



HAL
open science

Les mycotoxines dans l'alimentation : mode de contamination, conséquences sur la santé des consommateurs et moyens de les combattre

Hamid Boudra

► To cite this version:

Hamid Boudra. Les mycotoxines dans l'alimentation : mode de contamination, conséquences sur la santé des consommateurs et moyens de les combattre. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2010. tel-02814215

HAL Id: tel-02814215

<https://hal.inrae.fr/tel-02814215v1>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Les mycotoxines dans l'alimentation : mode de contamination,
conséquences sur la santé des consommateurs et moyens de les combattre**

Synthèse des travaux de recherches

Présentée par

Hamid BOUDRA

En vue de l'obtention du Diplôme

HABILITATION à DIRIGER des RECHERCHES

Rapport présenté le 22 mars 2010 devant le jury composé de:

Isabelle OSWALD	Directeur de Recherche, INRA Toulouse	Rapporteur
M. Gérard FONTY	Directeur de Recherche, CNRS, UBP Clermont II	Rapporteur
Guido RYCHEN,	Professeur à l'ENSAIA, Nancy	Rapporteur
Anne-Marie DELORT	Directeur de Recherche, CNRS, UBP Clermont II	Examinateur
Sylvaine LECOEUR	Directeur de Recherche, ENV Lyon	Examinateur
Diego P. MORGAVI	Directeur de Recherche, INRA Theix	Examinateur

SOMMAIRE

1- Introduction générale sur les mycotoxines	14
2- Travaux de thèse	16
2.1. Démarche de l'évaluation du risque mycotoxique	16
2.2. Exemples d'études	17
3. Evaluation du risque mycotoxique chez les ruminants	24
3.1. Contamination des aliments destinés aux ruminants	28
3.2. Effets des mycotoxines sur les fermentations ruminales in vitro	28
3.3. Transfert des mycotoxines dans les produits animaux	31
4. Quels sont les moyens pour éliminer les mycotoxines présentes dans les fourrages conservés ?	34
4.1. Utilisation d'agents biologiques	34
4.2. Devenir des mycotoxines de <i>Fusarium spp</i> dans l'ensilage de maïs.	39
5. Autres activités	41
6. Perspectives de recherches	43
Conclusion	49
Références citées dans le mémoire	52

Curriculum vitae

Hamid BOUDRA

53 ans, marié, 3 enfants.

Situation Professionnelle

Ingénieur de Recherches

Unité de Recherche sur les Herbivores (UR 1213), Equipe de Digestion Microbienne et Absorption
INRA, Centre de Clermont-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle.

Tél : +33 (0)4 73 62 41 04

Fax : +33 (0)4 73 62 46 59

Mél : hboudra@clermont.inra.fr

Titres et diplômes universitaires

1996	- Diplôme universitaire en Pharmacocinétique (Université Paul Sabatier, Toulouse).
1991 - 1994	- Doctorat 3^{ème} cycle en Mycotoxicologie (Université Paul Sabatier, Toulouse), réalisé à l'Unité de mycotoxicologie (Station de Pharmacologie et de Toxicologie, INRA, Toulouse).
1981 - 1985	- Diplôme des Etudes Médicales Spécialisées en Toxicologie (Faculté de Pharmacie d'Alger).
1977 - 1981	- Docteur en Pharmacie (Faculté de Pharmacie d'Alger).

Formations complémentaires

Détachement dans l'équipe **Discovery** (Center for Microbial Biotechnology, Université de Copenhague) sur un projet intitulé « *Microbial Chemistry and Metabolome Analysis* » (Mai ó novembre 2007)

Habilitation à l'expérimentation animale (niveau 1) (Ministère de l'Agriculture, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)

Formation « Assurance Qualité » (6 jours à l'Université de Bordeaux)

Parcours Professionnel

2001	Recruté à l'INRA de Theix, Unité de Recherche sur les Herbivores (UR 1213), Equipe de Digestion Microbienne et Absorption.
1994 - 2000	Chercheur au Laboratoire de Cinétique des Xénobiotiques; Faculté de Pharmacie, Toulouse.
1990 - 1994	Unité de mycotoxicologie (Station de Pharmacologie et de Toxicologie, INRA, Toulouse). Thèse réalisée dans le cadre d'un contrat DGAL "Qualité 2000".
1985 - 1990	Chef d'Unité du Laboratoire de Toxicologie (Centre Hospitalier et Universitaire de Annaba).
1981 - 1985	Interne des Hôpitaux d'Alger (Service de Toxicologie d'Urgence, Centre Hospitalier et Universitaire d'Alger)

Encadrement de Travaux de Thèses

Stéphane Firmin (2008-2011) : Encadrement d'une thèse CIFRE, en collaboration avec la Société Alltech « *Etude de l'efficacité d'un inactivateur de mycotoxines à base de parois de levure chez la brebis en lactation* ».

Vincent Niderkorn (2004-2007) : Encadrement d'une thèse CIFRE en collaboration avec la Société Lallemand « *Activités de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs* ».

Bertin Enanga (1996-1999) : Co-encadrement d'une thèse 3^{ème} cycle avec G. Houin « *Pharmacocinétique et efficacité clinique du mégazol (produit en développement) sur les Trypanosomiases* » (Projet de recherche en collaboration avec l'Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges).

Encadrement de mémoires de fin d'études

Frederic Faure (2009) : Encadrement d'un Master II (Université de Limoges), intitulé « *Effet de la flore du fourrage vert récolté sur la disparition des fusariotoxines au cours du processus d'ensilage de maïs* ».

Christèle Provenchère (2006) : Encadrement d'un mémoire de spécialisation en Biotechnologie (Université Catholique de Lyon), intitulé « *Effets des métabolites produits par *Monascus spp.* sur les fermentations ruminales* ».

Antoine Tissandier (2005) : Co-encadrement d'un mémoire de Fin d'étude (Master Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand) avec V. Niderkorn intitulé « *Criblage des bactéries lactiques pour leur capacité à limiter l'impact des mycotoxines dans les ensilages de maïs* ».

Christèle Provenchère (2004) : Encadrement d'un mémoire de Fin d'étude (BTS, Anabiotec, Institut des Sciences de la Vie et de la Terre, Le Puy en Velay), intitulé « *Validation de mini silos pour les études de stabilité des mycotoxines durant l'ensilage* ».

Julien Cartailier (2004) : Encadrement d'un mémoire de Fin d'étude (IUT Mesures Physiques, Clermont-Ferrand), intitulé « *Evaluation de l'absorption ruminale des principales mycotoxines présentes dans l'alimentation animale* ».

Activités d'enseignement et de Formation

- **Depuis 2009**. Je participe à l'enseignement du Master 2 (Sciences, technologies, santé : Mention Nutrition et Sciences des Aliments), module UE 11 "Santé Animale et Sécurité Alimentaire"
- J'ai participé comme conférencier aux journées de formation interne destinée au personnel de l'Unité :
 - **Mars 2007** « Journée sur la *Sécurité alimentaire : transfert de polluants dans les produits animaux* ». J'ai fait une présentation sur « *Présence des mycotoxines dans l'alimentation animale et conséquences sur le plan de la santé animale et de la sécurité alimentaire* ».
 - **Mai 2008** « *Journée sur les approches en « omique » en élevage* ». J'ai fait une présentation sur « *Approche métabolomique, aspects techniques et exemples d'étude* ».

- **2003-2007.** J'ai participé à l'enseignement du DESS *Elaboration et Amélioration de la production Végétale* de L'ENITA de Clermont-Ferrand. Mon cours portait sur les aspects de la contamination des fourrages par les moisissures et les mycotoxines, et les conséquences sur le plan des performances zootechniques et de la santé des animaux d'élevage.
- **1985-1990 :** Maître-Assistant responsable de l'enseignement des cours, travaux dirigés et des travaux pratiques de Toxicologie pour les étudiants de Pharmacie à l'Université des Sciences Médicales d'Annaba, Algérie.
- **1981-1985:** Assistant de l'enseignement dirigé et des travaux pratiques de Toxicologie pour les étudiants de Pharmacie à l'Université des Sciences Médicales d'Alger, Algérie.

Activités collectives et responsabilités scientifiques

Au Laboratoire de Cinétique des Xénobiotiques, Faculté de Pharmacie de Toulouse

Durant la période de 1994 à 2000, j'ai assuré la responsabilité de projets réalisés en collaboration avec des industriels:

A l'INRA

- **2002-2003.** J'ai participé à la **commission "Assurance Qualité"** mise en place par notre Unité de Recherche.
- **Depuis 2002,** j'assiste en tant qu'expert dans le domaine de la contamination par les moisissures et les mycotoxines aux réunions (2 à 3 fois par an) de la **Commission Nationale des Co-Produits.**
- **2003.** J'ai organisé, en collaboration avec l'UR d'Epidémiologie animale (INRA, Theix), une enquête nationale sur la contamination mycotoxique du lait français dans le cadre d'un programme Transversal inter-département "Mycotoxines-INRA".
- **2003-2007.** J'ai participé aux réunions (4 à 5 fois par an) pour la mise en place d'un « consortium mycotoxines » et à l'élaboration d'un projet dans le cadre du réseau RARE (Réseau de recherche et d'innovations technologiques Alimentation, Référence Europe) : *Projet 03RARE032* ayant pour titre « Maîtrise du risque de contamination par les fusariotoxines des aliments à base de céréales ». Ce projet a été financé par le Ministère de l'Agriculture. J'ai assuré pour ma part la coordination d'une action du champ thématique 2: *Outils de suivi et de traçabilité des mycotoxines de la récolte à l'aliment*.
- **2005.** J'ai présidé un jury professionnel de titularisation d'un ingénieur d'études (ENSAIA, Nancy, 7/9/2005).
- **Depuis 2006.** Je participe, en tant que correspondant de notre Unité, **aux 2 plateformes Métabolomiques** (INRA, Centre de Theix) et (Université Blaise Pascal, Clermont II).
- **2008-2009.** J'ai participé à l'écriture du projet de recherche et aux réunions du comité de thèse d'Ahmed Hodroge.
- **2009.** J'ai participé au jury de thèse de DOGUIET K. Denis Dalie à l'Université de Bordeaux I en tant qu'examinateur, intitulé : « Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par des bactéries lactiques autochtones du maïs »
- **Depuis 2007.** Je suis membre élu au Conseil d'Administration de l'ADAS.
- **2001-2007.** J'ai mis sur pied une équipe de foot dont j'assurais les entraînements et la participations aux coupes nationales ADAS.
- **Depuis 2005.** J'assure les entraînements de l'équipe de volley INRA-Theix/Clermont.
- J'ai également développé un réseau de partenariats en relation avec mes travaux de recherches (Cf **Figure 3** : organigramme fonctionnel).

Liste des Publications, Communications et Travaux scientifiques

I- Publications scientifiques

I.1. Articles dans périodiques à comité de lecture

1. Firmin, S., P. Gandia, D. P. Morgavi, G. Houin, J. P. Jouany, G. Bertin and **H. Boudra**. Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. *Food Additives and Contaminants*. (soumis).
2. **Boudra, H.**, K. Karlshøj, J.C. Frisvad, K.F. Nielsen and T.O. Larsen. Simple and fast methods for identification of key fungi involved in human *Aspergillo*sis. *Medical Mycology* (Soumis).
3. **Boudra, H.**, J.C. Frisvad, K.F. Nielsen, D. P. Morgavi and T.O. Larsen. Do fumonisin B2 from *Aspergillus niger* present a risk of contamination in corn and corn-based products? *Animal Feed Science and Technology* (soumis).
4. Niderkorn V., D. P. Morgavi, B. Aboab, M. Lemaire, **H. Boudra**. 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisins B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. *Journal of Applied and Microbiology* **106**: 977-915.
5. Niderkorn V., **H. Boudra**, and D.P. Morgavi. 2008. Stability of the bacteria-bound zearalenone complex in ruminal fluid and in simulated gastrointestinal environment *in vitro*. *World Mycotoxin Journal* **1(4)**: **463-467**.
6. **Boudra H.** and D.P. Morgavi. 2008. Reduction in *Fusarium* Toxins Levels in Corn Silage with Low Dry Matter and Storage Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56(12)**: 4523-4528.
7. **Boudra, H.**, J. Barnouin, S. Dragacci and D.P. Morgavi. 2007. Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in raw bulk milk from french dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 90 (7):3197-3201.
8. Niderkorn V., D.P. Morgavi, E. Pujos, A. Tissandier and **H. Boudra**. 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage. *Food Additives and Contaminants*. 24 (6) : 406-415.
9. Niderkorn, V., D. P.Morgavi, **H. Boudra**. 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Journal of Applied and Microbiology*. 101 (4): 849-856.
10. **Boudra, H.** and D.P. Morgavi. Development and validation of a HPLC method for the quantitation of ochratoxins in plasma and raw milk. 2006. *Journal of Chromatography. B* 843: 295-301.
11. **Boudra, H.**, D.P. Morgavi. 2005. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Animal Feed Sciences and Technology*. 120 (1-2): 113-123.
12. Morgavi, D.P., **H. Boudra**, J.P. Jouany, B. Michalet-Doreau. Toxic effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on *in vitro* rumen fermentation. 2004. *Food Additives and Contaminants*. 21:871-87.
13. Morgavi, D. P., **H. Boudra**, J.P. Jouany and Graviou, D. 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6906-6910.
14. Enanga, E., J.M.M. Ndong, **H. Boudra**, L. Debrauwer, C. Labat, G. Chauvière, M. Keita, B. Bouteille, M. Dumas, G.Houin. 2000. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a Trypanosoma brucei gambiense primate model of human African trypanosomiasis - Preliminary study. *Arzneimittelforschung*. 50 (2): 158-162.

15. Lavit, M, S. Saivin, **H. Boudra**, F. Michel, A. Martin, G. Cahiez, J.P. Labaune, M. Chaumard, G. Houin. 2000. Determination of trimebutine and desmethyl-timebutine in human plasma by HPLC. *Arzneimittelforschung*. 50 (7): 640-644.
16. **Boudra, H.**, S. Saivin, M.F Malmay, G. Houin. 1999. Microdialysis of melatonin in the confluens sinuum of the rat following quantification by GC-MS in the NCI mode. *Arzneimittelforschung*. 49(10): 849-852.
17. Enanga, B., **H. Boudra**, C. Labat, G. Chauvière, M. Keita, B. Bouteille, M. Dumas, G. Houin. 1999. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal in animals. *Arzneimittelforschung*. 49(5): 441-447.
18. Enanga, B., **H. Boudra**, C. Labat, G. Chauvière, M. Keita, B. Bouteille, M. Dumas, G. Houin. 1997. Simple high-performance liquid chromatographic method to analyse megazol in human and rat plasma. *Journal of Chromatography B*, 696 (2): 261-266.
19. **Boudra, H.**, P. Le Bars, J. Le Bars. 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental of Microbiology*, 61 (3): 1156-1158.
20. **Boudra, H.**, P. Le Bars, J. Le Bars. 1994. Time of *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin formation in ripening of figs. *Mycopathologia*, **127**: 29-33, 1994.
21. Le Bars, J., P. Le Bars, J. Dupuy, **H. Boudra** and R. Cassini. 1994. Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability. *Journal of AOAC International*, 77(2): 517-521.
22. Dupuy, J., P. Le Bars, **H. Boudra** and J. Le Bars. 1993. Thermostability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme* , in corn. *Applied and Environmental of Microbiology*, 59: 2864-2867.
23. Dupuy, J., P. Le Bars, J. Le Bars and **H. Boudra**. 1993. Determination of fumonisin B1 in corn by Instrumental Thin Layer Chromatography. *Journal of Planar Chromatography*, **6**: 476-480.

I.2. Synthèses scientifiques

I.2.1. Dans périodiques à comité de lecture

24. J.F. Hocquette, **H. Boudra**, I. Cassar-Malek, C. Leroux, B. Picard, I. Savary, L. Bernard, A. Cornu, D. Durand, A. Ferlay, D. Gruffat, D.P. Morgavi, C. 2009. Terlouw. Perspectives offertes par les approches en « omiques » pour l'amélioration de la durabilité de l'élevage des herbivores. *Productions Animales*. 22 (5)1 : 385-396.
25. **Boudra, H.** 2009. Mycotoxines dans les fourrages : un facteur de stress supplémentaire pour les ruminants. *Fourrages* **106** : 265-280.
26. Galtier P., I.P. Oswald, P.Guerre, D.P. Morgavi, **H. Boudra**, Jouany J.P. 2008. Le risque mycotoxique : danger et impact sanitaire en productions animales. *Productions Animales*. 21 : 107-116.
27. Krska, R., E. Welzig and **H. Boudra**. 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137(3-4): 241-264.
28. Niderkorn, V., **H. Boudra**, D.P. Morgavi. 2007. Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants ? *Fourrages*. (No.189): 111-123.
29. Jouany, J.P., D.P. Morgavi, **H. Boudra**. 2006. Le risque mycotoxique dans la chaîne alimentaire en France. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 41:151-158.
30. **Boudra, H.**, DP. Morgavi, P. Galtier, B. Michalet-Doreau. 2002. Présence de moisissures toxigènes et des mycotoxines dans les fourrages conservés.

Signification et prévention. Proceedings 9^{ème} Rencontres Recherches Ruminants, Paris, pp : 17-23.

I.2.2. Dans périodiques professionnels sans comité de lecture

31. **Boudra, H.** 2008. L'ensilage est-il un moyen d'éliminer la contamination des ensilages de maïs par certaines fusariotoxines? *Phytoma*. 618: 20-22
32. **Boudra, H.** 2006. Prévenir au mieux les moisissures et mycotoxines. *Cultivar*. N° 599: 36-37.

I.2.3. Chapitres d'ouvrages

33. Morgavi D.P., **H. Boudra**, J.P. Jouany. Consequences of mycotoxins in ruminant production. 2008. *Mycotoxins in Farm Animals* (Editeur I. Oswald, I. Taranu), pp 29-46.

I.2.4. Rapports diplômants

34. **Boudra, H.** Protocole d'évaluation de la contamination mycotoxique : application à la noix et à la figue. 1994. Thèse 3^{ème} cycle en Mycotoxicologie *Thèse de 3^{ème} cycle*. Université Paul Sabatier, Toulouse.
35. **Boudra, H.** Inventaire des plantes traditionnelles à usage thérapeutique dans le constantinois. 1981. *Mémoire de fin d'études en Pharmacie (Faculté de Pharmacie d'Alger)*.
36. **Boudra, H.** Les mycotoxines dans l'alimentation humaine en Algérie, un problème de santé publique. 1985. *Mémoire de fin d'études de Spécialité Toxicologie (Faculté de Pharmacie d'Alger)*, pp : 1-30.

I.3. Communications dans des congrès

37. Bonnefoy, J-C., **Boudra, H.**, Doreau, M. 2009. Réduction de la fréquence de distribution des ensilages : incidence sur la qualité des rations. *XVI^{ème} Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 3-4 Décembre.
38. **Boudra, H.** and D. P. Morgavi. 2009. Silage could be a way to detoxify maize contaminated by mycotoxins. *World Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains, 9-11 September 2009, Tulln, Austria*.
39. Firmin, S., P. Gandia, D. P. Morgavi, G. Houin, J. P. Jouany, G. Bertin and **H. Boudra**. Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats by a preparation of yeast cell wall glucomannans. *World Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains, 9-11 September 2009, Tulln, Austria*.
40. Hocquette, J.F., **Boudra, H.**, Cassar-malek, I., Leroux, C., Picard, B., Savary, I., Bernard, L., Cornu, A., Durand, D., Ferlay, A., Gruffat, D., Morgavi, D., Terlouw, C. 2008. Contribution des approches en « omique » à l'élevage durable des herbivores. *XV^{ème} Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 3-4 Décembre.
41. **Boudra, H.**, M. Godejohann and D. P. Morgavi. 2008. Metabolic profiles reveal changes induced by ochratoxin A, a feed-borne mycotoxin, in sheep. *3^{ème} Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique*. 7 et 8 Février, Bordeaux.
42. Agabriel J., Garel J.P., **Boudra H.**, Bonnefoy J.C., Doreau M., Note P., Tournadre H., Pomies D., Garcia-Launay F., Micol D., Farruggia A. Nouvelles pratiques d'élevage herbivores en zone herbagère. *2^{èmes} Journées de Restitution des projets financés sur crédits incitatifs PHASE en 2006-2007, Tours, 26-27 novembre 2008*.

43. **Boudra, H.**, D. Alvarez, D. P. Morgavi. 2007. Evaluation des critères de fermentation et de stabilité aérobie de l'ensilage de maïs en mini silos. *Colloques scientifiques sur les progrès de la recherche sur les mycotoxines des Fusarium dans les céréales*. Arcachon, 11-13 septembre.
44. Roumet, P., N. Boinot, **H. Boudra**, F. Compan, X. Hais, B. Mahaut, M. Provot. 2007. Potentialités de la spectroscopie proche infra rouge pour le développement de prédictions de la teneur en DON de grains de blé tendre. *Colloques scientifiques sur les progrès de la recherche sur les mycotoxines des Fusarium dans les céréales*. Arcachon, 11-13 septembre.
45. Niderkorn, V., D.P. Morgavi, B. Aboab, M. Lemaire, **H. Boudra**. 2007. Composant de la paroi bactérienne et groupement chimique des mycotoxines impliqués dans la séquestration des fumonisines B₁ et B₂ par les bactéries lactiques. *XIIème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 8-9 Décembre.
46. Niderkorn, V., D.P. Morgavi, **H. Boudra**. 2006. Aptitude des bactéries lactiques à séquestrer et biotransformer les fusariotoxines - Application à la détoxification des ensilages de maïs. *14ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 17-19 mai, Paris*.
47. D. Lapole, **H. Boudra**, D.P. Morgavi, M. Doreau, J.P. Jouany, P. Nozière, B. Graulet, C. Feidt, G. Rychen. 2006. Évolution des Mycotoxines et des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par la technique du « Rumen vidé - lavé ». *Journées du Département PHASE*, Tours (FRA), 14-15 septembre.
48. Niderkorn N., **H. Boudra**, D.P. Morgavi. 2006. Binding and biotransformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone to -zearalenol by lactic acid bacteria. *Gut Microbiology, Rowett Research Institute-INRA*, Aberdeen, 21-23 juin.
49. **Boudra, H.**, D. Alvarez, J.P. Jouany, D.P. Morgavi. 2005. Transmission of Ochratoxin A into ewe's milk following a single or chronic ingestion of contaminated feed. *The World Mycotoxin Forum, Third Conference*, 10-11 novembre, Netherlands.
50. Jouany, J.P., D.P. Morgavi, **H. Boudra**. 2005. Le risque mycotoxique dans la chaîne alimentaire en France. *2ème Congrès de la Société Française de Nutrition*, 17-19 novembre, Campus de la Timone, Marseille, France.
51. **Boudra H.**, D.P. Morgavi, D. Alvarez, D. Graviou. 2004. Etude du devenir de 4 mycotoxines de l'*Aspergillus fumigatus* dans les fourrages conservés. *XIème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 8-9 Décembre.
52. Morgavi D.P., **H. Boudra**, D. Graviou, D. Alvarez. 2004. Ruminal toxicity of individual mycotoxins and of a mixed-toxin extract obtained from *Aspergillus fumigatus*-contaminated feed. *INRA-RRI 4th joint symposium. Reproduction Nutrition Development*. 44. S67.
53. Morgavi D.P., **H. Boudra**, J.P. Jouany, D. Graviou. 2004. Reducing agents prevent patulin toxicity in *in vitro* rumen fermentations. *Fourth Joint INRA-RRI Symposium Gut Microbiology*, Clermont-Ferrand (FRA), 21-24 June 2004. *Reproduction Nutrition Development*. 44. (Suppl.1). S67.
54. Niderkorn V., V. Morgavi, **H. Boudra**. 2004. Effet *in vitro* de l'addition d'agents biologiques sur la présence de mycotoxines. *XIème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 8-9 Décembre.
55. **Boudra H.**, D.P. Morgavi, D. Alvarez, B. Michalet-Doreau. 2003. Effets de deux modes de conservation sur la viabilité et la toxinogénèse de souches d'*Aspergillus fumigatus*. Résultats préliminaires. *Journées du Réseau de Mycologie*. Nancy (FRA), 15-17 Janvier.

56. **Boudra H.**, D.P. Morgavi, D. Alvarez, B. Michalet-Doreau. 2003. Etude du devenir de la gliotoxine dans le rumen. *Xème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 3-4 Décembre.
57. Morgavi D.P., **H. Boudra**, D. Graviou, J.P. Jouany. 2003. Effets de la patuline sur les fermentations in vitro du rumen. Prévention de sa toxicité par l'addition d'agents réducteurs. *Xème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 3-4 Décembre.
58. **Boudra H.**, P. Galtier. 2002. Stability of ochratoxin A in wheat during the thermal process. *IRTAC Cereal Conference*, CNIT PARIS La Défense (FRA), 9-11 October.
59. **Boudra H.**, D.P. Morgavi, D. Graviou, B. Michalet-Doreau. 2002. Conditions de production de la gliotoxine par *Aspergillus fumigatus*, contaminant majeur des fourrages conservés. *9ème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 4-5 Décembre.
60. Morgavi D.P., **H. Boudra**, D. Graviou, J.P. Jouany, Michalet-Doreau B., 2002. Effect of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* mycotoxin, on rumen microbial fermentation in vitro. *9ème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 4-5 Décembre.
61. **Boudra, H.**, M. Lavit, G. Houin. 1999. Mise au point et validation du dosage de la bromocryptine plasmatique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode NCI. *Congrès de Toxicologie analytique*. Marseille 2 juin.
62. **Boudra, H.**, P. Delagrangé, P. Genissel, G. Houin. 1998. Etude des profils des concentrations de mélatonine centrales au niveau du *confluens sinuum* par couplage GC-MS en mode NCI. *3ème journée de spectrométrie de masse en région Midi-Pyrénées*, 20 décembre.
63. **Boudra, H.**, P. Duchêne, S. Saivin, G. Houin. 1997. Development and validation of an HPLC method for the quantitation of piroxicam in human plasma. *Sixth European of Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. Athens, April.
64. **Boudra, H.** P. Le Bars, J. Le Bars, J. Dupuy. 1993. Susceptibility of aflatoxin contamination of figs in orchard. *Proceedings of Central Science Laboratory for Occurrence and significance of mycotoxins*, Brunel 21-23 april.
65. Dupuy, J., P. Le Bars, **H. Boudra**, J. Le Bars. 1993. Effect of thermal treatment on fumonisin B1 in maize. *Proceedings of Central Science Laboratory for Occurrence and significance of mycotoxins*, Brunel 21-23 april.
66. Le Bars, P., J. Le Bars, J. Dupuy, **H. Boudra**. 1993. Fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme*: frequency of toxigenic strains and abiotic factors. *Proceedings of Central Science Laboratory for Occurrence and significance of mycotoxins*, Brunel 21-23 april.
67. **Boudra, H.**, P. Le Bars, J. Le Bars. 1992. Intérêt et limite de la fluorescence jaune-vert (BGY-F) pour l'élimination des figues contaminées par les aflatoxines. *Réunion de la Société Française de Mycologie*, Paris, 27-28 janvier.

I.4. Conférences dans un congrès ou Symposium

I.4.1. Dans un congrès ou Symposium

68. **Boudra, H.**, D. Alvarez, DP. Morgavi. 2007. Devenir de quatre fusariotoxines dans l'ensilage de maïs à différentes conditions de stockage. *Mycotoxines fusariennes des céréales*, Arcachon, 11-13 septembre 2007.
69. **Boudra, H.** Mycotoxines dans l'alimentation animale: Effets sur la production et la santé des animaux de ferme. *5^{èmes} Journées des Sciences Vétérinaires*, Alger le 21 &

- 22 avril 2007. «Alimentation et Reproduction des Ruminants : Aspects sanitaires et zootechniques ».
70. **Boudra, H.**, DP. Morgavi, P. Galtier, B. Michalet-Doreau. 2002. Présence de moisissures toxigènes et des mycotoxines dans les fourrages conservés. Signification et prévention. *9ème Rencontres Recherches Ruminants*, Paris (FRA), 4-5 Décembre 2002.
71. **Boudra, H.** 2005. Evaluation des risques par les mycotoxines chez les ruminants. *1ères journées du Département PHASE*, Tours, 15 et 16 mars.
72. **Boudra, H.** 1990. Aflatoxine M1 dans les produits laitiers algériens. *VIIIème Journée Pharmaceutiques Maghrébines*. Marrakech, 10-12 Mai.
73. **H. Boudra**, M. Saouthi, M. Maamar, S. Megharbi, B. Lahrech. Analyse mycotoxicologique d'aliments consommés à l'hôpital. *XVIème Journées Médico-Chirurgicales de l'A.N.P*, Alger (15-16-17 Mai, 1989).

I.4.2. Conférences dans un séminaire

74. **Boudra, H.** 2008. "Sécurité alimentaire : « Maîtrise de la santé des bovins dans le nouveau contexte « grenelle de l'environnement »". *Commission de Recherches Bovines*. Maisons Alfort, 11-12 juin.
75. **Boudra, H.** 2007. Mycotoxines dans le lait de ferme: Résultats d'une enquête en France en 2003. *Commission Nationale des Co-produits*. Paris, 03 avril 2007.
76. **Boudra, H.** 2004. Missions du groupe des mycotoxines à l'Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA Theix. *Commission Nationale des Co-produits*. Paris, 03 avril 2004.
77. **Boudra, H.** 2002. La contamination par les moisissures et les mycotoxines des fourrages conservés. Signification et prévention. *Commission "Plastique et Elevage"*, Château d'Echerolles, Allier (FRA), 4 Juin 2002.

II- Productions à vocation de transferts

II.1. Documents destinés aux professionnels

78. Commission Nationale des Co-produits (avec **Boudra, H.**). 2009. Fiches sanitaires destinés aux professionnels.
79. **Boudra, H.** 2008. Quelques Mycotoxicoses observées chez les animaux de ferme en France. Fiches sanitaires pour les professionnels. *Commission Nationale des Co-produits*.
80. **Boudra, H.**, J. Le Bars. 1995. Les moisissures et les mycotoxines : Prévention de la contamination de la noix. *Guide Pratique à l'usage des Professionnels*, CTIFL, Creysse. Mars.

II.2. Expertise

II.2.1. Projets scientifiques

81. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. 2009. pp: 1-189. Prepared by : (**AFSSA, France**) : Caroline BOUDERGUE, Christine BUREL, Sylviane DRAGACCI, Marie-Christine FAVROT, Jean-Marc FREMY, Claire MASSIMI, Philippe PRIGENT; **CODA-**

CERVA (BELGIUM): Philippe DEBONGNIE, Luc PUSSEMIER; **INRA Clermont-Theix: Hamid BOUDRA,** Diego MORGAVI; **INRA Toulouse:** Isabelle OSWALD; **IRTA (SPAIN):** Anna PEREZ; **ISPA (ITALY):** Giuseppina AVANTAGGIATO. *Call for proposals CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01 published on the 23 February 2009.* pp: 1-189.

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/External_Rep/024e,0.pdf?ssbinary=true

82. **Boudra, H.** 2008. Evaluation projet « Haras nationaux » (2008) : « *Optimiser la qualité sanitaire des fourrages pour réduire la prévalence de maladies pulmonaires équine d'origine environnementale ou alimentaire telle que la pousse ou « MORVR », pp : 1-39.*
83. **Boudra, H.** 2006. Expertise d'un appel à projets 2006 " sécurité sanitaire des aliments en aquitaine" du Conseil Régional d'Aquitaine recherche - Enseignement Supérieur - Transfert de Technologie.
84. Doreau, M., **H. Boudra.** 2005. Expertise d'un Appel d'Offre "AFSSA ó INRA, 2005" intitulé PORCDON.
85. **Boudra, H.** 2006. *Rapport d'expertise analytique réalisée à la demande de l'AFSSA, suite à une intoxication collective suite à la consommation d'un fromage de fabrication artisanale.*

III.2.2 Compte rendu d'essais avec des industriels

86. **Boudra, H.** 2007. Protocole d'étude de l'efficacité de 3 conservateurs biologique sur la conservation de 3 types d'ensilage d'herbe. Contrat d'Etude avec la Société Lallemand.
87. **Boudra, H.** 2002. Effet du conservateur "SILASTAR" sur la qualité de conservation, la stabilité et la digestibilité des ensilages de maïs. Contrat d'Etude avec la Société *Lactosan.*
88. **Boudra, H.** 2002. Effet d'un conservateur biologique « L7M » sur la qualité de conservation, la stabilité et la digestibilité des ensilages de maïs. Contrat d'Etude avec la Société *WPM.*
89. **Boudra, H.** 2002. Effet d'un mélange d'acide propionique-ammoniac-1.2 propanediol sur la qualité de conservation, la stabilité et la digestibilité des ensilages de maïs. Contrat d'Etude avec la Société *BASF.*
90. **Boudra, H.** 1994. Mise au point et validation de méthodes de dosage plasmatique de médicaments (aténolol, diltiazem, indinavir, piroxicam, prométhazine et warfarine), avec rédaction des rapports de validation en conformité aux Bonnes Pratiques de Laboratoire et dans l'esprit de la « Conference Report » " *Analytical Methods Validation : Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic studies*" (December 1990-Washington DC.). Collaboration Industrielle avec *ADME, Sophia Antipolis.*
91. **Boudra, H.** 1995. Etude de la fixation protéique *in-vitro* du Gadolinium avec la méthode de microdialyse, Laboratoire GUERBET, Paris.
92. **Boudra, H.** 1995. Etude pharmacocinétique bromocryptine salivaire chez l'homme (collaboration : Centre d'Etudes Spatiales, CHU Ranguéil).
93. **Boudra, H.** 1995-1997. Contrat d'Etude par microdialyse de la sécrétion de mélatonine endogène chez le rat éveillé après implantation de sondes de microdialyse, et administration de produits agonistes ou antagonistes, *Laboratoires SERVIER, Orléans.*

II.3. Mémoires de stage

94. Faure F. (avec **Boudra H.**). 2009. Effet de la flore du fourrage vert récolté sur la disparition des fusariotoxines au cours du processus d'ensilage de maïs. *Master II Professionnel (Spécialité Biotechnologie, Université de Limoges)*, pp : 1-40.
95. Provenchère C. (avec **Boudra H.** et Morgavi D.P). 2006. Effets des métabolites produits par *Monascus* spp. sur les fermentations ruminales. Mémoire de spécialisation en Biotechnologie (Université Catholique de Lyon), pp : 1-20.
96. Tissandier A (avec Niderkorn V. et **Boudra H.**). 2005. Criblage des bactéries lactiques pour leur capacité à limiter l'impact des mycotoxines dans les ensilages de maïs. Mémoire Master II (Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand), pp : xx.
97. Provenchère P. (avec **Boudra H.**). 2004. Validation de mini silos pour les études de stabilité des mycotoxines durant l'ensilage. Mémoire de BTS (Anabiotec, Institut des Sciences de la Vie et de la Terre, Le Puy en Velay), pp : xx.
98. Cartailier J. (avec **Boudra H.**). 2004. Evaluation de l'absorption ruminale des principales mycotoxines présentes dans l'alimentation animale. Mémoire de Fin d'étude (IUT Mesures Physiques, Clermont-Ferrand), pp : xx.

II.4. Document interne INRA

99. **Boudra, H.**, J. Barnouin, D.P Morgavi. 2007. Enquête sur la contamination du lait de ferme français par l'ochratoxine A et l'aflatoxine M. *Echo des Puys*, n° 97, p 4.
100. **Boudra, H.** *Fait marquant de nos recherches.* 2007. Une Enquête réalisée en 2003 a révélé un faible risque de contamination par l'ochratoxine A et l'aflatoxine M1 du lait de ferme produit en France.
101. Niderkorn, V., **Boudra, H.** *Fait marquant de nos recherches.* 2006. Les bactéries fermentaires utilisées comme agents de conservation sont capables d'éliminer les fusariotoxines des ensilages contaminés.

II.5. Autres

102. **Boudra, H.** 2004-2007. Compte rendu annuel pour l'Association Nationale de la Recherche Technique, Bourse CIFRE avec la Société Lallemand.
103. **Boudra, H.** 2003-2007. Rapport semestriel, annuel et de fin de contrat RARE (*Réseau de recherche et d'innovation technologiques Alimentation Référence Europe*, Projet 03RARE032) financé par le ministère de l'Agriculture, intitulé « *Maîtrise de la contamination par les fusariotoxines des aliments à bases de céréales* ».
104. **Boudra, H.** 2008-2010. Compte rendu annuel pour l'Association Nationale de la Recherche Technique, Bourse CIFRE avec la Société Alltech.

1- Introduction générale sur les mycotoxines

Le risque mycotoxicologique provoque une inquiétude grandissante chez les consommateurs et les pouvoirs publics. La contamination par les moisissures des aliments peut intervenir au champ, durant leur conservation ou leur utilisation. Elle peut provoquer dans certaines conditions climatiques ou de mauvaise conservation une production de mycotoxines pouvant être néfaste à la santé des animaux et de l'homme. Le développement fongique et/ou la production de mycotoxines sont principalement régis par des facteurs environnementaux, notamment la teneur en eau, la température mais aussi la composition chimique de l'aliment et le degré de confinement durant la conservation.

Les mycotoxines sont des toxines issues du métabolisme secondaire des moisissures contaminant naturellement les denrées alimentaires, notamment les céréales. Ce sont des contaminants ubiquitaires présents dans 25 à 70% des aliments végétaux selon leur provenance (Pittet, 1998; Binder et al., 2007). Plus d'un millier de métabolites secondaires d'origine fongique ont été isolés et identifiés dans les conditions de laboratoire (Cole et al., 2003). L'amélioration des performances des techniques d'analyse permet de identifier constamment de nouveaux métabolites. Une partie seulement de ces métabolites, possédant expérimentalement une activité biologique, ont été identifiés (environ une trentaine) et sont retrouvés à des niveaux appréciables comme contaminants naturels des aliments. La quasi-totalité de ces mycotoxines sont produites par des moisissures appartenant notamment aux genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Une même espèce fongique peut produire plusieurs mycotoxines et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs moisissures. Ce qui peut avoir comme conséquence la présence dans un même aliment de plusieurs mycotoxines à la fois (Richard *et al.*, 2007; Mansfield *et al.*, 2008).

Les observations réalisées sur le terrain ou lors d'expérimentation sur les animaux ont montré que les mycotoxines possèdent divers effets biologiques: certains sont cancérigènes, mutagènes, hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques; alors que d'autres possèdent des propriétés immunotoxiques, cytotoxiques ou oestrogéniques. En plus des effets individuels des différentes mycotoxines, **il existe des effets synergiques** observés entre certaines mycotoxines (D'Mello and Macdonald, 1997; Smith et al., 1997).

Sur le terrain, des cas de mycotoxicoses aiguës ont été rapportés chez l'homme, dont la plus importante est l'aflatoxicose responsable de cancers primaires du foie avec une fréquence élevée dans les zones tropicales d'Afrique et d'Asie en relation avec la contamination alimentaire en aflatoxine B1 (AFB1). Deux cas d'aflatoxicose récente ont été récemment observés au Kenya en

2004 et 2005 où plus de 150 personnes ont trouvé la mort des suites d'hépatites provoquées par la toxine, après avoir consommé du maïs produit et stocké sur place (Strosnider *et al.*, 2006). Plus récemment, la présence de fumonisines (FBs) dans du maïs a été corrélée avec une augmentation du risque de cancer de l'œsophage dans certaines régions d'Afrique du Sud (Rheeder *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1992), du nord de l'Italie (Franceschi *et al.*, 1990), d'Iran (Shephard *et al.*, 2000) et de Chine (Wang *et al.*, 2000).

A l'exception des mycotoxicoses aiguës, les effets des mycotoxines sur les animaux d'élevage ont rarement été identifiés. Le premier cas de mycotoxicose remonte à 1960 en Angleterre dans les élevages industriels de dindons, lorsqu'une ingestion d'une forte dose d'AFs a provoqué une mortalité de plus de 10 000 dindonneaux. Depuis, de nombreuses autres mycotoxicoses ont été décrites dont certaines en France (Le Bars and Le Bars, 1996). La toxicité des FBs se manifeste de façon variable selon l'espèce animale. Des oedèmes pulmonaires et des lésions hépatiques ont été observés chez le porc (Colvin and Harrison, 1992; Motelin *et al.*, 1994), tandis que le syndrome caractéristique chez les chevaux est une leucoencéphalomalacie caractérisée par une liquéfaction localisée de la substance blanche de l'encéphale (Marasas *et al.*, 1988). Elles sont également néphrotoxiques et/ou hépatotoxiques chez certaines autres espèces (lapin, poulet, singe, agneau) et favorisent le cancer du foie chez le rat (Riley, 1998).

Mes travaux de recherches se sont focalisés, - dans un premier temps, sur la contamination par les mycotoxines d'aliments destinés à l'homme. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de mes travaux de thèse (1991-1994, INRA de Toulouse); - ensuite, sur l'évaluation du risque mycotoxique chez les ruminants depuis mon recrutement en 2001 au sein de l'Unité de Recherches sur les Herbivores à l'INRA de Clermont-Theix .

2- Travaux de thèse :

L'objectif de cette thèse¹ était de définir les mécanismes de contamination fongique et mycotoxique sur deux types de fruits (la noix et la figue) afin d'aboutir à des mesures de prévention raisonnée. Ce travail de thèse a été initié à la demande de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), faisant suite à un rejet de la noix française par certains pays européens pour un problème de contamination par AFs. Le deuxième substrat étudié durant cette thèse est la figue qui, contrairement à la noix où il n'y a aucune donnée, est connue comme étant un véhicule potentiel de la contamination par les mycotoxines. J'ai également participé avec des collègues à d'autres travaux qui ont donné lieu à 3 publications communes (*Publi 21, 22 et 23*).

2.1. Démarche pour l'évaluation du risque mycotoxique

La démarche choisie pour l'évaluation du risque de contamination de l'aliment par les mycotoxines a été inspirée de la méthode **HACCP (Hazard-Analysis and Critical Control Points)**. Il s'agit d'une démarche globale structurée en 2 volets : (i) le premier volet concerne l'analyse des dangers **hazard analysis**; (ii) et le deuxième volet concerne la détermination et le contrôle des facteurs favorisant l'apparition de ce danger (**Critical Control Points**). Cette stratégie n'est pas figée et peut être adaptée à chaque type de produit en fonction des avancées technologiques. L'objectif de cette démarche est de réduire la présence des mycotoxines dans les aliments en éliminant les facteurs de risque.

Pour le risque mycotoxique, l'analyse des dangers a pour objectif de déterminer successivement : (i) la nature des contaminants fongiques; (ii) la répartition du potentiel toxigène des souches isolées; (iii)- la capacité des « espèces à risque »² à produire des mycotoxines sur l'aliment étudié ; (iv) et enfin, leur stabilité durant la conservation. En fonction des résultats obtenus dans le premier volet, les études du second volet concerneront l'évaluation des modes et des moments de la contamination fongique et mycotoxique, qui seront entreprises à 3 niveaux, chacune correspondant à un moment de la vie du végétal : (i) La période de Pré-récolte où la stratégie est actuellement limitée à la lutte contre les altérations fongiques par les prédateurs qui, en plus des pertes qu'ils infligent, sont de véritables véhicules des spores de moisissures ; (ii) la période de récolte qui permet d'évaluer les effets du processus technologique de récolte sur la contamination mycotoxique. Elle est

¹ Collaboration avec la Station Expérimentale de la Noix (CTIFL, Creysse) et la Direction Générale de l'Alimentation

² Les principales espèces d'intérêt toxicologique appartiennent à 3 genres fongiques: *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*.

relativement courte appelée également "péri-récolte", et constitue une période à haut risque du fait de la disparition des barrières physiologiques de la plante et des altérations physiques résultant de la mécanisation des récoltes et de la présence d'une humidité favorable à l'invasion fongique ; et enfin (iii) la période Post-récolte qui évaluera le risque au cours de la conservation. Comme par exemple, la détermination de l'activité en eau (a_w) minimale de sécurité ne permettant aucun développement fongique, - ou encore l'évaluation de la stabilité des mycotoxines durant un processus technologique de transformation³. Comme je l'ai dit plus haut, cette démarche n'est pas figée, elle peut être transposée à d'autres substrats susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines. Selon le produit et les connaissances acquises en terme de contamination par les mycotoxines, la démarche pourrait être partielle pour la figue et le blé, ou complète pour la noix.

2.1. Exemples d'études

2.2.1. Exemple 1 : La noix

La France est le premier exportateur de noix de la CEE. Face à une concurrence sévère, celle des Etats-Unis notamment, la France doit améliorer la qualité de ses produits pour rester compétitive. A ce titre, la présence de moisissures voire de mycotoxines, peut infliger une perte directe et une dépréciation importante de l'image du produit.

L'objectif de ce travail était d'évaluer le risque fongique et mycotoxique notamment par les AFs, seules mycotoxines réglementées, et d'identifier les moments de contamination afin de proposer des mesures de prévention. Etant donné l'absence totale d'informations sur la contamination de la noix par les mycotoxines, une évaluation complète du risque a été nécessaire.

L'étude de la mycoflore de cerneaux de noix a été la première étape de l'analyse du danger. Elle a été réalisée sur trois années successives et a permis d'isoler au total 338 souches appartenant à 17 genres. La comparaison de la mycoflore en fonction de l'origine des cerneaux a montré que les espèces du genre *Penicillium* sont majoritaires dans les pays tempérés (Chine, France, Roumanie et Ukraine) ; alors que le genre *Aspergillus* est dominant dans les cerneaux provenant de pays chauds (Algérie, Inde, Turquie et USA). L'importance relative de ces deux genres semble donc dépendre du climat de ces pays (**Figure 1**).

³ Comme l'étude du devenir de l'OTA dans le blé durant les processus thermiques (Cf exemple d'étude n° 3)

Dans un second temps, j'ai criblé les souches fongiques isolées précédemment et appartenant aux 3 genres (*Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*) pour leur capacité à produire des mycotoxines dans des conditions optimales de culture. Sur un total de 209 souches testées, seulement 29 (14 %) ont produit des mycotoxines⁴ (**Tableau 1**). A l'exception des *Aspergillus*, la fréquence des souches toxigènes paraît relativement faible, comparativement à d'autres études réalisées sur d'autres substrats comme les céréales. Ceci pourrait s'expliquer par la recherche des mycotoxines directement à partir de l'extrait, sans concentration préalable, ne permettant de mettre en évidence que les souches moyennement ou fortement toxigènes.

Un essai de toxinogénèse au laboratoire, réalisé avec les souches les plus productrices, a montré que les cerneaux de noix sont favorables à la production non seulement des AFs, mais aussi de la fumonisine B1 (FB1) et de la zéaralénone (ZEA). Enfin, La stabilité sur cerneaux de 6 mycotoxines a été testée à 2 températures (+ 5 et 20° C), et durant 8 mois de conservation. Les résultats ont montré que l'acide pénicillique, la patuline et la citrinine sont instables, puisque plus de 50 % de la quantité initiale de ces mycotoxines a disparu après seulement 8 jours (données non montrées). En revanche, l'AFB1, la FB1 et la ZEA sont restées relativement plus stables après 8 mois de conservation (**Tableau 2**).

*En conclusion, les études portant successivement sur la mycoflore, la toxinogénèse et la stabilité des mycotoxines dans les cerneaux de noix ont montré **un risque potentiel de contamination** par l'AFB1, la FB1 et la ZEA. Ces résultats pourraient orienter la recherche des mycotoxines dans des enquêtes ou des contrôles éventuels sur la noix.*

Dans un but de compréhension des phénomènes et dans la perspective d'apporter des éléments de prévention, il importait de déterminer dans le second volet de l'évaluation du risque **le mode et le moment de contamination fongique et mycotoxique de la noix**. Pour ce faire, trois grandes périodes du végétal ont été explorées : - au verger, durant les étapes de maturation de la noix; - à la récolte, au cours des processus technologiques; et - pendant la conservation de la noix.

(i) **Au verger**, 2 variétés de noix (*Franquette* et *Lara*) ont été artificiellement contaminées à

⁴ Sur chaque extrait de culture, 11 mycotoxines ont été recherchées : aflatoxine B1, B2, G1 et G2, acide kojique, acide cyclopiazonique, acide pénicillique, citrinine, ochratoxine A, patuline et stérigmatocystine

différents stades de leur maturation à l'aide de souches toxigènes⁵ selon 2 modes d'inoculation: par injection et saupoudrage de la totalité de la surface de la noix simulant l'introduction des spores par les insectes et la contamination par voie aérienne, respectivement. A la récolte, une analyse mycologique a été réalisée individuellement sur des noix entières saines et contaminées prélevées sur l'arbre. Les 2 types d'inoculation aux premiers stades phénologiques à partir de la floraison ont conduit à une chute de plus de 50% des noix avant d'atteindre le stade mature. Parmi les noix parvenues à maturité, 3,4% pour la variété *Lara* et 61,6% pour la variété *Franquette* ont été atteintes par une maladie (bactériose). L'analyse mycologique individuelle, après décontamination artificielle, des noix arrivées à maturité n'a montré aucune contamination fongique dans les 2 cas de contamination naturelle et artificielle.

En revanche, l'analyse mycologique des noix est effective au moment de la récolte, après contact avec le sol, et durant les étapes technologiques de lavage et de l'énoisage, mais aucun développement fongique apparent sur le cerneau entier. La rupture de la pellicule au cours de l'énoisage, peut entraîner dans certaines conditions de stockage le développement fongique et la production de mycotoxines. C'est ce que j'avais montré dans un essai de toxinogénèse après inoculation de 3 souches (*A. flavus*, *F. moniliforme* et *Penicillium spp.*) sur des cerneaux stockés à différentes teneurs en eau. La détection de la première croissance fongique sur le cerneau était très différente en fonction de l'espèce utilisée. A 13% d'humidité, seul l'*A. flavus* s'est développé, alors que le *Penicillium* est apparu à une teneur en eau plus élevée, et le *Fusarium* à partir de 34 % d'humidité (**Tableau 3**). La production de l'AFB1 a augmenté avec la teneur en eau du cerneau puis ont décliné à partir de 34% (résultats non montrés).

Sur le plan sanitaire, il s'agit de savoir dans quelles conditions ces espèces potentiellement présentes sur la surface du cerneau sont capables de se développer et d'élaborer des mycotoxines. Pour cela, des simulations de conservation de noix entière et de cerneaux à 5 différentes activités en eau (a_w) (0.75, 0.80, 0.85, 0.90, et 0.95) ont été réalisées selon la méthode décrite par (Solomon, 1951).

Les résultats ont montré que durant la conservation des cerneaux, le risque de développement et par conséquent de production de mycotoxine par des espèces xérophiles telles que *Aspergillus* et *Penicillium* demeure plausible aux valeurs des a_w durant la conservation (0.80 à 0.85). Par contre, le risque "fusariotoxique" est négligeable du fait de la nécessité d'une a_w plus élevée ($> 0,90$) (**Tableau 4**).

⁵ Souches toxigènes d'*Aspergillus* et de *Fusarium spp.*

Comme pour les autres oléagineux, une partie de la production française des cerneaux de noix (< 1%) est destinée à la production de l'huile. Cette activité reste très artisanale et donc non soumise au contrôle. Étant donné la qualité médiocre des cerneaux destinés à la fabrication de l'huile et le risque de contamination possible par les AFs dans les conditions habituelles de conservation (Cf essai précédent), j'ai entrepris de quantifier la répartition des AFs entre les deux produits de transformation, l'huile et les tourteaux, dans le cas d'une extraction artisanale de l'huile de noix à partir de cerneaux artificiellement contaminés avec une souche toxigène de *A. flavus*.

Le **tableau 5** indique la quantité totale des 4 aflatoxines retrouvées dans les 2 produits, ainsi que les pourcentages respectifs. Environ 9% de la quantité totale de l'AFB1 passe dans l'huile, le reste de la toxine est retrouvée dans la fraction solide de la noix, c'est à dire le tourteau. En raison de la faible solubilité des AFs dans les lipides, leur passage dans l'huile est dû essentiellement à la présence de particule en suspension. Ceci est particulièrement dangereux pour des consommateurs qui, pour satisfaire à un désir d'alimentation saine, préfèrent l'huile brute. Il est donc prudent d'avoir une huile qui soit la plus claire possible et ne comportant pas de particules en suspension, ni de dépôt au fond de la bouteille. Les tourteaux de noix doivent également bénéficier d'une attention particulière, d'autant plus qu'ils sont donnés à des canards, très sensibles à la contamination aflatoxique.

En conclusion, au vu des essais réalisés au laboratoire, seules l'AFB1, la FB1 et la ZEA pourraient constituer un risque pour le consommateur.

Au champ, l'ensemble des résultats d'observations et d'essais expérimentaux montre que la probabilité de contamination de la noix au verger avant sa chute au sol reste négligeable quelle que soit le stade phénologique et le mode d'inoculation. En conséquence, aucune contamination mycotoxique ne devrait avoir lieu au verger.

En revanche, la contamination fongique (sans croissance et production de toxine) est effective au moment de la récolte, après contact avec le sol, et durant les étapes technologiques de lavage et d'énoisage.

*Enfin, des simulations de conservation du cerneau sec à différentes a_w ont permis de déterminer une valeur minimale de 0,80 empêchant tout développement de *A. flavus*.*

2.2.2. Exemple 2 : La Figue

Plusieurs enquêtes ont rapporté la contamination des figues par les AFs. D'après les travaux effectués, il apparaît que l'*A. flavus* ne peut se développer ni sur la figue immature au verger (Buchanan *et al.*, 1975), ni sur la figue sèche en cours de la conservation sauf dans des conditions

d'hydratation tout à fait anormales (Le Bars, 1990). Deux points nous ont paru nécessiter des travaux complémentaires: (i) en amont de la récolte, la détermination du moment critique de contamination; (ii) et en aval de la récolte, l'évaluation de l'efficacité du tri industriel en étudiant la liaison entre la contamination par les AFs et la présence d'une fluorescence sous lumière UV (= critère de tri).

Détermination du moment et du mode de contamination mycotoxique
(Publi. 20)

Des figes ont été inoculées avec une souche toxigène d'*A. flavus* à 3 stades de maturation: 1- figes fraîches, 2- figes "ridées" et 3- figes sèches. Comme pour la noix, l'inoculation a été réalisée de 2 manières : par saupoudrage de spores diluées dans du talc et par injection de spores dans une suspension, simulant respectivement la piqûre d'insecte et le dépôt de spores transportées par le vent et les insectes sur la surface de la fige. Chaque fige a été analysée individuellement à des moments différents : 0, 2, 4, 6, 8 et 10 jours après l'inoculation. La totalité des figes du stade 1 inoculées par injection contenaient de l'AFB1 et ont montré un développement fongique macroscopiquement visible. L'AFB1 a été détectée après seulement 2 jours, et la concentration a augmenté rapidement pour atteindre 1 000 ng/kg après 10 jours. En revanche, dans les figes fraîches inoculées par saupoudrage, l'AFB1 a été détectée dans seulement 35% des figes après le 6^{ème} jour. Les taux d'AFB1 retrouvés dans les figes inoculées aux stades 2 et 3 ont été nettement plus faibles (0,08 - 0,34 ng/g) (**Tableau 6**).

Etude de la liaison entre la contamination par l'AFB1 et le critère de fluorescence utilisé dans le tri industriel

La contamination des figes par *A. flavus* produit une fluorescence vert-jaune (ou *bright green yellow fluorescence*, BGY) visualisée sous lumière UV. C'est cette fluorescence qui est utilisée en industrie comme critère de tri pour éliminer les figes contaminées. Pour vérifier l'efficacité de ce tri, nous nous sommes procurés des figes sèches (n=58) triées industriellement BGY-positives (BGY⁺) et BGY-négatives (BGY⁻) par l'Aegean Exporters'Union (Izmir, Turquie). Les figes ont été individuellement examinées sous lumière UV à 366 nm et triées sur la base de l'absence ou la présence d'une BGY externe sur la fige. Les figes BGY⁺ ont été groupées en 4 classes selon l'importance de la surface fluorescente externe. Les figes ont été ensuite analysées individuellement par chromatographie sur couche mince et détection fluorodensitométrique à 365 nm après une extraction liquide-liquide et une séparation sur plaques de gel de silice.

L'observation minutieuse sous lumière UV a permis de vérifier l'exactitude du tri industriel pour les deux lots de figues concernés (BGY⁺ et BGY⁻). L'analyse de l'AFB1 des figues BGY⁻ a montré que 33% (6/18) contenaient de l'AFB1 à des concentrations très faibles (0,2 à 1,7 ng/g). En revanche, toutes les figues BGY⁺ étaient contaminées par l'AFB1 à des niveaux très variables (0,05-2294 ng/g) (**Tableau 7**). Globalement, l'intensité de la fluorescence BGY dans une figue est en relation directe avec la concentration moyenne en AFB1; mais il y a de grandes variations individuelles, notamment quelques figues très fluorescentes (F³⁺ et F⁴⁺) mais qui sont peu contaminées (**Tableau 7**).

*En conclusion, contrairement à la noix, la contamination fongique et mycotoxique de la figue a lieu principalement au stade « figue fraîche »; toutes les causes de lésions de la peau (physiologiques, mécaniques ou provoquées par des prédateurs) favorisent la production d'AFs. Cette période dure entre 10 et 15 jours selon la température ambiante. Au stade figue verte, l'absence des glucides est certainement la principale cause de l'absence de développement d'*A. flavus*. Aux stades macroscopiques de "figues ridées" et "figues sèches", la teneur en eau interne de la figue devient incontestablement le facteur limitant. Compte tenu des résultats obtenus, une attention plus particulière doit être réservée au stade "figue fraîche". Afin de réduire la contamination fongique dans le verger, il sera recommandé du fait de la fragilité de ce fruit,*

- *d'accélérer le séchage de la figue; les résultats montrent qu'à ce stade, la production d'AFs après 2 jours a été multipliée par environ un facteur 300 au bout de 10 jours. (Buchanan et al., 1975), comparant le séchage naturel sur l'arbre ou au sol et le séchage artificiel à la chaleur, ont constaté que la quantité d'AF produite dans ce dernier cas est nettement inférieure.*
- *d'éliminer les figues endommagées qui sont en général le siège d'une contamination mycotoxique.*

*- Le tri industriel, basé sur l'examen des figues sous UV permet d'abaisser considérablement le taux moyen de contamination à l'échelle d'un lot (**Figure 2**). Néanmoins, l'absence de fluorescence BGY ne constitue pas une garantie absolue de l'absence de contamination par les AFs. Il en résulte que pour ce type de tri, si le risque pour le producteur (rejet de figues BGY⁻) apparaît très faible; le risque pour le consommateur (ingestion de figues BGY⁺ / AF⁺) est non négligeable.*

2.2.3. Etude du devenir de l'ochratoxine A durant les processus thermiques de transformation du blé

(Publi. 19)

Les céréales peuvent être contaminées par plusieurs mycotoxines dont la nature diffère selon le climat et la zone géographique. Parmi ces mycotoxines, la présence de l'OTA dans les céréales et le sérum humain a été rapportée dans plusieurs travaux. Or dans certains pays d'Afrique, d'Amérique latine ou d'Asie, plus de 50% de la nourriture est à base de céréales, notamment le blé et le maïs. Un des moyens pour évaluer le risque d'exposition d'une population à une mycotoxine donnée est l'enquête alimentaire et/ou l'étude du devenir de la toxine au cours des processus de transformation des aliments. Le blé est par exemple soumis à plusieurs processus technologiques dont la température constitue un paramètre essentiel. Le but de ce travail était d'évaluer la stabilité de l'OTA dans le blé à différentes conditions de température, d'humidité et de durée du traitement simulant les différents modes de cuisson.

Les résultats ont montré que la stabilité de l'OTA était fonction de la température, de l'humidité (blé sec vs humide à 50%) et de la durée du traitement. Jusqu'à 150 °C, l'humidification à 50% du blé diminue significativement la stabilité de l'OTA ($P < 0.05$), cette tendance s'est inversée à 200 °C ($P < 0.05$) (**Tableau 8**).

En conclusion, l'étude de la stabilité de l'OTA aux températures habituellement utilisées pour la cuisson des plats à base de blé et dérivés, met en évidence sa relative stabilité. La mycotoxine peut par conséquent être recherchée dans les aliments ayant subi au préalable un traitement thermique.

3. Evaluation du risque mycotoxique chez les ruminants

Problématique :

Des études et enquêtes réalisées ces dernières années ont montré que la contamination des aliments destinés aux animaux est souvent inévitable dans les conditions d'agriculture actuelles (Scudamore and Livesey, 1998; Binder et al., 2007). Chez les animaux d'élevage, les mycotoxines sont responsables d'intoxications aiguës parfois mortelles et d'intoxications chroniques dont les effets sont rarement identifiés. Aujourd'hui les effets spectaculaires des mycotoxicoses aiguës suite à l'ingestion de fortes doses sont devenus rares en raison de l'amélioration des techniques de récolte et de conservation. En revanche, les conséquences liées à l'ingestion prolongée de faibles doses de mycotoxines et les effets synergiques avec d'autres mycotoxines ou agents pathogènes sont probablement les plus fréquentes mais les plus difficiles à diagnostiquer.

Les conséquences du risque mycotoxique chez les ruminants sont de deux ordres : (i) une **perte directe à l'éleveur par l'altération des aliments et la diminution des performances zootechniques de l'animal** ; (ii) mais aussi des **problèmes de sécurité alimentaire** liés à la présence de résidus de mycotoxines dans les produits animaux, notamment le lait.

L'exposition des ruminants aux mycotoxines est la résultante d'au moins 2 facteurs : animal et alimentaire. Pour ce qui est du **facteur animal**, il est fréquemment considéré que les ruminants sont moins sensibles aux mycotoxines que les monogastriques. L'explication habituellement avancée est la présence dans le rumen d'une communauté importante et complexe de micro-organismes capables de dégrader les mycotoxines. En réalité, la dégradation ne concerne qu'un nombre limité de mycotoxines : le déoxynivalénol (DON) et l'ochratoxine A (OTA), la ZEA et l'AFB1 sont peu détoxifiées, alors que d'autres mycotoxines majeures comme les FBs ne sont pas du tout dégradées par le rumen. De plus, pour que cette détoxification soit réellement efficace, il faut que le rumen et son microbiote soient maintenus dans de bonnes conditions. Or, chez les ruminants à potentiel de production élevé, les régimes riches en concentré permettent souvent de maximiser les performances, mais peuvent être également à l'origine de modifications importantes de la flore ruminale, notamment une diminution du nombre de protozoaires (Brossard *et al.*, 2004), responsables de la dégradation de certaines mycotoxines (Galtier and Alvinerie, 1976). En outre, les capacités de détoxification du rumen peuvent être dépassées chez ces mêmes animaux qui ont une ingestion élevée et donc un turnover rapide des aliments dans le rumen (Veldman *et al.*, 1992). Une autre différence qui n'avantage pas les ruminants est la présence d'un cycle de production long qui

peut atteindre jusqu'à 7 ans, comparé par exemple aux 42 jours pour le poulet. De nombreux travaux expérimentaux ont montré que la consommation d'aliment contaminé par les mycotoxines se traduit généralement par une diminution des quantités ingérées (QI). Des bovins à l'engraissement ayant reçu un aliment contaminé en AFB1 à 0.6 mg/kg ont réduit significativement les QI (Helferich *et al.*, 1986). Des vaches laitières, ayant reçu une dose de 13 mg d'AFB1 provenant d'un extrait de culture d'*A. parasiticus*, ont diminué significativement leur production laitière journalière (19.7 vs 22.1 kg/jour) (Applebaum *et al.*, 1982). Aux USA, les pertes imputables aux fourrages endophytés par *Acremonium coenophialum* sont évaluées à 600 millions \$ par an pour la seule filière bovins-viande (Towers, 1993). Ainsi, les QI par des agneaux consommant du foin endophyté sont plus faibles ($P < 0.05$) (856 vs 936 g/animal/jour) (Chestnut *et al.*, 1992). Oldenburg *et al.* (Oldenburg *et al.*, 1998) ont observé une diminution significative du gain de poids journalier chez deux races d'agneaux pâturant une même variété de *Lolium perenne* fortement endophytée. Parmi les autres mycotoxines pouvant contaminer les fourrages conservés, ce sont les mycotoxines à effets oestrogéniques, comme la ZEA, le coumestrol ou une isoflavone : la génistéine retrouvée en grande quantité dans le trèfle. Elles ont toutes été responsables de troubles de la reproduction dans un élevage de moutons en pâturage (Towers, 1993; Shier, 1998).

Pour ce qui est du **facteur alimentaire**, les ruminants peuvent être exposés à un nombre variable et plus important de mycotoxines que les animaux monogastriques, en raison d'une **alimentation complexe et variée**. En effet, la ration des ruminants compte une part de fourrages apportant son lot de mycotoxines supplémentaires. Dans le cas de lots de fourrages contaminés, les animaux peuvent donc être exposés durant une longue période à des mycotoxines. De plus, l'alimentation des ruminants (fourrages conservés et concentrés) est moins contrôlée que celle des monogastriques, car produite et consommée à la ferme. Les recommandations de la commission européenne relatives à la présence des mycotoxines majeures dans les produits destinés à l'alimentation animale sont disponibles (recommandation 2006/576/CE du 17 août 2006), mais ne concernent que les concentrés, les céréales et les aliments complets.

Une autre conséquence de la présence des mycotoxines dans l'alimentation des ruminants est la possibilité **de transfert de certaines mycotoxines dans les produits animaux et surtout dans le lait**. La présence de mycotoxines et/ou de leur(s) métabolite(s) dans le lait et les produits dérivés pose un problème de santé publique du fait que ces produits sont largement consommés, notamment par les enfants pour lesquels ces aliments constituent l'alimentation de base, et qui sont plus sensibles à la toxicité de ces contaminants. Si pour certaines mycotoxines, comme les fusariotoxines le transfert dans le lait est faible ou nul, pour l'aflatoxine M1 (AFM1), seule mycotoxine

réglementée, les taux peuvent atteindre jusqu'à 6% de la dose ingérée en AFB1 chez les vaches à haut potentiel de production (Veldman *et al.*, 1992). Ces résultats n'ont jamais été confirmés. De plus, des conclusions provisoires du groupe de travail AFSSA "Mycotoxines" ont clairement identifié un défaut des connaissances sur le taux de transfert de mycotoxines dans le lait en fonction du niveau de production des animaux et de l'espèce animale. Notre équipe de recherche est la seule en France qui traite ce sujet ayant des implications fortes sur la sécurité alimentaire.

En France, il existe 2 pôles de recherches sur la thématique « mycotoxines-monogastriques » : l'INRA de Toulouse⁶ pour le porc et l'ENV de Toulouse⁷ sur le poulet et le canard. L'absence de recherches sur les herbivores a longtemps été justifiée, à tort comme je l'ai signalé plus haut, par leur résistance à l'agression aux mycotoxines. En 2001, le département PHASE s'est doté au sein de l'Unité de Recherches sur les Herbivores (URH) d'un pôle de compétences pour développer une nouvelle thématique « mycotoxines-ruminants ». Le groupe a été constitué avec mon recrutement en 2001 (spécialiste en mycotoxines) et celui d'un chargé de recherches (spécialiste en ruminants), une année plus tard pour prendre en charge cette thématique. La mission de ce groupe était de développer une nouvelle thématique ciblée sur l'évaluation de la contamination par les mycotoxines des aliments destinés aux ruminants et les conséquences sur le double plan de la santé animale et de la sécurité alimentaire (transfert des mycotoxines dans le lait en particulier).

Au sein de notre Unité, les programmes de recherches sont organisés en finalités élaborées autour de 4 mots clés : « *Qualité des produits* », « *Bien-être animal* », « *Environnement* » et « *Système d'élevage* », et à l'intérieur desquelles se déclinent plusieurs thématiques de recherches. La thématique « mycotoxines » entre dans le cadre des finalités: santé animale et sécurité alimentaire. Durant sa mise en place, un effort significatif de la part de l'URH et du département PHASE a été porté sur cette thématique, avec le financement pour la création et l'équipement de 2 laboratoires de « Mycotoxines » et de « Mycologie de type P2 », mais aussi l'affectation de 2 techniciens à cette thématique (**Figure 3** : organigramme de l'équipe). Cet effort justifie l'ouverture de l'Unité à l'évaluation des aliments à de nouveaux critères, permettant de prendre en compte, outre leur stricte efficacité au plan nutritionnel, d'autres aspects de la production tels que la santé animale, la qualité des produits animaux et le respect de l'environnement.

Cette activité, conduite dans l'équipe Digestion Microbienne et Absorption (DIMA) de l'URH, a

⁶ INRA, UR66 Pharmacologie-Toxicologie, F-31931 Toulouse

⁷ Ecole National Vétérinaire, Mycotoxicologie, F-31931 Toulouse

pour objectif d'évaluer le risque mycotoxique pour le ruminant aux trois niveaux de la chaîne: - **aliments** pour ruminants notamment les fourrages conservés et les **moyens de prévenir ces contaminations** ; - l'impact d'une exposition aux mycotoxines sur **la santé des ruminants** ; et - **le transfert des mycotoxines dans les produits animaux** (lait). Je présenterai ci-dessous mes principaux résultats obtenus dans les différents niveaux ainsi définis.

3.1. Contamination des aliments destinés aux ruminants

Des contaminations mycotoxiques des aliments destinés aux ruminants ont été observées dans tous les systèmes de conservation. Cependant, il y a très peu de données sur la contamination des fourrages conservés (Scudamore and Livesey, 1998; Garon et al., 2006) qui constituent la ration de base des ruminants, les recherches ayant été focalisées jusqu'à maintenant sur les céréales. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à certaines moisissures (et leurs mycotoxines) fréquemment retrouvées dans les fourrages dont *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys* et *Fusarium spp.*

Les premiers travaux ont concerné *A. fumigatus*, l'un des contaminants majeurs des fourrages conservés et souvent associé à l'échauffement des balles rondes de foin. Parmi les toxines produites par cette espèce, la gliotoxine est la plus toxique. Elle est douée de propriétés antibiotiques et immunosuppressives, et peut jouer par conséquent un rôle dans l'apparition de maladies opportunistes chez les ruminants. Les spores d'*A. fumigatus* sont également à l'origine de mammites chez les animaux et des aspergilloses pulmonaires chez l'homme.

Le risque mycotoxique lié à cette espèce a été évalué, (i) en étudiant la capacité d'*Aspergillus fumigatus* à produire les mycotoxines sur les principaux aliments destinés aux ruminants ; (ii) en testant la stabilité durant la conservation des mycotoxines produites précédemment; et enfin, (iii) en mesurant leurs effets sur les fermentations ruminales (ce dernier travail a été réalisé en collaboration avec D. Morgavi).

Etude de la toxinogénèse sur les principaux aliments destinés aux ruminants (Publi. 11)

Dans un premier temps, j'ai criblé plusieurs souches d'*A. fumigatus* (n = 15) pour leur capacité à produire 4 mycotoxines⁸ (**Tableau 9**).

La souche la plus productrice (*Afu 09*) a été utilisée par la suite pour tester la toxinogénèse sur les différents fourrages et céréales destinés à l'alimentation animale. Les résultats ont montré un développement rapide, après seulement 2 jours d'incubation, d'*A. fumigatus* sur les céréales (blé, orge, triticale et maïs). En revanche, son développement a été plus lent sur les fourrages, 2 à 3 semaines sur le dactyle et le ray grass et nul sur la luzerne et la fétuque (**Tableau 10**). De la même

⁸ Acide helvolique, fumagilline, gliotoxine et verruculogène : les seules disponibles dans le commerce

façon, la production de gliotoxine a été plus importante dans les céréales. Parmi les fourrages, seuls le dactyle et le ray grass peuvent constituer un risque de contamination mycotoxique par la gliotoxine (Tableau 10).

Etude de la stabilité durant la conservation des fourrages
(Publi. 11)

L'étude de la stabilité des 4 mycotoxines produites par *A. fumigatus* a montré qu'à l'exception de la fumagilline, les 3 autres toxines étaient relativement stables. Après 8 semaines de conservation, les taux moyens de mycotoxine récupérés étaient de 63, 76 et 89% pour la gliotoxine, le verruculogène et l'acide helvolique respectivement ; alors qu'il n'est que de 9% pour la fumagilline. Le type de fourrage et le taux de matières sèches (MS) du fourrage n'ont pas eu d'effet significatif sur la stabilité des toxines ($P < 0.05$) (Tableau 11).

*En conclusion, la production des mycotoxines dans les fourrages a été faible. A l'exception de la fumagilline, les mycotoxines restent cependant relativement stables durant la conservation. En conséquence, toutes les céréales (à l'exception du maïs), et à un degré moindre le dactyle et le ray grass pour les fourrages, peuvent constituer un risque de contamination par les mycotoxines de *Aspergillus fumigatus*.*

3.2. Effets des mycotoxines sur les fermentations ruminales *in vitro*⁹

(Publi. 12 et 13)

Une des stratégies de l'évaluation de la toxicité des mycotoxines chez les ruminants est de mesurer leurs effets sur les fermentations *in vitro*. En effet, le rumen est considéré comme un "organe microbien" dont le rôle est primordial dans la nutrition notamment dans la digestion des aliments et dans la protection des ruminants contre les toxines et les pathogènes contenus dans les aliments.

Les fermentations *in vitro* sont effectuées en anaérobiose dans des tubes contenant 5 ml d'un mélange de jus de rumen et de tampon, additionné de 100 mg de foin de luzerne comme substrat. Les échantillons ainsi obtenus sont surchargés avec les mycotoxines et mis à incuber en agitation à 39 °C pendant 18 h. En fin d'incubation, les paramètres suivants sont mesurés : la dégradation de la matière sèche, la production de gaz et d'acides gras volatiles (AGV). Dans ces travaux, je suis en

⁹ Collaboration avec D. Morgavi dans le cadre du *Programme transversal inter-Département INRA sur les Mycotoxines* (AIP INRA 0263, 2002-2005)

charge de la mise au point et le dosage des mycotoxines testées dans le jus de rumen.

3.2.1. Exemple 1 : mycotoxines d'*Aspergillus fumigatus*

Nous avons testé *in vitro* l'effet de la gliotoxine seule ou en association avec d'autres mycotoxines d'*A. fumigatus* sur la fermentation ruminale. La gliotoxine pure utilisée jusqu'à la dose de 20 µg/ml¹⁰ n'a pas altéré les fermentations ruminales ($P > 0,05$) (**Tableau 12**). Cette absence d'effet de la gliotoxine pourrait s'expliquer en partie par son instabilité dans le jus de rumen (**Figure 4**). À l'inverse, l'ajout d'un extrait brut d'une culture d'*A. fumigatus* dans les fermenteurs, contenant seulement 8,8 µg/ml de gliotoxine, a significativement diminué la dégradation de la MS, la production d'AGV et de gaz de 28, 35 et 46 % respectivement ($P < 0,01$). La toxicité supérieure des extraits de culture d'*A. fumigatus* par rapport à la gliotoxine pure est probablement due à la présence d'autres métabolites qui agiraient en synergie avec la gliotoxine dans les extraits.

*En conclusion, la gliotoxine principale mycotoxine d'*A. fumigatus*, se trouve en faible quantité dans les fourrages même lorsque ceux-ci sont mal conservés. Par ailleurs, l'environnement du rumen est peu sensible à cette toxine et les microorganismes du rumen semblent la dégrader rapidement. La gliotoxine seule ne semble pas constituer un risque majeur pour les ruminants. En revanche, l'action synergique et/ou additive en présence des autres toxines produites par la même espèce (*A. fumigatus*) peut augmenter les effets négatifs de la gliotoxine même à des taux faibles. Ceci indique qu'un effort doit être fait pour la recherche et le dosage des autres toxines dans les aliments à risque.*

3.2.2. Exemple 2 : la patuline (Publi. 13)

La patuline, une des mycotoxines majeures des fourrages conservés, est produite par plusieurs espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Byssoschlamys*. Elle a été retrouvée dans les ensilages à des concentrations pouvant atteindre 40 ppm (Escoula, 1977). Elle est douée de propriétés antibiotiques marquées, ce qui explique son effet négatif à de faibles concentrations sur les fermentations ruminales *in vitro* (**Tableau 13**).

¹⁰ Compatible avec les taux retrouvés dans la nature.

En conclusion, la patuline a des effets négatifs sur la fermentation du rumen à des concentrations qui peuvent être trouvées naturellement dans les ensilages. Nous avons montré que l'utilisation d'additifs alimentaires contenant un groupement thiol, tel que la cystéine, peut inhiber la toxicité de cette mycotoxine (Résultats non montrés).

3.3. Transfert des mycotoxines dans les produits animaux

(Publi 7 et 10)

Une autre conséquence de la contamination par les mycotoxines des aliments pour ruminants est le risque de transfert de certaines mycotoxines et/ou de leur(s) métabolite(s) dans les produits animaux (Boudra *et al.*, 2002). Dans mes travaux, je me suis intéressé plus particulièrement au transfert des mycotoxines dans le lait. Ce travail a été abordé de 2 manières : - par des essais expérimentaux sur animaux en lactation pour évaluer le transfert dans le lait de certaines mycotoxines pour lesquelles il n'y a pas de données ; - et par une enquête nationale pour évaluer la contamination possible du lait commercialisé en France.

3.3.1. Evaluation expérimentale du transfert des mycotoxines dans le lait de la brebis laitière *(Publi. 10)*

Ce type d'étude s'inscrit bien dans les préoccupations actuelles, puisque les dernières conclusions du rapport "Mycotoxines" de l'AFSSA ont clairement identifié un défaut des connaissances sur le taux de transfert des mycotoxines dans le lait en fonction du niveau de production des animaux et de l'espèce animale. Notre équipe de recherche est la seule en France qui traite de ce sujet.

Dans un premier travail, j'ai essayé d'évaluer le taux de transfert de l'OTA et de son métabolite l'ochratoxine α (OT α) sur 2 lots de brebis laitières recevant chacun une dose d'OTA (5 et 30 μ g/kg de pv) pendant 4 semaines. Les taux mesurés ont été très faibles puisqu'ils varient entre 0,015 et 0,04 % de la dose ingérée (**Tableau 14**). Le passage de l'OTA et de son métabolite l'OT α , après une administration orale unique de la mycotoxine, a été rapide dans le sang (6 h) (**Figure 4a**) et dans le lait (24 h) (**Figure 4b**).

Un second travail est en cours sur l'évaluation du transfert de l'AFM1¹¹ chez des brebis laitières ayant reçu séparément pendant 4 semaines 2 doses d'AFB1, la première à 0.5 µg/kg de pv correspondant à la teneur réglementaire, et une dose plus élevée à 10 µg/kg de pv.

3. 3. 2. *Evaluation des niveaux de contamination dans les produits laitiers français*¹² (Publi. 7)

La France produit 22 milliards de litres de lait par an, dont dépendent aujourd'hui plus de 500 000 emplois et dont le budget global représente plus de 9 milliards d'€uros. Il est important pour la filière « lait » de garantir sa qualité. Il y a peu de données publiées sur la contamination par les mycotoxines des laits français, en comparaison avec nos voisins européens. La dernière publication sur la contamination par l'AFM1 datait de 1993 (Dragacci and Fremy, 1993), alors que l'OTA n'a jamais été recherchée dans le lait français. C'est dans le cadre d'une transversalité INRA inter-Département, que j'ai organisé en 2003 une enquête nationale sur la contamination mycotoxique du lait de ferme français. Cette enquête a été réalisée en collaboration avec l'Unité d'Epidémiologie Animale (INRA, Theix), l'AFSSA (Maisons Alfort), France Contrôle Laitier et les Organismes de Contrôle Laitier de 4 départements de l'Ouest de la France. Elle a été réalisée sur 128 élevages tirés au sort et appartenant aux départements du Grand Ouest représentant environ 60 % de la collecte nationale du lait (source SCEES, 2003). Les prélèvements de lait de tank ont été accompagnés d'un questionnaire rempli par les techniciens des Organismes Départementaux de Contrôle Laitier, qui renseignait sur l'élevage et le rationnement ainsi que les facteurs jugés pertinents pour l'enquête. L'AFM1 a été retrouvée dans 3,4% des échantillons analysés, mais à des taux largement inférieurs aux limites fixées par la réglementation européenne (50 ng/L). L'OTA a été également retrouvée dans 3 échantillons à des taux faibles (5 à 8 ng/L). Les "fermes positives", qui ont montré une présence de l'une ou l'autre mycotoxines (n=12), diffèrent principalement des "fermes négatives" par des niveaux de productions laitières inférieures (**Tableau 15**) et par l'utilisation plus importante des rations mixtes (58 vs 27%).

¹¹ Métabolite majeur de l'AFB1 excrété dans le lait.

¹² Collaboration avec J. Barnouin (UR d'épidémiologie animale, INRA Theix), les Organismes de Contrôle Laitier, France Contrôle Laitier et S. Dragacci (AFSSA, Unité des Toxines Microbiennes, Maisons Alfort). Projet financé par le *Programme transversal inter-Département INRA sur les Mycotoxines* (AIP INRA 0263, 2002-2005)

3. 3. 3. Rôle du rumen dans le transfert des mycotoxines¹³

Le taux de transfert de certaines mycotoxines dans le lait peut ne pas être négligeable et nécessite de comprendre les mécanismes impliqués au sein de l'organisme, et en tout premier lieu de connaître le site d'absorption. Les aliments contaminés ingérés par les ruminants peuvent séjourner de 10 à 70 heures dans le rumen, ce qui permet un contact prolongé avec les microbes et avec la muqueuse ruminale. On peut donc légitimement se demander si le rumen n'est pas un lieu d'absorption des mycotoxines et/ou de leur(s) métabolite(s). Pour répondre à cette question, nous avons testé le passage ruminal de 2 contaminants organiques : les mycotoxines et les polluants organiques persistants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH). Cet exemple d'association s'appuie sur des cas sanitaires avérés lors de crises récentes (aflatoxines, dioxines). La cinétique de l'absorption ruminale de ces contaminants seuls ou en association a été évaluée par la technique du "rumen-isolé" mise au point dans notre équipe.

Pour les mycotoxines, la vitesse de disparition de l'AFB1 et de la ZEA a été rapide (50% de l'AFB1 et 75% de la ZEA ont disparu au cours de la première ½ h et la totalité de chacune de ces toxines a été éliminée après un séjour de 3h dans le rumen. En revanche, les quantités de FB1 et d'OTA introduites dans le rumen ont peu évolué au cours du temps et environ 70 et 90% de ces toxines ont été retrouvés à la fin de l'expérience (**Figure 5**).

En conclusion, les résultats préliminaires obtenus sont prometteurs et nous conduisent à approfondir par cette technique l'étude des mécanismes impliqués, en particulier en précisant le rôle du pH sur les cinétiques d'absorption de ces molécules. Il sera particulièrement intéressant de tester par exemple l'absorption de certaines mycotoxines à caractère acide, comme l'ochratoxine A, chez des animaux en situation d'acidose.

¹³ Collaboration avec tous les chercheurs de l'équipe DIMA (D. Morgavi, M. Doreau, B. Graulet, JP Jouany et P. Nozière), des Installations Expérimentales (P. Gaydier) et de l'ENSAIA (G. Rychen). Ce travail a été financé par un crédit incitatif du Département PHASE

4. Quels sont les moyens pour éliminer les mycotoxines présentes dans les aliments destinés aux animaux ?

Tous les systèmes de production des aliments destinés aux animaux peuvent être concernés par la contamination mycotoxique. Bien qu'un certain nombre de facteurs de risque connus soit pris en compte concernant la contamination mycotoxique au champ (pratiques culturales) ou durant le stockage (en respectant certains facteurs environnementaux comme la teneur en eau du végétal, l'aérobiose, etc), l'élimination de la contamination mycotoxique des aliments pour animaux ne peut pas être totalement réalisée.

Face à cette contamination « silencieuse » et à un déficit d'aliments, le recours à des méthodes de détoxification peut être envisagé. Des méthodes physiques et chimiques ont été développées principalement pour la détoxification d'aliments contenant des aflatoxines, mais c'est la décontamination par des agents biologiques (bactéries et levures) qui a été la plus étudiée ces dernières années.

Cette problématique a été abordée dans notre équipe de deux manières, - d'abord, en testant des **adsorbants organiques (bactéries fermentaires et levures)** à fixer les mycotoxines; - ensuite en testant la **stabilité durant le processus d'ensilage** de mycotoxines produites au champ (ex. les fusariotoxines).

4.1. Utilisation d'agents biologiques

Une des nouvelles stratégies pour réduire l'exposition des animaux aux mycotoxines, est l'utilisation d'adsorbants organiques capables de complexer les mycotoxines et de faciliter ainsi leur élimination dans les fèces. Ces travaux ont été réalisés dans notre laboratoire en collaboration avec 2 industriels dans le cadre de thèses CIFRE.

4.1.1. Thèse 1 : Activités de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs (Publi. 4, 5, 8, 9 et 27)

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse CIFRE¹⁴ que j'ai encadré¹⁵. Ce travail avait pour objectif d'évaluer la capacité des bactéries fermentaires à séquestrer et/ou à biotransformer les

¹⁴ De Vincent Niderkorn (2004-2007) qui est actuellement recruté en tant que chargé de recherches à l'URH.

¹⁵ Avec D. Morgavi et en partenariat avec la société LALLEMAND.

fusariotoxines présentes dans les ensilages de maïs. Pour ce travail, nous nous sommes focalisés sur les fusariotoxines (FT), dont la production se fait au champ et est fortement dépendante des conditions climatiques. Il faut rappeler que l'ensilage de maïs entre pour une part importante dans la nutrition des ruminants. Près de 80% des vaches laitières en consomment sur tout ou partie de l'année. L'hypothèse d'une détoxification par la microflore fermentaire pourrait apparaître comme une solution plus économique et plus pratique. En effet, ce sont des agents naturels de la fermentation, qui sont capables de croître fortement au cours du processus d'ensilage et pourraient être actifs de façon plus homogène. De plus, des travaux ont montré que les bactéries en général, et les lactobacilles (LAB) en particulier, ont cette capacité « détoxificatrice » *in vitro*.

Ce travail de recherche a été effectué en 3 étapes :

(i) Dans un premier temps, nous avons constitué une collection de 202 bactéries fermentaires¹⁶ représentatives des espèces fréquemment isolées des ensilages, que nous avons criblé pour leur capacité à sequestrer ou à biotransformer les principales FT¹⁷. Ensuite, avec les souches particulièrement actives sélectionnées au cours de l'étape précédente _ (ii) nous avons testé la stabilité du complexe « bactérie-FT » tout au long du tractus digestif des animaux *in vitro* ; _ et d'autre part (iii) étudié le mécanisme de séquestration des fusariotoxines par la paroi des bactéries fermentaires en tentant de déterminer quel(s) composant(s) de la paroi bactérienne et quel(s) groupement(s) fonctionnels des toxines est(sont) impliqué(s) dans cette interaction. L'amélioration des connaissances sur ce mécanisme pourrait permettre à terme de sélectionner des souches bactériennes en fonction de leur physiologie (évolution de la structure séquestrante de la paroi) et de mieux appréhender la force des liaisons mises en jeu dans le complexe « bactérie ó fusariotoxine ».

(i) Le résultat du criblage des souches bactériennes a montré que la séquestration des principales fusariotoxines est une activité répandue chez ces microorganismes. Les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont apparus comme les plus efficaces (**Tableau 16**). En outre, environ 5% des souches testées (8 *Lactobacilli* et 3 *Leuconostoc*) ont biotransformé la zéaralénone en zéaralénol, dont l'activité oestrogénique est environ 4 fois supérieure à celle de la mycotoxine parente. Mais comme nous n'avons pas mis en évidence de biotransformation en résidu moins toxique avec les

¹⁶ Issues de plusieurs collections de 5 laboratoires différents

¹⁷ Les fusariotoxines testées dans cette étude sont : le déoxynivalénol (DON), les fumonisines B1 et B2 (FB1 et FB2) et la zéaralénone (ZEA).

souches testées, nous avons focalisé la suite de nos travaux sur l'activité de séquestration de ces bactéries.

(ii) La stabilité du complexe formé entre l'adsorbant et la mycotoxine dans le tractus digestif me paraît essentielle. Les résultats de l'étude de la stabilité *in vitro* du complexe, formé entre la ZEA et la souche *Streptococcus thermophilus* RAR1, ont montré que les variations de pH en conditions simulant le tractus digestif ainsi que la présence des enzymes digestives ont peu d'effet sur la stabilité du complexe, et que le relargage observé est surtout dû à un effet de lavage (**Tableau 17**). Cet effet mesuré *in vitro* est cependant difficile à extrapoler aux conditions réelles du tube digestif, et seuls des essais *in vivo* pourront fournir des informations fiables sur la capacité de ces microorganismes à fixer les mycotoxines.

(iii) La dernière étape des travaux de thèse a concerné l'étude des mécanismes de séquestration a été conduite avec 2 mycotoxines FB₁ et FB₂ et 2 bactéries (*Streptococcus thermophilus* et *Lb. Paraplantarum*) présentant des taux de séquestration différents. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir quels sont les groupements fonctionnels des 2 FT sont impliqués dans la séquestration. Pour cela, nous avons testé la capacité de séquestration par les bactéries des 2 FT intactes et après différents traitements chimique conduisant à la libération des 2 bras d'acide tricarballoylique (TCA) et au masquage de la fonction amine primaire après respectivement une dérivatisation avec l'α-Phthaldialdehyde (OPA) et une hydrolyse alcaline (Figure 6). Les modifications structurales des FBs par hydrolyse (**Figure 6, cercle en trait plein**) ont montré que ces bras jouent un rôle important dans le mécanisme de séquestration, puisque les FBs hydrolysées ont moins d'affinité pour les LAB. En revanche, l'inactivation de la fonction amine terminale par dérivatisation (**Figure 6, cercle en trait pointillé**) n'a aucun effet sur le mécanisme de fixation. Enfin, nous avons voulu savoir pourquoi la FB₁ (qui possède un groupemnt hydroxyle en plus sur le carbone 10) est toujours largement moins séquestrée que la FB₂. Pour cela, nous avons utilisé une méthode de modélisation moléculaire¹⁸ (**Figure 7**) pour voir si une conformation spatiale différente pouvait être à l'origine de cette différence. La modélisation de la FB₁ montre qu'une liaison hydrogène intramoléculaire s'établit entre le groupement « OH » en C₁₀ et le « O » d'un des 2 bras d'acide tricarballoylique, et de ce fait elle présenterait une conformation moins favorable pour la séquestration que la FB₂.

Dans un second temps, nous avons essayé d'identifier le ou les composants de la bactérie impliqués

¹⁸ Collaboration avec B. Aboab et M. Lemaire (SEESIB, UMR 6504 CNRS Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)

dans la séquestration des 2 FT. Pour cela, nous avons testé différents traitements physico-chimiques et enzymatiques, mais aussi utilisé des bactéries « mutantes » dont la synthèse de certains composés pariétaux est affectée. Les résultats ont montré que les traitements qui dégradent la surface extérieure de la bactérie ont augmenté leur capacité de fixation, alors que les traitements enzymatiques (lysozyme et mutanolysine) la diminuaient partiellement (**Tableau 18**). L'utilisation de peptidoglycanes (PG) purifiés de bactéries gram+ a montré une séquestration des FBs similaire à celle obtenue avec les bactéries vivantes, et a permis de vérifier que le PG pourrait être le site de fixation des FBs.

En conclusion, l'étude du mécanisme de séquestration des FBs par les LAB a montré que le peptidoglycane de la paroi bactérienne pourrait être le site principal de leur séquestration. Il a montré également que la nature chimique de la mycotoxine pouvait modifier de façon importante la séquestration. Optimisée, la capacité des bactéries fermentaires à séquestrer les fusariotoxines pourrait compléter avantageusement les propriétés acidifiantes ou probiotiques des inoculants bactériens utilisés en nutrition animale.

4.1.2. Thèse 2 : Etude de l'efficacité d'un inactivateur de mycotoxines à base de parois de levure *Saccharomyces cerevisiae*

(Publi.1)

Cette deuxième thèse CIFRE (2008-2011)¹⁹ que j'encadre traite de la même problématique que la précédente, mais cette fois-ci avec des parois modifiées de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce travail fait suite à un premier travail de thèse effectué dans notre Laboratoire sous la responsabilité de JP Jouany, et portant sur les mécanismes chimiques impliqués dans la complexation des mycotoxines par les composants de la paroi cellulaire de la levure *S. cerevisiae*. Les conclusions de ce travail étaient similaires à ceux obtenus avec les LAB, à savoir la capacité de ces parois de levure à séquestrer plusieurs mycotoxines (Yiannikouris, 2004). Cependant la quasi-totalité de ces travaux ont été effectués *in vitro* et ces résultats doivent être validés *in vivo*. C'est l'objectif de ce travail qui va tester une préparation à base de parois de levures modifiées de *S. cerevisiae* (Mycosorb) fourni par notre partenaire (Alltech SA, France) sur 2 animaux modèles : le rat et la brebis en lactation.

¹⁹ Collaboration avec D. Morgavi et la société (2008-2011) en collaboration avec la société Alltech.

L'essai sur rats²⁰ a été réalisé avec 2 mycotoxines radiomarquées (AFB1 et OTA). Le choix de l'AFB1 et de l'OTA a été conditionné par leur toxicité mais aussi par la fréquence de leur présence dans les aliments destinés aux animaux. L'AFB1 a été testée à 2 doses : - une faible dose (0.716 µg/kg PV) correspondant à la teneur limite fixée par la Communauté Européenne de 0.02 mg/kg (directive 2003/100/EC) ; - et une deuxième dose utilisée à 18.12 µg/kg pv. Mycosorb a été également testé à 2 doses : 4 et 10 mg/kg pv. En plus d'un choix économique en raison du coût important des mycotoxines marquées, l'essai sur rat avait pour objectif de déterminer **la preuve du concept de l'adsorbant testé**, en comparant l'excrétion urinaire vs fécale de la radioactivité, mais aussi les paramètres toxicocinétiques avec et sans l'addition de l'adsorbant.

La mycotoxine radiomarquée a été administrée par gavage à une dose unique à 40 µCi/kg pv seule (lot 1) ou en combinaison avec l'adsorbant 4 mg/kg pv (lot 2) et 10 mg/kg pv (lot 3). Pour chaque toxine, deux études ont été réalisées : - **Une étude sur l'excrétion** (fécale vs urinaire), réalisée sur 15 rats (5 rats par lots), avec un suivi de la radioactivité à différents temps (6, 12, 24, 36, 48 et 72h) ; et **une étude toxicocinétique** sur 117 rats (39 rats par lot) avec un suivi de la radioactivité plasmatique à 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 24, 36, 48 et 72 h après administration.

Les résultats des 3 études réalisées sont résumés dans les tableaux 19 et 20. Dans un but de simplification, seuls les résultats de l'AFB1 à faible dose seront commentés sauf indication contraire. la comparaison des profils de la radioactivité dans le plasma met en évidence une diminution des paramètres d'absorption en présence de l'adsorbant (**Tableau 19**). Les valeurs de l'aire sous la courbe extrapolée à l'infini (AUC_{0-inf}) et la concentration maximale (C_{max}) sont plus faibles dans le lot avec le MYCOSORB, et cela sans modification de la valeur de la demie vie d'élimination ($t_{1/2}$). Par contre, le MYCOSORB n'a pas eu d'effet sur l'absorption de l'OTA. En ce qui concerne la balance d'excrétion, l'administration simultanée du MYCOSORB et de l'AFB1 entraîne une diminution significative ($P < 0.05$) des quantités de radioactivité dans les fèces. La radioactivité éliminée dans fèces a augmenté jusqu'à 55% par rapport aux contrôles sans MYCOSORB alors que le taux dans les urines diminuait ($P < 0,05$) (**Tableau 20**). En revanche, l'effet du MYCOSORB sur l'OTA a été moins marqué ; il a augmenté la radioactivité dans les fèces (jusqu'à 16%, $P < 0,05$) mais n'a pas modifié ni l'excrétion de la radioactivité dans les urines (**Tableau 20**) ni les paramètres toxicocinétiques (**Tableau 19**).

²⁰ Collaboration P. Gandia et G. Houin (*Cinétiques des Xénobiotiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier Toulouse*)

Les travaux sur le modèle « brebis laitière » ont été réalisés sur les mêmes mycotoxines mais non radioactives. Dans cette expérimentation, l'évaluation de l'efficacité du MYCOSORB a été basée sur des **critères spécifiques** (suivi de la mycotoxine et de ses métabolites dans les différentes matrices : balance d'excrétion dans les fèces et les urines, toxicocinétique et transfert des dans le lait, mais aussi sur **des critères non spécifiques**, comme les performances zootechniques (quantités ingérées, gain de poids et production laitière), et la toxicité générale mesurée à l'aide de l'outil métabolomique²¹. Pour cela, 16 brebis laitières ont été réparties dans chaque essai en 4 lots équivalents :

Lot 1: Contrôle négatif (mycotoxine 0, adsorbant 0) ; Lot 2: Contrôle positif (mycotoxine +, adsorbant 0) ; Lot 3: (mycotoxine 0, adsorbant +) et Lot 4: (mycotoxine +, adsorbant +).

Les résultats sont en cours d'exploitation.

4.2. Devenir des mycotoxines de *Fusarium spp* dans l'ensilage de maïs²² (Publi.6, 30 et 31)

Les ensilages de maïs représentent la part la plus importante de l'alimentation des ruminants. Parmi les facteurs affectant la qualité hygiénique des ensilages de maïs, c'est incontestablement la contamination au champ par les moisissures du genre *Fusarium spp.* qui est la plus importante. Dans certaines conditions climatiques défavorables, ces *Fusaria* sont capables de produire des fusariotoxines (FT) qui peuvent se retrouver à la mise en silo du maïs plante entière. L'idée d'utiliser l'ensilage comme moyen de détoxification m'a été inspiré par les résultats encourageants obtenus sur la stabilité des mycotoxines lors des processus fermentaires, et dont la majorité rapportait une diminution des toxines (Karlovsky, 1999). Cette hypothèse a été renforcée par les résultats montrant que certaines bactéries fermentaires utilisées pour la conservation des ensilages sont capables de séquestrer mais également de dégrader certaines mycotoxines (Niderkorn et al., 2007; Wu et al., 2009). C'est ce que j'ai proposé comme programme de recherche dans le cadre du projet RARE²³, financé par le Ministère de l'Agriculture.

²¹ Collaboration avec E. Pujos et JF Martin (*Plateforme Exploration du Métabolisme, INRA, Theix*)

²² Ce travail a été réalisé dans le cadre du réseau RARE²², et s'intitulait : « Outils de suivi et de traçabilité des mycotoxines de la récolte à l'aliment ».

²³ Réseau de recherche et d'innovation technologiques Alimentation Référence Europe C'est un consortium de 35 laboratoires ou unités de recherches des secteurs publics et privés

L'objectif de ce travail était d'étudier la stabilité durant l'ensilage des quatre principales fusariotoxines : le DON, la FB1, la FB2 et la ZEA. La stabilité des quatre principales fusariotoxines a été étudiée sur deux années consécutives sur une même variété de maïs (*Anjou 265*). Les variables testées durant cette étude étaient : la matière sèche à la mise en silo (MS, 28 vs 38), mais aussi la température (ambiante, 15 et 30° C) et la durée de la conservation (3, 6 et 11 mois). Afin de réduire ces différences entre les silos et maintenir certaines conditions constantes, notamment la température et la MS, j'ai validé au préalable un modèle mini silo de 20 L, en le comparant aux grands silos (2000-L de capacité) habituellement utilisés dans les études d'homologation des conservateurs d'ensilages. L'étude de la stabilité des fusariotoxines a été testée sur deux années consécutives sur une même variété de maïs (*Anjou 265*) ensilée à deux MS (28-30 vs 38-40) et stockée à trois températures (ambiante, 15 et 30°C) durant 3, 6 et 11 mois. Les résultats ont montré que la concentration des quatre FT testées a diminué significativement durant le processus d'ensilage ($P < 0.01$). La stabilité diffère selon la nature de la mycotoxine, et est classée dans l'ordre décroissant : ZEA > FB2 > FB1 > DON. Un sachet-contrôle par chaque FT a été placé à l'intérieur du silo mais en évitant le contact direct avec l'ensilage n'a montré aucune diminution de la concentration. La MS à la mise en silo et la durée de conservation ont un effet significatif sur la disparition des FT ($P < 0.01$). Le DON a disparu presque totalement de l'ensilage à faible MS après 3 mois de conservation ; alors qu'il est toujours présent après 6 mois même si c'est à faible concentration dans l'ensilage à la MS élevée (**Tableau 21**). En revanche, la température n'a pas eu d'effet ($P < 0.05$).

En conclusion, ces résultats indiquent qu'une conservation prolongée peut diminuer le taux de contamination des ensilages par certaines FT, notamment le DON et la FB1 qui sont les plus fréquentes mais aussi les plus toxiques. L'ensilage, à certaines conditions notamment en MS, pourrait être recommandé comme un moyen de réduire ou d'éliminer une contamination par les mycotoxines présentes à la mise en silo.

5- Autres activités

Parallèlement à mes activités dans la thématique « Mycotoxines », je me suis également impliqué dans un programme transversal intra URH réunissant en plus de notre équipe 4 autres équipes²⁴ (SP, ACS, DIMA, RAPA et C2M), ainsi que les installations expérimentales de Theix, des Monts Dore et de Marcenat. Ce travail a porté sur « la simplification des pratiques » avec pour objectif de réduire le temps d'affouragement et le nombre de passages (2 à 3 fois par semaine) à l'étable. Cette pratique nécessite cependant une bonne conservation de la ration, faute de quoi l'ingestion pourra diminuer, entraînant une baisse des performances. Les actions proposées dans la tâche 3 «*Simplification de la distribution des rations alimentaires*» se proposaient d'étudier les conséquences de ces nouvelles pratiques, - d'une part sur la **valeur alimentaire et hygiénique** des rations offertes sous forme complète mélangée, - et d'autre part sur les performances des animaux et la qualité de leurs produits. En ce qui me concerne, j'étais en charge²⁵ avec l'Annexe expérimentale de l'évaluation sanitaire de la ration en relation avec le développement des moisissures. (*Réalisations 36 et 41*).

Dans le cadre des **activités d'encadrement et d'enseignement**, j'ai assuré l'encadrement de 3 thèses et de plusieurs mémoires de fin d'études. Je participe à un enseignement destiné aux étudiants de DESS et de Master 2 à l'ENITA de Clermont-Ferrand.

Malgré la jeunesse de notre groupe (créé en 2002), j'ai acquis une certaine reconnaissance dans le domaine des mycotoxines, puisque j'ai été sollicité à plusieurs reprises :

- pour **des expertises** de produits destinés à la conservation des ensilages (*Réalisations 85-88*) mais aussi de projets scientifiques (*Réalisations 81-83*).
- pour une expertise analytique à la demande de l'AFSSA lors d'intoxications collectives (*Réalisation 84*).
- J'interviens dans le Comité National des Coproduits en tant qu'expert sur les questions sanitaires (moisissures et contamination).
- Récemment, j'ai participé avec un groupe d'experts nationaux et européens²⁶ à l'élaboration

²⁴ SP, Système de Production ; ACS, Adaptation et Comportement Social ; RAPA, Relations Animal Plante et C2M, Croissance et Métabolisme du Muscle.

²⁵ Collaboration avec M. Doreau (DIMA) et JC Bonnefoy (Installations Expérimentales)

²⁶ Dans le cadre d'un appel d'offre EFSA: (http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/External_Rep/024e,0.pdf?ssbinary=true)

d'un document de synthèse (*Réalisation 80*) sur les travaux concernant l'utilisation d'additifs alimentaires pour la détoxification des aliments destinés aux animaux. En plus de la revue de l'état de l'art, nous avons soumis un certain nombre de recommandations concernant notamment l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité de ces additifs.

- Je suis également consulté de façon régulière par les éleveurs et les vétérinaires pour des problèmes dans les élevages, comme la suspicion de mycotoxicoses ou d'altérations des fourrages conservés par les moisissures.

6. Perspectives de recherches

Depuis mon recrutement à l'INRA, mes activités de recherches ont porté exclusivement sur l'évaluation du risque d'exposition mycotoxique chez les ruminants. Les travaux de recherches pour les années à venir s'organiseront autour de 2 grands axes:

1- La **thématique « mycotoxines »** que j'envisage d'orienter sur: - d'une part l'amélioration des diagnostics de mycotoxicoses en testant le nouvel outil métabolomique ; et d'autre part l'évaluation des effets d'une exposition chronique à faible dose de mycotoxines sur le système immunitaire.

2- A côté de ma thématique principale sur les mycotoxines, j'ai initié récemment un nouvel axe de recherche utilisant l'approche métabolomique, qui m'a permis de m'impliquer dans d'autres programmes de recherches de l'équipe, notamment dans le cadre de **la finalité « Environnement »**.

Programmes-Mycotoxines

De nombreux auteurs ont montré que l'ingestion par les animaux d'aliments contaminés par les mycotoxines s'accompagnait d'une altération des performances zootechniques, avec une diminution de la production laitière et/ou du gain de poids, une infertilité et des cycles de sélection manqués (Wu, 2007). La majorité de ces études expérimentales ont été réalisées avec une seule mycotoxine et à des doses largement supérieures aux teneurs réglementaires. En pratique, l'aliment contaminé n'est presque jamais contaminé avec une seule mycotoxine (Ren et al., 2007; Richard et al., 2007), car la quasi totalité des espèces fongiques contaminant les aliments sont capables de produire plusieurs mycotoxines à la fois. De plus, les ruminants peuvent être exposés à un nombre plus important de mycotoxines que les animaux monogastriques puisque leur ration est composée de plusieurs aliments (les rations mixtes), pouvant chacun être contaminés par différentes mycotoxines. Actuellement, nous ne disposons que de très peu de données toxicologiques et toxicocinétiques (devenir dans l'organisme animal) dans le cas d'une exposition à plusieurs mycotoxines et encore moins à de faibles doses. Des auteurs ont montré des effets de synergie entre mycotoxines produites par les mêmes espèces. Ainsi, l'acide fusarique augmentait la toxicité des fumonisines chez le poulet (D'Mello and Macdonald, 1997), et celle du DON et du diacétoxyscirpénol chez le porc (Smith et al., 1997). Des résultats similaires ont été également obtenus avec l'AFB1 et la stérigmatocystine produites par *A. flavus* et qui ont une augmentation de la mortalité des cochons d'inde lorsqu'elles sont associées (Pier, 1992). La présence concomitante de la ZEA et de l'acide fusarique augmentait de 2 à 5 fois leur passage dans le lait de

rat (Porter et al., 1998).

Pour la thématique mycotoxines, les programmes de recherches pour les années à venir se déclineront comme suite:

Amélioration du diagnostic des mycotoxicoses avec l'outil métabolomique

Une partie de ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse CIFRE en collaboration avec la Société Alltech

Sur le terrain, les pertes en élevage sont globalement la résultante de nombreux facteurs, et il est souvent difficile de faire la part du rôle des mycotoxines de celui de tous les autres facteurs de stress (**Figure 8**), ce qui complique encore plus le diagnostic des mycotoxicoses. Il est évident qu'il faut rechercher de nouvelles méthodes capable d'appréhender l'impact de ces toxines souvent présentes en mélange et à de faibles concentrations. La métabolomique semble être une approche de choix pour la recherche de nouveaux biomarqueurs dans des matrices non invasives telle que les urines. **La métabolomique** est, comme son nom l'indique, focalisée sur l'étude des métabolites. L'une des forces de cette approche est de donner une information « intégrative » dans la mesure où elle prend en compte un grand nombre de métabolites impliqués dans le fonctionnement de la cellule et de l'organe. Le diagnostic d'une exposition à un produit toxique peut se faire par la mise en évidence: - soit des mycotoxines et/ou de leur(s) métabolites dans les aliments ou les fluides biologiques (= **marqueurs d'exposition**) ; - soit des modifications induites par le produit sur les fonctions de l'organisme (= **marqueurs d'effets**). Les marqueurs d'exposition sont certes des marqueurs spécifiques d'exposition mais qui restent difficile à mettre en évidence pour plusieurs raisons. En élevage, la suspicion d'une mycotoxicose est presque toujours tardive, et la recherche des mycotoxines dans les aliments est souvent réalisée une fois que les causes infectieuses et parasitaires soient éliminées. Le diagnostic dans ce cas là est très difficile à établir dans la mesure où l'aliment consommé, qui constitue la preuve de l'exposition, est soit consommé soit éliminé. La deuxième difficulté est l'orientation des recherches vers une mycotoxine plutôt qu'une autre en raison du nombre important de mycotoxines pouvant potentiellement contaminer l'aliment, et de l'absence d'un tableau clinique spécifique à chaque mycotoxine.

Une autre façon de diagnostiquer une mycotoxicose est de mettre en évidence des **marqueurs d'effets** suite à une modification du métabolisme animal par l'action des mycotoxines sur l'organisme animal. C'est ce que j'ai testé avec l'outil métabolomique à haut débit pour rechercher de nouveaux marqueurs biologiques d'exposition aux mycotoxines. Le développement de cette approche a été facilité par l'implantation de 2 plateformes métabolomiques, une de spectrométrie de

masse sur le Centre de l'INRA de Theix, et une autre au niveau de l'Université Blaise Pascal utilisant le *Metabolic Profiler*, qui est une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (LC-MS/RMN).

J'ai commencé par tester cet outil sur des urines, matrice non invasive et ne nécessitant pas une extraction préalable avant analyse, d'animaux ayant une alimentation contaminée par les AFs ou l'OTA. Afin de mieux visualiser l'effet de l'exposition, les premiers essais ont été réalisés avec des doses supérieures aux normes et recommandations en vigueur. Dans un second temps, j'essaierai de tester la validité de cet outil sur des concentrations faibles plus conformes à la réalité du terrain.

Un essai préliminaire pour tester cet outil a été réalisé sur 2 lots de moutons (*faunés vs défaunés*) ayant reçu par voie orale pendant 4 semaines une dose quotidienne de 30 µg d'OTA par kg de PV.

Le choix de l'OTA était conditionné par le fait que cette mycotoxine est dégradée par les microorganismes du rumen et les protozoaires en particulier en un métabolite moins toxique, le chratoxin α. La comparaison entre animaux *faunés* et *défaunés* nous permet par conséquent d'évaluer le rôle des protozoaires du rumen dans la prévention des effets toxiques de l'OTA chez le mouton.

La comparaison des empreintes métaboliques urinaires nous a permis de séparer clairement les 2 groupes d'animaux (**Figure 9**). Ces résultats sont encourageants, et suggèrent que les approches de métabolomique pourraient être utilisées pour le diagnostic d'exposition aux mycotoxines par la mise évidence de changement précoce du profil métabolique (Boudra et al., 2008). Un autre essai avec les AFs (seules toxines réglementées) est prévu pour 2010 sur le modèle brebis laitière.

Evaluation de l'effet des mycotoxines sur le système immunitaire des ruminants

Un autre aspect du diagnostic que j'aimerais également aborder, si une opportunité se présente, est l'évaluation de l'immunotoxicité des mycotoxines chez les ruminants. Ce travail pourrait être réalisé en partenariat avec le Laboratoire de Toulouse²⁷, la référence dans ce domaine, avec un financement par exemple des Départements INRA dans le cadre des actions incitatives. En effet, les effets immunotoxiques sont à prendre au sérieux surtout que la majorité des mycotoxines possèdent à faible dose des propriétés immunosuppressives (Oswald et al., 2005; Pestka et al., 2008). Certains auteurs ont suggéré que l'exposition à de faibles concentrations en mycotoxines entraînait une incidence accrue des maladies infectieuses sans symptômes évidents de toxicité ou d'effets sur les

²⁷ INRA, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66, F-31931 Toulouse Cedex

critères zootechniques. Oswald *et al.* ont ainsi observé une aggravation des infections (Oswald *et al.*, 2003; Halloy *et al.*, 2005; Oswald *et al.*, 2005), et une diminution de l'efficacité des vaccins chez le porc recevant du DON à une dose de 2.3 mg/kg pendant 9 semaines (Pinton *et al.*, 2008). En revanche, aucun travail de ce type n'a été entrepris sur les ruminants.

Programme : Effets néfastes de l'élevage des ruminants sur l'environnement

Le second axe de mes recherches est relatif aux rejets par les ruminants des déchets azotés et du méthane (gaz à effet de serre) dans l'environnement. Ce programme sera abordé à travers 2 projets de recherche auxquels participent de nombreux chercheurs de l'équipe:

1- Réduction des rejets azotés dans l'environnement

Programme de recherches réalisé dans le cadre du projet Européen RedNexô Innovative and practical management approaches to reduce nitrogen excretion by ruminants, FP7-KBBE-2007-1 (2009-2014)²⁸

Au-delà des objectifs de production et de santé, la nutrition animale doit aussi répondre dorénavant aux préoccupations environnementales. L'intensification de l'élevage a conduit les agriculteurs à augmenter la fourniture d'azote dans la ration des ruminants pour accroître la production. Ceci s'est traduit par un accroissement parallèle des rejets azotés dans l'environnement (pollution des eaux : nitrates, eutrophisation, pollution de l'air par volatilisation de l'ammoniac). Les recherches seront réalisées dans le cadre d'un projet européen visant à proposer des solutions pour limiter cette excretion d'azote dans les urines et les fecès des animaux tout en maintenant les niveaux de production. Dans ce projet, je suis en charge dans le **WP6**²⁹ de mettre au point et d'optimiser une méthode de *fingerprint* dans les urines par une technique de LC-MS/RMN. Je suis également en charge d'analyser tous les échantillons d'urines provenant des WPs suivants : **WP2.2.2** (*Effect of nature of energy on N ruminal metabolism and intestinal digestibility in low-N diets*); **WP2.2.3** (*Effect of degradable N on ruminal metabolism in low-N diet*) ; **WP3.2.** (*Effects of absorbable protein supply relative to requirements on amino acid absorption*) ; **WP3.3.** (*Effects of forage type on amino acid absorption and utilization in lactating dairy cows provided*) and **WP 7** (*Prediction of N excretion on herd level and validation*). L'objectif est de rechercher de nouveaux biomarqueurs

²⁸ Collaboration avec D. Morgavi, P. Noziere et M. Doreau.

²⁹ Intitulé « développer des indicateurs du statut azoté et de l'efficacité d'utilisation de l'azote »

non invasifs de l'efficacité d'utilisation de l'azote par les ruminants. Une rapide recherche bibliographique m'a permis de choisir 9 marqueurs potentiels incluant les dérivés des bases puriques (xanthine, hypoxanthine, allantoiné et acide urique), pyrimidiques (alanine, acide aminobutyrique), 3-méthyl histidine (marqueur de protéolyse), l'urée et la créatine (voie d'élimination de l'N alimentaire), et la créatinine. J'ai ensuite optimisé et validé une méthode LC/MS permettant le dosage des 9 métabolites.

2- Effet d'un additif alimentaire à base d'extrait fongique sur la diminution de production de méthane chez les ruminants

Programme de recherches réalisé dans le cadre dans un premier temps d'un projet-Prévalorisation INRA sur « l'effet d'un additif alimentaire à base d'extrait fongique sur la diminution de production de méthane chez les ruminants ». (2008-2010) ; Puis d'un projet ANR_EmergenceBio, intitulé : « Supplément alimentaire pour diminuer la production de méthane chez le ruminant »

Dans la même optique environnementale, notre équipe s'est investit dans la recherche de nouvelles stratégies pour réduire la production ruminale de méthane tout en maintenant la capacité de production des animaux. Le méthane est un gaz à effet de serre, dont le pouvoir de réchauffement est environ 21 fois supérieur à celui du CO₂. La totalité des émissions de méthane d'origine agricole provient de l'activité d'élevage et plus précisément des fermentations digestives des herbivores et des déjections animales. Chez le ruminant, le méthane produit contribue pour 2 à 3% dans l'effet de serre global. Par ailleurs, la méthanogénèse est un processus normal et nécessaire chez les ruminants, il constitue une perte en énergie sous forme gazeuse estimée à environ en moyenne à 8% de l'énergie brute ingérée et 12% de l'énergie digestible. Parmi les stratégies envisagées, l'utilisation d'additifs alimentaires est une voie qui est actuellement explorée par notre équipe. Une étude exploratoire sur les effets des métabolites de *Monascus spp.*³⁰ sur les fermentations ruminales a également montré une réduction de la production de méthane. Des essais *in vitro*, réalisés avec des extraits de *Monascus* obtenus par inoculation d'une céréale, ont montré une diminution significative de la production du méthane dans le rumen ($P < 0.05$) (résultats non montrés). Un financement obtenu dans le cadre des projets-Emergence_INRA, nous a permis de valider la preuve du concept sur un modèle mouton³¹. Sur le conseil d'INRA Transfert, nous avons déposé et obtenu un projet ANR (D. Morgavi est le porteur de ce projet). Dans ce projet, je suis responsable du WP1 qui aura pour objectif l'optimisation de la production des métabolites actifs en terme de substrat et de

³⁰ Espèces fréquemment retrouvées dans les ensilages

³¹ Ces résultats ont fait également l'objet d'un dépôt de brevet

conditions culturelles (pH, température, ..). Je suis également en charge du dosage des métabolites dans les différentes matrices étudiées (substrat fermenté, jus de rumen et lait), ainsi que de l'identification des principaux métabolites responsables de cette action anti-méthane.

Conclusion

Jusqu'en 2006, mes travaux de recherches se sont focalisés sur la thématique « **Risque mycotoxique chez les ruminants** » avec une évaluation du risque aux trois niveaux de la chaîne: - Aliments, Animal et Produits animaux (lait). Pour mener à bien cette mission, j'ai mis en place et équipé, grâce au concours financier du Département ENA puis PHASE et de l'URH, les 2 laboratoires de mycologie (laboratoire type P2) et des mycotoxines. Grâce à mes compétences en bioanalyse acquises avant mon recrutement, j'ai ensuite développé plusieurs techniques de dosages de mycotoxines dans différentes matrices (jus de rumen, plasma, urines, lait, organes, fourrages). Actuellement, nous disposons d'une vingtaine de méthodes, dans certaines ont été publiées, rédigées en conformité aux Bonnes Pratiques de Laboratoire et dont certaines ont fait l'objet de publications scientifiques. **Les compétences en bioanalyse** ont été acquises durant la période (1995-2000) où j'étais en charge, au Laboratoire de *Cinétique des Xénobiotiques* de Toulouse des études en relation avec des industriels, et notamment la mise au point et la validation de méthodes de dosage des médicaments dans le plasma pour le compte d'ADME, Sophia Antipolis) (*Réalisations 89-92*). J'ai également participé, durant cette période, à des travaux du Laboratoire dont certains ont été publiés (*Publi 14, 15, 16, 17 et 18*).

Malgré la jeunesse de notre groupe³², les programmes de recherches, mis en place avec la collaboration de D. Morgavi, ont tous bénéficié de financement avec des partenaires internes dans le cadre de programmes INRA (inter-Départements, programmes incitatifs PHASE et programme transversal intra Unité), ou externes (Projet RARE, 2 thèses CIFRE, une thèse ESTIVE et un projet ANR-Emergence Bio). En plus des travaux originaux, j'ai publié 6 articles de synthèses (*Publi 24-29*) dont 2 de vulgarisations (*Publi 30-31*) destinés aux professionnels.

Après mon évaluation de 2006, j'ai élargi mon domaine de compétences en m'investissant dans le développement d'une nouvelle approche « la métabolomique », outil transversal au sein de notre équipe de recherches. Ceci m'a permis de m'impliquer dans une autre thématique « la digestion de l'azote » à travers un projet européen (RedNex, 2009-2014).

Cette présentation de mes perspectives de recherches s'inscrit dans la continuité des programmes que j'ai conduit sur les mycotoxines depuis mon recrutement en 2001 à l'INRA de Theix. Ces programmes évolueront certainement avec les questions que j'ai énumérées dans mes perspectives de recherches, mais également avec d'autres questions qui ne manqueront pas d'être posées. Parmi

³² Le groupe mycotoxine a été constitué en 2002.

ces questions, (i) la découverte de nouvelles toxines (il faut savoir qu'en moyenne 1 à 2 métabolites secondaires des moisissures sont découverts chaque année sans qu'on puisse connaître leurs effets sur les organismes vivants), (ii) l'évolution des pratiques, comme l'utilisation de nombreux nouveaux co-produits issus par exemple de la production de biocarburants, ou des nouvelles techniques d'alimentation utilisées dans le cadre de la simplification de la distribution des rations, qui vont à coup sûr générer de nouveaux problèmes de mycotoxines.

A côté de ces aspects de santé animale et de sécurité alimentaire, des questions environnementales suscitent de plus en plus d'intérêt de la part de la société civile et des Pouvoirs Publics. Ces questions constituent une thématique importante au niveau de notre équipe, avec notamment la production du méthane par les ruminants. Cette thématique qui fédère plusieurs chercheurs de notre équipe s'est avérée une source de nouveaux financements pour les programmes de recherche.

REMERCIEMENTS

Je remercie Anne Marie Delort pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire à l'Université Blaise Pascal à Clermont II.

L'habilitation à diriger les recherches étant censé reprendre toute la période de recherches, je ne peux m'empêcher de penser à 2 personnes qui m'ont beaucoup appris. D'abord, J. Le Bars qui m'a initié et fait aimer le métier de la recherche. Ensuite G. Houin avec qui j'ai passé 7 années de fructueuses collaborations. Je le remercie sincèrement pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accordant la gestion avec une totale liberté des nombreux contrats industriels que j'ai eus à traiter. Notre collaboration se poursuit encore puisque une partie de la thèse que j'encadre actuellement s'est déroulée dans son Laboratoire.

Je remercie Isabelle Oswald, Gérard Fonty et Guido Rychen d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Mes remerciements vont également à toutes les personnes (la liste serait trop longue !) des différents Laboratoires de recherches que j'ai fréquentés pour leur aide et conseils.

Je tiens également à remercier Jean-Pierre Jouany et Diego Morgavi pour leur aide et commentaires dans la préparation de ce mémoire.

Références citées dans le mémoire

- Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W., Marth, E.H., 1982. Responses of Dairy Cows to Dietary Aflatoxin: Feed Intake and Yield, Toxin Content, and Quality of Milk of Cows Treated with Pure and Impure Aflatoxin. *Journal of Dairy Science* 65, 1503-1508.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137, 265-282.
- Boudra, H., Godejohann, M., Morgavi, D.P., 2008. Uncovering metabolic changes using a combined LC-MS/NMR approach: Ochratoxin α effect in sheep, 3 e me Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique-Bordeaux, Bordeaux, France.
- Boudra, H., Morgavi, D.P., Galtier, P., Michalet-Doreau, B., 2002. Présence de moisissures toxigènes et des mycotoxines dans les fourrages conservés. Signification et prévention, 9 e me Rencontres Recherches Ruminants.
- Brossard, L., Martin, C., Chaucheyras-Durand, F., Michalet-Doreau, B., 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod Nutr Dev* 44, 195-206.
- Buchanan, J.R., Sommer, N.F., Fortage, R.J., 1975. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in fig fruits. *Applied Microbiology* 30, 238-241.
- Chestnut, A.B., Bernard, J.K., Harstin, J.B., Reddick, B.B., 1992. Performance of growing lambs fed *Acremonium coenophialum* infested tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) hay. *Small Ruminant Research* 7, 9-19.
- Cole, R.J., Jarvis, B.B., Schweikert, M.A., 2003. Handbook of secondary fungal metabolites, New York.
- Colvin, B.M., Harrison, L.R., 1992. Fumonisin-induced pulmonary-edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia* 117, 79-82.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 69, 155-166.
- Dragacci, S., Fremy, J.M., 1993. Contamination du lait par l'aflatoxine M1: résultats de quinze années de surveillance. *Science des Aliments* 13, 711-722.
- Escoula, L., 1977. Moisissures des ensilages et conséquences toxicologiques. *Fourrages* 69, 97-114.
- Franceschi, S., Bidoli, E., Baron, A.E., La Vecchia, C., 1990. Maize and Risk of Cancers of the Oral Cavity, Pharynx, and Esophagus in Northeastern Italy. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1407-1411.
- Galtier, P., Alvinerie, M., 1976. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annales de Recherche Vétérinaire*, 1.

- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., Lebailly, P., 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3479-3484.
- Halloy, D.J., Gustin, P.G., Bouhet, S., Oswald, I.P., 2005. Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurellamultocida*. *Toxicology* 213, 34-44.
- Helferich, W.G., Garrett, W.N., Hsieh, D.P.H., Baldwin, R.L., 1986. Feedlot Performance and Tissue Residues of Cattle Consuming Diets Containing Aflatoxins. *Journal Animal Science* 62, 691-696.
- Karlovsky, P., 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins* 7, 1-23.
- Le Bars, J., 1990. Contribution to a practical strategy for preventing aflatoxin contamination of dried figs. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 8, 265-270.
- Le Bars, J., Le Bars, P., 1996. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Veterinary Research* 27, 383-394.
- Mansfield, M.A., Jones, A.D., Kuldau, G.A., 2008. Contamination of Fresh and Ensiled Maize by Multiple *Penicillium* Mycotoxins. *Phytopathology* 98, 330-336.
- Marasas, W.F., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., van der Lugt, J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55, 197-203.
- Motelin, G.K., Haschek, W.M., Ness, D.K., Hall, W.F., Harlin, K.S., Schaeffer, D.J., Beasley, V.R., 1994. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathologia* 126, 27-40.
- Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Pujos, E., Tissandier, A., Boudra, H., 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants* 24, 406-415.
- Oldenburg, E., Weissbach, F., Valenta, H., Höltersshinken, M., Barkow, B., Loose, K., 1998. Effects of endophyte-infected perennial ryegrass on the performance of sheep. *Revue de Medecine Veterinaire* 149, 638.
- Oswald, I.P., Desautels, C., Laffitte, J., Fournout, S., Peres, S.Y., Odin, M., Le Bars, P., Le Bars, J., Fairbrother, J.M., 2003. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5870-5874.
- Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I., Accensi, F., 2005. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Additives and Contaminants* 22, 354-360.
- Pestka, J.J., Islam, Z., Amuzie, C.J., 2008. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. *Toxicology Letters* 178, 83-87.

- Pier, A.C., 1992. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal Animal Science* 70, 3964-3967.
- Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A.M., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P., 2008. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicology Letters* 177, 215-222.
- Pittet, A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in food and feed-an update review. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149, 479-492.
- Porter, J.K., Wray, E.M., Eppley, R., Hagler, W.M., 1998. Zearalenone and fusaric acid in the diet of nursing dams enhances both mycotoxins lactational transfer to the suckling neonate (abstract). 112th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Montréal, Québec, Canada.
- Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., Wang, Z., 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1143, 48-64.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Vanschalkwyk, D.J., 1992. Fusarium-Moniliforme and Fumonisin in Corn in Relation to Human Esophageal Cancer in Transkei. *Phytopathology* 82, 353-357.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., Garon, D., 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2420-2425.
- Riley, R.T., 1998. Fumonisin: mechanism of mycotoxicity. *Revue de Medecine Veterinaire* 149, 617-626.
- Scudamore, K.A., Livesey, C., 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 1-17.
- Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Leggott, N.L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H., Safavi, N., 2000. Natural Occurrence of Fumonisin in Corn from Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1860-1864.
- Shier, T.W., 1998. Estrogenic mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire* 149, 599-604.
- Smith, T.K., McMillan, E.G., Castillo, J.B., 1997. Effects of feeding blends of *Fusarium* mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *Journal of Animal Science* 75, 2184-2191.
- Solomon, M.E., 1951. Control of humidity with potassium hydroxide, sulphuric acid, or other solutions. *Bulletin of Entomology Research* 42, 543-554.
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S.H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G.N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C.N., Onsongo, M.T., Page, S.W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H.S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J.T., Wilson, D., 2006. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives* 114, 1898-1903.

Thiel, P.G., Marasas, W.F., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C., 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117, 3-9.

Towers, N., 1993. Pasture as source of mycotoxins: the New Zealand experience and European implications, In: Scudamore, K.A. (Ed.), *Proc of the UK Workshop on Occurrence and significance of mycotoxins*, Central Science Laboratory MAF, Slough, Berkshire, UK, pp. 16-26.

Veldman, A., Meijs, J.A.C., Borggreve, J.J., 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production* 55, 163-168.

Wang, H., Wei, H., Ma, J., Luo, X., 2000. The fumonisin B1 content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology* 19, 139-141.

Wu, F., 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137, 363-374.

Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., Kuca, K., 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab. Rev.* 41, 1-7.

Yiannikouris, A., 2004. Etude des mécanismes chimiques impliqués dans la complexation des mycotoxines par les composants de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Université Blaise Pascal, pp. 1-264.