, les chiens ont développé des tremblements musculaires et des crises d'épilepsie. La roquefortine C a été retrouvée majoritairement dans le fromage frais (37 µg/g et seulement 3,5 µg/g de penitrem A) consommé par le premier chien et seul le penitrem A a été retrouvé dans les macaronis et le fromage (20 à 50 µg/g) consommés par le second. Les signes cliniques d'intoxication ont régressé en 24 à 48 heures.

En définitive, du fait de leur comportement détritivore, c'est-à-dire de consommateurs occasionnels de denrées alimentaires familiales altérées et éliminées sans précaution, de déchets ou de restes alimentaires laissés à disposition, les carnivores domestiques, et notamment le chien, sont particulièrement exposés au risque lié à la présence de ces mycotoxines. Le syndrome convulsif qui domine le tableau clinique rétrocede facilement en moins de 48h à la suite d'un traitement sédatif (pentobarbital) mis en place précocement, associé à un éventuel lavage d'estomac et à une fluidothérapie.

5.5.2 Chez les ruminants

Les intoxications avec des effets trémorgènes chez les animaux de rente sont le plus souvent dues aux mycotoxines trémorgènes produites par *Neotyphodium* (toxines d'endophytes) et *Claviceps* (cf.chapitres spécifiques).

En février 1975, une neurotoxique trémorgénique a décimé un troupeau de bovins au Transvaal du nord (région du nord-est de l'Afrique du Sud). Les symptômes de la maladie ont été une incoordination, une démarche raide des postérieurs, des trémulations généralisées des muscles striés accompagnées de parésie ou paralysie et de constipation. A l'autopsie, une dégénérescence et une nécrose dans certains muscles striés, des hémorragies des séreuses et une stase gastro-intestinale ont été observées. Après analyse du contenu de la nourriture de ces animaux, la présence d'*Aspergillus clavatus* dans des résidus de sorgho utilisés dans le brassage de la bière, a été mise en évidence sans déterminer toutefois la nature exacte de la toxine responsable. Les auteurs notent que celle-ci n'est ni la patuline, ni la tryptoquivaline, ni aucune autre substance trémorgène connue (Kellerman *et al.*, 1976).

Aspergillus clavatus a également été incriminé dans une neurotoxique létale (96 % de mortalité) chez un troupeau de moutons ayant consommé des grains d'orge contaminés. Les signes cliniques rapportés sont des tremblements, une boiterie, une démarche anormale, une paralysie puis la mort de l'animal dans les 17 jours (Shlosberg *et al.*, 1991).

Conclusion

Les intoxications par des mycotoxines trémorgènes produites par *Aspergillus* et *Penicillium* sont principalement observées chez le chien. Chez les ruminants, la toxicité aiguë de ces composés est importante, mais peu d'informations existent quant à leur toxicité chronique ou au risque de transfert dans les productions. Chez l'homme, si les intoxications aiguës sont rares en raison du caractère très altéré des aliments contaminés à de fortes teneurs, il est difficile d'estimer un niveau réel d'exposition.

Il serait donc important de : i) préciser les dangers d'une exposition chronique à ces composés et leur caractère génotoxique, ii) disposer de données sur leur transfert dans les productions, principalement lors d'exposition des ruminants à de faibles teneurs, iii) estimer les niveaux de contamination des produits connus pour leur contamination possible par ces moisissures.

6. Les sporidesmines

Les sporidesmines sont synthétisées par *Pithomyces chartarum*. Elles contaminent l'herbe destinée à la pâture et sont à l'origine de la sporidesmiotoxicose, maladie communément appelée «eczéma facial des ruminants» car elle touche les ovins, les bovins et moins fréquemment les caprins. Cette affection est endémique au Pays Basque en France et décrite dans différents pays dont la Nouvelle Zélande, l'Australie, l'Afrique du Sud, l'Uruguay, l'Argentine, les îles des Açores Portugaises (Bezille, *et al.*, 1984 ; Bonnefoi *et al.*, 1988 ; Cheeke *et al.*, 1995 ; Guerre *et al.*, 1998 ; Le Bars *et al.*, 1996 ; Pinto *et al.*, 2002). D'un point de vue clinique, elle évolue en deux phases, l'atteinte cutanée est postérieure à une insuffisance hépatique brutale. Elle entraîne une diminution des performances (chute de production de lait et de la vitesse de croissance des agneaux, augmentation du taux de réforme) dont l'importance est difficile à évaluer en France. Par contre, l'impact économique de l'eczéma facial en Nouvelle Zélande, pays le plus touché par la maladie, était estimé en 2003, à 100 millions de dollars par an (*Media Statement Of Association of Crown Research Institute*, 2003).

Les moyens de lutte contre la maladie reposent essentiellement sur une prophylaxie défensive, relativement onéreuse et ne permettant pas son éradication totale.

6.1. Facteurs favorisant le développement

Les sporidesmines apparaissent avec les premières pluies d'automne faisant suite à un été chaud et sec, sur des prairies dites «à risque». Il s'agit le plus souvent de Dactyle, de Ray Grass, et parfois de Trèfle blanc. L'absence de fauche au cours de l'année et le surpâturage en septembre sont des facteurs additionnels de risque (Bezille *et al.*, 1984 ; Bonnefoi *et al.*, 1988 b).

L'herbe morte où se développe la moisissure, que l'on trouve au ras du sol dans les pâtures, constitue le seul mode d'intoxication des ruminants. Jusqu'à présent, la maladie n'a pourtant été observée que dans un nombre restreint de pays dans lesquels les souches toxigènes sont probablement plus fréquentes. De plus, *Pithomyces chartarum* se développe particulièrement dans des conditions de humidité élevée (100 %) à température optimale de 20 à 25 °C et (Le Bars *et al.*, 1990).

La production de toxines est généralement proportionnelle à la sporulation du champignon ; ainsi la contamination des pâtures est estimée en comptant les spores récoltées par divers moyens mécaniques (Bonnefoi *et al.*, 1988 b). Ces dernières sont noires ou brun noirâtres, rugueuses, de 8 à 20 µm x 10 à 30 µm. Au laboratoire, le champignon montre de fortes variations morphologiques en culture, ce qui rend parfois délicate son identification. Cependant, certaines souches ne produisent pas de toxines bien qu'ayant une intense sporulation. Un résultat supérieur à 200 000 spores par gramme d'herbe humide est considéré comme niveau d'exposition aiguë entraînant un syndrome tandis qu'un résultat allant de 80 à 100 000 spores est considéré comme «niveau dangereux». L'exposition chronique doit également être prise en considération car un animal nourri par l'herbe d'une pâture contenant 40 000 spores par gramme sur une longue période est susceptible de développer un eczéma facial (Dinger *et al.*, 1999).

6.2. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse

La synthèse des sporidesmines passe probablement par la condensation du L-tryptophane avec la L-alanine qui conduit à diverses molécules (sporidesmines A, B, C, D, E, F, G, H, I et J de masses moléculaires comprises entre 450 et 500) dont les proportions relatives peuvent varier d'un isolat à l'autre. La sporidesmine A représente généralement plus de 80 % de la production totale (Bonnefoi et Sauvagnac, 1988).

Les sporidesmines sont des dicétopipérazines aromatiques chlorées contenant un pont disulfure, en relation probable avec une toxicité membranaire qui s'observe facilement *in vitro* et expérimentalement chez les animaux de laboratoire.

La figure 6 illustre la structure moléculaire de la sporidesmine A (masse moléculaire : 473,05 g/mol). Ces toxines sont très hydrophobes et particulièrement instables en solution alcoolique ou aqueuse.

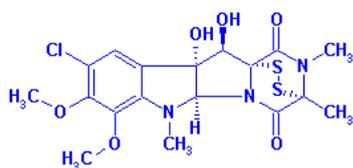


Figure 6 : structure chimique de la sporidesmine A

La spectrophotométrie UV à 254 nm permet de doser la sporidesmine A en solution pure tandis que la spectroscopie infra-rouge permet de différencier les différentes sporidesmines entre elles (Ronaldson *et al.*, 1981).

Des méthodes sont utilisables pour identifier et doser les sporidesmines à partir de culture pure de *Pithomyces chartarum*. Toutefois, aucune méthode ne permet de les détecter directement dans un prélèvement d'herbe.

6.3. Propriétés toxicologiques

6.3.1 Mode d'action

L'eczéma facial se caractérise par une photosensibilisation et un ictère secondaires à d'importantes altérations hépatiques. Les sporidesmines sont parmi les molécules les plus hépatotoxiques pour les ruminants. L'aspect biphasique de la pathologie a été facilement reproduit dans des conditions expérimentales chez le mouton après administration orale d'une dose unique de toxines (Bonnefoi et Sauvagnac, 1988).

La réactivité moléculaire de ces toxines est liée à une réaction d'échanges d'électrons avec d'autres thiols, suivie de l'auto-oxydation de leurs thio-dérivés. Les sporidesmines sont capables, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, d'initier une série de réactions radicalaires aboutissant à la génération d'anion superoxyde et de radical hydroxyde. La réaction est activée par de faibles concentrations d'ions Cu²⁺ ou Fe²⁺ ; alors que le Zn²⁺ est inhibiteur. Il a été montré que le fer et surtout le cuivre catalysent fortement l'auto-oxydation de la sporidesmine réduite *in vitro*. Le zinc, au contraire, se fixe à un métabolite de la sporidesmine, empêchant ainsi son auto-oxydation. Il réduit en outre l'absorption du cuivre et ainsi la quantité de cuivre disponible dans le foie pouvant catalyser l'oxydation de la toxine (Bonnefoi et Sauvagnac, 1988 ; Bonnefoi *et al.*, 1988 b; Dinger *et al.*, 1999).

6.3.2 Toxicocinétique et cibles principales

La sporidesmine A est absorbée au niveau du tractus digestif et éliminée par voie biliaire et urinaire. Les concentrations biliaire et urinaire sont respectivement 100 et 10 fois supérieures à la concentration plasmatique.

La forte excretion biliaire explique probablement l'atteinte hépatique. Les sporidesmines détruisent les membranes cellulaires avec lesquelles elles entrent en contact par un mécanisme de peroxydation lipidique. Les membranes canaliculaires des hépatocytes et les membranes apicales des cellules pariétales des canaux biliaires sont les plus touchées. Les mêmes observations ont été rapportées au niveau des reins, mais à un degré moindre.

La cholestase, résultant de l'atteinte hépatique, empêche l'élimination de la phylloérythrine, produit de dégradation de la chlorophylle par la microflore du rumen, qui s'accumule alors dans l'organisme. Ce composé circule donc dans le sang jusqu'aux vaisseaux capillaires de la peau. Comme il s'agit d'un pigment photodynamique, il devient réactif après exposition aux rayonnements ultra-violet du soleil et provoque de ce fait la destruction des membranes des cellules cutanées et des muqueuses exposées (Bonnefoi et Sauvagnac, 1988 ; Dinger *et al.*, 1999, Phua *et al.*, 1998).

6.3.3 Autres actions

Des études de toxicologie génétique *in vitro* et *in vivo* ont été menées en 1992 par Ferguson *et al.* Les résultats ont démontré l'absence de pouvoir mutagène de la sporidesmine A purifiée dans le test d'Ames sur les souches TA98, TA100, TA102 et TA1537. En revanche, la sporidesmine A est considérée comme un clastogène potentiel *in vitro* (sur cellules hamster chinois, CHO). Ces derniers résultats n'ont pas été confirmés *in vivo* par le test de micronoyaux chez le mouton. Les auteurs ont ainsi conclu que la sporidesmine n'est pas clastogène pour cette espèce (Ferguson *et al.*, 1992). Elle ne l'est pas non plus pour la souris (Munday *et al.*, 1993). Il semble que le métabolisme jouerait un rôle dans la protection des effets clastogènes de la sporidesmine A sur l'animal vivant.

En 1990, Waring *et al.* ont rapporté que la sporidesmine A pouvait induire de l'apoptose *in vitro* sur des macrophages et des lymphocytes T de souris. Cependant, aucune étude n'a montré qu'elle induit ce même processus dans les hépatocytes et il n'est pas certain que ce phénomène se produise *in vivo*.

A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant les effets cancérogènes des sporidesmines ni chez les ruminants, ni chez les animaux de laboratoire.

6.4. Exposition humaine

Le risque sanitaire pour l'homme est très mal connu, puisque peu d'informations sont disponibles sur le passage dans les produits animaux.

6.5. Exposition animale

6.5.1. Effet sur la santé animale : l'eczéma facial des ruminants

Un eczéma facial a été observé sur des moutons, des vaches, des chèvres, des daims et des lamas ayant ingéré de l'herbe contaminée (Bonnefoi et Sauvagnac, 1988 ; Coulton *et al.*, 1997). Les ovins et les bovins sont les animaux les plus touchés par l'eczéma facial. L'espèce la plus sensible est le lama, suivi du daim et du mouton. Le bétail laitier, les boeufs et les chèvres sont moins sensibles à la maladie.

La morbidité est extrêmement variable (0 à 100 %) en fonction du troupeau et de l'année ; il en est de même pour la mortalité. Dans certains cas, 18 % des animaux d'un troupeau sont affectés, avec 31 % des animaux présentant des signes cliniques et 14 % de mortalité (Pinto *et al.*, 2002). Dans d'autres circonstances, le taux de pertes peut atteindre 70 %. Le taux de mortalité chez les agneaux est couramment 20 % (Dinger *et al.*, 1999). Diverses hypothèses sont avancées pour expliquer les divergences observées : hétérogénéité des habitudes alimentaires, hétérogénéité de la distribution de la moisissure dans les pâtures, existence d'un facteur de résistance d'origine génétique ...

D'un point de vue clinique, l'inflammation œdémateuse faisant suite à l'apparition de l'érythème débute généralement par les oreilles pour s'étendre à toutes les régions dépigmentées : les paupières, les orifices nasaux. La respiration est bruyante et difficile, la prise de nourriture est douloureuse. L'inconfort de l'animal est d'autant plus important que la vulve et les mamelles peuvent également être touchées, ce qui gêne parfois la miction et interdit la traite mécanique. Ces symptômes régressent lorsque les animaux sont mis à l'abri de la lumière, avec ou sans traitement médical.

En l'absence de traitement, la deuxième phase de la maladie se met alors en place après quelques jours. Elle se caractérise par l'apparition d'une dermatite croûteuse prurigineuse et d'une surinfection bactérienne qui produit des sécrétions plus ou moins purulentes. La cicatrisation est très lente.

Les activités des enzymes hépatiques telles que la phosphatase alcaline (PAL) et la gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) peuvent être multipliées par plus de dix. La recherche d'une très forte augmentation de la GGT, permettant d'évaluer la sévérité des atteintes hépatiques, a d'ailleurs été proposée comme un test de dépistage des animaux atteints sans photosensibilisation. Dans un troupeau, la fréquence des signes cutanés peut n'affecter que 1 à 10 % des animaux tandis que la biochimie sérique révèle que plus de 50 % présentent des lésions hépatiques. Cet élément se traduit par des pertes de production particulièrement insidieuses (Bonnefoi *et al.*, 1988a). La production de laine diminue chez le mouton de même que la production de lait chez les brebis et les vaches. Aucun

avortement n'a été constaté lors de ces deux phases ; en revanche, on note une diminution de la fertilité et de la fécondité (Bonnefoi *et al.*, 1988ab).

En présence d'une enzootie déclarée, l'éleveur peut traiter ses animaux ou les abattre. Le traitement est non spécifique. Il consiste à retirer l'animal du pâturage et à le placer à l'ombre, puis à lui fournir une alimentation à forte digestibilité afin de faciliter la régénération hépatique. Un traitement symptomatique des lésions cutanées et du prurit est mis en place. Il est recommandé de tarir les animaux en lactation afin de prévenir l'apparition de mammites. L'administration orale de sulfate de zinc est efficace pour limiter la toxicité des sporidesmines. En Nouvelle Zélande la sélection d'individus génétiquement résistants a été proposée (Morris *et al.*, 1995 ; Phua et Crawford, 1998 ; Phua *et al.*, 1998).

6.5.2. Persistance à l'état résiduel

Aucune donnée concernant l'éventuelle excrétion lactée des toxines ni une éventuelle persistance à l'état résiduel dans les tissus n'est disponible à ce jour. Cependant, les propriétés physico-chimiques des sporidesmines (composés basiques, très peu hydrosolubles) suggèrent qu'elles pourraient être retrouvées dans le lait d'animaux consommant des aliments contaminés. Bien qu'aucune preuve n'existe, il convient toutefois d'éliminer de la distribution tout lait issu d'animaux présentant une suspicion de toxicose (Guerre *et al.*, 2000).

Conclusion

Bien que l'affection observée en France soit moins grave que celle couramment rencontrée en Nouvelle Zélande, Afrique du Sud ou Australie, la présence de sporidesmines dans l'alimentation animale présente un réel problème sanitaire pour certaines productions, notamment les ovins. Le risque sanitaire pour l'homme est très mal connu, puisque peu d'informations sont disponibles sur le passage dans les produits animaux. Il serait donc important de connaître le devenir des sporidesmines chez l'animal et notamment de mettre en place des recherches sur le transfert dans le lait.

7. Les stachybotryotoxines

Les stachybotryotoxines sont des mycotoxines synthétisées par *Stachybotrys chartarum* (synonymes *Stachybotrys atra*, *S. alternans*) appartenant à la famille des trichothécènes macrocycliques. Il s'agit des satratoxines, isosatratoxines F, G, H, roridine E et verrucarine J. Ces toxines sont responsables de la stachybotryotoxicose, observée principalement chez les chevaux, qui sont les animaux les plus sensibles, suivis des bovins, des porcins et des ovins. Cette affection est décrite dans de nombreux pays même si elle s'observe surtout en Europe de l'Est, en Hongrie notamment. La stachybotryotoxicose est également présente en France, en particulier au sud de la Loire. Chez les équidés, des signes cutanéomuqueux de nécrose, limités à la face, sont suivis par des signes systémiques graves, associés à une neutropénie et à une thrombopénie. Dans sa forme chronique la plus typique, la maladie évolue en un mois vers la mort. Dans les cas d'intoxications aiguës, la mort peut survenir en quelques heures.

En santé humaine, *Stachybotrys chartarum* est responsable de troubles pulmonaires, secondaires à l'inhalation de spores. Cet aspect sanitaire de la toxicité de la moisissure hors voie alimentaire ne sera pas traité dans ce rapport.

7.1. Facteurs favorisant le développement

Stachybotrys chartarum est un champignon saprophyte qui se développe sur les matériaux riches en cellulose tels que les ensilages, le foin et surtout la paille mal stockés. Cette dernière source est d'ailleurs responsable de la plupart des stachybotryotoxicoses animales. La moisissure a été également identifiée sur orge, blé, canne à sucre, pois, coton et ray grass. Bien que la contamination survienne le plus souvent dans les climats continentaux (Europe de l'Est surtout), elle s'observe également dans les régions à climat doux et chaud : cas rapportés au Sud Ouest de la France et plus

récemment au Maroc (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994). *Stachybotrys chartarum* est donc thermo-tolérant, il sporule de 2 à 40 °C, mais ne se développe que lorsque l'humidité est supérieure à 80%. Les satratoxines, toxines majoritairement produites, ne sont synthétisées que lorsque l'humidité atteint 100 % (Nikulín *et al.*, 1994). La fréquence des souches toxigènes est variable selon les pays et relativement faible en France (15%) (Le Bars *et al.*, 1991). Ces différences expliquent les différences de toxicité observées (Andriienko *et al.*, 1997).

Stachybotrys chartarum est une moisissure noire verdâtre ; les brins de paille contaminés apparaissent de ce fait beaucoup plus foncés que les brins sains. Un diagnostic différentiel doit être réalisé avec l'anthraxose, il n'est possible que par examen à la loupe binoculaire. Une détection spécifique de *S. chartarum* dans des cultures pures peut être réalisée par PCR quantitative (Cruz-Perez *et al.*, 2001).

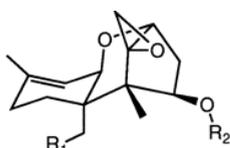
Les résultats d'une étude récente ont montré que deux chemotypes de *S. chartarum* existent : cha-A et cha-S. Leur phylogénie et leurs profils métaboliques permettent de les différencier : en effet, seul le chemotype S (cha-S) produit des trichothécènes macrocycliques (Andersen *et al.*, 2003). Une étude ancienne a montré que 80 % des souches isolées de cas de stachybotryotoxicose observés chez les animaux de ferme en Europe de l'Est en produisaient (Jarvis *et al.*, 1986).

7.2. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse

En 1973, Eppley et Bailey ont été les premiers à isoler les trichothécènes macrocycliques produits par *Stachybotrys chartarum*. Cette moisissure élabore une large variété de molécules : principalement des satratoxines F, G et H et en quantité moindre des isosatratoxines F, G et H, roridine E, et verrucarine J. Généralement les souches de *S. chartarum* produisent 40 à 70 % de satratoxine H pour 30 à 40 % d'autres trichothécènes macrocycliques (Bata, *et al.*, 1985). Les satratoxines sont donc considérées comme les plus délétères des toxines produites par la moisissure même si la quantité totale de toxines synthétisée est relativement faible : inférieure à 10 mg/kg (Jarvis *et al.*, 1986 ; Nelson *et al.*, 2001).

Un nouveau métabolite, l'hydroxyroridine E, a été identifié récemment (Andersen *et al.*, 2003).

S. chartarum produit en outre des trichothécènes simples, notamment la trichodermine et le trichodermol, qui sont des précurseurs des trichothécènes macrocycliques. La figure 7a illustre la structure de ces deux molécules.



Trichodermol: $R_1 = R_2 = H$

Trichodermin: $R_1 = H; R_2 = Ac$

Figure 7a : structures des précurseurs des trichothécènes macrocycliques

Les trichothécènes macrocycliques sont des lactones époxydées. Ce sont des molécules neutres, liposolubles et très peu hydrosolubles. La satratoxine H est la plus polaire des toxines produites. Elle est insoluble dans l'eau et soluble en solution alcoolique et dans des solvants organiques polaires tel que le méthanol. La figure 7b illustre notamment sa structure (masse moléculaire : 5281).

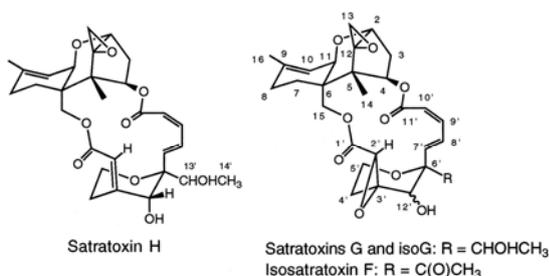


Figure 7b : Structures de la satratoxine G, satratoxine H, et isosatratotoxines F et G

Les trichothécènes macrocycliques de *S. chartarum* possèdent un maximum d'absorption dans l'UV compris entre 255 et 262 nm, caractéristique du butadiène conjugué (Harrach *et al.*, 1981 et 1982). L'hydrolyse des trichothécènes macrocycliques conduit à l'obtention d'un alcool unique, le verrucarol.

Bien qu'il n'existe aucune méthode de référence et qu'aucune technique de dosage ne permette l'identification directe dans les aliments ou la recherche de résidus, de nombreuses méthodes sont utilisables pour identifier et doser les stachybotryotoxines à partir d'un extrait méthanolique concentré de culture de *Stachybotrys chartarum*. La chromatographie sur couche mince permet de détecter les différentes toxines synthétisées tout en les séparant (Bata *et al.*, 1985 ; Jarvis *et al.*, 1986). La chromatographie liquide haute performance et la chromatographie en phase gazeuse couplées à une détection par spectrométrie de masse ou barrette de diodes permettent de les quantifier (Bata *et al.*, 1985 ; Jarvis, *et al.*, 1998). Les trichothécènes macrocycliques peuvent être détectés par GC-MS et GC-MS-MS, après dérivation de l'extrait préalablement hydrolysé en verrucarol. L'extraction liquide-liquide des extraits fongiques permet d'éviter les pics interférents lors de l'analyse (Niels and Thran 2001). Il est à noter que l'HPLC-UV ne permet pas la détection des trichothécènes simples tels que le trichodermol et le verrucarol (Jarvis *et al.*, 1998).

Des tests de toxicité biologique sont souvent réalisés dans un premier temps, afin de cribler les échantillons. Il en existe différents types dont le test de dermatotoxicité sur lapin (Andriienko *et al.*, 1997), le test de cytotoxicité utilisant une lignée de cellules fœtales de félin (évaluation de l'inhibition de croissance cellulaire) (Nikulin *et al.*, 1994) ou le bioessai sur *Artemia salina*. Ce dernier est facile à mettre en œuvre du fait de son faible coût et bénéficie de plus d'une bonne sensibilité. Il s'agit en fait d'observer l'effet des toxines sur la mortalité et la mobilité de larves d'*Artemia salina* maintenues en solution saline et tout juste écloses (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994).

7.3. Propriétés toxicologiques

7.3.1 Mécanisme d'action

Les trichothécènes macrocycliques sont les éléments les plus cytotoxiques de la famille des trichothécènes. Ce sont des inhibiteurs de synthèse protéique qui ont pour cible principale les cellules présentant une activité mitotique élevée, telles que les leucocytes et les cellules des épithéliums (Chung *et al.*, 2003).

Le mode d'action primaire des trichothécènes est une interaction directe avec les ribosomes, qui conduit à une inhibition de l'initiation et de l'élongation lors de la traduction (Lee *et al.*, 1999).

Les relations dose-effet des trichothécènes de *Stachybotrys chartarum* sont encore méconnues du fait des difficultés de production et d'isolement de ces toxines sous forme purifiée (Rao *et al.*, 2000 ; Servantie *et al.*, 1985). Les DL50 chez la souris dépendent de la nature de la toxine et de la voie d'exposition. Elles peuvent aller de 1 à 7 mg/kg pc. La satratoxine H est la plus cytotoxique des trichothécènes macrocycliques aussi bien par voie orale que par inhalation (Bata *et al.*, 1985).

Les effets toxiques des trichothécènes macrocycliques pourraient également résulter d'une modification de production de cytokines, notamment de l'interleukine 2. Les satratoxine G, isosatratoxine F, satratoxine H, roridine A et verrucarine A, à faibles doses, stimulent fortement la production d'interleukine 2 et diminuent la viabilité cellulaire des EL-4 thymoma (modèle murin de lymphocytes T4), tandis qu'à fortes doses, aussi bien la production de cytokines que la viabilité cellulaire sont inhibées. La roridine A et la verrucarine A semblent être les plus immunotoxiques suivies par la satratoxine G puis la satratoxine H et l'isosatratoxine F. L'étude montre par ailleurs que les trichothécènes macrocycliques sont au moins 100 fois plus toxiques que le déoxyrnivalénol (Lee *et al.*, 1999).

Une étude de Yang *et al.* (2000) a montré que la cytotoxicité des trichothécènes macrocycliques est induite par un processus d'apoptose, dans lequel l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) jouerait un rôle. Toutefois, les mécanismes par lesquels les trichothécènes activent ces protéines restent mal connus.

Une étude de Chung *et al.* (2003) a montré que la satratoxine G induit l'expression de la MIP-2 (Macrophage inflammatory protein-2) ainsi que la transcription de son ARNm. La MIP-2 est une

chemokine responsable du chemotactisme des neutrophiles sur le lieu de l'inflammation. L'augmentation de l'expression de MIP-2 et l'accumulation des neutrophiles provoquent des dommages tissulaires ainsi qu'une inflammation.

7.3.2 Effets cliniques

Une immunosuppression et une hémorragie des organes cibles sont les symptômes caractéristiques d'une intoxication quelle que soit l'espèce animale étudiée ou la voie d'exposition (Forgacs *et al.*, 1958). En effet, *S. chartarum* synthétise non seulement des trichothécènes macrocycliques mais aussi des spirolactones, des spirolactames et des cyclosporines, qui sont des agents immunosuppresseurs (Jarvis *et al.*, 1995).

Une étude menée par Korpinen *et al.* (1974) a mis en évidence une embryotoxicité des toxines de *Stachybotrys chartarum* sur des souris auxquelles une préparation purifiée de toxines a été administrée *per os*. Les résultats de cette étude révèlent que les stachybotryotoxines peuvent affecter le déroulement normal de la gestation de femelles exposées, lors de sa phase précoce, à de faibles doses de ces toxines : augmentation significative des mortalités intra-utérines, résorptions ou malformations fœtales. De plus, l'analyse histopathologique révèle des hémorragies utéro-placentaires et des membranes fœtales (Korpinen *et al.*, 1974).

7.4. Exposition humaine

Chez l'homme, les affections dues à *Stachybotrys chartarum* ne sont connues que lors d'exposition par inhalation ou par contact. Il n'y a en revanche aucune information concernant le transfert dans les denrées alimentaires d'origine animale. De ce fait l'exposition de l'homme par voie alimentaire ne peut être estimée.

7.5. Exposition animale

7.5.1. Effet sur la santé animale : la stachybotryotoxicose

Toutes les espèces animales peuvent être atteintes de stachybotryotoxicose : des cas ont été rapportés surtout chez les chevaux, mais néanmoins chez les moutons, les porcs, les daims, les chèvres et les vaches. Le cheval est l'espèce la plus sensible à la maladie et c'est également la plus fréquemment touchée : l'ingestion de 200 g à 1 kg de paille naturellement contaminée provoque la mort d'un cheval en 17 heures, tandis que la dose létale pour les bovins est trois fois supérieure, la mort survenant dans les 17 jours (Forgacs *et al.*, 1958). Les bovins semblent plus résistants que les autres espèces aux effets des toxines (Forgacs *et al.*, 1958). C'est en juillet 1975, en France, au parc zoologique de Paris, que le premier cas aigu de stachybotryotoxicose en Europe de l'Ouest a été rapporté chez 52 daims ayant consommé de la paille contaminée : 28 d'entre eux périrent (Le Bars *et al.*, 1977).

La stachybotryotoxicose équine est décrite comme étant une maladie saisonnière, existant sous deux formes : typique et atypique.

La forme typique s'observe lors de l'ingestion prolongée de faibles quantités d'aliments contaminés. Elle évolue en trois stades, précédés d'une phase asymptomatique durant laquelle les performances des animaux sont réduites. Le stade asymptomatique est parfois accompagné d'une hyperesthésie, de rhinite avec légère conjonctivite et des squames sur les lèvres. Le premier stade clinique dure 8 à 30 jours ; la gorge, le nez et la muqueuse buccale montrent les premiers signes de nécrose et d'ulcération. Si rien n'est fait, le second stade de la maladie s'installe et dure 15 à 20 jours. Il se caractérise par le développement progressif d'une leucopénie et d'une thrombopénie, avec diminution des facteurs de coagulation. Des lésions nécrotiques sont fréquemment observées au niveau des membranes des muqueuses orales. Enfin, la troisième et dernière phase dure 1 à 6 jours et se termine la plupart du temps par la mort de l'animal. Cette phase se caractérise par une forte fièvre, des diarrhées fréquentes, une agranulocytose. La mort survient par surinfection bactérienne. On constate une dégénérescence hépatique, rénale et myocardique, ainsi qu'une atrophie des organes lymphoïdes avec hypoplasie médullaire (Drobotko *et al.*, 1945).

La forme atypique, suraiguë, s'observe après ingestion de fourrages fortement contaminés et peut durer de 1 à 3 jours. Cette forme se caractérise par un dysfonctionnement nerveux dont les symptômes apparaissent dans les 10 heures suivant l'ingestion : hyper irritabilité, perte des réflexes, tremblements. Cela conduit rapidement à un état de choc, puis le plus souvent à la mort de l'animal (Forgacs *et al.*, 1958). Dans les cas d'intoxications les plus graves, les animaux peuvent mourir dans

les 15 heures après l'ingestion suite à une défaillance cardiaque, sans présenter les symptômes caractéristiques précédemment décrits. A titre d'exemple, en novembre 1991, au Maroc, plus de 200 équins (chevaux, ânes, mules) ont trouvé la mort suite à un cas de stachybotryotoxicose aiguë (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1994).

Toutefois, la maladie n'est pas irréversible : si elle est diagnostiquée à temps, les animaux guérissent en quelques jours après le retrait de l'aliment incriminé sans séquelle apparente (Forgacs *et al.*, 1958 ; Le Bars *et al.*, 1977). Ainsi, la prophylaxie passe par le contrôle des conditions de stockage des pailles et des aliments.

Chez les autres espèces animales, les signes cliniques sont similaires.

Une hypotonie du rumen et des diarrhées sont décrites chez les ovins et les bovins. Aucune baisse significative de la production laitière chez les bovins et les ovins et de la laine chez les ovins n'est à déplorer.

Chez les porcins, des cas rapportés font aussi état d'avortements. Le taux de mortalité est élevé chez les porcelets : il peut atteindre 65 % (Wyllie *et al.*, 1978).

7.5.2. Persistance à l'état résiduel

Aucune donnée concernant l'éventuelle excrétion lactée des trichothécènes macrocycliques ni une éventuelle persistance à l'état résiduel dans les tissus des animaux consommant des aliments contaminés n'est disponible à ce jour.

Conclusion

Les stachybotryotoxines et en particulier les satratoxines, synthétisées par *Stachybotrys chartarum*, sont les mycotoxines les plus cytotoxiques de la famille des trichothécènes. Elles sont responsables de la stachybotryotoxicose principalement observée chez les équidés. Cette maladie est reconnue en Europe de l'Est où des cas sont rapportés chaque année. Cette affection est également décrite dans de nombreux autres pays, y compris la France mais sa prévalence est difficile à évaluer.

Chez l'homme, les affections dues à *Stachybotrys chartarum* sont bien connues lors d'exposition par inhalation ou par contact. Il n'y a en revanche aucune information concernant le transfert dans les denrées alimentaires d'origine animale. De ce fait l'exposition de l'homme par voie alimentaire ne peut être estimée.

8. Les toxines d'endophytes

Les micromycètes endophytes du genre *Neotyphodium* peuvent contaminer certaines graminées fourragères telles que la fétuque et le ray-grass anglais. Ces champignons vivent en symbiose avec la plante et synthétisent des alcaloïdes durant la croissance de leur hôte.

Neotyphodium coenophialum contamine la fétuque *Festuca arundinacea* et synthétise des alcaloïdes ergopeptidiques. L'ergovaline est considérée comme la principale mycotoxine responsable de la « toxicose de la fétuque » plus connue sous son appellation anglo-saxonne : « fescue toxicosis ».

Neotyphodium lolii contamine quant à lui le ray-grass anglais *Lolium perenne*. Il synthétise également de l'ergovaline mais surtout du lolitrème B, alcaloïde trémorgène responsable de la maladie connue sous le nom anglo-saxon de « rye-grass staggers disease » que l'on pourrait traduire par « tournis du ray-grass ».

Les alcaloïdes synthétisés par les endophytes du genre *Neotyphodium* n'affectent pas l'aspect extérieur de la plante infectée, mais sont susceptibles d'entraîner des troubles graves chez les ruminants consommateurs, aussi bien au pâturage que dans les foin. De nombreux pays sont touchés par les maladies liées aux toxines d'endophytes. Une étude française a notamment montré que plus de la moitié des lots de fétuque commerciale était infectée par des endophytes à des taux relativement élevés (Emile *et al.*, 2000). L'impact économique et sanitaire de ces toxines peut être important. Aux Etats-Unis, les pertes dues à la baisse de productivité sont estimées à 1 milliard de dollars par an (Panaccione *et al.*, 2001). En Europe, cependant, très peu de cas de toxicoses ont été rapportés et les effets sur les performances des animaux sont mal connus (Emile *et al.*, 2000).

8.1. Facteurs favorisant le développement

Les graminées dans lesquelles on trouve des endophytes sont plus résistantes que celles qui en sont dépourvues. En effet les champignons endophytes croissant à l'intérieur de la plante sans lui nuire et en raison de la production de toxines, lui confèrent une résistance aux agressions extérieures : insectes et autres invertébrés herbivores, ainsi qu'une tolérance accrue à la sécheresse (Powel *et al.*, 1992).

Pour une même variété de graminée contaminée par des mêmes niveaux de *Neotyphodium*, les taux d'ergovaline peuvent varier en fonction des saisons et/ou de l'année. Les maladies d'herbage qui touchent les ruminants sont plus fréquentes au printemps, lorsque l'herbe croît rapidement (Hussein *et al.*, 2001). Les pâtures fertilisées par des niveaux élevés d'azote ou dont les sols en sont naturellement riches constituent un facteur additionnel de risque.

En ce qui concerne la contamination du ray-grass, il a été montré que les concentrations en toxines, et le lolitram B en particulier, augmentent avec l'âge de la plante et/ou de la feuille. Le développement de ray-grass contaminé par des endophytes bénéficiant d'une bonne résistance aux insectes (forte production de péramine) mais présentant une faible toxicité pour les ruminants consommateurs (faible taux de synthèse d'ergovaline et de lolitram B) a été mis au point par une équipe néo-zélandaise (Ball *et al.*, 1999).

La viabilité de *Neotyphodium* dans les graines de fétuque et de ray-grass est diminuée lors de stockage prolongé (de 18 mois ou plus). Ainsi, le taux d'infection dans les graines âgées et les plantes issues de ces dernières est réduit. Cependant, l'ergovaline est stable pendant plusieurs années ; ni le stockage, ni l'ensilage ne diminuent la toxicité de la graminée qui en contient.

La Nouvelle Zélande et les Etats-Unis sont particulièrement atteints par les conséquences toxicologiques, zootechniques et économiques de la consommation par les ovins, bovins et chevaux, de fétuque ou de ray-grass contaminés (Cheeke *et al.*, 1995 ; Powell *et al.*, 1992). Par ailleurs, cette contamination est susceptible de s'observer partout où ces graminées sont utilisées pour la pâture. En Europe, des cas de mycotoxicoses associées à l'ingestion de toxines au pré ont été rapportés aux Pays-Bas, au Royaume-Uni, en Allemagne et en France. Dans notre pays, elles sont surtout décrites dans le Limousin et la région Midi-Pyrénées, l'Aquitaine et le Nord lors de pâturages excessifs l'été, quand l'herbe est courte.

8.2. Propriétés physico-chimiques des toxines d'endophytes et méthodes d'analyse

Les ergopeptides sont des dérivés de l'acide lysergique. Ils appartiennent aux alcaloïdes également connus pour être synthétisés par le genre *Claviceps*. Toutefois, aucun sclérote (formation caractéristique de la contamination par *Claviceps*) n'est présent sur les graminées contaminées par des *Neotyphodium*.

La toxine majoritairement synthétisée par *Neotyphodium coenophialum* se développant sur la fétuque est l'ergovaline, un alcaloïde ergopeptidique très rare (Bacon *et al.*, 1995 ; Bony *et al.*, 2001 ; Porter *et al.*, 1995). La figure 8a illustre sa structure chimique.

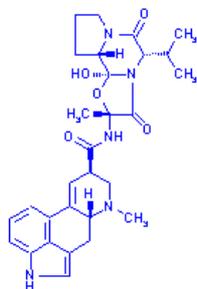


Figure 8a : Structure chimique de l'ergovaline

D'autres alcaloïdes ont également été isolés de fétuques infectées par *Neotyphodium coenophialum* dont un autre ergopeptide, l'ergotamine et un amide dérivé de l'acide lysergique, l'ergonovine (Hill *et al.*, 2001). Ce dernier composé semble être également associé de façon non négligeable à la toxicose de la fétuque (Browning *et al.*, 1997 et 2000).

Le lolitrème B est l'alcaloïde trémorgène majoritairement produit lors de la contamination du ray-grass par *Neotyphodium lolii*. Sa structure chimique est illustrée en figure 8b.

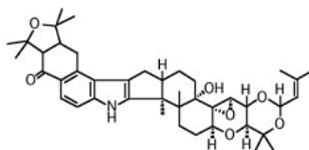


Figure 8b : Structure chimique du lolitrème B

N. lolii synthétise lui aussi de l'ergovaline, en quantité moindre cependant, et de la paxilline, qui semble être le précurseur des lolitrèmes et des trémorgènes associés (Miles *et al.*, 1998 ; Porter *et al.*, 1995). Le lolitrème B et la paxilline sont, comme tous les autres composés trémorgènes, des indoles diterpénoïdes neurotoxiques (Hussein *et al.*, 2001).

D'autres alcaloïdes ont été isolés des hôtes de *Neotyphodium* : il s'agit d'alcaloïdes de la famille des lolines, principalement la N-acetylloline et de la N-formylloline dans la fétuque et de la péramine, dans le ray-grass et la fétuque. Bien que ces composés soient davantage impliqués dans la lutte contre les insectes que dans les toxicoses animales, ils peuvent contribuer à augmenter la toxicité des mycotoxines alcaloïdiques vis à vis des ruminants.

Les alcaloïdes ergotiques sont extrêmement sensibles à l'oxydation photolytique, l'hydratation et l'épimérisation du cycle ergolène en position C₈, qui peut se produire aussi bien en conditions acides que basiques. Les solutions d'ergovaline se conservent pendant plusieurs mois à - 4°C, dans des flacons opaques. Toutefois, cette molécule se dégrade rapidement lorsqu'elle est extraite de tissus végétaux frais.

Aussi bien l'ergovaline que le lolitrème B ont été isolés de cultures pures et de graminées contaminées par *Neotyphodium*. Il existe de nombreuses procédures d'extraction, d'isolement et d'identification des alcaloïdes de *N. coenophialum*. Le plus souvent l'extraction des toxines est réalisée en solution aqueuse d'acide tartrique ou d'acide lactique, cette dernière permettant un meilleur rendement d'extraction de l'ergovaline. Suivent alors la chromatographie de partage avec du chloroforme ou du dichlorométhane, la purification sur colonne de silice, alumine ou résine échangeuse d'ions, et enfin, l'identification et l'analyse par CCM ou encore HPLC-UV ou fluorimétrie (utilisée en routine). La spectrométrie de masse (MS utilisant l'ionisation par impact électronique, ionisation chimique ou MS/MS) permet également le dosage des alcaloïdes de la famille des ergopeptides (Porter *et al.*, 1995).

Les lolines sont présentes dans les plantes contaminées par *N. coenophialum*, mais n'ont pas été identifiées dans celles infectées par *N. lolii*. La GC-FID ou GC-MS constitue la méthode de choix pour le dosage des alcaloïdes de cette famille. Un système d'extraction biphasique permet l'analyse simultanée de la péramine et du lolitrème B (Porter *et al.*, 1995).

8.3. Propriétés toxicologiques

Peu d'études sont disponibles sur les effets toxiques de ces composés car il est difficile d'isoler des quantités suffisantes d'alcaloïdes purifiés en dépit de la mise au point de systèmes par fermentation immergée (Powell *et al.*, 1992).

8.3.1. Toxicocinétique et métabolisme

Peu de données concernant la biodisponibilité ou le métabolisme des ergopeptides chez les ruminants sont disponibles. L'absorption est faible, l'élimination rapide. Chez les bovins, 94 % des alcaloïdes absorbés seraient excrétés dans l'urine dans les 12 h suivant l'ingestion et environ 6 % dans la bile. En raison de cette excrétion rapide, l'hypothèse d'une absorption ruminale a été avancée (Hill *et al.*, 2001). Les ergopeptides peuvent être hydroxylés ou déalkylés par les cytochromes P450 et par conséquent, leur hydrosolubilité et les possibilités de conjugaison et excrétion sont augmentées (Hussein *et al.*, 2001). Il a également été prouvé que les ergopeptides interagissent avec la PgP (P-glycoprotéine), qui pourrait participer à leur excrétion (Yasuda *et al.*, 2002).

8.3.2. Effets musculaires et neurologiques

Les ergopeptides provoquent la stimulation des muscles lisses en inhibant les récepteurs α et β adrénergiques et en entraînant une vasoconstriction des tissus périphériques. Le flux sanguin chute brutalement, aussi bien vers les tissus centraux que périphériques. Il en résulte une diminution de la dissipation thermique d'où une augmentation de la température corporelle (Browning *et al.*, 1997). Ce phénomène est amplifié lorsque la température ambiante augmente et provoque alors une augmentation de la fréquence cardiaque (Browning, *et al.*, 1997 ; Rhodes, *et al.*, 1991). Une concentration de 50 ng d'ergovaline par gramme de plantes infectées suffirait à entraîner des premiers signes de toxicoses chez des bovins soumis à un stress thermique (Porter *et al.*, 1995).

Le lolitrem B affecte les muscles lisses et les muscles striés du tractus gastro-intestinal (Reed, *et al.*, 2002) mais le mécanisme exact de son action n'a pas encore été identifié. Des hypothèses possibles suggèrent une inhibition des neurotransmetteurs des acides aminés, des récepteurs GABA de type A, ou une stimulation des récepteurs cholinergiques (Hussein, *et al.*, 2001). Les signes de tétanie s'observent chez les bovins et les ovins, lorsque les concentrations de lolitrem B atteignent 2 à 2,5 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche tandis que chez les équins, il faut une teneur supérieure à 5,3 $\mu\text{g/g}$. Il faut noter toutefois que les tremblements peuvent être dus à d'autres toxines tétrogènes telles que le janthitrem, synthétisé par *Penicillium* spp., qui se développent sur les débris végétaux morts des pâtures de ray-grass.

8.3.3. Effets endocriniens

L'ergovaline induit une forte diminution de la prolactine sérique, neurohormone dont la concentration varie en fonction de la photopériode (Cheeke *et al.*, 1995 ; Porter et Thompson, 1992). La prolactine est impliquée dans la lactation mais aussi la croissance, les réponses immunitaires et l'osmorégulation (Browning *et al.*, 1997). Sa sécrétion est inhibée par la dopamine (Paterson *et al.*, 1995). Or, il semblerait que l'ergovaline stimule les récepteurs dopaminergiques : le cycle ergolène, qui se trouve dans tous les alcaloïdes ergopeptidiques, présente une similarité structurale avec la dopamine mais aussi avec la noradrénaline et la sérotonine, qui jouent un rôle dans la synthèse et la sécrétion de mélatonine, autre neurohormone photodépendante dont le taux est également diminué lors de l'ingestion de plantes contaminées (Paterson *et al.*, 1995 ; Porter et Thompson 1992). Le dérèglement neuro-hormonal de la prolactine mais aussi de la mélatonine, la restriction du flux sanguin vers les organes internes et l'hyperthermie, semblent être les causes principales des effets observés chez les ruminants : perturbation de l'adaptation physiologique aux saisons, effets sur la reproduction, la pousse du poil ou de la laine, la production laitière et la prise alimentaire (Porter et Thompson, 1992).

Des effets sur les hormones thyroïdiennes et le cortisol ont également été observés. Chez les bovins, l'ergotamine pourrait altérer les concentrations plasmatiques de la triiodothyronine (T3) et du cortisol (Browning *et al.*, 1997) et contribuer aux effets de ces toxines sur la thermorégulation et le métabolisme des nutriments.

Les ergopeptides sont également impliqués dans l'altération des concentrations plasmatiques de certaines hormones hypophysaires importantes chez les bovins, telles que l'hormone de croissance et l'hormone lutéinisante, LH, ce qui pourrait expliquer également les effets néfastes des alcaloïdes d'endophytes sur la reproduction des bovins (Browning *et al.*, 1997). De plus, l'ergotamine et l'ergonovine retrouvées dans la fétuque infectée par *Neotyphodium* (E+) stimulent la contractilité utérine en induisant une libération de prostaglandine par l'utérus (Browning *et al.*, 1998).

8.3.4. Effets zootechniques

Les maladies d'herbage ne sont pas irréversibles si elles sont diagnostiquées à temps. Les animaux guérissent en quelques semaines après le retrait des aliments incriminés (Emile *et al.*, 2000). Cependant, l'impact économique des graminées infectées par *Neotyphodium* (E+) est considérable. Par exemple, les vaches consommant des pâtures E+ produisent 25 % de lait en moins que celles ayant consommé des pâtures E- (dépourvues d'endophytes). La perte de production laitière est estimée à 0,15 l par jour pour chaque augmentation de 10 % du niveau d'infestation de la pâture. De même, le taux de gestation est estimé à 96 % pour les vaches consommant de l'herbe E- et à 55 % seulement pour celles consommant de l'herbe E+ (Porter et Thompson, 1992). Une étude conduite sur moutons a montré que la digestibilité de la fétuque (*Festuca pratensis*) n'est pas modifiée par la présence d'endophytes (Daccord *et al.*, 1995). Ce résultat tend à montrer que la population microbienne ruminale est peu ou pas sensible aux toxines d'endophytes.

Les éleveurs de bétail et les producteurs de fourrages européens s'interrogent de plus en plus sur les effets, aussi bien positifs que néfastes de l'infection des graminées par *Neotyphodium* sp. En France,

une étude à grande échelle a permis de mettre en évidence que plus de la moitié des échantillons de fétuque étaient infestés par des endophytes (Emile *et al.*, 2000).

Il faut noter que des essais sont menés afin de déterminer une éventuelle résistance génétique de certaines races de bovins vis à vis des alcaloïdes d'endophytes (Browning, 2003).

8.3.5. Autres effets

Chez les moutons atteints de tétanie due au ray-grass infecté, une augmentation de la concentration en Aspartate Amino Transférase (ASAT) a été rapportée, ce qui suggère une atteinte hépatique. Cette élévation des taux d'ASAT est accompagnée d'une augmentation du taux de créatine kinase sérique, ce qui suggère une fuite enzymatique des cellules musculaires (Cheeke *et al.*, 1995).

8.4. Exposition humaine

Le risque de contamination du consommateur humain par le lait d'animaux nourris avec un fourrage contaminé par des endophytes apparaît très limité (voir plus loin). Néanmoins l'apport de données afin de confirmer l'absence de risque, principalement statuant le cas d'exposition chronique ou d'exposition conjointe à d'autres toxiques ayant des effets reprotoxiques, seraient bienvenues.

8.5. Exposition et effets sur la santé animale

8.5.1. La «Fescue toxicosis»

Le terme de «toxicose de la fétuque» est utilisé pour décrire l'ensemble des syndromes associés à l'ingestion par les ruminants de fétuque contaminée par *Neotyphodium coenophialum*. En effet, la manifestation clinique de ces différents syndromes varie avec la température ambiante. Il existe trois formes de maladies ;

1) la toxicose de la fétuque *sensu stricto*, qui se caractérise par une agalactie et autres désordres tels que diminution de la croissance, pelage rêche, salivation excessive, élévation de la température corporelle et du rythme respiratoire, et réduction de la capacité de reproduction. Ces signes sont observés dans chacune des formes de la maladie, mais sont amplifiés par des élévations de température ambiante. Ainsi, ce syndrome est plus fréquent en été et porte de ce fait, le nom de «summer syndrome»

2) *le mal de pied* («fescue foot disease»), qui consiste en une gangrène sèche des extrémités - pattes, oreilles et queue - ressemblant à l'ergotisme. Il s'observe le plus souvent en hiver, mais cette forme de la toxicose est assez rare même si la chute de l'extrémité de la queue est assez fréquente. Plusieurs cas ont été rapportés en France (Bony *et al.*, 2001).

3) *la nécrose adipeuse* («fat necrosis syndrome»), caractéristique d'une exposition chronique, quelle que soit la saison : des masses graisseuses se déposent dans la cavité abdominale de l'animal atteint, et peuvent interférer avec la digestion et la parturition (Browning, 2003).

Chez les bovins, on observe pour ces trois formes une diminution de la prise alimentaire et donc une baisse du gain de poids corporel, une chute des performances de reproduction, une réduction du cholestérol et de mélatonine ainsi qu'une diminution de la tolérance au stress thermique et à la lumière (Rhodes *et al.*, 1991). Il a également été montré que le volume ruminal augmente proportionnellement à l'ingestion d'ergovaline (Aldrich, *et al.*, 1993).

De même, chez les ovins, les performances de reproduction sont réduites (chute de la fertilité), les taux de cholestérol et la production laitière sont diminués. Cependant, les ovins ne sont pas aussi sévèrement affectés que les bovins, la consommation alimentaire et leur vitesse de croissance restent normaux (Aldrich *et al.*, 1993 ; Bacon *et al.*, 1995 ; Porter et Thompson, 1992).

Les chevaux sont les seuls animaux chez lesquels les effets résultant de leur consommation de fétuque E+ sont presque exclusivement reliés à une atteinte de la fonction de reproduction. Chez la jument, on observe une augmentation de la durée de la gestation, un épaississement du placenta, des avortements, des poulains immatures et plus fragiles ainsi qu'une agalactie (Cross *et al.*, 1995 ; Porter et Thompson, 1992). Contrairement aux vaches et aux brebis, les juments gestantes ne présentent pas d'augmentation de leur température corporelle lorsqu'elles sont exposées aux toxines d'endophytes et ceci en raison de leur capacité à réguler leur température par une augmentation de la sudation (Bony *et al.*, 2001 ; Cross *et al.*, 1995).

Chez toutes les espèces animales touchées, l'effet le plus important de la toxicose de la fétuque est la diminution du taux de prolactine sérique. Cette diminution est indépendante des conditions environnementales et survient dans les trois formes de la maladie. Les antagonistes de la dopamine tels que l'halopéridol, la phénotiazine, le spipéron ou la métoclopramide ont été évalués en tant que traitements pharmacologiques permettant de diminuer la toxicité de la fétuque : ils se sont avérés efficaces pour augmenter le taux de prolactine mais n'ont eu que des effets limités sur la capacité de l'animal à dissiper sa chaleur corporelle. Ceci implique donc un double mécanisme d'action de l'ergovaline (Aldrich *et al.*, 1993 ; Paterson *et al.*, 1995). Enfin, la toxicose à la fétuque est le plus souvent sub-clinique, les ruminants atteints présentant des altérations de performances (Browning, 2003).

8.5.2. La «Rye-grass staggers disease»

Les Etats Unis et la Nouvelle Zélande sont régulièrement affectés par la maladie, des cas ont également été rapportés dans d'autres pays tel que l'Argentine (Cheeke *et al.*, 1995).

En raison de la présence du lolitrème B dans les plantes contaminées, le «syndrome du tournis du ray-grass» se caractérise par des signes neurologiques tels que de l'incoordination, des tremblements, des mouvements de tête et un collapsus. Aucun signe précurseur n'est visible avant que la maladie ne soit déclenchée.

Lors d'exposition à de faibles doses, les effets neurologiques sont temporaires, l'animal guérit dans un temps court. Pour des doses supérieures, de la mortalité peut être observée, un taux de 20% ayant été rapporté par les éleveurs Néo-Zélandais chez les moutons qui sont particulièrement sensibles à la tétanie due au ray-grass. En ce qui concerne les bovins, seuls 0,2 % des animaux meurent. Les équins semblent les plus sensibles à la maladie. Dans toutes les espèces, la mort survient le plus souvent par blessures accidentelles (Reed *et al.*, 2002). Comme pour la toxicose de la fétuque, les agonistes de la dopamine peuvent servir de traitements, mais l'effet trémorgène du lolitrème B impose un traitement supplémentaire : le plus souvent à base de benzodiazépine (Scrivener *et al.*, 2002).

8.5.3. Persistance à l'état résiduel

Très peu de données chiffrées concernant l'éventuelle excrétion lactée des toxines d'endophytes et l'éventuelle présence de résidus dans les tissus ont été publiées.

Cependant, les propriétés physico-chimiques des alcaloïdes, qui sont des composés basiques, suggèrent qu'ils pourraient être retrouvés dans le lait d'animaux consommant des graminées contaminées. En effet, le lait étant plus acide que le plasma, ces composés peuvent s'y trouver concentrés. En ce qui concerne le lolitrème B, il apparaît en quantités détectables dans le lait environ 4 h après l'administration dans le rumen de la chèvre mais les concentrations maximales obtenues après 24 h sont faibles (3 ng/ml). En ce qui concerne l'ergovaline, aucun passage ni dans le sang ni dans le lait n'a été mis en évidence (Grancher *et al.*, 2004). En l'absence de certitude il convient d'éliminer de la consommation tout lait issu d'animaux présentant des signes de toxicose (Guerre *et al.*, 2000 ; Panter *et al.*, 1990).

Conclusion

Les toxines d'endophytes, principalement l'ergovaline présente dans la fétuque et le lolitrème B présent dans le ray-grass, sont toxiques pour les ruminants et responsables de pertes de productivité importantes. Bien que les mécanismes d'actions de ces toxines soient complexes, leur interaction avec la sécrétion de prolactine semble à l'origine des principaux troubles observés.

Bien que le risque de contamination de l'homme soit très faible via notamment le lait d'animaux exposés, des recherches devraient être menées afin de confirmer l'absence de risque, principalement lors d'exposition chronique ou d'exposition conjointe à d'autres toxiques ayant des effets reprotoxiques.

9. Les phomopsines

Les phomopsines sont des mycotoxines synthétisées par *Phomopsis leptostromiformis* (également connu sous le nom de *Diaporthe toxica*). Ces mycotoxines contaminent les lupins qui constituent l'hôte principal du champignon. Ces légumineuses sont utilisées en alimentation animale où les phomopsines sont à l'origine de la lupinose, maladie qui affecte principalement les ovins mais aussi

les bovins, les caprins, les porcins et les équins. Il s'agit de toxines hépatotoxiques entraînant une cholangite oblitérante, une fibrose et une prolifération des canaux biliaires qui, dans certains cas peuvent donner lieu à une photosensibilisation secondaire. Elles sont connues pour être de puissants inhibiteurs des microtubules cellulaires. Des cas cliniques de lupinose animale ont été rapportés à partir de 1900 en Allemagne, en Europe centrale, aux États-Unis, en Nouvelle Zélande, en Afrique du Sud et plus récemment en 1988, en Espagne (Lacey *et al.*, 1987 ; Soler Rodriguez *et al.*, 1991). L'Australie est atteinte quasiment chaque année par la lupinose ovine depuis 1950 (Gardiner *et al.*, 1967). Bien qu'aucun cas n'ait été rapporté en France, les importations de graines provenant de pays divers étant en constante progression, il est utile de faire le point sur l'état des connaissances concernant ces toxines et leurs effets chez l'animal.

Chez l'homme, l'Agence Australienne et Néo-Zélandaise de Sécurité Alimentaire (*Australia New Zealand Food Authority*) a établi en novembre 2001 une limite réglementaire de 5 µg de phomopsines par kilogramme d'aliment destiné à l'homme. En effet, bien que la majorité des graines de lupin soit destinée à l'alimentation animale, elles sont introduites de plus en plus dans l'alimentation humaine pour leur qualité nutritive (bonne teneur protéique, en fibres et acides gras essentiels). Ces toxines ont été évaluées dans ces pays qui sont particulièrement concernés par les conséquences de la lupinose chez l'animal : déficit de la productivité voire la mort de l'animal.

9.1. Facteurs favorisant le développement

Phomopsis leptostromiformis contamine les plantes fourragères de la famille des lupins, *Lupinus spp.*, lorsque celles-ci sont en phase de croissance. Ce champignon saprophyte continue de se développer, sporule et synthétise des phomopsines sur les lupins morts qui constituent le vecteur d'intoxication principal des ruminants au pâturage. La lupinose s'observe également chez des ruminants ayant consommé des ensilages ou du foin contenant des tiges, des gousses ou des graines de lupin contaminés par *Phomopsis leptostromiformis*.

Il semblerait que le développement de la moisissure soit favorisé par une humidité importante et une température voisine de 25°C, tandis que la température optimale de sporulation se situerait autour de 18°C (Van Warmelo *et al.*, 1972). Cependant, les conditions de croissance et de toxinogenèse de *Phomopsis leptostromiformis* ne sont pas encore bien définies. Les premières pluies d'automne faisant suite à un été sec favoriseraient l'incidence de la maladie. Par ailleurs, la sensibilité à la contamination par *Phomopsis leptostromiformis* diffère selon les espèces de lupins. *Lupinus luteus* et *L. albus* sont particulièrement sensibles tandis que *L. mutabilis* est plus résistant (Lacey *et al.*, 1991). Enfin, *L. angustifolius*, commercialisé pour la consommation humaine, est aussi susceptible d'être contaminé (Casey *et al.*, 2001).

Pour les variétés de lupins les plus sensibles, les niveaux de phomopsines peuvent atteindre 217 mg/kg (D'Mello *et al.*, 1997). En Australie, où la lupinose cause le plus de pertes économiques, des essais ont été menés afin de développer des variétés de lupin résistantes à la contamination par *Phomopsis*. Dans ces variétés, les taux de phomopsine A ne dépassent pas 88 mg/kg soit près de trois fois moins qu'une variété sensible (D'Mello *et al.*, 1997). Pourtant, même si cette sélection permet de réduire considérablement les risques de lupinose, elle ne permet pas l'éradication totale de la maladie. La présence de *Phomopsis leptostromiformis* sur les graines de lupins peut être révélée après isolement sur boîte de gélose (Ali *et al.*, 1982), la toxicité d'un échantillon dépend toutefois de la quantité de phomopsines présentes.

9.2. Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyse

Les phomopsines appartiennent à la famille des hexapeptides macrocycliques (Tönsing *et al.*, 1984). La phomopsine A (C₃₆H₄₅N₆O₁₂, poids moléculaire : 789,2) représente plus de 80 % de la production totale de toxines. Sa structure chimique est illustrée en figure 9.

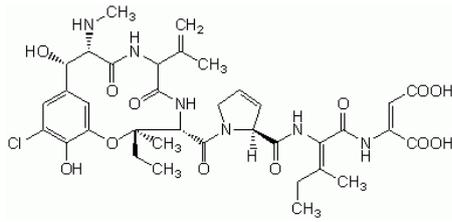


Figure 9 : Structure chimique de la phomopsine A

Les autres phomopsines, notamment la phomopsinamine A, l'octahydrophomopsine A, la phomopsine B et la phomopsine C sont produites en quantité moindre (D'Mello *et al.*, 1997 ; Lacey *et al.*, 1987). La phomopsine A n'est soluble que dans l'eau alcaline. Les phomopsines sont relativement solubles dans les solutions alcooliques. Par ailleurs, elles sont stables à la chaleur (Australia New Zealand Food Authority).

Le dosage des phomopsines s'effectue par chromatographie après extraction méthanolique de feuilles ou de graines de lupin (Shankar *et al.*, 1999). La CCM (chromatographie sur couche mince) permet la détection des différentes toxines (Pettersen *et al.*, 1985). L'HPLC permet de séparer les phomopsines A, B et C entre elles. Toutefois, s'il existe des solutions étalons de phomopsine A, on ne dispose pas à l'heure actuelle de solution étalon des phomopsines B et C (Allen, *et al.*, 1989), ce qui empêche leur quantification dans un extrait. Un test ELISA a été élaboré, il permet également la détection et la quantification de la phomopsine A (Shankar *et al.*, 1999). Enfin, des bioessais visant à détecter une hépatotoxicité précoce sur jeunes rats (Culvenor *et al.*, 1977 ; Peterson *et al.*, 1978) et sur moutons (Hancock *et al.*, 1987) ont été largement utilisés par le passé. Ils sont basés sur l'observation de la dégénérescence des cellules hépatiques et du nombre de cellules bloquées en métaphase (Pettersen *et al.*, 1985).

9.3. Propriétés toxicologiques

La lupinose se caractérise par d'importantes altérations hépatiques pouvant donner lieu à une photosensibilisation secondaire. Cette maladie est principalement due à la phomopsine A, produite en majorité par *Phomopsis leptostromiformis*, et 5 fois plus toxique que la phomopsine B (Allen *et al.*, 1983).

Toxicocinétique et métabolisme

Peu de données sont disponibles concernant l'absorption, le métabolisme, la distribution et les voies d'excrétion des phomopsines chez l'animal (Australia New Zealand Food Authority).

Mécanisme d'action hépatotoxique

La phomopsine A inhibe la polymérisation des microtubules et de la tubuline, et induit la dépolymérisation des microtubules préformés de façon dose-dépendante aussi bien *in vivo* chez les rongeurs, le porc ou le mouton, qu'*in vitro* sur différentes lignées cellulaires HeLa humaines, CV1 de singe et hépatocytes de rats (Lacey *et al.*, 1987 ; Tönsing *et al.*, 1984). Cet effet conduit à une inhibition du transport intracellulaire des lipides provoquant leur accumulation dans les cellules du parenchyme hépatique ainsi qu'une perturbation de l'excrétion biliaire. La bilirubine, produit de dégradation de l'hémoglobine normalement éliminé par voie biliaire, s'accumule entraînant un ictère. Le blocage des microtubules et de la tubuline entraîne également une inhibition de la formation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire. Le blocage des hépatocytes en mitose provoque une nécrose cellulaire (Australia New Zealand Food Authority). On observe alors une cholangite oblitérante avec une fibrose associée à une prolifération des canaux biliaires. Dans certains cas, cette atteinte hépatique provoque une photosensibilisation par diminution de l'élimination de la phylloérythrine (produit de dégradation de la chlorophylle par la microflore du rumen) qui s'accumule alors dans l'organisme. Ce composé circule dans le sang jusqu'aux vaisseaux capillaires de la peau. Ce pigment photodynamique devient réactif après exposition aux rayonnements ultra-violet du soleil provoquant alors la destruction des membranes des cellules cutanées et des muqueuses exposées (Bonnefoi et Sauvagnac 1988, D'Mello *et al.*, 1997).

Les études expérimentales montrent que la dose minimale létale chez le mouton par injection sous-cutanée unique de phomopsine A est de 10 µg/kg p.c. Une dose de 37,5 µg/kg p.c. provoque la mort de 100% des animaux. La dose sans effet sur le poids corporel semble être de 1,25 µg/kg p.c. dans ces conditions (Jago *et al.*, 1982). On note que la perte de poids n'est pas corrélée à la dose de toxine administrée (Jago, *et al.*, 1982).

Autres effets

Une toxicité embryonnaire a été observée après administration par voie intra-péritonéale de phomopsine A à des rates gestantes. La dose de 90 µg/kg p.c./j pendant 4 jours est associée à la mort de 40 % des rates gestantes et à une forte mortalité des embryons, également observée lors de l'injection d'une dose unique de toxine de 400 µg/kg p.c. Les embryons qui survivent présentent un retard de croissance et une ossification irrégulière (Peterson *et al.*, 1983).

Deux études de mutagenèse *in vitro* ont été menées en 1986. Elles révèlent que la phomopsine A purifiée n'induit pas de mutations géniques sur bactéries (Australia New Zealand Food Authority) mais qu'elle agit comme un clastogène potentiel sur cellules de mammifères (Brown *et al.*, 1986).

A ce jour, aucune donnée concernant les effets cancérogènes *in vivo* des phomopsines chez les ruminants ni chez les animaux de laboratoire n'est disponible.

9.4. Exposition humaine

En alimentation humaine, l'utilisation de lupin est plus restreinte qu'en alimentation animale, bien que l'introduction de farine de lupin dans le pain et autres denrées ainsi que la consommation directe de graines semblent en augmentation. Devant l'absence de données suffisantes, il est impossible de conclure à l'heure actuelle sur la possibilité de transfert de ces toxines dans les produits animaux (Casey *et al.*, 2001). L'Agence Australienne et Néo-Zélandaise a jugé prudent de s'assurer que l'exposition humaine soit la plus basse possible en fixant une limite de 5 µg de phomopsine A / kg d'aliment, pour tous aliments.

9.5. Exposition animale

9.5.1. Effet sur la santé animale

La lupinose est une maladie affectant toutes les espèces de ruminants et les chevaux mais ce sont les ovins qui sont les plus sévèrement et les plus fréquemment touchés. Les bovins sont plus résistants que les ovins (Hough *et al.*, 1994). La gravité de la maladie dépend de la quantité de toxines contenues dans le lupin consommé, de la durée de consommation ainsi que de la sensibilité individuelle de l'animal (Gardiner *et al.*, 1967). En Australie et en Nouvelle Zélande la lupinose ovine est responsable de pertes zootechniques considérables : diminution de la capacité de reproduction, de la production de lait, de laine (Barnes *et al.*, 1996). Le taux de mortalité dû à la lupinose est le plus souvent élevé (Casey *et al.*, 2001). A titre d'exemple, un cas de lupinose a été déclaré en 1988 en Espagne ; sur un troupeau de 80 moutons, 12 ont été affectés après une semaine de pâturage et 5 en sont morts (Soler Rodriguez *et al.*, 1991).

Les ovins et les bovins atteints de lupinose présentent une inappétence, un des premiers signes cliniques de la maladie, qui évolue rapidement vers une anorexie mortelle (Jago *et al.*, 1982). Ils peuvent également présenter un atonie ruminale variable (Allen *et al.*, 1989). On note en outre une augmentation de la température corporelle. La photosensibilisation des parties non recouvertes de laine ou sans poil selon l'espèce animale touchée, s'observe dans certains cas d'intoxications chroniques, lorsque l'atteinte hépatique est déjà importante.

Chez les chevaux, l'ictère semble être le seul signe clinique spécifique de la lupinose. L'intoxication aiguë se caractérise par le développement rapide d'une infiltration lipidique intense des cellules hépatiques.

L'analyse biochimique, révèle chez les moutons atteints une forte augmentation de la bilirubine sérique et de l'activité de la phosphatase alcaline. Cette dernière augmentation s'observe principalement lors d'atteinte chronique (Rodriguez *et al.*, 1991). La mort peut survenir dans ce cas 3 à 11 jours après l'ingestion de lupin fortement contaminé (Gardiner *et al.*, 1967).

A l'autopsie, on constate un ictère prononcé, le foie est friable, augmenté de volume, décoloré et jaune avec des foyers hémorragiques (Allen *et al.*, 1983). Dans les cas d'intoxications chroniques, les analyses histo-pathologiques révèlent une fibrose hépatique péri-portale qui se développe 10 à 30 jours après l'ingestion de lupins contaminés (Jago *et al.*, 1982).

9.5.2. Persistance à l'état résiduel

Les données pharmacocinétiques disponibles ne permettent pas de conclure quant à la présence de résidus de phomopsines dans les produits d'origine animale. Toutefois, certaines études expérimentales suggèrent que des résidus toxiques peuvent se retrouver dans les abats d'animaux ayant consommé des lupins contaminés (Australia New Zealand Food Authority). De plus, aucune méthode analytique n'a été mise au point afin de détecter les phomopsines dans la viande ou le lait. Ainsi, il est impossible de conclure à l'heure actuelle sur la possibilité de transfert de ces toxines dans les produits animaux (Casey *et al.*, 2001). Bien qu'aucune preuve n'existe, il convient d'éliminer de la distribution tout lait issu d'animal et tout animal présentant une suspicion de toxicose (Guerre *et al.*, 2000).

Conclusion

L'utilisation de graines de lupin dans l'alimentation animale est en constante progression depuis les années 1970. Le risque serait optimal pour les animaux qui consomment le lupin en tant que matière première. Chez les ruminants, en particulier les ovins, la maladie se caractérise par une forte hépatotoxicité, le plus souvent mortelle. Aucun cas n'a été rapporté en France mais la vigilance doit être maintenue en raison de l'importation croissante de graines provenant de divers pays et de leur utilisation en alimentation animale.

En France, il est peu probable que les phomopsines présentent un risque pour l'homme. Toutefois, l'introduction de farine de lupin dans le pain et autres denrées ainsi que la consommation directe de graines semblent en augmentation. Par ailleurs, en raison du profil toxicologique de ces toxines, il conviendrait de réaliser des études de transfert dans les productions animales.

Références bibliographiques (voir document spécifique)

Conclusions et recommandations générales

En 1998, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France avait rédigé un rapport faisant le point des connaissances sur les mycotoxines. L'impact des mycotoxines sur l'alimentation et la santé animales n'avait pas été développé dans ce document. Depuis cette date, de nombreuses publications et l'acquisition de données de contamination au travers de la surveillance ont permis de mieux connaître certaines mycotoxines, leur impact sur la santé humaine et animale et d'estimer les niveaux d'exposition alimentaire.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a décidé de procéder à une revue des connaissances disponibles sur les mycotoxines ayant un impact sur la santé humaine et/ou animale, d'évaluer les risques liés aux mycotoxines entrant dans les chaînes alimentaires humaine et animale et d'émettre certaines recommandations.

Concernant les mycotoxines en général

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage, et doués de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, les céréales mais aussi les fruits, les fourrages ainsi que les aliments manufacturés et composés issus de ces filières destinés à l'alimentation humaine et animale. Les produits d'origine animale tels que le lait ou les abats peuvent être également contaminés par certaines toxines au travers de l'alimentation animale. Les mycotoxines sont généralement thermostables et ne sont pas détruites par les procédés habituels de cuisson et de stérilisation.

Les groupes de mycotoxines considérés comme importants du point de vue agro-alimentaire et sanitaire sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les trichothécènes et tout spécialement le déoxynivalénol, les fumonisines, la zéaralénone et la patuline. D'autres mycotoxines, moins étudiées quant à leurs effets toxiques mais susceptibles d'avoir des effets sanitaires chez l'homme et/ou l'animal ont été également prises en compte.

Caractérisation du danger

D'une façon générale, les mycotoxines traitées sont des contaminants alimentaires et présentent un danger pour la santé humaine et/ou animale.

La caractérisation du danger est fondée sur des données toxicologiques la plupart du temps incomplètes. De plus certaines études expérimentales mettent en avant des effets toxiques obtenus par des voies d'administration sans rapport avec les conditions réelles de l'exposition du consommateur, rendant difficile toute transposition à l'homme.

Même si certaines mycotoxines ont été mieux étudiées que d'autres du point de vue de leurs propriétés toxicologiques et de leurs effets sur la santé humaine et animale, la caractérisation du risque doit être affinée à l'aide de nouvelles données sur les effets toxiques obtenues à partir d'études qui devront être réalisées selon des lignes directrices reconnues internationalement.

Il est à noter que les données toxicologiques disponibles concernent principalement les toxines prises individuellement et non les effets résultant de l'association de mycotoxines alors qu'elles peuvent être présentes simultanément sur la même denrée ou dans une même ration. En effet, une même espèce de moisissure peut produire plusieurs types de toxines, selon les souches et les conditions climatiques. Ce sont par exemple le cas d'*Aspergillus flavus* produisant les aflatoxines mais aussi l'acide cyclopiazonique, la stérigmatocystine, ou l'aflatrem ; le cas d'*Aspergillus clavatus* produisant la patuline mais aussi l'aflatrem ; le cas de *Penicillium verrucosum* produisant l'ochratoxine mais aussi la citrinine ; ou encore le cas de *Fusarium graminearum* produisant la zéaralénone mais aussi certains trichothécènes, si l'on est en présence de souches toxigènes placées dans des conditions favorables à leur développement. Par ailleurs, la présence simultanée de plusieurs mycotoxines peut provenir du fait qu'une même ration, ou un régime alimentaire sont composés de divers types de denrées ou d'aliments simples dont chacun d'eux peut être susceptible de contenir une mycotoxine particulière. Ces cas de multi contamination modifient ils les toxicités individuelles rendant difficile la

caractérisation de ces risques associés? Cette question, étant une réelle préoccupation, mériterait l'engagement d'études expérimentales spécifiques pour y répondre, les données disponibles actuellement étant fragmentaires.

Caractérisation du risque

La caractérisation du risque doit être affinée à l'aide de données nouvelles sur les effets toxiques comme recommandé ci-dessus et sur les niveaux de contamination recueillis dans le cadre de plans de surveillance et de contrôle conduits sur plusieurs années. En effet l'évolution des objectifs et des pratiques de l'agriculture constatée au début du XXI^e siècle liée notamment à l'extension de l'agriculture biologique, à l'émergence de production des biocarburants et au changement climatique doit être suivie avec attention en matière d'évolution de la qualité et la nature des matières premières utilisées en alimentation humaine et animale :

- Le cas de l'influence de l'agriculture biologique excluant l'utilisation d'insecticides et fongicides sur le risque mycotoxinique des produits, par rapport à celui de l'agriculture conventionnelle, bien qu'il n'ait pas été repris ici puisque traité dans un rapport de l'Afssa en 2003, est à suivre à l'aune de l'organisation des plans de surveillance et de contrôle considérant les denrées issues des deux modes de production.
- Des plans seraient aussi à envisager en fonction du devenir des sous produits des végétaux ayant servi à la production de biocarburants.
- De même, la modification des pratiques culturales due à la prise en compte de critères économiques et au changement climatique se traduisant par une extension de la culture de certains végétaux du sud vers le nord et consécutivement du risque associé doit être considérée lors de la révision annuelle des plans de surveillance et de contrôle. En outre, la possibilité de rencontrer des conditions climatiques favorables à l'émergence de nouveaux risques en Europe méridionale, connus jusqu'alors en région sub tropicale, comme lors de canicules, est à considérer.

En matière d'alimentation animale, quelle que soit la mycotoxine, l'utilisation dans la ration des poussières et déchets de céréales, étant donné leur probabilité élevée d'être hautement contaminées est problématique en matière de risque d'intoxication et quelle que soit l'espèce animale. Cette matière alimentaire correspond à des déchets de céréales provenant de diverses sources (fond de silo ou de bateau ou de camion, issues des filtres à poussières...). Il serait donc recommandé de ne pas les utiliser pour alimenter les animaux.

Les données de contamination sont souvent très disparates en raison des difficultés d'échantillonnage, et des difficultés de dosage. En effet, les mycotoxines sont souvent distribuées d'une manière très hétérogène dans les produits végétaux. La qualité de l'échantillonnage a une influence primordiale sur le résultat analytique. L'Afssa recommande d'établir des plans d'échantillonnage sur la base de protocoles normalisés ou validés qui débouchent sur un échantillon final aussi représentatif que possible de la salubrité globale d'une denrée. De plus, le dosage des mycotoxines dans les denrées doit mettre en jeu des méthodes analytiques sur la base de modes opératoires normalisés ou validés, et réalisées au sein de laboratoires placés au moins, sous assurance qualité ou au mieux, accrédités. La démarche de normalisation est ainsi à poursuivre aussi bien pour l'établissement de normes d'échantillonnage que de normes analytiques.

Evaluation du risque

Bien que l'exposition moyenne du consommateur soit généralement faible, en raison notamment des mesures de gestion prises pour limiter la contamination des aliments, il convient d'émettre un certain nombre de recommandations générales pour améliorer la connaissance et consécutivement la maîtrise des risques liés à la présence de ces mycotoxines dans les aliments pour l'homme et l'animal.

Si la mise en place de réglementations est déjà intervenue à propos des aflatoxines et de l'ergot (il serait d'ailleurs souhaitable de considérer la teneur en alcaloïdes de l'ergot plutôt que l'ergot lui-même) en alimentation humaine et animale, de l'ochratoxine A, de la patuline, du DON, de la zéaralénone et des fumonisines en alimentation humaine, elle est en préparation pour l'ochratoxine A, le DON, la zéaralénone et les fumonisines en alimentation animale.

L'évaluation du risque mycotoxique demeure délicate. En effet, ce risque est d'origine naturelle, l'homme n'en maîtrisant pas la survenue (notamment liée aux conditions climatiques), il est pernicieux car la contamination fongique est difficilement contrôlable. La contamination peut être multiple en raison de la présence possible de plusieurs mycotoxines dans le même produit ou la même ration alimentaire.

Devant ce constat, il convient de mettre en place des moyens de prévention incluant des stratégies agronomiques (bonnes pratiques agricoles incluant le choix des variétés, les pratiques culturales, l'utilisation raisonnée des traitements phytosanitaires...), l'amélioration des conditions de récolte et de stockage et du suivi tout au long de la chaîne alimentaire. Il est enfin nécessaire de poursuivre une activité de recherche soutenue afin d'améliorer encore les connaissances sur la toxicité des métabolites et la toxicité lors d'associations de mycotoxines, ou de mycotoxines et agents pathogènes infectieux, ou encore de mycotoxines et autres contaminants...

La suite de cet avis reprend les conclusions et recommandations par mycotoxine ou groupe de mycotoxines

Aflatoxines

Le groupe des aflatoxines et son représentant principal l'aflatoxine B1 (tant en terme de teneur et de fréquence dans les aliments à risque que d'impact toxique) est le groupe de mycotoxines le mieux étudié et le plus réglementé. L'aflatoxine B1 est à ce jour la seule mycotoxine identifiée comme cancérigène chez l'homme. Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'aflatoxine B1 était retrouvée sous la forme de son métabolite M1 dans le lait.

Les mesures réglementaires en vigueur dans l'Union Européenne sont des plus sévères. Même si ces études et ces réglementations ont permis de diminuer le risque à un niveau très faible, ces mesures doivent être poursuivies pour maintenir une maîtrise de ce risque à un niveau faible. Plus précisément, la conduite des plans de contrôle visant à vérifier l'application des mesures législatives prises au sein de l'Union européenne est à maintenir et cela aussi bien au stade des matières premières végétales – notamment fruits secs et arachides - qu'au stade des produits finis ou dérivés tels que le lait. En ce domaine, la provenance des échantillons est une information d'intérêt à maintenir pour l'interprétation des données issues de ces plans.

De plus il est recommandé

au niveau de la surveillance : Un programme de surveillance orienté sur le maïs, en ciblant par exemple une région suivie sur plusieurs années, permettra de relier les teneurs en aflatoxines en fonction des conditions climatiques. En effet, l'évolution climatique observée en Europe pourrait conduire à des conditions de température et d'humidité favorables à la prolifération d'espèces toxigènes avec possibilité de production d'aflatoxines dans certaines régions méridionales de la France.

au niveau de la prévention : les mesures réglementaires peuvent être contraignantes pour certains acteurs professionnels notamment pour ceux des pays en voie de développement qui abritent une grande part des zones à "risque aflatoxines". De ce fait, ces mesures sont à accompagner par l'établissement de guides de bonnes pratiques à appliquer à la production et à la transformation. C'est l'accent que mettent certaines instances internationales dans leurs travaux actuels. Ceux-ci doivent donc être encouragés.

au niveau des connaissances relatives au devenir chez les animaux d'élevage : il serait intéressant de réaliser des études de transfert dans les œufs et les abats chez les volailles, dans les abats chez les autres animaux, ainsi que dans le lait chez les petits ruminants. En outre, des études complémentaires chez les vaches fortes productrices viseront à confirmer le taux de transfert dans le lait

Ochratoxines

L'OTA est une mycotoxine qui présente des effets néphrotoxiques démontrés chez l'animal et suspectés chez l'homme. En 2006, la DHT a été revue à la hausse à 120 ng/kg p.c./sem par l'EFSA. Cette réévaluation se fonde notamment sur la démonstration de l'absence de génotoxicité directe de l'OTA.

Des techniques analytiques plus sensibles sont à développer de façon à affiner les estimations d'exposition du consommateur, pour deux raisons majeures. D'une part, le nombre de données de contamination par l'OTA des denrées alimentaires inférieures à la limite de détection est important et la méthode de calcul conduit vraisemblablement à une surestimation de l'exposition du fait de la multiplicité des denrées susceptibles d'être contaminées.

Les farines de seigle et de sarrasin paraissent les plus contaminées ; aussi conviendrait-il de renforcer les plans de surveillance et de contrôle de l'OTA dans ces produits.

Les données de contamination reliées à la consommation montrent que les forts consommateurs français sont exposés à 3,5 ng/kg p.c./j (20% de la DJT) pour les adultes et à 7,8 ng/kg p.c./j (45% de la DJT) pour les enfants. Cependant, il est à souligner que les calculs d'exposition ne prennent pas en compte les nourrissons, et de ce fait que des données supplémentaires seraient nécessaires afin d'évaluer les taux d'exposition de cette population de consommateurs avec prise en compte de leurs préférences alimentaires.

Des interrogations subsistent quant à l'origine et à la signification toxicologique de la présence d'OTA à faible concentration dans le sang humain et dans le lait maternel. Des études complémentaires associant les données d'exposition et la présence de cette toxine dans les liquides biologiques humains, sont nécessaires pour éclairer cet aspect afin de mieux estimer le risque pour l'homme.

Les trichothécènes

Les TCT sont des mycotoxines produites principalement par des *Fusarium* dans les pays au climat tempéré et humide. Les TCT sont une famille de plusieurs centaines de molécules, mais seules quelques unes d'entre elles sont retrouvées sur les matières premières céréalières et les produits finis céréaliers en raison de la grande stabilité de ces molécules aux fortes températures. Parmi ces mycotoxines, c'est le déoxynivalénol (DON) qui est le plus fréquemment retrouvé sur les céréales en France, à des taux variables qui dépendent principalement des conditions climatiques lors de la période floraison-récolte. D'autres TCT méritent d'être suivis en raison du risque potentiel qu'ils représentent (notamment toxicité, prévalence): le nivalénol (NIV), le diacétoxyscirpénol (DAS), et les toxines T-2 et HT-2. Parmi les TCT, le DON est le plus souvent retrouvé sur les denrées alimentaires végétales mais est le moins toxique, alors que la toxine T-2 est moins souvent retrouvée mais est plus toxique que le DON.

Les principaux effets toxiques des trichothécènes du groupe A (T2, HT2, DAS...), hématotoxicité et immunotoxicité, se manifestent par une diminution du nombre de cellules sanguines circulantes, principalement des globules blancs et des plaquettes et un affaiblissement des défenses immunitaires à de très faibles niveaux de contamination. Les principaux effets toxiques des trichothécènes du groupe B (DON, NIV...) se traduisent par une diminution de la consommation alimentaire et du gain de poids. Chez les animaux de production, ceci conduit à une perte économique pour l'éleveur. Toutefois, l'exposition humaine via la consommation de produits animaux provenant d'élevages exposés est faible. Les animaux de compagnie, et plus particulièrement les félinés, sont également sujets à des troubles hématologiques et immunologiques induits par la consommation d'aliments contaminés par des TCT.

Le consommateur français est exposé à des doses inférieures aux doses considérées comme sans risque de survenue des effets toxiques ; ces doses sont respectivement : les Doses Journalières Tolérables (DJT) sont pour le DON : 1 µg/kg pc /j, le NIV : 0,07 µg/kg pc /j et les toxines T-2 et HT-2 : 0,06 µg/kg pc /j. Il faut noter cependant que ces valeurs toxicologiques de référence ont été fixées à partir d'études chez l'animal dont la qualité et la quantité sont insuffisantes. Les agences internationales en charge de fixer les DJT ont souligné la carence en études toxicologiques de référence.

Il est donc pertinent de suivre les recommandations de ces agences visant à la mise en place d'études subchroniques (1/10 de la durée de vie de l'animal, 90 jours chez le rat) et chroniques (2 ans

chez le rat) menées suivant les lignes directrices OCDE, sur les espèces les plus sensibles afin de fixer des valeurs toxicologiques de référence plus précises.

Les TCT n'ont pas été assez pris en compte au cours du siècle dernier en tant que contaminants alimentaires. Il est indispensable de disposer de données suffisamment solides à la fois en toxicologie conventionnelle et en exposition humaine pour caractériser le risque pour l'homme, mais également en termes d'échantillonnage et de dosage dans l'alimentation humaine et animale compte tenu des conséquences de leur présence potentielle dans les produits céréaliers.

La Commission européenne a publié un règlement fixant des limites maximales en DON dans les matières premières et les denrées destinées à l'alimentation humaine. Toutefois, il convient de développer des méthodes de multidétection rapides et compatibles avec les limites réglementaires, utilisables dans les auto-contrôles. Ainsi, dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle, il conviendrait de rechercher les teneurs en toxines T-2 et HT-2, conjointement aux teneurs en DON et en NIV dans les produits céréaliers avec des limites analytiques permettant l'estimation de l'exposition.

Il est important également de prendre en compte la possibilité de multicontaminations par des TCT différents, ou des TCT et d'autres mycotoxines comme la zéaralénone, voire les fumonisines. Des études subchroniques sont à entreprendre pour évaluer les conséquences toxicologiques de telles multicontaminations.

Zéaralénone

L'effet toxique le plus préoccupant de la zéaralénone est son caractère de perturbateur endocrinien à activité œstrogénique. L'effet sur l'homme n'est pas avéré. En revanche, les porcins sont sensibles à la zéaralénone et plus particulièrement les jeunes femelles. Chez cette espèce, la zéaralénone subit une bioactivation en α -zéaralénol, dont l'activité œstrogénique est supérieure à celle du composé parental. Cette bioconversion pourrait intervenir dans le tube digestif des ruminants, mais le risque d'une contamination du lait reste à démontrer. La présence de la zéaralénone et de ses métabolites, notamment l' α -zéaralénol, dans les produits animaux, devrait ainsi faire l'objet d'études complémentaires afin d'évaluer la réalité du transfert dans les denrées d'origine animale.

La DJTP fixée par le SCF en 2000 a été retenue pour la caractérisation du risque pour le consommateur. L'exposition alimentaire humaine est inférieure à la dose journalière tolérable sauf pour 2,5% des enfants de 3 à 14 ans, et pour 31% de la population végétalienne.

Les principaux aliments vecteurs sont les céréales (maïs) contaminées au champ par des *Fusarium* producteurs. Les plans de surveillance devraient être confortés par la prise en compte des produits céréaliers à base de blé destinés à l'alimentation humaine et animale.

Les animaux d'élevage peuvent être exposés à la zéaralénone contaminant les céréales et coproduits céréaliers à des teneurs élevées capables d'induire un risque d'apparition d'effets œstrogéniques, notamment chez le porc. Il serait souhaitable de disposer de plus de données de contamination d'autres matières premières, et notamment de fourrages et d'ensilages.

Compte tenu de la part prépondérante prise par les aliments secs dans l'alimentation des carnivores domestiques, et de la contribution notable de certaines céréales à risque (maïs notamment) dans la formulation de ces aliments, des essais devraient être entrepris afin d'évaluer scientifiquement le niveau de réceptivité et de sensibilité des femelles reproductrices de ces deux espèces.

Il serait souhaitable que des études toxicologiques soient réalisées selon les lignes directrices reconnues internationalement afin de réviser les doses journalières tolérables provisoires fixées en 1999 et 2000 sur le fondement d'études insuffisantes. Il serait aussi intéressant d'étudier les interactions de la zéaralénone avec les autres perturbateurs endocriniens.

Des études devraient également être conduites pour améliorer les connaissances toxicologiques des associations de toxines fusariennes, notamment de la zéaralénone avec des trichothécènes et des fumonisines.

Fumonisines

Parmi les différentes fumonisines, les effets de la fumonisine B1 (FB1) sont les mieux caractérisés : on assiste notamment à une altération du métabolisme des sphingolipides dont toutes les conséquences toxicologiques ne sont pas connues. En terme d'effet clinique majeur, l'œdème pulmonaire porcin et la leucoencéphalomalacie équine sont les principaux effets observés sur la santé animale.

La population française est peu exposée aux différentes fumonisines en raison de la faible consommation de maïs et du faible transfert de ces toxines dans les produits animaux. Cependant, les teneurs mesurées dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle dans les produits à base de céréales destinés aux enfants en bas-âge montrent qu'il conviendrait de renforcer les contrôles sur ces produits.

En revanche, la population animale est plus exposée, le maïs pouvant constituer un élément majeur de son alimentation. Particulièrement contaminées, les issues de maïs utilisées dans l'alimentation des animaux, notamment celle des équidés, présentent un risque particulier et devraient être réglementées. D'une façon générale, les teneurs maximales recommandées (Recommandations de la Commission et de la FDA⁴³) pour les maïs destinés aux animaux apparaissent trop laxistes au regard de la protection de la santé animale.

La connaissance de la toxicité des fumonisines autres que la FB1 est très limitée et le différentiel toxique entre fumonisines n'est pas connu. Il faudra à l'avenir engager des recherches sur le danger toxique des fumonisines, notamment les dangers immunotoxique et cancérigène à doses faibles.

Outre la recherche sur les dangers toxiques des fumonisines, plusieurs voies d'amélioration sont à considérer :

- du point de vue réglementaire, la réglementation devrait s'appliquer non seulement à la somme FB1+FB2 mais également à la seule FB1.
- du point de vue analytique, des progrès sont attendus pour le dosage en routine des fumonisines dans les matières premières et produits finis.
- du point de vue de la surveillance, la conduite des plans devra se poursuivre sur le maïs afin de prendre en compte l'évolution du climat. En effet, la contamination naturelle en fumonisines peut être fréquente selon les années dans le maïs du sud de l'Europe. Par ailleurs les plans de surveillance devront intégrer le shorgo.

La patuline

La patuline est une mycotoxine susceptible d'être retrouvée à l'état de contaminant naturel d'un grand nombre d'aliments d'origine végétale issus des fruits et notamment de la pomme. A ce titre, elle fait l'objet d'une réglementation drastique pour tous les aliments de cette filière et notamment pour les jus de fruits et compotes destinés aux enfants et aux personnes âgées. Néanmoins, de grandes incertitudes existent quant au devenir de cette mycotoxine dont le suivi analytique est difficile dans les matrices biologiques. En effet, la liaison avec les groupements thiols des peptides et des protéines interdit toute détection ultérieure de la toxine, de métabolites ou de ses composés d'addition.

Les études entreprises concernant la toxicité chronique de la patuline, peu nombreuses et relativement anciennes, ont surtout démontré, à doses moyennes, des désordres intestinaux et des perturbations de la fonction rénale. Les symptômes nerveux suspectés d'être associés lors d'accidents d'élevage ne sont pas rapportés dans les études expérimentales. Ces mêmes études ne mentionnent jamais de pouvoir cancérigène *in vivo* chez l'animal. C'est la raison pour laquelle cette toxine a été classée par le CIRC (1986⁴⁴) dans le groupe 3 des produits pour lesquels il est impossible de se prononcer quant à la cancérigénicité pour l'homme.

⁴³ FDA. Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Animal Feed, FDA 2001.

⁴⁴ IARC (1986) International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Vol. 40 Some naturally occurring and synthetic food components, flurocoumarins and ultraviolet radiation, p83-98

Néanmoins, une étude récente entreprise chez le rat exposé à la patuline durant 90 jours, rapporte des perturbations des hormones stéroïdes circulantes corrélées à des atteintes testiculaire et thyroïdienne. Cette information mériterait confirmation en raison du souci actuel des toxicologues à statuer sur le caractère perturbateur endocrinien de tout constituant ou contaminant alimentaire. Plus généralement, des recherches sur le danger toxique réel de la patuline devraient être engagées.

L'exposition alimentaire de l'homme reste très inférieure pour les enfants comme pour les populations végétariennes à la dose journalière maximale tolérable provisoire fixée en 1995 par le JECFA à 0,4 µg/kg p.c./j. La réglementation en vigueur pour la présence de patuline dans les aliments dérivés de la pomme peut apparaître comme particulièrement protectrice au regard des niveaux d'exposition observés.

L'exposition alimentaire des animaux d'élevage est vraisemblable chez les ruminants par la consommation des ensilages ou des écarts de tri de pommes. Toutefois, le danger réel chez l'animal demeure mal évalué, compte tenu de la méconnaissance de la toxicité et du devenir de cette toxine. Il serait souhaitable de mettre en place un plan de surveillance sur les aliments conservés par voie acide (ensilages de fourrages ou de grains, fourrages enrubannés).

Les toxines de *Claviceps purpurea*

Les champignons du genre *Claviceps* peuvent entraîner la formation d'ergot sur toutes les graminées. Sa présence diminue les rendements et la valeur nutritive du grain et entraîne des risques pour la santé humaine et animale.

En Europe, les toxines de *C. purpurea* sont indirectement réglementées en alimentation humaine et en alimentation animale (puisque basée sur une limite de proportion pondérale en ergot), limitant ainsi les risques d'intoxications. Les problèmes d'ergotisme, aussi bien convulsif que gangreneux, surviennent sur des animaux consommant librement des aliments contaminés au pâturage ou à qui des céréales non contrôlées sont fournies. Chez l'homme, les alcaloïdes de *C. purpurea* ne semblent plus constituer un risque sanitaire majeur pour la santé, étant donné que la problématique est bien connue, que l'occurrence d'une contamination au champ est bien visible et qu'un tri sélectif peut s'opérer.

Néanmoins au regard de l'évolution à la fois des pratiques culturales visant à diminuer les intrants (engrais et/ou traitements fongicides), et des conditions climatiques, favorables à la survenue d'épisodes de contamination par le genre *Claviceps*, l'information auprès des producteurs de céréales et la surveillance par les autorités compétentes devraient être renforcées. De plus la réglementation actuelle pour l'alimentation humaine concerne le seul blé et devrait évoluer pour s'appliquer à toutes les céréales, et ainsi, après acquisition des connaissances toxicologiques sur les toxines, prendre en compte la teneur en quelques alcaloïdes au lieu de la teneur pondérale d'ergot dans un lot de céréales ou d'aliment.

La citrinine

Il est peu probable que la citrinine seule présente un risque pour l'Homme dans les conditions d'exposition connues actuellement. Toutefois son association à l'OTA pouvant engendrer une synergie, la surveillance de la contamination simultanée de ces deux toxines en particulier dans les produits tels que consommés mériterait d'être réalisée. En alimentation animale, le risque d'intoxication provient surtout de la consommation de céréales contaminées utilisées à l'état brut, en particulier chez les porcs et les volailles.

Les toxines d'*Alternaria*

Au vu des données disponibles, il n'existe pas actuellement de raisons objectives de considérer le danger des toxines élaborées par *Alternaria* comme une priorité en sécurité sanitaire des aliments destinés à l'homme ou aux animaux d'élevage. Toutefois, les études toxicologiques essentiellement réalisées *in vitro* laissent apparaître des caractères mutagènes qui devront être confirmés ou infirmés par des études *in vivo* réalisées chez des animaux recevant des doses compatibles avec les données

de contaminations existantes. De plus la vigilance doit être maintenue sur la qualification du caractère « contaminant naturel » de ces toxines, au travers d'enquêtes voire de plans de surveillance.

L'acide cyclopiazonique

Il est peu probable que l'acide cyclopiazonique présente un risque sanitaire majeur pour l'Homme dans des conditions habituelles. Le risque d'exposition pourrait provenir surtout de la consommation de céréales contaminées alors que celui provenant des produits laitiers est très hypothétique. En Amérique du Nord, la présence de ce co-contaminant de l'aflatoxine B1 est considérée sans conséquence néfaste car il est supposé participer à l'atténuation du danger des aflatoxines en participant à leur inhibition métabolique.

Les toxines trémorgènes d'*Aspergillus* et de *Penicillium*

Les intoxications par des mycotoxines trémorgènes produites par *Aspergillus* et *Penicillium* sont principalement observées chez le chien. La toxicité aiguë de ces composés est importante, mais peu d'information existent quant à leur toxicité chronique ou le risque de transfert dans les productions. Chez l'homme, si les intoxications aiguës sont rares en raison du caractère très altéré des aliments contaminés à de fortes teneurs, il est difficile d'estimer un niveau réel d'exposition.

Il serait donc important de : i) préciser les dangers d'une exposition chronique à ces composés et leur caractère génotoxique, ii) disposer de données sur leur transfert dans les productions, principalement lors d'exposition des ruminants à de faibles teneurs, iii) estimer les niveaux de contamination des produits connus pour leur contamination possible par ces moisissures.

Les sporidesmines

Bien que l'affection observée en France soit moins grave que celle couramment rencontrée en Nouvelle Zélande, Afrique du Sud et Australie, la présence de sporidesmines dans l'alimentation animale présente un réel problème sanitaire pour certaines productions, notamment les ovins. La toxicologie de ces mycotoxines est relativement préoccupante, le risque sanitaire pour l'homme est peu connu et peu d'informations sont disponibles sur le passage dans les produits animaux. Il serait donc important de connaître le devenir des sporidesmines chez l'animal d'élevage et la conséquence éventuelle de la contamination des denrées, notamment le transfert dans le lait.

Les stachybotryotoxines

Les stachybotryotoxines et en particulier les satratoxines, synthétisées par *Stachybotrys chartarum*, sont les mycotoxines les plus cytotoxiques de la famille des trichothécènes. Elles sont responsables de la stachybotryotoxicose principalement observée chez les équidés. Cette maladie est reconnue en Europe de l'Est où des cas sont rapportés chaque année. Cette affection est également décrite dans de nombreux autres pays, y compris la France mais sa prévalence est difficile à évaluer.

Chez l'homme, les affections dues à *Stachybotrys chartarum* sont bien connues lors d'exposition par inhalation ou contact. Il y a en revanche peu de préoccupations à avoir en terme d'exposition par voie alimentaire.

Les toxines d'endophytes

Les toxines d'endophytes, principalement l'ergovaline présente dans la fétuque et le lolitrem B présent dans le ray-grass, sont toxiques pour les ruminants et responsables de pertes de productivité importantes. Bien que les mécanismes d'actions de ces toxines soient complexes, leur interaction avec la sécrétion de prolactine semble à l'origine des principaux troubles observés.

Bien que le risque de contamination de l'homme soit très faible via notamment le lait d'animaux exposés, des recherches devraient être menées afin de confirmer l'absence de risque, principalement lors d'exposition chronique ou d'exposition conjointe à d'autres toxiques ayant des effets reprotoxiques.

Les phomopsines

L'utilisation de graines de lupin dans l'alimentation animale est en constante progression depuis les années 1970. Le risque serait optimal pour les animaux qui consomment le lupin en tant que matière première. Chez les ruminants, en particulier les ovins, la maladie se caractérise par une forte hépatotoxicité, le plus souvent mortelle. Aucun cas n'a été rapporté en France mais la vigilance doit être maintenue en raison de l'importation croissante de graines provenant de divers pays et de leur utilisation en alimentation animale.

En France, il est peu probable que les phomopsines présentent un risque pour l'homme. Toutefois, l'introduction de farine de lupin dans le pain et autres denrées ainsi que la consommation directe de graines semblent en augmentation. Par ailleurs, en raison du profil toxicologique de ces toxines, il conviendrait de réaliser des études de transfert dans les productions animales.

ANNEXE 1

ANALYSE DES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS

Rédaction : Bruno Le Bizec, Sylviane Dragacci et Jean-Marc Fremy

I – L'ÉCHANTILLONNAGE

Le but de cette opération est de produire un échantillon représentatif d'un lot de matière en vue de le soumettre au laboratoire pour subir l'essai. La procédure d'échantillonnage est ainsi primordiale dans l'évaluation de la qualité sanitaire d'un lot dont les conséquences sont à la fois commerciales (*déclassement du produit*) et sanitaires (*mise sur le marché d'un produit présentant un risque pour le consommateur*). Cette notion de représentativité repose sur des statistiques qui ont été déclinées en différentes approches ou options. La rédaction de normes et directives spécifiques ainsi que la mise en place de démarches d'assurance qualité permettent de rendre plus fiable cette délicate et importante étape (Blanc, 2005).

Les mycotoxines sont souvent distribuées dans l'alimentation d'une manière très hétérogène, parce qu'elles sont formées par des moisissures qui interviennent de manière isolée dans le matériel brut, ou au niveau de grains isolés. Plus l'élément recherché est présent à un niveau faible et plus cet élément est réparti d'une manière hétérogène, plus difficile est la confection d'un échantillon représentatif. Les mycotoxines en sont la parfaite illustration (Whitaker and Dickens, 1972, 1974 et 1979).

Lorsque les contrôles sont conduits pour déterminer la conformité ou non de la denrée vis à vis de limites maximales réglementaires, il est important que la valeur obtenue par la méthode analytique de la prise d'essai issue de l'échantillon soit représentative de l'ensemble du lot, avec une incertitude minimale. Si cette phase n'est pas assurée, des risques sont encourus : des lots conformes peuvent être rejetés (on parle alors de risque pour le vendeur ou « risque-vendeur » engendrant des situations contentieuses et ayant des conséquences financières) et des lots contaminés acceptés (on parle alors de risque pour l'acheteur ou « risque-acheteur » ayant des conséquences sanitaires et financières).

Les facteurs requis pour assurer un échantillonnage représentatif sont résumés ci-dessous :

- Les échantillons doivent être collectés par du personnel formé et respectueux des consignes et des conditions indiquées dans le plan ou la procédure.
- Des outils appropriés comme indiqué dans le plan ou la procédure doivent être utilisés. Le bon respect des conditions environnementales (météorologie notamment) par exemple revêt une importance qui doit être elle aussi soulignée dans le protocole.
- Les échantillons doivent être pris seulement lorsque l'ensemble du lot est accessible (c'est normalement le cas lors du transport ou du déchargement) pour toujours permettre d'appliquer strictement la procédure. Chaque partie du lot doit avoir une chance égale d'être sélectionné.
- Le transport et la conservation des échantillons doivent permettre de respecter leur intégrité de ce fait la non transformation de l'analyte.
- Les bonnes pratiques d'échantillonnage nécessitent l'identification non ambiguë et sécurisée de l'échantillon et permettent de retrouver *a posteriori* au moins le nom du préleveur, le lieu de prélèvement, le numéro de lot, les outils utilisés, l'heure et la date et toute observation nécessaire à la bonne interprétation des résultats de mesure.

Quelques définitions

L'Union Européenne publie des protocoles d'échantillonnage pour quelques mycotoxines dans certaines catégories de produits lors de contrôles officiels. Les termes suivants sont utilisés et notamment repris dans le règlement 401/2006 pour les aflatoxines, fusariotoxines, l'ochratoxine A et pour la patuline :

Lot : quantité identifiable d'une denrée alimentaire, livrée en une fois, pour laquelle il a été établi par l'agent responsable qu'elle présente des caractéristiques communes telles que l'origine, la variété, le type d'emballage, l'emballer, l'expéditeur ou le marquage.

Sous-lot : partie désignée d'un grand lot, afin d'appliquer le mode de prélèvement à cette partie désignée. Chaque sous-lot doit être physiquement séparé et rester identifiable.

Echantillon élémentaire : quantité de matière prélevé en un seul point du lot ou du sous-lot.

Echantillon global : agrégation de tous les échantillons élémentaires prélevés sur le lot ou le sous-lot.

Echantillon de laboratoire : partie ou quantité représentative de l'échantillon global destiné au laboratoire.

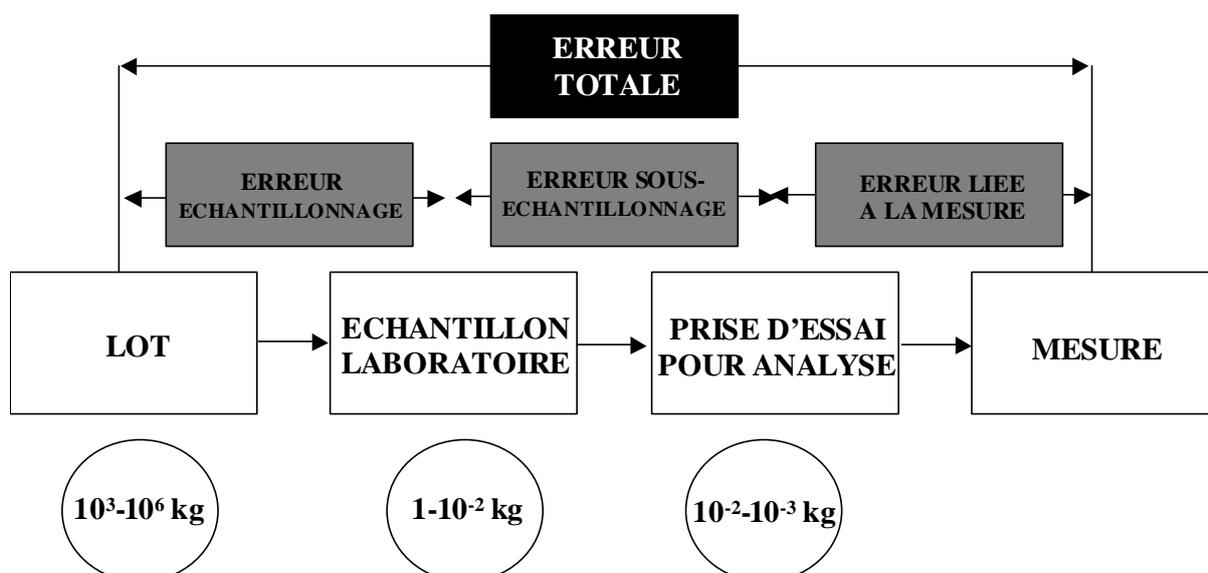
Notion de représentativité de l'échantillon

Un échantillon doit être le plus représentatif d'un lot duquel il est issu. Le résultat analytique obtenu donne alors une valeur s'approchant le plus possible de la valeur « vraie ». Si la composition d'un lot est supposée uniforme (tel qu'un liquide de grand mélange), le plan d'échantillonnage peut être établi avec un protocole bien plus simple que s'il s'agit d'un lot normalement hétérogène.

Remarques générales

Un nombre suffisant d'échantillons élémentaires est vital pour obtenir un échantillon représentatif. L'importance du nombre d'échantillons élémentaires détermine la représentativité et, par voie de conséquence, une valeur s'approchant le plus de la valeur « vraie ». Il est difficile d'estimer *a priori* le nombre optimal d'échantillons élémentaires car celui-ci dépend directement de la distribution du contaminant, du niveau de contamination, de la taille du lot, de la nature du produit et de la valeur vénale de ce dernier. Le protocole d'échantillonnage doit être un compromis entre le coût et le travail nécessaire à la collecte de l'échantillon, et la variabilité attendue (incertitude) pour le résultat. La justification de l'effort à fournir pour parvenir à un échantillon représentatif doit également prendre en compte l'incertitude de mesure de la méthode analytique utilisée pour la mesure de la concentration de l'analyte (figure 10).

Figure 1 : Sources d'erreur ayant un impact sur l'interprétation finale du résultat de analyse d'un échantillon.



II LES METHODES ANALYTIQUES DE MESURE

Il est important de souligner en préalable que l'analyse mycologique (recherche et identification des moisissures) n'est pas suffisante pour évaluer le risque d'une contamination par des mycotoxines puisque l'identification d'une espèce toxino-gène n'affirmera pas que l'on est en présence d'une souche productrice et que les conditions environnementales ont permis la production de toxines. Réciproquement, l'absence de spores n'indiquera pas que l'aliment n'est pas contaminé si des procédés technologiques ultérieurs ont pu faire disparaître toute trace de la moisissure.

La mise en évidence des mycotoxines dans les aliments requiert l'utilisation de méthodes analytiques performantes, qu'il s'agisse de la préparation de l'échantillon, de la détection de l'analyte, de son identification, de son dosage ou encore de la confirmation de sa mesure et son identité. Elles doivent associer sensibilité, notamment lorsqu'il s'agit de quantifier des ultra-traces (exemple de l'aflatoxine M1 dans le lait pour laquelle une limite maximale de résidus a été fixée à 0,05 µg/L), et spécificité puisque la recherche des analytes est effectuée généralement dans des échantillons biologiques particulièrement complexes (céréales, fruits, produits laitiers...). Aucune méthode n'est réellement applicable à l'ensemble des mycotoxines, en d'autres termes être multi-résidus, tant les caractéristiques physico-chimiques des analytes – nature chimique, poids moléculaire et polarité – sont variées.

La qualité des dosages est primordiale et doit assurer la fiabilité des résultats. Parmi les aspects à considérer pour entreprendre cette démarche, on peut en citer deux principaux : i) l'utilisation de méthodes normalisées et/ou validées impliquant divers laboratoires d'organismes reconnus; ii) l'accréditation des laboratoires d'analyses par des organismes indépendants reconnus comme le COmité FRançais pour l'ACcréditation (COFRAC) en France (programme 99-1).

II.1 – LES TYPES DE METHODES ET LEURS PRINCIPES GENERAUX

L'analyse des mycotoxines dans les aliments, tout comme celle des autres résidus et contaminants de notre alimentation, est articulée autour de deux types de méthodes :

- celles qui permettent de discriminer, dans des délais brefs, les échantillons négatifs ou suspects. Ces méthodes dites de dépistage sont généralement caractérisées par une excellente sensibilité mais peuvent être limitées en terme de spécificité. Le taux de résultats faux négatifs est par définition limité à un très faible niveau, alors que les faux positifs sont tolérés dans des limites raisonnables.
- celles qui permettent de confirmer ou d'infirmer la présence et l'identité d'un analyte suspecté lors de l'utilisation d'un test de dépistage. Ces méthodes dites de confirmation sont caractérisées par une sensibilité suffisamment bonne pour être à même de vérifier des suspicions générées en dépistage et de limiter le risque de faux négatif. Elles doivent être suffisamment spécifiques pour identifier à coup sûr la nature de la molécule recherchée et interdire toute conclusion erronée (résultat faux positif).

Il existe deux grands principes de méthodes qui peuvent être appliqués à l'analyse de traces de mycotoxines dans les aliments : les approches immunologiques et les approches physico-chimiques.

Les méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques s'appuient sur la reconnaissance plus ou moins spécifique de l'analyte à doser (ici l'antigène Ag) par un anticorps produit et caractérisé pour inter-agir avec ce dernier. Ce principe est utilisé à la fois pour purifier les analytes cibles (colonnes d'immunoaffinité) mais également pour doser rapidement les mycotoxines en première intention (ELISA, RIA).

Les méthodes physico-chimiques

Ces méthodes à la fois utilisées à des finalités séparatives (extraction et purification de l'échantillon) ou analytiques (identification et dosage des analytes) s'appuient sur les caractéristiques structurales

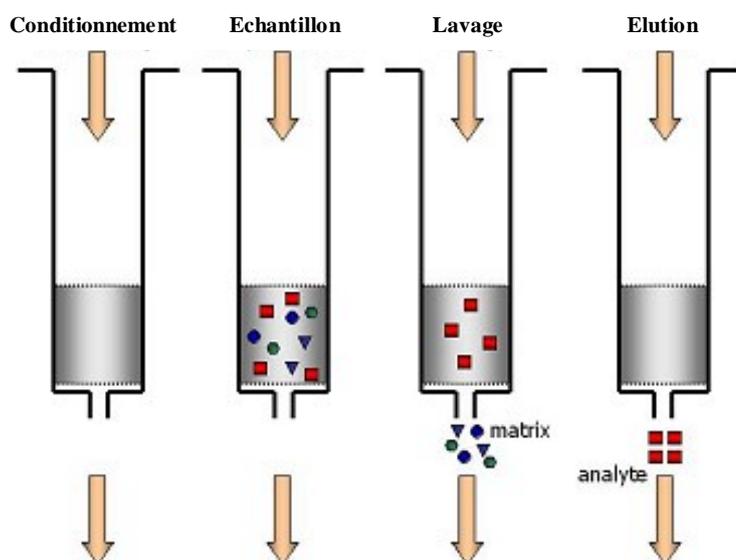
de la molécule, à savoir sa polarité ou sa taille, mais encore sa capacité à absorber dans l'UV ou à produire des signaux spectrométriques caractéristiques.

II.2 – L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION

L'analyse d'un échantillon d'aliment passe par plusieurs phases qui doivent être parfaitement maîtrisées. La première phase concerne la prise d'essai et implique la mesure précise d'un volume ou d'une masse selon qu'il s'agit d'un aliment liquide (lait, jus de fruits ...) ou solide. Une transformation physique de l'échantillon peut ensuite s'avérer nécessaire (lyophilisation, broyage, digestion enzymatique ou chimique) avant l'étape d'extraction (solide-liquide, ou liquide-liquide selon la nature de l'échantillon) suivie de la purification. Ces dernières étapes sont destinées à éliminer les composés qui pourraient interférer avec le dosage de l'analyte, et également à concentrer le soluté pour abaisser les limites de détection. Les méthodes de mesure utilisées, selon leur spécificité, nécessitent un nombre variable d'étapes de purification.

L'extraction liquide-liquide (LLE) permet le transfert de l'analyte issu d'un milieu complexe et difficile à travailler (l'échantillon) vers un solvant qui pourra ensuite être concentré, évaporé, ou encore destiné à des phases ultérieures de purification. Cette extraction liquide-liquide est basée sur le partage différentiel et sélectif de l'analyte entre deux solvants non miscibles. L'analyte migrera vers le solvant pour lequel il a le plus d'affinité ; cette opération peut être répétée plusieurs fois, pour tendre vers un rendement de récupération maximal. Après extraction, le solvant, selon sa nature, organique ou aqueuse, est respectivement évaporé (sous flux d'azote, sous vide...) ou transféré vers une colonne chromatographique en vue d'une purification ultérieure. L'étape LLE est une technique presque incontournable quel que soit le protocole utilisé. Elle présente quelques inconvénients liés à l'usage de tubes en verre (problèmes d'adsorption des composés polaires), ou à l'utilisation de grands volumes de solvants (parfois toxiques pour l'environnement et critiques en terme de temps d'évaporation) et enfin à la difficulté associée à l'automatisation de cette phase. Lorsque l'échantillon est liquide, cette étape peut être remplacée par une extraction en phase solide (SPE). Cette technique utilise une phase stationnaire de nature chimique variée, disposée dans un cartouche à usage unique. L'objectif est ici d'assurer simultanément l'extraction de l'analyte depuis l'échantillon, de le faire passer dans un volume restreint de solvant (concentration) tout en garantissant sa purification.

Figure 2 : Principe de la purification sur cartouche d'extraction en phase solide (SPE).



Cette étape SPE débute systématiquement par le conditionnement de la phase stationnaire par passage d'un solvant *ad hoc*, l'application de l'échantillon sur la colonne en veillant généralement à piéger l'analyte, le lavage du système chromatographique par un ou des solvants de manière à éliminer de manière sélective les composés interférents, et enfin l'élution sélective de l'analyte. La fraction collectée peut être évaporée partiellement ou complètement avant – si nécessaire – une ou des étapes de purification complémentaires. L'étape SPE repose sur divers principes chromatographiques et le choix de la nature du phénomène est conditionné par la polarité de l'analyte et la nature du milieu dans lequel il se trouve. Plusieurs principes peuvent être appliqués:

- la polarité avec deux types de phases :

- la phase normale où la phase stationnaire est plutôt polaire constituée soit de silice, de terre de diatomée, de silice greffée CN ou NH₂. Les solutions et milieux aqueux d'élution sont proscrits,
- la phase inverse où la phase stationnaire est plutôt apolaire constituée par exemple de silice greffée par des chaînes alkyles type C8 ou C18 ; l'élution des échantillons en solution ou milieu aqueux peut alors être pratiquée sur la colonne. Des phases copolymériques basées sur des mélanges styrène - vinylbenzène sont de plus en plus utilisées étant donné leur meilleure stabilité et leur plus grande capacité de fixation

- l'échange d'ions :

La phase stationnaire est constituée de silice greffée par des groupements fonctionnels type carboxylate ou ammonium (CO₂⁻ ou NH₃⁺). L'utilisation de ce principe implique évidemment que l'analyte soit ionisable (ex : ochratoxine A, fumonisines, moniliformine) ;

- l'interaction antigène-anticorps ou chromatographie d'immuno-affinité (Immuno Affinity Clean-up, IAC)

Cette technique très répandue offre une sélectivité qu'aucune autre phase stationnaire ne peut revendiquer. L'analyte dans l'échantillon est retenu par un anticorps fixé sur la phase stationnaire et qui lui est spécifique. Non reconnus par l'anticorps, les composés interférents ne sont pas retenus. L'élution de l'analyte passe par la rupture de sa liaison avec l'anticorps, soit par changement de pH, de force ionique et/ou de l'éluotropie du solvant. Des colonnes sont commercialement disponibles ; elles sont généralement dédiées à un seul analyte (aflatoxines, zéaralénone, ochratoxine A, fumonisines et déoxynivalénol), plus rarement à plusieurs (ochratoxine A et zéaralénone).

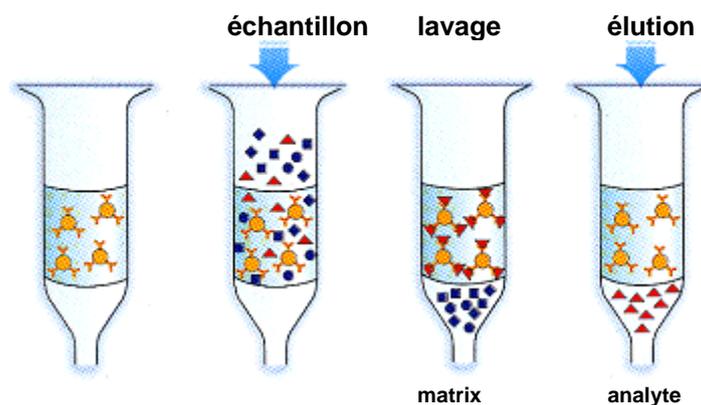


Figure 3 : Principe de la Chromatographie d'Immuno-Affinité

- l'empreinte moléculaire (Molecular Imprinted Polymers, MIP)

Cette technique émergente repose sur un principe proche de l'IAC à la différence près que la phase stationnaire est un polymère qui a été façonné chimiquement de telle sorte qu'il ne reconnaisse que la structure d'un composé cible et de ses analogues structuraux (figure 4). Cette technique a déjà été appliquée avec succès à l'ochratoxine A (Baggiani *et al.*, 2001 ;

Zhou *et al.*, 2004) mais il n'existe pas encore aujourd'hui un choix exhaustif de colonnes MIP consacrées aux mycotoxines.

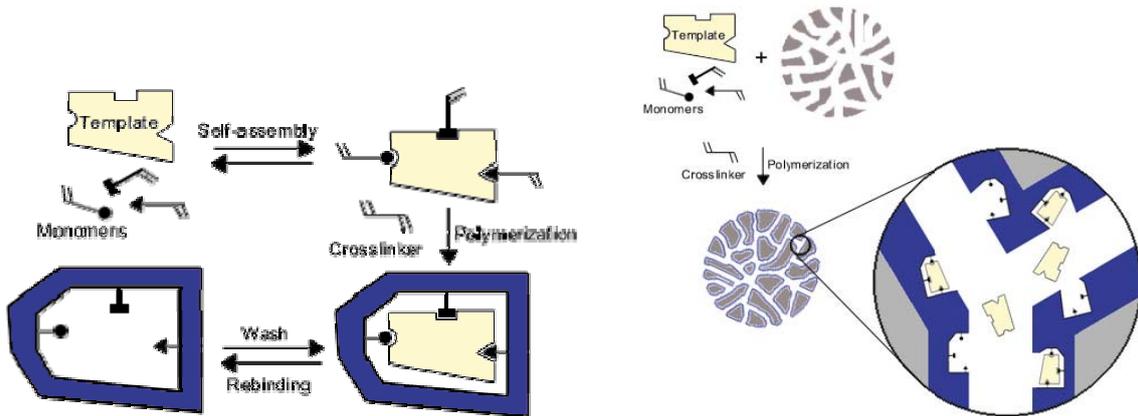


Figure 4 : Principe de fabrication d'une phase stationnaire type MIP.

Parallèlement à ces techniques traditionnelles et rencontrées sans exception pour l'ensemble des résidus et contaminants dans les aliments, il existe des kits SPE consacrés uniquement à la recherche des mycotoxines. Il s'agit notamment des colonnes Mycosep™ (distribuées par Romer Labs Inc., USA).

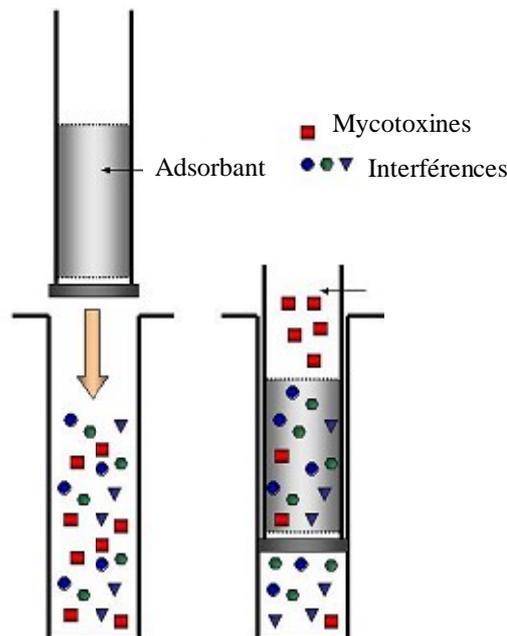


Figure 5 : Principe de la purification des mycotoxines sur système dédié (Mycosep™).

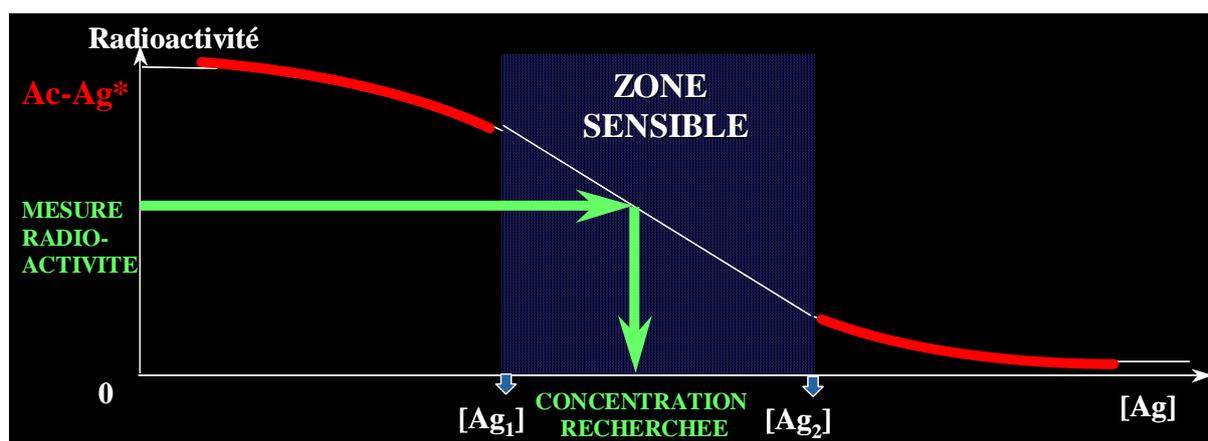
Plusieurs adsorbants spécifiques seuls ou en mélange (charbon, célide, résines échangeuses d'ions...) sont disposés dans un tube plastique, lui-même équipé à l'une de ses extrémités d'un fritté et d'une soupape à passage monodirectionnel. Lorsque cette colonne est introduite dans l'échantillon liquide (pré extrait ou non), ce dernier est contraint de parcourir la phase stationnaire. Les composés interférents sont piégés par la cartouche alors que la phase liquide récupérée contient les mycotoxines purifiées.

D'autres techniques moins répandues parce que parfois plus coûteuses, plus difficiles à mettre en œuvre ou encore moins efficaces sont utilisées pour l'étape d'extraction - purification des mycotoxines dans les aliments. Ainsi, l'extraction par fluide supercritique (SFE) (Krska, 1998), l'extraction accélérée par solvants (ASE) et l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) (Pallaroni et al., 2002) sont parfois citées. Elles présentent toutes une excellente efficacité en terme de récupération de l'analyte, caractéristique d'autant plus importante qu'il s'agit de matrices solides ; elles sont en outre parfaitement automatisables. En raison de l'investissement conséquent lié à l'acquisition de l'instrumentation correspondante, ces approches ne sont pas encore très répandues dans les laboratoires de contrôle. En ce qui concerne les autres techniques de purification utilisées pour les mycotoxines, la chromatographie liquide haute performance semi - préparative (HPLC) est considérée comme particulièrement sélective, même si elle reste fastidieuse à mettre en œuvre et relativement coûteuse pour un usage routinier.

II 3 - LES TESTS IMMUNOLOGIQUES

Pour ces tests, la réaction est rendue possible par addition à l'échantillon du même antigène marqué (Ag^*), de manière à ce qu'il y ait une compétition entre Ag et Ag^* vis-à-vis d'un nombre limité de sites anticorps. Selon le marquage d' Ag^* par une enzyme ou par de la radioactivité, la technique correspondante est respectivement désignée ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ou RIA (Radio Immuno Assay). La qualité de l'anticorps détermine la spécificité du test, en d'autres termes son affinité et sa sélectivité vis à vis de l'analyte recherché quelle que soit la complexité de la matrice. Dans le cas le plus favorable, aucune étape préalable de préparation de l'échantillon n'est à envisager, ce qui contribue encore à diminuer le délai de rendu de résultats.

Ces techniques ont l'avantage d'une grande rapidité de mise en œuvre, un coût réduit et enfin la possibilité de gérer un grand nombre d'échantillons dans une même série d'analyse. En revanche, les principaux reproches attribués à ce type de technique sont liés à la qualité de l'anticorps en termes d'affinité et de spécificité qui, lorsqu'elles sont faibles, contribuent à augmenter le risque de résultats erronés. Ce risque peut être amplifié par les divers constituants des matrices alimentaires et/ou la présence de traces de solvants qui peuvent perturber (ou interférer avec) la liaison $Ag-Ac$. Ceci signifie que ces méthodes nécessitent d'être caractérisées avant diffusion et utilisation et ne peuvent être considérées que comme des méthodes qualitatives de détection des toxines avec une portée semi-quantitative. Ceci implique nécessairement que l'échantillon soit soumis à une analyse de seconde intention surtout lorsqu'une concentration en analyte a été détectée ou a dépassé la valeur d'intérêt ou la limite réglementaire.



II. 4 - LES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DE DEPISTAGE

Les méthodes chromatographiques appliquées à la séparation et la mesure ont un principe commun qui fait intervenir une différence de comportement des constituants d'un mélange (comportant l'analyte) entre une phase stationnaire et une phase mobile. Trois types de techniques

chromatographiques sont principalement utilisées pour doser les mycotoxines : la chromatographie en couche mince (CCM), la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

La CCM a été historiquement la première technique de séparation appliquée à la détection et mesure des mycotoxines.

- la phase stationnaire est généralement constituée de liant fixé sur de la silice (greffée ou non) étalé en fine épaisseur (inférieure au 1/2 mm) le plus souvent sur une plaque de verre mais aussi sur d'autres supports (aluminium...) de dimension variable (20 x 20 cm, 20 x 10 cm, 10 x 10 cm ...),
- la phase mobile est soit apolaire à base de mélanges de solvants et alcools, soit polaire car constituée de mélanges d'alcools, eau ou autres préparations aqueuses), selon le type de phase stationnaire (respectivement plutôt polaire ou plutôt apolaire).

La CCM ne nécessite pas d'équipement sophistiqué notamment en cas d'observation et d'identification visuelles. Elle est très utile en cas de multidétection : des dépôts de la toxine étalon recherchée et de plusieurs extraits d'échantillons, ou des dépôts de plusieurs types de toxines étalons en dépistage et d'un ou plusieurs échantillon(s), peuvent être réalisés sur une même plaque et ainsi être séparés et visualisés en même temps. La CCM est également utile dans le cas de dépistage de fortes contaminations. Néanmoins elle est à considérer comme une technique plutôt qualitative ou semi quantitative, avec généralement une limite de détection assez élevée. De ce fait, elle n'est pas utilisable comme outil de contrôle de conformité à des limites réglementaires.

Les deux autres techniques séparatives sont nécessairement couplées à un détecteur permettant la caractérisation et le dosage de l'analyte. Ces détecteurs sont de spécificité et de sensibilités extrêmement variables.

Pour la CLHP la séparation repose :

- sur une différence de polarité des composés à séparer se déclinant en deux types de phases :
 - o en phase normale (phase stationnaire plutôt polaire constituée de silice, alumine, silice greffée avec des fonctions -CN ou -NH₂ et une phase mobile plutôt apolaire à base de solvants et alcools,
 - o en phase inverse (phase stationnaire plutôt apolaire constituée de silice greffée de chaînes alkyles de longueurs variables (C2 à C18) et une phase mobile plutôt polaire constituée sur la base d'alcools, d'eau ou d'autres préparations aqueuses),
- sur une différence de charge ionique : échange d'ions avec une phase stationnaire constituée par exemple de silice greffée par des fonctions -COOH ou -NH₂).

Les détecteurs utilisés en CLHP sont de type photomètre UV à longueur d'onde fixe pour les plus simples, à longueurs d'ondes variables (spectrophotomètres ou barrettes de diodes) pour les plus informatifs. La sensibilité atteinte par ces ensembles CLHP-UV est, dans le meilleur des cas, de l'ordre du nanogramme. La spécificité de l'information accordée par ces détecteurs est limitée surtout lorsqu'il s'agit de mettre en évidence des traces de mycotoxines dans des matrices biologiques complexes.

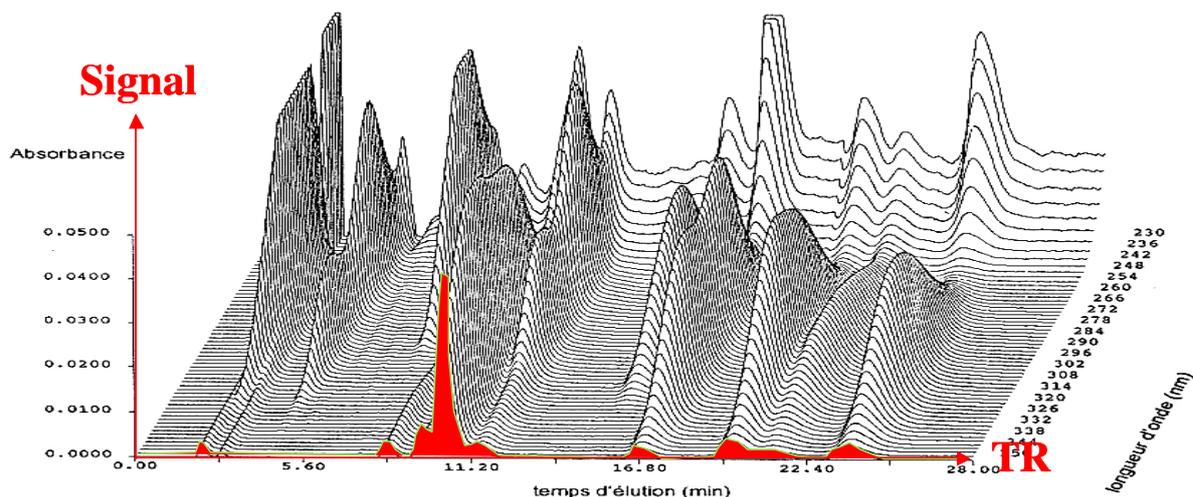


Figure 6 : Vue tridimensionnelle d'un chromatogramme obtenu avec un détecteur à barrettes de diodes (x : temps de rétention, y : intensité du signal, z : longueur d'onde en nm).

La CLHP peut également être couplée à un détecteur fluorimétrique lorsque l'analyte possède une fluorescence naturelle ou induite. Les composés se prêtant à ce type de détection sont généralement aromatiques, cycliques ou mieux polycycliques, aliphatiques avec des groupes carbonyles ou des doubles liaisons conjuguées. Dans ce cas la sensibilité peut être de 10 à 1000 fois supérieures à celle observée en UV et être inférieure au $\mu\text{g}/\text{kg}$. Compte tenu de sa spécificité, ce mode de détection convient particulièrement à l'analyse de certaines mycotoxines dans les aliments (aflatoxines, ochratoxine par exemple). Le détecteur électrochimique, d'un usage plus délicat en analyse de routine, fait preuve d'une excellente sensibilité pour les composés phénoliques ainsi qu'une spécificité remarquable. Enfin, le couplage de la CLHP avec la spectrométrie de masse (CLHP-SDM) supplante progressivement toutes les autres techniques, même si cette approche reste aujourd'hui encore réservée aux laboratoires de recherche ou d'expertise dans le cas d'échantillons problématiques. Le couplage sera discuté dans une partie spécifiquement dédiée dans ce rapport. En résumé, il n'existe pas, hormis le couplage CLHP-SDM, de techniques universelles c'est-à-dire s'adressant à toutes les mycotoxines sans exception, basées sur la chromatographie liquide et combinant à la fois sensibilité (pour la mesure de concentrations au maximum de l'ordre du ppb) et spécificité (capacité à distinguer de manière non ambiguë l'analyte d'un signal interférent).

Le principe de la séparation en CPG repose avant tout sur la différence de volatilité entre analytes, et dans une moindre mesure sur des affinités physico-chimiques respectives des solutés vis-à-vis de la phase stationnaire et de la phase mobile en fonction de leur polarité. Le degré de polarité des phases stationnaires varie selon la nature des greffons fixés sur la silice. Les moins polaires sont greffés par des groupements méthyles (type OV-1, SE-30, HP-1 selon le fournisseur) et la polarité augmente avec les groupements phényles ou nitriles (type DB-5, OV-1701), les plus polaires étant constituées de polyéthylène glycole (type Carbowax). La CPG peut être couplée à un détecteur aspécifique tels que le détecteur à ionisation de flamme (FID) ; ce dernier en brûlant l'éluat de la chromatographie génère des ions qui sont collectés sur une électrode et créent un courant électrique à l'origine du signal de détection. Une réponse est donc enregistrée quelle que soit la nature du soluté éluant hors de la colonne. On comprend aisément que le tracé chromatographique soit parfois difficilement interprétable dans les matrices alimentaires complexes où le nombre de composés interférents est potentiellement important. La CPG peut être couplée à un détecteur plus spécifique tel que le détecteur à capture d'électrons (ECD). Ce dernier permet la mise en évidence des composés halogénés avec une excellente sensibilité, ces composés étant capables de piéger les électrons émis par une source radioactive en sortie de colonne. Puisque peu de mycotoxines sont naturellement détectables par un détecteur ECD, il est nécessaire de les modifier par des réactions de dérivation de type fluoroacylation. Les mêmes remarques peuvent être émises pour le détecteur « azote-phosphore » (NPD) qui ne mesure que les analytes possédant ces deux éléments. Comme cela a été indiqué précédemment, le détecteur le plus performant en CPG est le spectromètre de masse. C'est la raison pour laquelle la CPG-SDM est utilisée de manière presque incontournable en méthode de confirmation, tout au moins pour les mycotoxines qui se prêtent à une séparation par chromatographie en phase gazeuse.

II. 5 - LES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DE CONFIRMATION

Les méthodes de confirmation généralement retenues pour une identification non ambiguë et, le cas échéant, pour la quantification d'un analyte reposent aujourd'hui de plus en plus fréquemment sur la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse ou à la chromatographie liquide haute performance. Le choix du type de chromatographie (CPG ou CLHP) est conditionné par la taille des molécules et leur polarité. Alors que la CPG est réservée aux petites molécules de polarité réduite (c'est le cas de certaines mycotoxines), la CLHP s'applique à pratiquement l'ensemble des molécules organiques quelles que soient leur taille et leur polarité, puisque finalement la seule obligation pour l'analyte est d'être soluble dans la phase mobile. La spectrométrie de masse met en jeu trois étapes : tout d'abord l'analyte est ionisé dans la source du spectromètre, les ions fragments sont ensuite séparés dans l'analyseur de masse avant d'être détectés. Différentes méthodes d'ionisation peuvent être utilisées selon les caractéristiques physico-chimiques de l'analyte. De même, un type d'analyseur de masse sera appliqué en fonction de la taille et la spécificité de l'information requise.

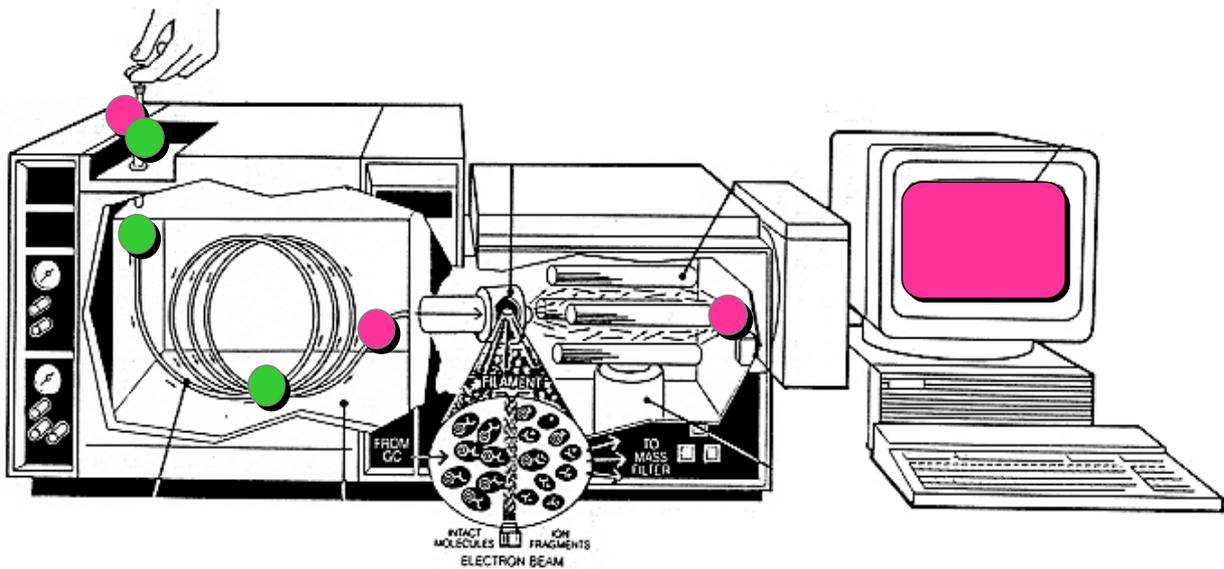


Figure 7 : Couplage CPG-SDM. Séparation des molécules d'un échantillon (CPG), ionisation des analytes séparés dans la source du SDM, puis mesure de la masse des ions fragments dans l'analyseur de masse.

En couplage CPG-SDM (figure 4), trois principales techniques d'ionisation sont possibles :

- l'impact électronique (EI) qui met en jeu une forte quantité d'énergie conduisant à une fragmentation prononcée des analytes. Le principal avantage est la richesse de l'information spectrale pour les composés stables (grand nombre d'ions diagnostiques), ce qui permet la démonstration non ambiguë de la présence de la molécule. En revanche, cette caractéristique peut se transformer en inconvénient majeur pour les molécules fragiles donnant naissance à de nombreux fragments de petites tailles dont l'intérêt diagnostique est faible.
- l'ionisation chimique positive (PCI) qui met en jeu une quantité moindre d'énergie en comparaison à l'EI. En effet, un gaz réactionnel (par exemple CH_4 , ou NH_3) est introduit dans la source du spectromètre de masse pour atténuer l'impact des électrons. L'analyte est ionisé par transfert de protons depuis le plasma d'ions du gaz, à condition que l'affinité protonique de l'analyte soit supérieure à celle du gaz. Le transfert d'énergie est ainsi limité et la fragmentation de l'analyte protoné est d'autant plus atténuée que la différence d'affinité protonique entre le gaz et l'analyte est faible (du méthane à l'ammoniac par exemple). La conséquence pratique pour les molécules qui s'y prêtent est l'obtention d'ions fragments de haute masse très utiles à l'établissement du diagnostic, en particulier dans le cas de la recherche d'un soluté au sein d'une matrice biologique complexe.

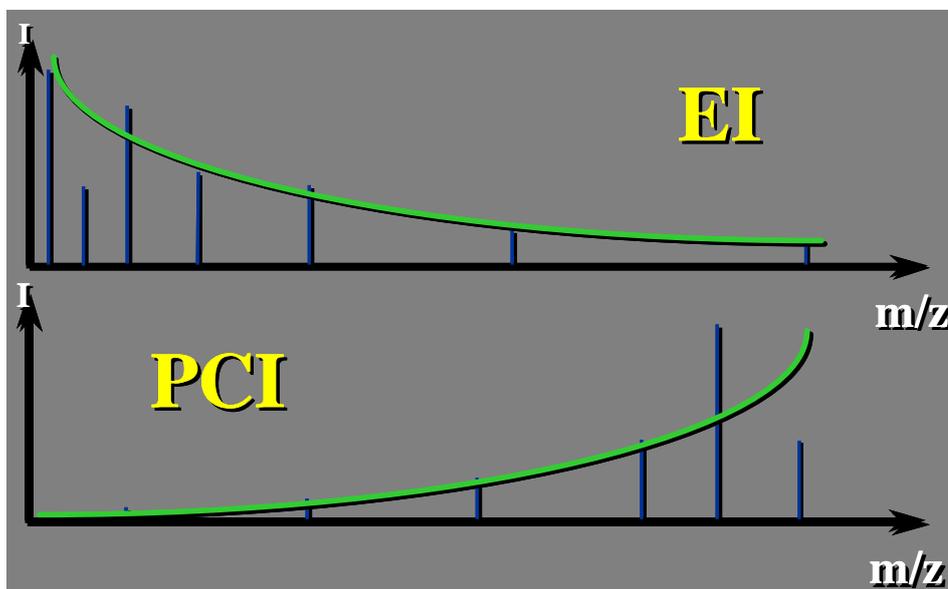


Figure 8 : Conséquence du choix de la technique d'ionisation sur le caractère diagnostique des ions retenus pour le dosage.

- L'ionisation chimique négative (NCI) met en jeu des électrons de faible énergie (<1 eV) produits en ionisation chimique après impact des électrons avec le gaz réactionnel. Certains analytes peuvent capturer les électrons produits et être ainsi détectés et quantifiés. C'est notamment le cas des molécules halogénées (naturellement ou après réaction de dérivatisation) pouvant produire des signaux d'une rare sensibilité.

En couplage CLHP-SDM, trois principales techniques d'ionisation sont utilisées. Toutes fonctionnent à pression atmosphérique mais s'adressent à un type particulier de composés dont la polarité et le domaine de masse sont limités:

- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Son principe est proche de celui de l'ionisation chimique positive. Ici, la phase mobile joue le rôle du gaz réactionnel en PCI. On observe alors le plus souvent la formation de l'ion quasi-moléculaire $(M+H)^+$ dans le mode positif et $(M-H)^-$ dans le mode négatif. L'interface APCI s'adresse aux composés de polarité réduite, et plutôt à des molécules de taille modeste n'excédant pas quelques milliers de Daltons.

- l'ionisation photonique à pression atmosphérique (APPI). Cette interface est la dernière née des techniques CLHP-SDM à pression atmosphérique. L'ionisation est initiée par des photons émis par une lampe UV. Ils ionisent les molécules de dopants introduites en post-colonne (toluène ou acétone), ces dernières transférant leur charge aux analytes à condition qu'ils aient un faible potentiel d'ionisation. L'ionisation étant sélective, ni la phase mobile, ni la grande majorité des substances interférentes ne sont ionisées, ce qui engendre une nette réduction du bruit de fond, donc à signal constant, une sensibilité de détection accrue.

- l'électrospray (ESI). L'ionisation est ici provoquée par l'application d'une grande différence de potentiel sur l'éluat de la CLHP. Les charges ainsi générées vont permettre après évaporation de la gouttelette, son explosion puis le transfert des analytes ionisés en phase gazeuse. Cette technique s'adresse à la presque totalité des molécules organiques, et particulièrement aux molécules de polarité importante voire ionisées, ainsi qu'aux composés de haut poids moléculaire. Cette méthode d'ionisation peut être exploitée indifféremment dans le mode positif ou négatif.

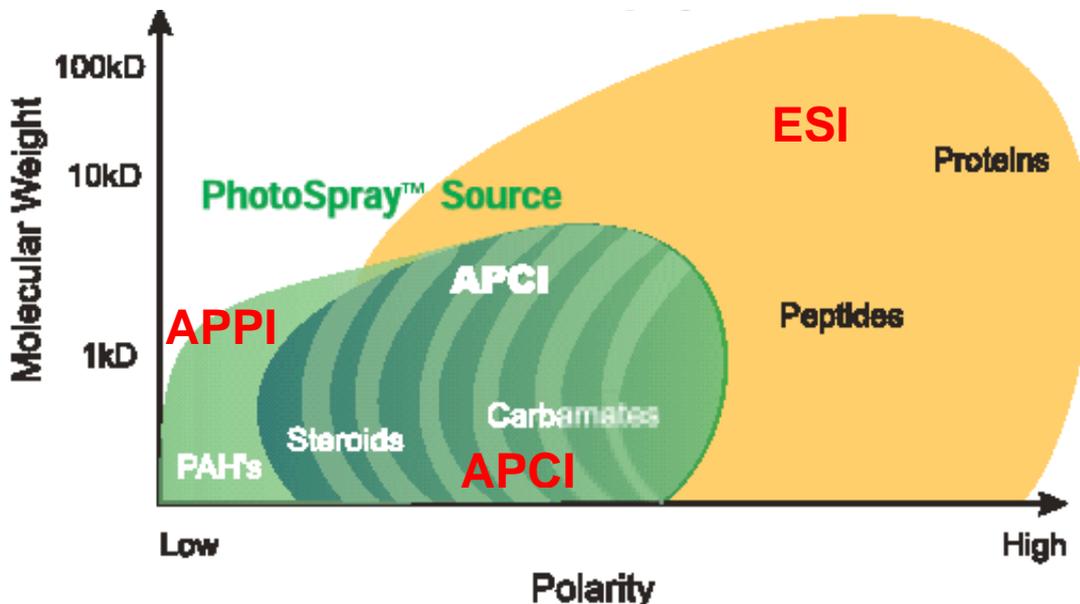


Figure 11 : Domaines d'application respectifs des différentes interfaces CLHP-SDM utilisées aujourd'hui dans les laboratoires.

III – CRITERES DE FIABILITE DES RESULTATS

Pour garantir la fiabilité de ses résultats analytiques, le laboratoire d'essai doit mettre en place plusieurs outils (Dragacci *et al.*, 2005). En premier lieu, l'ensemble de ses activités doit être placé sous assurance qualité selon un référentiel normatif, le plus adapté pour la prestation d'essai étant le référentiel ISO17025. Ensuite, les critères de performance de la méthode analytique doivent être parfaitement connus ; cette évaluation des limites hautes et basses de la méthode est également appelée phase de validation. Ainsi, il est demandé au laboratoire d'intégrer l'incertitude associée à la mesure, grandeur déterminée pendant la validation, et d'en tenir compte pour le résultat final figurant sur le rapport d'essai. Enfin, le laboratoire doit s'entourer de contrôles « qualité interne » (autocontrôle tel que la mesure régulière de matériaux de référence certifiés) et externe (comparaison à d'autres laboratoires par l'intermédiaire de campagnes d'analyses inter-laboratoires). L'ensemble de ces dispositions doit permettre au laboratoire de solliciter son accréditation auprès d'un organisme national d'accréditation tel que le COFRAC en France (Comité Français d'Accréditation).

III.1 - Performance et validation des méthodes

Une méthode d'analyse doit tout d'abord faire l'objet d'une description très détaillée de son protocole ou de ses modes opératoires. La caractérisation d'une méthode d'analyse consiste en l'étude d'un certain nombre de critères (appelés critères de performance) tels que la linéarité de réponse, les limites de détection et de quantification, la fidélité (répétabilité et reproductibilité), la justesse, ou encore le taux de récupération. Les techniques de détermination de l'ensemble de ces critères, et les outils statistiques correspondants, figurent dans la norme AFNOR V03-110 ; les directives contenues dans cette norme permettent d'effectuer la validation en interne d'une méthode – par exemple lorsque cette dernière a été mise au point dans un même laboratoire.

D'autres critères peuvent bien entendu être étudiés suivant les besoins ; par exemple :

- en cas d'étapes d'extraction et de purifications multiples, une étude de robustesse peut s'avérer nécessaire ;
- en cas d'utilisation de techniques immuno-chimiques, l'étude des critères « sensibilité » (ici, variation du signal en fonction de la variation de concentration en analyte) et « spécificité » (étude des réactions croisées) doit être initiée.

L'une des voies contribuant à fiabiliser les résultats d'analyse, et ceci quel que soit le laboratoire considéré, est l'utilisation de méthodes analytiques validées au préalable par une étude collaborative consistant en des essais inter-laboratoires. Il s'agit ici d'étudier à plusieurs laboratoires quelques critères de performance – par exemple la fidélité et la justesse – ceci sur un panel d'échantillons identiques. Les résultats sont traités statistiquement selon les instructions de la norme ISO 5725, ce qui permet d'assigner des valeurs de répétabilité, de reproductibilité et de justesse à la méthode. Ces validations inter-laboratoires sont souvent organisées par des laboratoires de référence (contrôle officiel des aliments) ou privés (autocontrôle des aliments dans une filière interprofessionnelle).

Pour les mycotoxines, plusieurs protocoles analytiques ont ainsi fait l'objet de telles validations inter-laboratoires.

III.2 - Compétence des laboratoires

La compétence analytique d'un laboratoire s'appréciera au regard d'un certain nombre d'outils de qualité et de maîtrise qu'il aura mis en place.

Le laboratoire de contrôle emploiera de préférence des méthodes d'analyse normalisées (publiées sous forme de normes AFNOR, EN, ISO...) dont la validation est garantie au moins par une analyse inter-laboratoire. En cas d'utilisation d'une méthode d'analyse nouvellement conçue, ou bien adaptée d'une norme par le laboratoire, ce dernier devra procéder à sa validation, en suivant la norme AFNOR V03-110.

Lors de l'application de la méthode, le laboratoire fera la démonstration de l'utilisation de contrôles de qualité internes. Ces contrôles consisteront notamment en l'emploi de solutions étalons des mycotoxines disponibles dans le commerce, après vérification de la pureté. Le laboratoire peut également utiliser des matériaux de référence – lorsqu'ils existent - qui sont des échantillons dont la teneur en analyte a été certifiée d'après les résultats d'une analyse effectuée par un ensemble de laboratoires experts. Pour les mycotoxines, de tels matériaux ont été élaborés sous forme stabilisée (en général sous atmosphère inerte en sachet aluminium) et commercialisée par l'Institut des

Matériaux de Référence (IRMM – Institute of Reference Materials and Measurement, anciennement le BCR (Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles, Belgique) dans le cadre de projets financés par la Commission Européenne. Les matériaux de référence sont coûteux et n'existent que pour certains couples matrices-mycotoxines (Tab. 1). Dès lors qu'ils existent, l'analyste se doit de les utiliser régulièrement, pour anticiper toute dérive, ou bien à chaque modification majeure du protocole d'analyse.

Pour prouver sa compétence, le laboratoire se doit également de participer à des essais d'aptitude. Un essai d'aptitude est une analyse inter-laboratoire où l'objectif est de comparer les résultats obtenus par les laboratoires à partir de l'analyse d'un même ensemble d'échantillons, la méthode d'analyse employée étant laissée au libre choix du laboratoire ou au contraire imposée lorsqu'il s'agit d'une méthode de référence pour un contrôle officiel mené par un réseau de laboratoires. Il existe plusieurs circuits d'essais d'aptitude pour l'analyse des mycotoxines les plus couramment recherchées (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, Deoxynivalenol, zéaralénone). Les organisateurs d'essais d'aptitude sont les laboratoires de référence ou des représentants d'une filière interprofessionnelle ou encore des organismes spécialisés : BIPEA (Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques) en France ou FAPAS (Food Analysis Proficiency Testing) en Grande-Bretagne. Il existe un référentiel normatif pour l'organisation d'essais d'aptitude et l'exploitation statistique des résultats inter-laboratoires qui est tout à fait adapté au domaine des mycotoxines. Les auditeurs mandatés périodiquement par les organismes d'accréditation examinent lors d'audits les résultats obtenus par le laboratoire aux essais d'aptitude, et se positionnent sur la compétence de la structure à bien mettre en œuvre la méthode pour laquelle elle demande l'accréditation. En cas d'échec à un essai d'aptitude, le laboratoire doit immédiatement rechercher les causes de l'écart et proposer des actions correctives.

La norme ISO17025 demande aux laboratoires d'exprimer l'incertitude sur le résultat d'analyse et de la rapporter sur le rapport d'essai si le client le demande. En effet, le calcul de l'incertitude totale par décomposition des incertitudes élémentaires n'est pas suffisant pour représenter toutes les sources de variabilité des protocoles d'analyse complexes qui sont mis en œuvre pour l'analyse des mycotoxines. De plus, même si certaines sources de variabilité sont correctement identifiées, elles sont parfois très difficiles à quantifier. L'AFNOR a reconnu la pertinence du critère « fidélité intermédiaire » pour l'estimation des incertitudes analytiques, notamment dans le domaine de l'analyse de traces de contaminants alimentaires (AFNOR V03-116). Cette position est également suivie par le Comité Européen de Normalisation (CEN).

Tab. 1 : Matériaux de référence certifiés et commercialisés par l'IRMM (Institut of Reference Materials and Measurement, Bruxelles, Belgique).

MYCOTOXINES	MATRICES	NIVEAUX DE CONTAMINATION (µg/kg)
AFLATOXINES B et G	BEURRE D'ARACHIDE	AFB1 < 0,2 AFB2 < 0,1 AFG1 < 0,1 AFG2 < 0,5 Aflatoxines totales < 0,5
AFLATOXINES B et G	BEURRE D'ARACHIDE	AFB1 < 7,0 AFB2 < 1,1 AFG1 < 1,7 AFG2 < 0,3 Aflatoxines totales < 10,1
AFLATOXINES B et G	TOURTEAUX DEGRAISSE	D'ARACHIDE < 3 43,3 206
AFLATOXINES B et G	ALIMENTS COMPOSES POUR ANIMAUX	< 1 9,3
AFLATOXINE M1	LAIT ENTIER EN POUDRE	< 0,05 0,09 0,31 0,76
OCHRATOXINE A	BLE	< 0,6 8,2
DEOXYNIVALENOL	FARINE DE MAÏS	< 0,05 0,43
DEOXYNIVALENOL	FARINE DE BLE	< 0,05 0,67

IV METHODES NORMALISEES et/ou VALIDEES

IV.1 – Procédure de normalisation des méthodes NF, EN ou ISO

Divers organismes de normalisation ont vocation à sélectionner puis proposer à la normalisation, c'est-à-dire à l'écriture sous un format standardisé, des protocoles d'analyse ayant reçu le consensus d'experts ou de spécialistes du domaine. Pour les mycotoxines, l'AFNOR (Association Française de NORmalisation, secteur agroalimentaire), le CEN (Comité Européen de Normalisation) et l'ISO (International Standard Organisation) ont procédé à la normalisation de plusieurs méthodes d'analyse. Suite à un accord de reconnaissance mutuelle au niveau européen, les normes publiées par le CEN (normes EN) doivent être reprises par chaque Etat Membre de l'Union Européenne et toute norme nationale existant dans le même champs d'analyse « s'incline » face à la norme EN correspondante. Les normes ISO bénéficient d'une reconnaissance internationale donc plus large mais leur aboutissement est implicitement plus long (consultation des experts au niveau mondial).

Les normes européennes doivent permettre aux professionnels de mettre sur le marché des denrées alimentaires respectant la réglementation et aux autorités publiques de vérifier de façon équitable que les denrées commercialisées respectent la réglementation en vigueur. Les méthodes normalisées EN sont ratifiées dans les trois langues officielles de l'Union Européenne (anglais, français, allemand).

Les étapes chronologiques menant à la parution d'une norme sont les suivantes :

- identification du besoin,
- programmation du groupe de travail,
- présentation du protocole analytique suivant le format de la norme et étude du dossier de validation,
- recherche du consensus par les experts,
- validation par enquête dans les Etats Membres,
- approbation par vote formel des Etats Membres,
- adoption formelle par le CEN,
- traduction dans les trois langues officielles,
- publication sous un format standardisé,
- révision quinquennale.

La normalisation privilégie les méthodes dites horizontales, c'est-à-dire dont le champ d'application permet d'analyser un grand nombre de matrices alimentaires selon le même squelette analytique. En effet, selon la nature et la composition de l'échantillon d'aliment, les sources d'interférences matricielles peuvent être significativement différentes, ce qui a pour conséquence d'aboutir à des protocoles différents suivant la matrice, ou pour des toxines appartenant à un même groupe de mycotoxines. La normalisation vise à sélectionner en priorité des protocoles adaptés à l'analyse des mycotoxines qui font l'objet d'une réglementation (ou en cours de projet) dans des denrées alimentaires qui elles-mêmes font l'objet d'une surveillance rapprochée. La sélection préalable des protocoles d'analyse privilégie les méthodes qui ont été validées suivant les guides normatifs en vigueur et, si possible, dont la validation a été confortée par un exercice de validation interlaboratoire. Ces protocoles ne doivent pas obliger à recourir à un unique fournisseur de réactifs et ne doivent pas dépendre de l'utilisation d'appareillage sophistiqué et coûteux car les méthodes ont vocation par définition à être transférées et utilisées par le plus grand nombre de laboratoires. Dans le cas particulier où un consommable/réactif particulier est recommandé, il convient de s'assurer qu'au moins deux fournisseurs sont disposés à délivrer ce dernier, ceci afin d'éviter toute exclusivité commerciale (exemple des colonnes d'immunoaffinité au début des années 1990). Enfin, il est recommandé que les protocoles d'analyse proposés à la normalisation du fait de leur large diffusion parmi les analystes respectent les consignes de sécurité pour l'environnement (par exemple en évitant l'utilisation de solvants chlorés).

Les protocoles d'analyse qui ont été jusqu'à présent retenus pour la normalisation sont des protocoles comprenant principalement des techniques chromatographiques. Les techniques immuno-chimiques sont encore considérées comme délicates à mettre en œuvre en particulier pour des échantillons d'aliment (risques d'interférences et donc de résultat faux positif), et sont encore écartées de ce processus de normalisation. Toutefois une norme AFNOR (NF V 04-421) a récemment été éditée pour aider les laboratoires à la mise en œuvre de techniques ELISA en sécurité des aliments.

Un certain nombre de méthodes d'analyse des mycotoxines a été dernièrement validé en inter-laboratoires (aflatoxines B, G et M1, ochratoxine A, patuline, fumonisines). La plupart des protocoles normalisés visant les matrices solides comprennent une étape de broyage, une étape de centrifugation et de filtration suivie d'une partition liquide-liquide et/ou d'une purification par

immunoaffinité, puis une analyse par chromatographie liquide couplée à une détection par fluorescence (pour la plupart des mycotoxines) ou par UV (patuline, DON, zéaralénone). Les normes parues concernent l'analyse des aflatoxines dans le beurre d'arachide, les pistaches, les figes, le maïs et le paprika (NF EN 12955 et NF EN 14123), l'aflatoxine M₁ dans le lait (NF EN ISO 14501), l'ochratoxine A dans l'orge et le café (NF EN 14132), dans le vin et la bière (NF EN 14133), les fumonisines dans le maïs et les produits dérivés (NF EN ISO 14501 et NF EN 14352), la patuline dans le jus de pomme et la compote de pomme (NF EN 14177).

IV. 2 – Liste des méthodes

IV.2.1 –Aflatoxines

Aflatoxines B et G dans le maïs, arachides et beurre d'arachide (méthode « Trucksess »)

- Norme NF EN 12955, octobre 1999 (indice classement AFNOR : V03-122) : Produits alimentaires - Dosage de l'aflatoxine B₁ et de la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans le maïs, les arachides brutes et le beurre d'arachide - Méthode par immunoaffinité puis chromatographie liquide avec dérivation post-colonne.
- Publication: Trucksess MW *et al.* : IAC coupled with fluorometry or liquid chromatography post-column derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter : collaborative study. Journal of AOAC International, 74 (1), 81-88, 1991.
- Parue comme méthode AOAC N° 991.31 dans « Official Methods of Analysis » de l'AOAC 17^{ème} édition 1995, chapitre 49, 20-22.

Aflatoxine B₁ et somme des aflatoxines dans le beurre d'arachide, les pistaches, les figes et le paprika

- Rapport EUR 18640 EN, paru en 1998.
- Norme NF EN 14123 (réf AFNOR V03-138) : Dosage de l'aflatoxine B₁ et de la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ G₂ présentes dans les cacahuètes, les pistaches, les figes et le paprika en poudre. Méthode de chromatographie liquide haute performance avec dérivation post-colonne et purification sur colonne d'immunoaffinité, décembre 2003
- Publication: Stroka J., Anklam E., Jörissen U., Gilbert J. : Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder : collaborative study. Journal of AOAC International, 83 (2), 320-340, 2000.
- Parue comme méthode AOAC N° 999.07 dans « Official Methods of Analysis » de l'AOAC 18^{ème} édition 2000, chapitre 49, 34-37.

Aflatoxine B₁ dans les baby food

- Rapport EUR 19509 EN, paru en 2000.
- Publication : Stroka J., Anklam E. : Determination of Aflatoxin B₁ in baby food (infant formula) by immunoaffinity column cleanup liquid chromatography with post-column bromination : collaborative study. Journal of AOAC International, 84 (4), 1116-1123, 2001.
- parue comme méthode AOAC N°2000.16 . Aflatoxin B₁ in Baby Food by IAC and HPLC.

Dosage de l'Aflatoxine B₁ et de la somme des Aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans les céréales, noix et produits dérivés, méthode par HPLC

- Projet de norme ISO/DIS 16050.2.

Aflatoxine B₁ dans l'alimentation animale

- Projet de norme ISO/TC 34 SC 10 N 908.
- Parue comme méthode AOAC N° 2003.02. Determination of Aflatoxin in Animal Feed by IAC clean-up and HPLC with Post Column Derivatization.

Aflatoxine M₁ dans le lait

- Norme FIL-IDF 111A : 1990 : Lait et lait sec : Dosage de l'aflatoxine M₁.
- Norme NF EN ISO 14501, février 1999, indice classement AFNOR:V04-175.
- Publication : Tuinstra L. G., Roos A. H., Trijp J. M.: Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup : interlaboratory study. Journal of AOAC International 1993;76:1249-1254.

- Norme NF EN ISO 14675, juin 2003 (indice classement AFNOR V 04-174) : Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en aflatoxine M₁.
- Rapport EUR 18856 EN, paru en 1999.
- Publication : Dragacci S., Grosso F., Gilbert J. : IAC cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M₁ in liquid milk : collaborative study. JAOAC International, 84 (2), 437-443, 2001.
- Parue comme méthode AOAC N° 2000.08. Aflatoxin M1 in Liquid Milk by IAC clean-up and HPLC.
- Adoptée comme document de travail du CEN/TC 302 « Lait » ; les résultats de cette validation incorporés lors de la révision de la NF EN ISO 14501.

IV.2.2 – Ochratoxine A

Ochratoxine A dans les céréales et les produits dérivés

- Norme NF EN ISO 15141 parties 1 et 2 (indice classement AFNOR:V03-121, parties 1 et 2). Foodstuffs - Determination of ochratoxin A in cereals and cereals products. Part 1 : HPLC method with silica gel chromatography clean up. Part 2 : HPLC method with bicarbonate clean up.

Ochratoxine A dans l'orge et le café

- Rapports EUR 19504 EN, paru en 2000 et EUR 18954 EN, paru en 1999.
- Norme CEN : EN 14132 (réf AFNOR V03-126), octobre 2003 : Dosage de l'ochratoxine A dans l'orge et le café torréfié.
- Publication : Entwisle A. C., Williams A. C., Mann P. J., Russell J., Slack P. T. : Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. Journal of AOAC International, 84 (2), 444-450, 2001.
- Parue comme méthode AOAC N° 2000.09. Determination of Ochratoxin in a Roasted Coffee by HPLC.
- Entwisle A. C., Williams A. C., Mann P. J., Slack P. T. : Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study. Journal of AOAC International, 83 (6), 1377-1382, 2000.
- Parue comme méthode AOAC N° 2000.03. Determination of Ochratoxin in Barley by HPLC.

Ochratoxine A dans le vin et la bière

- Norme CEN EN 14133 (réf AFNOR V03-128) : Determination of ochratoxin A in wine and beer. HPLC method with immunoaffinity column clean-up, juillet 2003.
- Publication : Visconti A., Pascale M. and Centonze G. : Determination of ochratoxin A in wine and beer by IAC clean-up an liquid chromatographic analysis with fluorometric detection. J AOAC International,, 84 (6), 1818-1828, 2001.
- parue comme méthode AOAC N°2001.01. Determination of ochratoxin A in wine by IAC clean-up and LC.

Ochratoxine A dans les baby food

- Rapport EUR 19718 EN, paru en 2001.
- Publication: Burdaspal P., Legarda M. : Determination of ochratoxin A in baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. Journal of AOAC International, 84 (5), 1445--1452, 2001.

Ochratoxine A dans la poudre de cacao

- Brera C., Grossi S., de Santis B., Miraglia M. : HPLC for the determination of ochratoxin A in cocoa powder, 2003.

IV.2.3 – Patuline

Patuline dans les jus de pomme et compotes

- Norme AFNOR NF V 76-116, novembre 1985 : Jus de pomme et boissons à base de jus de pomme – cidres. Détermination de la teneur en patuline.
- Rapport EUR 18857 EN, paru en 1999.
- Norme CEN : prEN 14177 (réf AFNOR V03-123).

- Publication : MacDonald S., Long M., Gilbert J. : Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree : collaborative study. Journal of AOAC International, 83 (6), 1387-1394, 2000.
- Parue comme méthode AOAC N° 2000.02. Determination of Patulin in Clear and Cloudy Apple Juices and Apple puree by HPLC.

IV.2.4 – Fumonisines

Fumonisines B1 et B2 dans le maïs et le maïs peu transformé

- Norme NF EN 13585, février 2002 : Détermination des fumonisines B₁ et B₂ dans le maïs. Méthode CLHP avec purification par extraction en phase solide. Octobre 1999 (AFNOR : V03-124).
- Publication : Sydenham E.W., Shepard G. S., Thiel P. G., Stockenstrom S., Snijman P. W., Van Schalkwyk D. J.: Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn. AOAC-IUPAC Collaborative study. Journal of AOAC International, 79 (3), 688-696, 1996.
- Parue comme méthode AOAC N° 995.15 dans « Official Methods of Analysis » de l'AOAC 18^{ème} édition 2000, chapitre 49, 44-46.

Fumonisines B1 et B2 dans les produits dérivés du maïs (farine, corn flakes)

- Projet de norme CEN : prEN 14352 (indice classement AFNOR : V03-140). Determination of fumonisins B₁ and B₂ in maize based foods by HPLC and IAC cleanup (Méthode Visconti).
- Publication : Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A. : Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and cornflakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup. J of AOAC International, 84 (6), 1828-1838, 2001.
- parue comme méthode AOAC N° 2001.04. Determination of Fumonisin B₁ and B₂ in Corn and Cornflakes by HPLC and IAC clean-up.

IV.2.5 – Déoxynivalenol

Déoxynivalenol dans le blé

AOAC Official Method 986.18 : déoxynivalenol dans le blé. Gas chromatographic method. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition (volume II), chap 49 Natural Toxins, 1995.

IV.2.6 – Zéaralénone

Zéaralénone dans le maïs

AOAC Official Method 985.18 : zéaralénol et zéaralénone dans le maïs. Liquid chromatographic method. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition (vol II), chap 49 Natural Toxins, 1995.

ANNEXE 2

EXPOSITION ANIMALE : METHODOLOGIE GENERALE

Rédaction : Alexandra Tard et Jean-Charles Leblanc

1. Régimes alimentaires

Les régimes utilisés dans les modèles de calcul d'exposition ont été fournis par des experts de chaque domaine du comité alimentation animale de l'Afssa.

Compte-tenu de la grande diversité des rations utilisées dans la pratique (variabilité due notamment au cours fluctuant des marchés des matières premières), les formulations ont été ici schématisées pour permettre une estimation de l'exposition pour un régime moyen considéré comme représentatif des pratiques professionnelles.

On dispose des régimes des animaux d'élevage suivants:

- Pour les porcins : 1^{er} et 2^{ème} âge, porcs croissance et finition, truies gestantes et allaitantes.
- Pour les volailles : poulets standard et label, poules pondeuses, canard, dinde, pintade.
- Pour les bovins : vaches laitières, vaches de réforme, bœufs, taurillons et génisses

Les régimes alimentaires sont présentés dans les tableaux 1, 2 et 3.

2. Données de contamination

Les données analytiques qui ont servi de base à l'évaluation de l'exposition des animaux d'élevage sont issues des contrôles officiels (plans de surveillance et de contrôle) réalisés de 2001 à 2004 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et de 1999 à 2004 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF). Toutes mycotoxines et matrices confondues, 636 résultats ont été fournis par la DGCCRF et 1353 par la DGAI.

En plus de ces données de contrôle, d'autres données transmises par les professionnels ont été utilisées. Il s'agit de :

- Qualimat (association des industriels de l'alimentation animale du Grand Ouest) a transmis un grand nombre de données (n=2650) reflétant la diversité des produits destinés à l'alimentation animale. Il s'agit de résultats des recherches de DON, OTA, Zéaralénone, toxine T-2 et fumonisines B1 et B2, datant des années 2002 à 2004.
- Arvalis-Institut du végétal (organisme de recherche appliquée agricole, financé et géré par les producteurs) et l'Institut de l'élevage ont fourni des données de contamination de fusariotoxines et d'OTA sur des échantillons de co-produits de céréales, données provenant d'une enquête de 2003-2004 (n=110).
- Les enquêtes ONIC-Arvalis sur le blé tendre, le blé dur et le maïs grain apportent des résultats d'analyses de toxines de *Fusarium* pour les années 2000 à 2005 (n=943).
- Une enquête UNIP-Arvalis permet de disposer de valeurs de contamination sur les pois (de 2000 à 2006 ; n=104) et les féveroles (2005-2006 ; n=19) pour les toxines de *Fusarium*, les fumonisines B1 et B2, l'OTA et l'aflatoxine B1.

Aucune donnée d'aliments produits à la ferme n'a pu être recueillie pour cette étude bien que cela représente une part de l'alimentation des animaux.

Plusieurs résultats concernant des aliments non clairement définis (composition inconnue), tels que « aliments complets », « compléments », ou des aliments dont le libellé n'est pas suffisamment précis : « fourrages bovins », « autres céréales » ou encore des analyses sur un mélange de

produits : « arachides et tourteaux d'arachides », ont été jugés comme non utilisables pour cette évaluation.

De plus, les types d'aliments pour lesquels peu de données (< 5 valeurs) sont disponibles n'ont pas été retenus pour participer au calcul total d'exposition.

Des différences importantes ont été observées quant aux limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) entre les différentes sources de données.

Par ailleurs, il existe dans ces données, une forte proportion de valeurs dites censurées, c'est à dire non détectée (<LOD) ou non quantifiée (<LOQ).

Afin de tenir compte de ces résultats dans le niveau de contamination des denrées, plusieurs scénarii de traitement de ces valeurs ont été réalisés.

Dans un premier temps, les valeurs ND sont remplacées par la moitié de la limite de détection (ND =1/2 LOD) et les résultats d'analyses inférieures à la LOQ sont estimés comme étant égaux à la moitié de cette valeur (<LOQ=1/2 LOQ), cette estimation est qualifiée de "minimale calculée".

Ensuite, afin de prendre en compte les situations de contamination élevée, seules ont été utilisées les valeurs positives ou non nulles c'est-à-dire les valeurs pour lesquelles un niveau de contamination a été détecté. Quant aux valeurs inférieures à la LOQ, on considère alors qu'elles sont égales à la moitié de la limite de quantification (< LOQ = 1/2 LOQ). L'utilisation du 75^{ème} ou du 95^{ème} percentile de ce scénario offre une estimation de "positive calculée".

3. Estimation de l'exposition

A la différence de l'estimation de l'exposition chez l'homme présentée en µg/kg de poids corporel/jour, l'exposition est ici calculée en µg/kg d'aliments. C'est donc le calcul de la contamination de la ration composée qui est présenté. De même, les calculs d'exposition ont été effectués sur le principe d'une estimation déterministe standard. En effet, on a utilisé les moyennes et p75 et p95 de contamination d'une part et les niveaux de consommation moyens estimés dans les différents régimes des animaux d'élevage d'autre part.

Les données de contamination relevées ont été comparées aux teneurs réglementaires dans le cas de l'aflatoxine B1 (directive 2002/32/CE) ou aux teneurs maximales recommandées dans les cas des DON, fumonisines, zéaralénone, OTA (recommandation 2006/576/CE).

Compte-tenu du manque de données pour certains des aliments composant les différents régimes des animaux d'élevage (soit aucune valeur pour une matière première donnée tel que « fourrage », soit moins de 5 valeurs pour d'autres), certaines composantes des régimes n'ont pas de contamination définie, ainsi l'exposition calculée ne correspond pas à l'ensemble de la ration. On pourra ainsi calculer le pourcentage de la ration pris en compte dans l'estimation.

Pour les espèces autres que porcins et volailles telles que les ruminants, les estimations n'ont pu être effectuées, les régimes comportant pour une très large part des aliments pour lesquels les données de contamination sont insuffisantes : foin, pâturage ou encore ensilages. Néanmoins, une simulation a été effectuée en vue du calcul des estimations théoriques de teneurs en AFM1 du lait. La simulation prend en compte, selon les différents régimes pour la vache laitière (voir tableau 3a), uniquement les teneurs maximales réglementaires de l'aflatoxine B1 (directive 2002/32/CE) dans les matières premières susceptibles d'en contenir telles que tourteau de soja, maïs (en grain et en ensilage) alors que l'herbe (en pâturage, en foin ou en ensilage) a été considérée exempte d'aflatoxine B1 (voir chapitre 1 « Aflatoxines » Tableau 4).

Les estimations de l'exposition des porcins et des volailles (données de contamination par groupe d'aliments et données de contamination par type de ration) à l'aflatoxine B1, l'Ochratoxine A, le Déoxynivalénol, la Zéaralénone, et la Fumonisine B1 sont indiqués dans les tableaux 4 à 23.

Tableaux 2 : Régimes alimentaires pour les volailles

2a : Poulet standard

Matières premières	Composition de la ration (en %)			
	Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION	Poulet RETRAIT
	%	%	%	%
Mais	18,5	12,2	7,6	8,3
Blé	40,0	50,0	55,0	60,0
Tourteau de soja 48	34,8	28,1	19,1	15,6
Graine de soja		0,5	9,5	10,3
Tourteau de tournesol		3,0	3,0	
Huile de soja	2,6	2,5	2,5	2,5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres	4,1	3,8	3,4	3,3
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

2b : Poulet label

Matières premières	Composition de la ration (en %)		
	Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION RETRAIT
	%	%	%
Mais	34,6	41,5	40,3
Blé	30,0	35,0	35,0
Son fin	1,2	1,1	
Pois			4,4
Tourteau de soja 48	30,6	19,1	17,1
Huile de soja			0,2
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres	3,6	3,3	3,0
Total	100,0	100,0	100,0

2e : Canard

	Composition de la ration (en %)		
	Canard DEMARRAGE	Canard CROISSANCE	Canard FINITION
Matières premières	%	%	%
Maïs	20,4	22,2	19,9
Blé	50,0	57,0	61,9
Tourteau de soja 48	21,7	14,1	7,5
Graine de soja	4,5	3,6	8,0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres	3,4	3,3	2,7
Total	100,0	100,0	100,0

2f : Pintade

	Composition de la ration (en %)		
	Pintade DEMARRAGE	Pintade CROISSANCE	Pintade FINITION RETRAIT
Matières premières	%	%	%
Maïs	45,6	52,5	60,4
Blé	10,0	10,0	5,0
Concentré protéique luzerne			0,4
Pois	2,7		
Tourteau de soja 48	35,5	23,8	22,0
Graine de soja		7,8	5,6
Huile de soja	1,0		0,6
Huile	1,0	2,0	2,5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres	4,2	3,9	3,6
Total	100,0	100,0	100,0

Tableaux 3 : Régimes alimentaires pour les bovins

3a : Exemples de régimes alimentaires français selon les niveaux de production laitière pour une vache de 650 kg (source INRA, Jouany, communication personnelle).

Nature du fourrage	Production lait (kg/j)	Quantités d'aliments ingérées (kg/j)		
		Fourrage	Maïs Grain	Tourteau de soja
Ensilage de maïs	30	15,3	4,4	2,3
	40	15,0	9,5	2,8
	50	14,7	8,8	4,4
Ensilage d'herbe	30	17,4	3,5	0,78
	40	16,8	9,2	0,8
	50	16,5	12,5	0,82
Foin	30	16,3	8,0	0,19
	40	16,3	12,6	0,73
	50	15,8	11,0	2,3
Pâturage (herbe)	30	19,9	1,2	0
	40	18,8	7,2	0
	50	18,2	12,8	0

3b : Exemples de types de régimes alimentaires français pour les vache de réforme, taurillon, bœuf et génisse, selon la saison (source INRA, 2007. Alimentation des bovins, ovins, caprins. Besoins des animaux-Valeurs des Aliments. Editions Quae, Paris, 307p)

Matières premières (en %)	été		hiver	
	Type 1*	Type 2*	Type 1*	Type 2*
Herbe	100	0	0	0
Maïs ensilage	0	0	65	0
Aliment concentré	0	70	35	70
Foin	0	30	0	30
Total	100	100	100	100

*type 1 et type 2 correspondent :

- pour les vaches de réforme respectivement à 60 et 40 % du cheptel aussi bien en hiver qu'en été
- pour les bœufs et génisses respectivement à 40 et 60 % du cheptel en été et à 50 et 50 % du cheptel en hiver
- pour les taurillons, régime de type 2 pour 100% du cheptel, en été et hiver

NB : L'apport de suppléments lipidiques durant la phase de finition s'est développé en France sous formes : d'huiles végétales, de savons calciques ou de lipides micronisés (palmitostéarine), mais surtout de graines oléagineuses (lin, colza, soja, tournesol). L'emploi de matières grasses est généralement bien toléré si les quantités apportées ne dépassent pas 5-6% de la matière sèche ingérée.

Tableau 4 : Niveaux de contamination en aflatoxine B1 par groupes d'aliments ; ensemble des valeurs, estimation intermédiaire : ND=1/2 LOD ; <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=908 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
blé	7	0.025	0.038	0.050	0.064	0.100	0.100	0.100
corn gluten feed	40	0.025	0.088	0.250	0.545	1.000	2.000	3.000
maïs	159	0.025	0.100	0.100	0.161	0.100	0.400	2.700
manioc	6	0.050	0.250	0.250	0.258	0.250	0.438	0.500
pois	20	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
sarrasin	5	0.050	0.050	0.050	0.060	0.050	0.090	0.100
soluble de distillerie	9	0.100	0.500	0.500	0.567	0.500	1.000	1.000
son	7	0.025	0.025	0.025	0.032	0.038	0.050	0.050
tourteaux arachide	286	0.100	3.000	4.000	5.315	7.000	13.000	29.000
tourteaux colza	6	0.025	0.025	0.025	0.038	0.025	0.081	0.100
tourteaux coton	14	0.025	8.250	12.300	13.990	18.500	30.700	45.000
tourteaux palmiste	173	0.025	0.250	0.250	0.631	0.250	1.000	24.000
tourteaux soja	122	0.025	0.100	0.100	0.288	0.250	0.695	8.000
tourteaux tournesol	54	0.025	0.250	0.750	0.999	1.000	3.000	6.000

Tableau 5 : Niveaux de contamination en aflatoxine B1 par groupes d'aliments ; valeurs non nulles, <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=419 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn gluten feed	19	0.500	0.500	1.000	1.032	1.150	9.000	3.000
maïs	15	0.060	0.300	0.400	0.801	1.250	4.800	2.700
manioc	1	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	5.450	0.500
soluble de distillerie	8	0.500	0.500	0.500	0.625	0.625	6.955	1.000
tourteaux arachide	282	0.200	3.000	4.000	5.388	7.000	10.000	29.000
tourteaux coton	13	1.000	9.000	15.000	15.070	19.000	11.750	45.000
tourteaux palmiste	18	0.500	0.500	1.000	4.011	1.000	15.000	24.000
tourteaux soja	28	0.200	0.475	0.500	0.895	0.625	12.500	8.000
tourteaux tournesol	35	0.300	1.000	1.000	1.480	2.000	9.550	6.000

Tableau 6 : Contamination par l'aflatoxine B1 de la ration des porcins en µg/kg d'aliments

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Porcelet 1er âge	Porcelet 2ème âge	Porc croissance Corpen	Porc finition Corpen	Truies gestantes	Truies allaitantes
	valeurs limites	moyenne	p75	p95						
Matières premières	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%	%	%
Maïs	20	0.2	1.3	4.8		15.0	16.4	21.5	18.4	11.0
Maïs Floconné	20	0.2	1.3	4.8	35.0					
Blé	20	0.1			21.5	32.0	20.0	20.0	10.0	10.0
Orge	20					20.0	19.0	10.0	25.0	20.0
Remoulage de blé blanc	20					7.5	8.0	7.5	2.5	15.0
Tourteau de soja Brésil 48	20	0.3	0.6	12.5	7.5	11.0	9.0			8.5
Tourteau de colza France	20	0.0				2.0	3.4	9.5		
Tourteau de tournesol France	20	1.0	2.0	9.6					6.0	1.6
Pois	20	0.5				3.5	20.0	19.0	13.9	12.0
Pulpe de betterave France	20								2.0	1.5
Son fin de blé	20	0.0						9.0	15.0	11.5
Luzerne	20								2.0	1.5
Graine de soja cuite	20					5.0				
Huile de soja brute					1.0				0.8	2.9
Huile de colza brute										
Noyau porcelet : Mélange de lactosérum, vitamines, minéraux, etc...					35.0					
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres						4.0	4.2	3.5	4.4	4.5
contamination théorique de la ration					12.8	19.2	19.2	19.3	19.0	18.5
contamination minimale calculée					0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2
contamination de la ration (p95 des positifs)					2.6	2.1	1.9	1.0	1.5	1.7

Tableaux 7 : Contamination par l'aflatoxine B1 de la ration des volailles en µg/kg d'aliments

7a : Poulets standard

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Dir 2002/32/CE valeurs limites	Toutes données moyenne	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION	Poulet RETRAIT
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	p75 (en µg/kg)	p95 (en µg/kg)	%	%	%	%
Maïs	20	0.2	1.3	4.8	18.5	12.2	7.6	8.3
Blé	20	0.1			40.0	50.0	55.0	60.0
Tourteau de soja 48	20	0.3	0.6	12.5	34.8	28.1	19.1	15.6
Graine de soja	20					0.5	9.5	10.3
Tourteau de tournesol	20	1.0	2.0	9.6		3.0	3.0	0.0
Huile de soja					2.6	2.5	2.5	2.5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.2	3.5	3.4	3.3
contamination théorique de la ration					18.7	18.7	18.8	18.8
contamination minimale calculée					0.2	0.2	0.1	0.1
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.4	0.4	0.3	0.2
contamination de la ration (p95 des positifs)					5.2	4.4	3.0	2.3

7b : Poulet label

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Dir 2002/32/CE valeurs limites	Toutes données moyenne	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION RETRAIT
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	p75 (en µg/kg)	p95 (en µg/kg)	%	%	%
Maïs	20	0.2	1.3	4.8	34.6	41.5	40.3
Blé	20	0.1			30.0	35.0	35.0
Son fin	20	0.0			1.2	1.1	0.0
Pois	20	0.5			0.0	0.0	4.4
Tourteau de soja 48	20	0.3	0.6	12.5	30.6	19.1	17.1
Huile de soja					0.0	0.0	0.2
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					3.6	3.3	3.1
contamination théorique de la ration					19.3	19.3	19.4
contamination minimale calculée					0.2	0.1	0.2
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.6	0.6	0.6
contamination de la ration (p95 des positifs)					5.5	4.4	4.1

7c : Poule pondeuse

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Dir 2002/32/CE valeurs limites	Toutes données moyenne	Données positives		Poulette DEMARRAGE	Poulette CROISSANCE	Poulette REPRO- ENTRETIEN	Poule PONDEUSE
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	p75 (en µg/kg)	p95 (en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	20	0.2	1.3	4.8	30.8	30.0	30.0	30.3
Blé	20	0.1			30.0	35.8	35.0	30.0
Son fin de blé	20	0.0			2.9	5.8	7.0	4.9
Tourteau de soja 48	20	0.3	0.6	12.5	25.3	17.7	15.5	20.8
Tourteau de tournesol	20	1.0	2.0	9.6	0.0	0.0	0.0	3.0
Pois	20	0.5			5.0	5.0	7.5	0.0
Luzerne	20					1.0		
Huile de soja					1.6	0.5	0.5	1.1
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.3	4.2	4.5	9.8
contamination théorique de la ration					18.8	19.1	19.0	17.8
contamination minimale calculée					0.2	0.1	0.2	0.2
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.5	0.5	0.5	0.6
contamination de la ration (p95 des positifs)					4.6	3.6	3.4	4.3

7e : Dinde

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Dindon DEMARRAGE	Dindon CROISSANCE 1	Dindon CROISSANCE 2	Dindon FINITION 1	Dindon FINITION 2	Dindon FINITION 3
	valeurs limites	moyenne	p75	p95						
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	
Maïs	20	0.2	1.3	4.8	10.0	4.5	6.1	13.3	5.1	6.0
Blé	20	0.1			30.9	40.0	45.0	45.1	55.0	58.3
Graine de soja cuites	20				3.5	7.5	3.2	4.0	3.8	11.8
Tourteau de soja 48	20	0.3	0.6	12.5	47.1	37.4	34.4	28.3	21.5	16.9
Tourteau de tournesol	20	1.0	2.0	9.6	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0
Pois	20	0.5			0.0	3.0	4.0	0.0	6.0	0.0
Huile de soja					0.5	0.6		1.1	1.5	0.0
Huile végétale Bergafat KP					2.0	2.0	3.0	3.2	3.5	3.6
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					6.0	5.1	4.4	3.8	3.7	3.4
contamination théorique de la ration					18.3	18.5	18.5	18.4	18.3	18.6
contamination minimale calculée					0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.4	0.3	0.3	0.4	0.2	0.2
contamination de la ration (p95 des positifs)					6.4	4.9	4.6	4.3	2.9	2.4

7f : Pintade de chair

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Pintade DEMARRAGE	Pintade CROISSANCE	Pintage FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)				
Maïs	20	0.2	1.3	4.8	45.6	52.5	60.4
Blé	20	0.1			10.0	10.0	5.0
Concentré protéique luzerne	20				0.0	0.0	0.4
Pois	20	0.5			2.7	0.0	0.0
Tourteau de soja 48	20	0.3	0.6	12.5	35.5	23.8	22.0
Graine de soja	20				0.0	7.8	5.6
Huile de soja					1.0	0.0	0.6
Huile					1.0	2.0	2.5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.2	3.9	3.6
contamination théorique de la ration					18.7	18.8	18.7
contamination minimale calculée					0.2	0.2	0.2
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.8	0.9
contamination de la ration (p95 des positifs)					6.6	5.5	5.6

7g : Canard barbarie

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Dir 2002/32/CE valeurs limites	Toutes données moyenne	Données positives		Canard DEMARRAGE	Canard CROISSANCE	Canard FINITION
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	p75 (en µg/kg)	p95 (en µg/kg)	%	%	%
Maïs	20	0.2	1.3	4.8	20.4	22.2	19.9
Blé	20	0.1			50.0	57.0	61.9
Tourteau de soja 48	20	0.3	0.6	12.5	21.7	14.1	7.5
Graine de soja	20				4.5	3.6	8.0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					3.5	3.3	2.7
contamination théorique de la ration					19.3	19.3	19.5
contamination minimale calculée					0.1	0.1	0.1
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.4	0.4	0.3
contamination de la ration (p95 des positifs)					3.7	2.8	1.9

7h : Canard prêt à gaver

Composition formule type	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration	
	Dir 2002/32/CE valeurs limites	Toutes données moyenne	Données positives		élevage	gavage
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	p75 (en µg/kg)	p95 (en µg/kg)	%	%
blé	20	0.1			40	
maïs	20	0.2	1.3	4.8	35	98
ftx soja/colza + tournesol	20	0.3	0.6	12.5	20	
prémix					5	2
contamination théorique de la ration					19.0	19.6
contamination minimale calculée					0.1	0.2
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.6	1.2
contamination de la ration (p95 des positifs)					4.2	4.7

Tableau 8 : Niveaux de contamination en ochratoxine A par groupes d'aliments ; ensemble des valeurs, estimation middle bound : ND=1/2 LOD ; <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=1042 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
blé	302	0.100	0.250	0.250	0.684	0.250	1.000	35.000
corn feed	31	0.500	0.500	0.500	0.581	0.500	0.500	3.000
farine basse	12	0.250	0.500	0.500	0.461	0.500	0.516	0.536
gluten feed de blé	120	0.250	0.250	1.000	1.596	2.225	4.510	14.230
issues de céréales	22	0.500	1.000	6.500	8.523	14.000	16.900	41.000
maïs	128	0.100	0.250	0.250	0.287	0.250	0.500	1.800
orge	239	0.150	0.250	0.250	0.395	0.250	1.000	7.000
paille de blé	7	0.500	0.500	0.500	0.900	0.500	2.460	3.300
remoulage	62	0.250	0.250	0.600	1.227	1.000	2.989	19.750
son	102	0.250	0.250	0.500	0.938	1.030	2.495	7.520
sorgho	6	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
ttx colza	5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ttx soja	6	0.500	1.000	1.000	0.917	1.000	1.000	1.000

Tableau 9 : Niveaux de contamination en ochratoxine A par groupes d'aliments ; valeurs non nulles, <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=654 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
blé	150	0.100	0.250	0.250	1.126	1.000	3.845	35.000
corn feed	31	0.500	0.500	0.500	0.581	0.500	0.500	3.000
farine basse	12	0.250	0.500	0.500	0.461	0.500	0.516	0.536
gluten feed de blé	120	0.250	0.250	1.000	1.596	2.225	4.510	14.230
issues de céréales	22	0.500	1.000	6.500	8.523	14.000	16.900	41.000
maïs	25	0.100	0.250	0.250	0.438	0.500	1.300	1.800
orge	106	0.250	0.250	0.250	0.578	0.438	1.925	7.000
paille de blé	7	0.500	0.500	0.500	0.900	0.500	2.460	3.300
remoulage	62	0.250	0.250	0.600	1.227	1.000	2.989	19.750
son	102	0.250	0.250	0.500	0.938	1.030	2.495	7.520
sorgho	6	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
ttx colza	5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ttx soja	6	0.500	1.000	1.000	0.917	1.000	1.000	1.000

Tableau 10 : Contamination par l'OTA de la ration des porcins en µg/kg d'aliments

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Porcelet 1er	Porcelet	Porc croissance	Porc finition	Truies	Truies
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	âge	2ème âge	Corpen	Corpen	gestantes	allaitantes
Matières premières	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%	%	%
Maïs	250	0.3	0.5	1.3		15.0	16.4	21.5	18.4	11.0
Maïs Floconné	250	0.3	0.5	1.3	35.0					
Blé	250	0.7	1.0	3.8	21.5	32.0	20.0	20.0	10.0	10.0
Orge	250	0.4	0.4	1.9		20.0	19.0	10.0	25.0	20.0
Remoulage de blé blanc	250	1.2	1.0	3.0		7.5	8.0	7.5	2.5	15.0
Tourteau de soja Brésil 48	250	0.9	1.0	1.0	7.5	11.0	9.0			8.5
Tourteau de colza France	250	1.0	1.0	1.0		2.0	3.4	9.5		
Tourteau de tournesol France	250						0.0		6.0	1.6
Pois	250					3.5	20.0	19.0	13.9	12.0
Pulpe de betterave France	250						0.0		2.0	1.5
Son fin de blé	250	0.9	1.0	2.5				9.0	15.0	11.5
Luzerne	250								2.0	1.5
Graine de soja cuite	250					5.0				
Huile de soja brute					1.0		0.0		0.8	2.9
Huile de colza brute							0.0			
Noyau porcelet : Mélange de lactosérum, vitamines, minéraux, etc...					35.0					
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres						4.0	4.2	3.5	4.4	4.5
contamination maximale* de la ration					50	50	50	50	50	50
contamination minimale calculée					0.3	0.6	0.5	0.5	0.4	0.5
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.5	0.7	0.6	0.6	0.5	0.6
contamination de la ration (p95 des positifs)					1.4	2.2	1.7	1.8	1.6	1.7

*selon la recommandation 2006/576/CE

Tableaux 11 : Contamination par l'OTA de la ration des volailles en µg/kg d'aliments

11a : Poulets standard

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION	Poulet RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95				
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%
Maïs	250	0.3	0.5	1.3	18.5	12.2	7.6	8.3
Blé	250	0.7	1.0	3.8	40.0	50.0	55.0	60.0
Tourteau de soja 48	250	0.9	1.0	1.0	34.8	28.1	19.1	15.6
Graine de soja	250					0.5	9.5	10.3
Tourteau de tournesol	250					3.0	3.0	0.0
Huile de soja					2.6	2.5	2.5	2.5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.2	3.5	3.4	3.3
contamination maximale* de la ration					100	100	100	100
contamination minimale calculée					0.6	0.6	0.6	0.6
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.8	0.8	0.8
contamination de la ration (p95 des positifs)					2.1	2.4	2.4	2.6

*selon la recommandation 2006/576/CE

11b : Poulet label

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Dir 2002/32/CE valeurs limites	Toutes données moyenne	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION RETRAIT
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	p75 (en µg/kg)	p95 (en µg/kg)	%	%	%
Maïs	250	0.3	0.5	1.3	34.6	41.5	40.3
Blé	250	0.7	1.0	3.8	30.0	35.0	35.0
Son fin	250	0.9	1.0	2.5	1.2	1.1	0.0
Pois	250				0.0	0.0	4.4
Tourteau de soja 48	250	0.9	1.0	1.0	30.6	19.1	17.1
Huile de soja					0.0	0.0	0.2
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					3.6	3.3	3.1
contamination théorique* de la ration					100	100	100
contamination minimale calculée					0.6	0.5	0.5
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.8	0.7
contamination de la ration (p95 des positifs)					1.9	2.1	2.0

*selon la recommandation 2006/576/CE

11c : Poule pondeuse

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Poulette DEMARRAGE	Poulette CROISSANCE	Poulette REPRO-ENTRETIEN	Poule PONDEUSE
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	250	0.3	0.5	1.3	30.8	30.0	30.0	30.3
Blé	250	0.7	1.0	3.8	30.0	35.8	35.0	30.0
Son fin de blé	250	0.9	1.7	2.0	2.9	5.8	7.0	4.9
Tourteau de soja 48	250	0.9	1.0	1.0	25.3	17.7	15.5	20.8
Tourteau de tournesol	250				0.0	0.0	0.0	3.0
Pois	250				5.0	5.0	7.5	0.0
Luzerne						1.0		
Huile de soja					1.6	0.5	0.5	1.1
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.3	4.2	4.5	9.8
contamination théorique de la ration					100	100	100	100
contamination minimale calculée					0.6	0.5	0.5	0.5
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.8	0.8	0.7
contamination de la ration (p95 des positifs)					1.9	2.1	2.0	1.9

11d : Dinde

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	DEMARRAGE	CROISSANCE 1	CROISSANCE 2	FINITION 1	FINITION 2	FINITION 3
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	250	0.3	0.5	1.3	10.0	4.5	6.1	13.3	5.1	6.0
Blé	250	0.7	1.0	3.8	30.9	40.0	45.0	45.1	55.0	58.3
Graine de soja cuites	250				3.5	7.5	3.2	4.0	3.8	11.8
Tourteau de soja 48	250	0.9	1.0	1.0	47.1	37.4	34.4	28.3	21.5	16.9
Tourteau de tournesol	250				0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0
Pois	250				0.0	3.0	4.0	0.0	6.0	0.0
Huile de soja					0.5	0.6		1.1	1.5	0.0
Huile végétale Bergafat KP					2.0	2.0	3.0	3.2	3.5	3.6
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					6.0	5.1	4.4	3.8	3.7	3.4
contamination théorique de la ration					100	100	100	100	100	100
contamination minimale calculée					0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
contamination de la ration (p95 des positifs)					1.8	2.0	2.2	2.2	2.4	2.5

11e : Pintade

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Pintade DEMARRAGE	Pintade CROISSANCE	Pintage FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)				
Maïs	250	0.3	0.5	1.3	45.6	52.5	60.4
Blé	250	0.7	1.0	3.8	10.0	10.0	5.0
Concentré protéique luzerne	250				0.0	0.0	0.4
Pois	250				2.7	0.0	0.0
Tourteau de soja 48	250	0.9	1.0	1.0	35.5	23.8	22.0
Graine de soja	250				0.0	7.8	5.6
Huile de soja					1.0	0.0	0.6
Huile					1.0	2.0	2.5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.2	3.9	3.6
contamination théorique de la ration					100	100	100
contamination minimale calculée					0.5	0.4	0.4
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.7	0.6	0.6
contamination de la ration (p95 des positifs)					1.3	1.3	1.2

11f : Canard barbarie

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		Canard DEMARRAGE	Canard CROISSANCE	Canard FINITION
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%
Maïs	250	0.3	0.5	1.3	20.4	22.2	19.9
Blé	250	0.7	1.0	3.8	50.0	57.0	61.9
Tourteau de soja 48	250	0.9	1.0	1.0	21.7	14.1	7.5
Graine de soja	250				4.5	3.6	8.0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					3.5	3.3	2.7
contamination théorique de la ration					100	100	100
contamination minimale calculée					0.6	0.6	0.5
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.8	0.8
contamination de la ration (p95 des positifs)					2.4	2.6	2.7

11g : Canard prêt à gaver

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration	
	Dir 2002/32/CE	Toutes données	Données positives		élevage	gavage
	valeurs limites	moyenne	p75	p95		
Composition formule type	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%
blé	250	0.7	1.0	3.8	40	98
maïs	250	0.3	0.5	1.3	35	
ttx soja/colza + tournesol	250	0.9	1.0	1.0	20	
prémix					5	2
contamination théorique de la ration					100	100
contamination minimale calculée					0.6	0.3
contamination de la ration (p75 des positifs)					0.8	0.5
contamination de la ration (p95 des positifs)					2.2	1.3

Tableau 12 : Niveaux de contamination en Deoxynivalenol par groupes d'aliments (en µg/kg) ; ensemble des valeurs, estimation intermédiaire : ND=1/2 LOD ; <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=2343 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn feed	22	25.0	209.8	676.5	1735.0	2379.0	5846.5	10500.0
triticale	46	40.0	53.0	146.5	1117.0	883.8	4189.3	9875.0
issues de céréales	21	175.0	596.0	873.0	1091.0	1212.0	2745.0	4066.0
gluten feed de blé	84	103.0	295.8	915.5	1064.0	1540.0	2828.3	3353.0
son	158	40.0	272.3	653.5	1041.0	1213.0	3394.5	5412.0
remoulage	46	105.5	232.5	536.3	844.3	1082.0	2682.0	3304.0
maïs	633	5.0	217.0	542.9	842.1	1076.0	2726.2	8500.0
paille de blé	10	81.0	270.5	624.5	838.3	1232.0	2066.0	2664.0
coproduit de blé dur	16	65.0	331.8	532.5	711.3	741.5	1860.0	2910.0
blé dur	267	5.0	15.0	50.0	414.2	400.0	2240.0	5700.0
blé	795	5.0	40.0	150.0	375.2	358.5	1500.0	8996.0
orge	106	5.0	40.0	44.0	194.6	213.8	783.5	2220.0
avoine	19	2.5	40.0	66.9	129.3	103.5	432.7	959.0
pois	101	20.0	20.0	25.0	33.7	25.0	25.0	772.0
féveroles	19	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0

Tableau 13 : Niveaux de contamination en Deoxynivalenol par groupes d'aliments (en µg/kg) ; valeurs non nulles, <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=2004 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn feed	22	25.0	209.8	676.5	1735.0	2379.0	5846.5	10500.0
triticale	46	40.0	53.0	146.5	1117.0	883.8	4189.3	9875.0
issues de céréales	21	175.0	596.0	873.0	1091.0	1212.0	2745.0	4066.0
gluten feed de blé	84	103.0	295.8	915.5	1064.0	1540.0	2828.3	3353.0
son	158	40.0	272.3	653.5	1041.0	1213.0	3394.5	5412.0
maïs	608	5.0	250.0	570.5	875.0	1100.0	2836.0	8500.0
remoulage	46	105.5	232.5	536.3	844.3	1082.0	2682.0	3304.0
paille de blé	10	81.0	270.5	624.5	838.3	1232.0	2066.0	2664.0
coproduit de blé dur	16	65.0	331.8	532.5	711.3	741.5	1860.0	2910.0
blé dur	187	10.0	45.5	200.0	586.7	650.0	2470.0	5700.0
blé	676	10.0	90.0	193.5	439.1	416.5	1814.8	8996.0
pois	6	25.0	41.5	99.4	208.4	199.1	636.4	772.0
orge	105	5.0	40.0	48.0	196.3	219.0	786.8	2220.0
avoine	19	2.5	40.0	66.9	129.3	103.5	432.7	959.0

Tableau 14 : Contamination par le Deoxynivalenol de la ration des porcins en µg/kg d'aliments

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Porcelet 1er âge	Porcelet 2ème âge	Porc croissance Corpen	Porc finition Corpen	Truies gestantes	Truies allaitantes
	valeurs limites	moyenne	p75	p95						
Matières premières	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%	%	%
Maïs	**	842	1100	2836		15	16	22	18	11
Maïs Floconné	**	842	1100	2836	35					
Blé	**	375	417	1815	22	32	20	20	10	10
Orge	**	195	219	787		20	19	10	25	20
Remoulage de blé blanc	**	844	1082	2682		8	8	8	3	15
Tourteau de soja Brésil 48	**				8	11	9			9
Tourteau de colza France	**					2	3	10		
Tourteau de tournesol France	**						0		6	2
Pois		34	199	636		4	20	19	14	12
Pulpe de betterave France							0		2	2
Son fin de blé		1041	1213	3395				9	15	12
Luzerne									2	2
Graine de soja cuite						5				
Huile de soja brute					1		0		1	3
Huile de colza brute							0			
Noyau porcelet : Mélange de lactosérum, vitamines, minéraux, etc...					35					
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres						4	4	4	4	5
contamination maximale* de la ration					900	900	900	900	900	900
contamination minimale calculée					375	350	324	439	423	419
contamination de la ration (p75 des positifs)					475	430	432	570	535	532
contamination de la ration (p95 des positifs)					1383	1387	1319	1679	1565	1520

*selon la recommandation 2006/576/CE

** la limite de 8000 µg/kg pour les céréales ne doit a priori pas s'appliquer aux porcs car ce sont des animaux sensibles

Tableaux 15 : Contamination par le Deoxynivalenol de la ration des volailles en µg/kg d'aliments

15a : Poulets standard

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION	Poulet RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95				
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%
Maïs	8000	842	1100	2836	18.5	12.2	7.6	8.3
Blé	8000	375	417	1815	40.0	50.0	55.0	60.0
Tourteau de soja 48	8000				34.8	28.1	19.1	15.6
Graine de soja	8000					0.5	9.5	10.3
Tourteau de tournesol	8000					3.0	3.0	0.0
Huile de soja					2.6	2.5	2.5	2.5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.2	3.5	3.4	3.3
contamination maximale* de la ration					5000	5000	5000	5000
contamination minimale calculée					306	290	270	295
contamination de la ration (p75 des positifs)					370	342	312	342
contamination de la ration (p95 des positifs)					1250	1252	1213	1325

*selon la recommandation 2006/576/CE

15b : Poulet label

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	
Maïs	8000	842	1100	2836	34.6	41.5	40.3
Blé	8000	375	417	1815	30.0	35.0	35.0
Son fin	8000	1041	1213	3395	1.2	1.1	0.0
Pois	8000	34	199	636	0.0	0.0	4.4
Tourteau de soja 48	8000				31	19	17
Huile de soja					0	0	0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	3	3
contamination maximale* de la ration					5000	5000	5000
contamination minimale calculée					416	492	472
contamination de la ration (p75 des positifs)					520	616	598
contamination de la ration (p95 des positifs)					1566	1850	1806

*selon la recommandation 2006/576/CE

15c : Poule pondeuse

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Poulette DEMARRAGE	Poulette CROISSANCE	Poulette REPRO-ENTRETIEN	Poule PONDEUSE
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	8000	842	1100	2836	30.8	30.0	30.0	30.3
Blé	8000	375	417	1815	30.0	35.8	35.0	30.0
Son fin de blé	8000	1041	1213	3395	2.9	5.8	7.0	4.9
Tourteau de soja 48	8000				25.3	17.7	15.5	20.8
Tourteau de tournesol	8000				0.0	0.0	0.0	3.0
Pois	8000	34	199	636	5.0	5.0	7.5	0.0
Luzerne						1.0		
Huile de soja					1.6	0.5	0.5	1.1
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.3	4.2	4.5	9.8
contamination maximale* de la ration					5000	5000	5000	5000
contamination minimale calculée					404	449	459	418
contamination de la ration (p75 des positifs)					509	560	576	517
contamination de la ration (p95 des positifs)					1550	1731	1771	1568

*selon la recommandation 2006/576/CE

15d : Dinde

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	DEMARRAGE	CROISSANCE 1	CROISSANCE 2	FINITION 1	FINITION 2	FINITION 3
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	8000	842	1100	2836	10.0	4.5	6.1	13.3	5.1	6.0
Blé	8000	375	417	1815	30.9	40.0	45.0	45.1	55.0	58.3
Graine de soja cuites	8000				3.5	7.5	3.2	4.0	3.8	11.8
Tourteau de soja 48	8000				47.1	37.4	34.4	28.3	21.5	16.9
Tourteau de tournesol	8000				0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0
Pois	8000	34	199	636	0.0	3.0	4.0	0.0	6.0	0.0
Huile de soja					0.5	0.6		1.1	1.5	0.0
Huile végétale Bergafat KP					2.0	2.0	3.0	3.2	3.5	3.6
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					6.0	5.1	4.4	3.8	3.7	3.4
contamination maximale* de la ration					5000	5000	5000	5000	5000	5000
contamination minimale calculée					200	189	221	281	251	269
contamination de la ration (p75 des positifs)					239	222	262	333	296	309
contamination de la ration (p95 des positifs)					844	871	1013	1194	1179	1229

*selon la recommandation 2006/576/CE

15e : Pintade de chair

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Pintade DEMARRAGE	Pintade CROISSANCE	Pintage FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)				
Maïs	8000	842	1100	2836	45.6	52.5	60.4
Blé	8000	375	417	1815	10.0	10.0	5.0
Concentré protéique luzerne	8000				0.0	0.0	0.4
Pois	8000	34	199	636	2.7	0.0	0.0
Tourteau de soja 48	8000				35.5	23.8	22.0
Graine de soja	8000				0.0	7.8	5.6
Huile de soja					1.0	0.0	0.6
Huile					1.0	2.0	2.5
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4.2	3.9	3.6
contamination maximale* de la ration					5000	5000	5000
contamination minimale calculée					422	480	527
contamination de la ration (p75 des positifs)					548	620	685
contamination de la ration (p95 des positifs)					1491	1672	1804

*selon la recommandation 2006/576/CE

15f : Canard barbarie

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Canard DEMARRAGE	Canard CROISSANCE	Canard FINITION
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%
Maïs	8000	842	1100	2836	20.4	22.2	19.9
Blé	8000	375	417	1815	50.0	57.0	61.9
Tourteau de soja 48	8000				21.7	14.1	7.5
Graine de soja	8000				4.5	3.6	8.0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					3.5	3.3	2.7
contamination maximale* de la ration					5000	5000	5000
contamination minimale calculée					359	400	400
contamination de la ration (p75 des positifs)					433	481	477
contamination de la ration (p95 des positifs)					1486	1662	1688

*selon la recommandation 2006/576/CE

15g : Canard prêt à gaver

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration	
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		élevage	gavage
	valeurs limites	moyenne	p75	p95		
Composition formule type	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%
blé	8000	375	417	1815	40	
maïs	8000	842	1100	2836	35	98
ttx soja/colza + tournesol	8000				20	
prémix					5	2
contamination maximale* de la ration					5000	5000
contamination minimale calculée					445	825
contamination de la ration (p75 des positifs)					552	1078
contamination de la ration (p95 des positifs)					1719	2779

Tableau 16 : Niveaux de contamination en zéaralénone par groupes d'aliments ; ensemble des valeurs, estimation intermédiaire : ND=1/2 LOD ; <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=2153 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn feed	22	20	93	191	283	394	799	823
issues de céréales	8	20	53	168	255	262	792	1064
maïs	972	1	8	32	102	107	397	6705
triticale	70	3	21	25	82	44	436	686
sorgho	24	25	25	25	52	33	137	344
pois	150	3	10	20	36	20	105	695
blé	322	1	3	25	22	25	35	544
féveroles	19	20	20	20	20	20	20	20
farine basse	9	3	3	20	15	20	23	25
orge	258	1	3	8	14	25	25	72
gluten feed de blé	112	2	5	8	14	20	37	109
son	76	3	3	5	11	20	21	106
avoine	56	3	3	3	7	5	25	25
remoulage	55	1	3	3	6	5	20	25

Tableau 17 : Niveaux de contamination en zéaralénone par groupes d'aliments ; valeurs non nulles, <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=1876 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn feed	22	20	93	191	283	394	799	823
issues de céréales	8	20	53	168	255	262	792	1064
maïs	859	2	25	47	116	125	422	6705
triticale	70	3	21	25	82	44	436	686
pois	60	3	3	5	61	41	335	695
sorgho	24	25	25	25	52	33	137	344
blé	296	1	5	25	24	25	37	544
orge	229	2	3	25	16	25	25	72
farine basse	9	3	3	20	15	20	23	25
gluten feed de blé	112	2	5	8	14	20	37	109
son	76	3	3	5	11	20	21	106
avoine	56	3	3	3	7	5	25	25
remoulage	55	1	3	3	6	5	20	25

Tableau 18 : Contamination par la zéaralénone de la ration des porcins en µg/kg d'aliments

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)						
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Porcelet 1er âge	Porcelet 2ème âge	Porc croissance Corpen	Porc finition Corpen	Truies gestantes	Truies allaitantes	
	valeurs limites	moyenne	p75	p95							
Matières premières	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%	%	%	
Maïs	2000	102	125	422		15	16	22	18	11	
Maïs Floconné	2000	102	125	422	35						
Blé	2000	22	25	37	22	32	20	20	10	10	
Orge	2000	14	25	58		20	19	10	25	20	
Remoulage de blé blanc	2000	6	5	20		8	8	8	3	15	
Tourteau de soja Brésil 48	2000				8	11	9			9	
Tourteau de colza France	2000					2	3	10			
Tourteau de tournesol France	2000						0		6	2	
Pois	2000	36	41	335		4	20	19	14	12	
Pulpe de betterave France	2000						0		2	2	
Son fin de blé	2000	11	20	21				9	15	12	
Luzerne	2000								2	2	
Graine de soja cuite	2000					5					
Huile de soja brute					1		0		1	3	
Huile de colza brute							0				
Noyau porcelet : Mélange de lactosérum, vitamines, minéraux, etc...					35						
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres						4	4	4	4	5	
contamination maximale* de la ration					100	100	250	250	250	250	
contamination minimale calculée					41	27	32	36	31	23	
contamination de la ration (p75 des positifs)					49	34	39	44	41	29	
contamination de la ration (p95 des positifs)					156	100	156	171	146	107	

*selon la recommandation 2006/576/CE

Tableaux 19 : Contamination par la zéaralénone de la ration des volailles en µg/kg d'aliments

19a : Poulets standard

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Poulet	Poulet	Poulet	Poulet
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	DEMARRAGE	CROISSANCE	FINITION	RETRAIT
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%
Maïs	2000	102	125	422	18	12	8	8
Blé	2000	22	25	37	40	50	55	60
Tourteau de soja 48	2000				35	28	19	16
Graine de soja	2000					1	9	10
Tourteau de tournesol	2000					3	3	0
Huile de soja					3	2	3	3
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	4	3	3
contamination maximale* de la ration								
contamination minimale calculée					28	23	20	22
contamination de la ration (p75 des positifs)					33	28	23	25
contamination de la ration (p95 des positifs)					93	70	52	57

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

19b : Poulet label

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Poulet	Poulet	Poulet FINITION
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	DEMARRAGE	CROISSANCE	RETRAIT
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%
Maïs	2000	102	125	422	35	42	40
Blé	2000	22	25	37	30	35	35
Son fin	2000	11	20	21	1	1	0
Pois	2000	36	41	335	0	0	4
Tourteau de soja 48	2000				31	19	17
Huile de soja					0	0	0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	3	3
contamination maximale* de la ration							
contamination minimale calculée					42	50	50
contamination de la ration (p75 des positifs)					51	61	61
contamination de la ration (p95 des positifs)					158	188	198

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

19c : Poule pondeuse

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Poulette DEMARRAGE	Poulette CROISSANCE	Poulette REPRO- ENTRETIEN	Poule PONDEUSE
	valeurs limites	moyenne	p75	p95				
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	
Mais	2000	102	125	422	31	30	30	30
Blé	2000	22	25	37	30	36	35	30
Son fin de blé	2000	11	20	21	3	6	7	5
Tourteau de soja 48	2000				25	18	16	21
Tourteau de tournesol	2000				0	0	0	3
Pois	2000	36	41	335	5	5	8	0
Luzerne						1		
Huile de soja					2	1	1	1
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	4	5	10
contamination maximale* de la ration								
contamination minimale calculée					40	41	42	38
contamination de la ration (p75 des positifs)					49	50	51	46
contamination de la ration (p95 des positifs)					159	158	166	140

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

19d : Dinde

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	DEMARRAGE	CROISSANCE 1	CROISSANCE 2	FINITION 1	FINITION 2	FINITION 3
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	2000	102	125	422	10	4	6	13	5	6
Blé	2000	22	25	37	31	40	45	45	55	58
Graine de soja cuites	2000				4	8	3	4	4	12
Tourteau de soja 48	2000				47	37	34	28	22	17
Tourteau de tournesol	2000				0	0	0	1	0	0
Pois	2000	36	41	335	0	3	4	0	6	0
Huile de soja					1	1		1	1	0
Huile végétale Bergafat KP					2	2	3	3	4	4
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					6	5	4	4	4	3
contamination maximale* de la ration										
contamination minimale calculée					17	14	17	23	19	19
contamination de la ration (p75 des positifs)					20	17	20	28	22	22
contamination de la ration (p95 des positifs)					54	44	55	73	62	47

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

19e : Pintade de chair

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Pintade DEMARRAGE	Pintade CROISSANCE	Pintage FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)				
Maïs	2000	102	125	422	46	53	60
Blé	2000	22	25	37	10	10	5
Concentré protéique luzerne	2000				0	0	0
Pois	2000	36	41	335	3	0	0
Tourteau de soja 48	2000				36	24	22
Graine de soja	2000				0	8	6
Huile de soja					1	0	1
Huile					1	2	3
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	4	4
contamination maximale* de la ration							
contamination minimale calculée					50	56	63
contamination de la ration (p75 des positifs)					60	68	77
contamination de la ration (p95 des positifs)					205	226	257

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

19f : Canard barbarie

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		Canard DEMARRAGE	Canard CROISSANCE	Canard FINITION
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%
Maïs	2000	102	125	422	20	22	20
Blé	2000	22	25	37	50	57	62
Tourteau de soja 48	2000				22	14	7
Graine de soja	2000				5	4	8
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	3	3
contamination maximale* de la ration							
contamination minimale calculée					32	35	34
contamination de la ration (p75 des positifs)					38	42	40
contamination de la ration (p95 des positifs)					105	115	107

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

19g : Canard prêt à gaver

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration	
	Rec 2006/576/CE	Toutes données	Données positives		élevage	gavage
	valeurs limites	moyenne	p75	p95		
Composition formule type	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%
blé	2000	22	25	37	40	
maïs	2000	102	125	422	35	98
ftx soja/colza + tournesol	2000				20	
prémix					5	2
contamination maximale* de la ration						
contamination minimale calculée					45	100
contamination de la ration (p75 des positifs)					54	122
contamination de la ration (p95 des positifs)					163	414

*pas de limite de contamination de la ration pour les volailles dans la recommandation 2006/576/CE

Tableau 20 : Niveaux de contamination en fumonisine B1 par groupes d'aliments (en µg/kg) ; ensemble des valeurs, estimation intermédiaire : ND=1/2 LOD ; <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=674 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn feed	20	25	98	455	4155	5120	16055	17100
issues de céréales	13	25	384	596	1428	1412	4481	7714
maïs	301	5	15	98	848	683	4300	13900
pois	104	5	5	5	147	25	568	5686
blé	61	5	25	25	130	25	586	2176
son	32	25	25	25	32	25	50	185
gluten feed de blé	49	25	25	25	28	25	40	90
orge	52	25	25	25	25	25	25	25
remoulage	23	25	25	25	25	25	25	25
féveroles	19	5	5	5	5	5	5	5

Tableau 21 : Niveaux de contamination en fumonisine B1 par groupes d'aliments (en µg/kg) ; valeurs non nulles, <LOQ=1/2 LOQ ; teneur en humidité de 12%, n=516 :

	n	min	p25	médiane	moyenne	p75	p95	max
corn feed	20	25	98	455	4155	5120	16055	17100
issues de céréales	13	25	384	596	1428	1412	4481	7714
maïs	248	5	45	196	1027	1063	4965	13900
pois	18	19	249	352	793	706	2255	5686
blé	61	5	25	25	130	25	586	2176
son	32	25	25	25	32	25	50	185
gluten feed de blé	49	25	25	25	28	25	40	90
orge	52	25	25	25	25	25	25	25
remoulage	23	25	25	25	25	25	25	25

Tableau 22 : Contamination en fumonisine B1 de la ration des porcins en µg/kg d'aliments

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Porcelet 1er âge	Porcelet 2ème âge	Porc croissance Corpen	Porc finition Corpen	Truies gestantes	Truies allaitantes
	valeurs limites	moyenne	p75	p95						
Matières premières	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%	%	%
Maïs	60000**	848	1063	4965		15	16	22	18	11
Maïs Floconné	60000**	848	1063	4965	35					
Blé		130	25	586	22	32	20	20	10	10
Orge		25	25	25		20	19	10	25	20
Remoulage de blé blanc		25	25	25		8	8	8	3	15
Tourteau de soja Brésil 48					8	11	9			9
Tourteau de colza France						2	3	10		
Tourteau de tournesol France							0		6	2
Pois		147	706	2255		4	20	19	14	12
Pulpe de betterave France							0		2	2
Son fin de blé		32	25	50				9	15	12
Luzerne									2	2
Graine de soja cuite						5				
Huile de soja brute					1		0		1	3
Huile de colza brute							0			
Noyau porcelet : Mélange de lactosérum, vitamines, minéraux, etc...					35					
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres						4	4	4	4	5
contamination maximale* de la ration					5000**	5000**	5000**	5000**	5000**	5000**
contamination minimale calculée					325	181	201	243	201	136
contamination de la ration (p75 des positifs)					377	199	327	374	307	216
contamination de la ration (p95 des positifs)					1864	1018	1389	1622	1300	890

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

Tableaux 23 : Contamination en fumonisine B1 de la ration des volailles en µg/kg d'aliments

23a : Poulets standard

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION	Poulet RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95				
COMPOSITION	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	%
Maïs	60000**	848	1063	4965	18	12	8	8
Blé		130	25	586	40	50	55	60
Tourteau de soja 48					35	28	19	16
Graine de soja						1	9	10
Tourteau de tournesol						3	3	0
Huile de soja					3	2	3	3
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	4	3	3
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**	20000**	20000**
contamination minimale calculée					208	168	136	148
contamination de la ration (p75 des positifs)					206	142	94	103
contamination de la ration (p95 des positifs)					1151	897	698	765

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

23b : Poulet label

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Poulet DEMARRAGE	Poulet CROISSANCE	Poulet FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%	%	
Maïs	60000**	848	1063	4965	35	42	40
Blé		130	25	586	30	35	35
Son fin		32	25	50	1	1	0
Pois		147	706	2255	0	0	4
Tourteau de soja 48					31	19	17
Huile de soja					0	0	0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	3	3
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**	20000**
contamination minimale calculée					333	398	393
contamination de la ration (p75 des positifs)					376	450	468
contamination de la ration (p95 des positifs)					1896	2267	2304

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

23c : Poule pondeuse

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)			
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Poulette DEMARRAGE	Poulette CROISSANCE	Poulette REPRO-ENTRETIEN	Poule PONDEUSE
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	60000**	848	1063	4965	31	30	30	30
Blé		130	25	586	30	36	35	30
Son fin de blé		32	25	50	3	6	7	5
Tourteau de soja 48					25	18	16	21
Tourteau de tournesol					0	0	0	3
Pois		147	706	2255	5	5	8	0
Luzerne						1		
Huile de soja					2	1	1	1
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	4	5	10
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**	20000**	20000**
contamination minimale calculée					309	310	313	297
contamination de la ration (p75 des positifs)					371	365	382	331
contamination de la ration (p95 des positifs)					1821	1815	1867	1682

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

23d : Dinde

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)					
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon	Dindon
	valeurs limites	moyenne	p75	p95	DEMARRAGE	CROISSANCE 1	CROISSANCE 2	FINITION 1	FINITION 2	FINITION 3
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)		(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)	(en %)
Maïs	60000**	848	1063	4965	10	4	6	13	5	6
Blé		130	25	586	31	40	45	45	55	58
Graine de soja cuites					4	8	3	4	4	12
Tourteau de soja 48					47	37	34	28	22	17
Tourteau de tournesol					0	0	0	1	0	0
Pois		147	706	2255	0	3	4	0	6	0
Huile de soja					1	1		1	1	0
Huile végétale Bergafat KP					2	2	3	3	4	4
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					6	5	4	4	4	3
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**	20000**	20000**	20000**	20000**
contamination minimale calculée					125	94	116	171	123	127
contamination de la ration (p75 des positifs)					114	78	104	152	110	78
contamination de la ration (p95 des positifs)					678	523	654	922	708	640

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

23e : Pintade de chair

COMPOSITION	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Pintade DEMARRAGE	Pintade CROISSANCE	Pintage FINITION RETRAIT
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)					
Maïs	60000**	848	1063	4965	46	53	60
Blé		130	25	586	10	10	5
Concentré protéique luzerne					0	0	0
Pois		36	156	2255	3	0	0
Tourteau de soja 48					36	24	22
Graine de soja					0	8	6
Huile de soja					1	0	1
Huile					1	2	3
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					4	4	4
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**	20000**
contamination minimale calculée					400	458	519
contamination de la ration (p75 des positifs)					491	561	643
contamination de la ration (p95 des positifs)					2381	2667	3029

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

23f : Canard barbarie

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration (en %)		
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		Canard DEMARRAGE	Canard CROISSANCE	Canard FINITION
	valeurs limites	moyenne	p75	p95			
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)		%	%	%
COMPOSITION							
Maïs	60000**	847.6	1063.0	4965.0	20.4	22.2	19.9
Blé		129.8	25.0	586.0	50.0	57.0	61.9
Tourteau de soja 48					21.7	14.1	7.5
Graine de soja					4.5	3.6	8.0
Vitamines, minéraux, OE, AA, autres					3.5	3.3	2.7
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**	20000**
contamination minimale calculée					238	262	249
contamination de la ration (p75 des positifs)					229	250	227
contamination de la ration (p95 des positifs)					1306	1434	1351

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1

23g : Canard prêt à gaver

	Contamination des matières premières (en µg/kg d'aliments)				Composition de la ration	
	Rec 2006/576/CE	Toute données	Données positives		élevage	gavage
	valeurs limites	moyenne	p75	p95		
	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	(en µg/kg)	%	%
Composition formule type						
blé		129.8	25.0	586.0	40	
maïs	60000**	847.6	1063.0	4965.0	35	98
ftx soja/colza + tournesol					20	
prémix					5	2
contamination maximale* de la ration					20000**	20000**
contamination minimale calculée					349	831
contamination de la ration (p75 des positifs)					382	1042
contamination de la ration (p95 des positifs)					1972	4866

*selon la recommandation 2006/576/CE

** les limites recommandées concernent la somme FB1+FB2, la FB2 représente environ 20% de la contamination de la FB1